

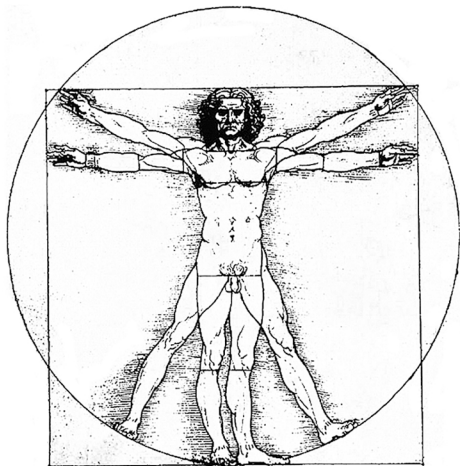
Mecanismes moleculars en els trastorns de la conducta alimentària

Estudis en humans i en models murins

Memòria presentada per
Josep Maria Mercader Bigas,
per tal d'obtenir el títol de
Doctor en Biologia.

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Xavier Estivill Pallejà
i la Dra. Mònica Gratacòs Mayora en el Centre de
Regulació Genòmica (CRG) de Barcelona.

Tesi adscrita al Departament de Ciències Experimentals
i de la Salut. Universitat Pompeu Fabra. Juliol 2008



Leonardo da Vinci va il·lustrar vora l'any 1492 les teories que l'arquitecte romà Marcus Vitruvius Pollio va enunciar en el segle I a.C. El cos humà es circumscriu en la geometria perfecta del cercle i el quadrat, respectant la proporció àurea, establint-se així l'ideal renaixentista de l'home com a centre de l'univers. El cànon mostrat en el dibuix conegut com "L'home de Vitruvi" constitueix un referent indispensable en els models de bellesa de la cultura occidental.

Els treballs de recerca duts a terme en aquesta tesi han estat realitzats al laboratori del programa de Gens i Malalties del Centre de Regulació Genòmica (CRG), centre integrant del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB).



Tesi adscrita a l'Universitat Pompeu Fabra



La recerca duta a terme en aquesta tesi ha estat possible gràcies al suport del Ministerio Educacion y Ciencia (MEC), el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) de l'Institut de Salut Carlos III, el Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI), la Fundació Genoma Espanya, i l'Institut Danone.



Als meus pares, que mai es van cansar
de que sempre preguntés “per què?”

(Bé, sí, alguna vegada..., però no els ho tindrè en compte)

I a l'Ester,
que amb la seva companyia
fa amè tot allò que és feixuc

Presentació

Els trastorns de la conducta alimentària, principalment l'Anorèxia Nerviosa i la Bulímia Nerviosa, són malalties psiquiàtriques amb conseqüències devastadores, tant a nivell físic, com a nivell psicològic. Malgrat que la cultura i la societat en la que vivim poden influenciar i potenciar el desenvolupament d'aquests trastorns, hi ha evidències de que factors biològics hi juguen un paper important. Els humans ens diferenciem els uns dels altres per petites variacions en el nostre genoma. Així com algunes d'aquestes variacions poden definir trets comuns, per exemple l'alçada o el color dels cabells i dels ulls, n'hi ha que poden fer l'individu més o menys susceptible a patir una malaltia. Aquesta susceptibilitat fa que la malaltia es manifesti o no, depenent de les condicions ambientals o familiars. Aquesta tesi ha permès identificar algunes variants genètiques que incrementen el risc a patir Anorèxia Nerviosa i Bulímia Nerviosa, especialment en gens de la via de les neurotrofines. Mitjançant models de ratolí, hem pogut avaluar com alguns d'aquests gens afecten al comportament alimentari. Aquesta tesi representa una nova contribució en el coneixement dels factors genètics de vulnerabilitat que hi ha darrera aquestes malalties.

Abreviatures

5-HT	Serotonina
ACTH	Corticotropina
AgRP	Proteïna relacionada amb Agouti
AN	Anorèxia Nerviosa
ANP	Anorèxia Nerviosa de tipus purgatiu
ANR	Anorèxia Nerviosa de tipus restrictiu
ARC	Nucli arquat
BDNF	Factor neurotròfic derivat de cervell
BED	Trastorn per afartament
BN	Bulímia Nerviosa
BNP	Bulímia Nerviosa de tipus purgatiu Transcrit regulador de cocaïna i amfetamina (de l'anglès <i>Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript</i>)
CART	
CCK	Colecistoquinina
CCK1	Receptor 1 de la Colecistoquinina
CNTF	Factor neurotròfic del gangli ciliar
CNTFR	Receptor del factor neurotròfic del gangli ciliar
COMT	Catechol-O-metiltransferasa
CRH	Hormona alliberadora de corticotropina
Crhr2	Receptor 2 de l'hormona alliberadora de corticotropina
DIO	Obesitat induïda per la dieta
DSM-IV	Manual Diagnòstic i Estadístic dels Trastorns Mentals
DVS	Complex dorso-vagal
EDNOS	Trastorns de la conducta alimentària no especificat
FBAT	Test d'associació basat en famílies
GHRL	Grelina
GIP	polipèptid insulinoatròpic dependent de glucosa
GLP-1	Pèptid similar a glucagó 1
GLP-2	Pèptid similar a glucagó 2
GWAS	Estudi d'associació global del genoma, de l'anglès <i>Genome wide association study</i>
HTR1D	Receptor 1 D de la serotonina
HTR2A	Receptor 2 A de la serotonina
HTR2C	Receptor 2 C de la serotonina
KCNN3	Canal de potassi activat per calci de baixa conductància 3
LCR	Líquid cefaloraquidi
LD	Desequilibri de lligament (de l'anglès <i>Linkage Disequilibrium</i>)
LHA	Àrea Hipotalàmica Lateral
LNA	de l'anglès, <i>Locked nucleic acid</i>
LOD	Logaritme en base 10 de la probabilitat de lligament

MAO-A	Mono-amina oxidasa
maxBMI	Màxim índex de massa corporal
Mb, Kb, pb	Mega base, kilobase, parell de bases
MC3R	Receptor 3 de la melanocortina
MC4R	Receptor 4 de la melanocortina
MCH	Hormona concentradora de Melanina
ME	Eminència mitja
minBMI	Mínim índex de massa corporal
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MSH	Hormona estimuladora de melanòcits
NE	Norepinefrina
NGF	Factor neurotròfic del nervi
NGFR	Receptor pan-neurotròfic, p75
NPY	Neuropèptid Y
NTF-3	Neurotrofina 3
NTF-4/5	Neurotrofina 4/5
NTRK1	Receptor neurotròfic tirosina cinasa 1
NTRK2	Receptor neurotròfic tirosina cinasa 2
NTRK3	Receptor neurotròfic tirosina cinasa 3
NTS	Nuclis del tracte solitari
OCD	Trastorn obsessiu-compulsiu
OPR1D	Receptor 1 d'opioides
PFA	Àrea perifornical
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Nucli paraventricular
PYY	Pèptid YY
SCL-90R	de l'anglès, <i>Symptom Check List 90 Revised</i>
SLC6A2	Transportador de la noradrenalina
SLC6A4	Transportador de la serotonina
SNC	Sistema Nerviós Central
SNP	Polimorfisme de nucleòtid simple, de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCA	Trastorns de la conducta alimentària
TCI-R	de l'anglès, <i>Temperament and character inventory test</i> ; revisió del text
TDT	Test de desequilibri de transmissió
TH	Tirosina hidroxilasa
TRH	Hormona alliberadora de tirotròpina
VMH	Hipotàlem ventromedial
VMN	Nucli Ventro-Medial
VTA	Àrea tegmental ventral

Index

1. Introducció.....	1
Bases neurofisiològiques de la conducta d'ingesta. Les vies hipotalàmiques	5
Els trastorns de la conducta alimentària	12
Epidemiologia genètica dels TCA.....	16
Factors neurotròfics i TCA	22
Models murins utilitzats per a l'estudi de l'anorèxia	27
microRNAs	32
2. Hipòtesis i Objectius.....	39
3. Resultats	43
<i>Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia</i>	49
<i>Blood Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor Correlate with Several Psychopathological Symptoms in Anorexia Nervosa Patients</i>	61
<i>Association of NTRK3 and its interaction with NGF suggest an altered cross-regulation of the neurotrophin signaling pathway in eating disorders</i>	69
Estudi de la sobreexpressió de les dues variants del polimorfisme Val66Met de <i>BDNF</i> dirigida pel promotor <i>Thy-1</i>	83
Anàlisi de lligament de la mutació causant del fenotip anorèxic en el ratolí <i>anx/anx</i> i cribatge de mutacions en els gens <i>Bdnf</i> i <i>Ppp1r14d</i>	91
<i>Hypothalamus transcriptome profile suggests an anorexia-cachexia syndrome in the anx/anx mouse model</i>	101
<i>Overabundance of microRNA targets in hypothalamus while scarcity in cortex suggest altered miRISC machinery in anx/anx anorexia mouse.</i>	137

4.	Material i Mètodes	167
	Material i Mètodes. Estudi de la sobreexpressió les dues variants del polimorfisme Val66Met de <i>BDNF</i> dirigida pel promotor Thy-1.....	170
	Material i Mètodes. Mapatge i cribatge mutacional en <i>anx/anx</i>	174
5.	Discussió	179
	Implicació de les neurotrofines en la conducta alimentària	182
	Estudis en model murins	187
6.	Conclusions	193
7.	Referències	197

1. Introducció

L'alimentació en els éssers humans comporta implícitament la modulació de processos cognitius, senso-perceptuals i afectius que participen tant en la recompensa com en la decisió d'alimentar-se.

La conducta alimentària es defineix com el comportament normal relacionat amb els hàbits d'alimentació, la selecció d'aliments que s'ingereixen, les preparacions culinàries i les quantitats ingerides d'aquests.

L'individu normal, en situacions de no precarietat, presenta unes reaccions adaptades als estímuls de gana i set, amb respostes cap a la sacietat correctes. Hi ha múltiples senyals orgànics que regulen el moment d'iniciar una nova ingestió d'aliments, i són principalment digestius de buidament gàstric i intestinal (mecàniques o hormonals). A aquests s'afegeixen senyals sensorials visuals, olfactoris, gustatius, tàctils i metabòlics. Finalment, aquests senyals s'integren a nivell de centres hipotalàmics amb la participació de pèptids i neurotransmissors. Donat que un dels objectius principals de la regulació de la ingesta alimentària és el control del pes corporal, també hi ha senyals provinents de les reserves corporals, especialment de greix, que integren la ingesta alimentària per tal de mantenir el pes corporal.

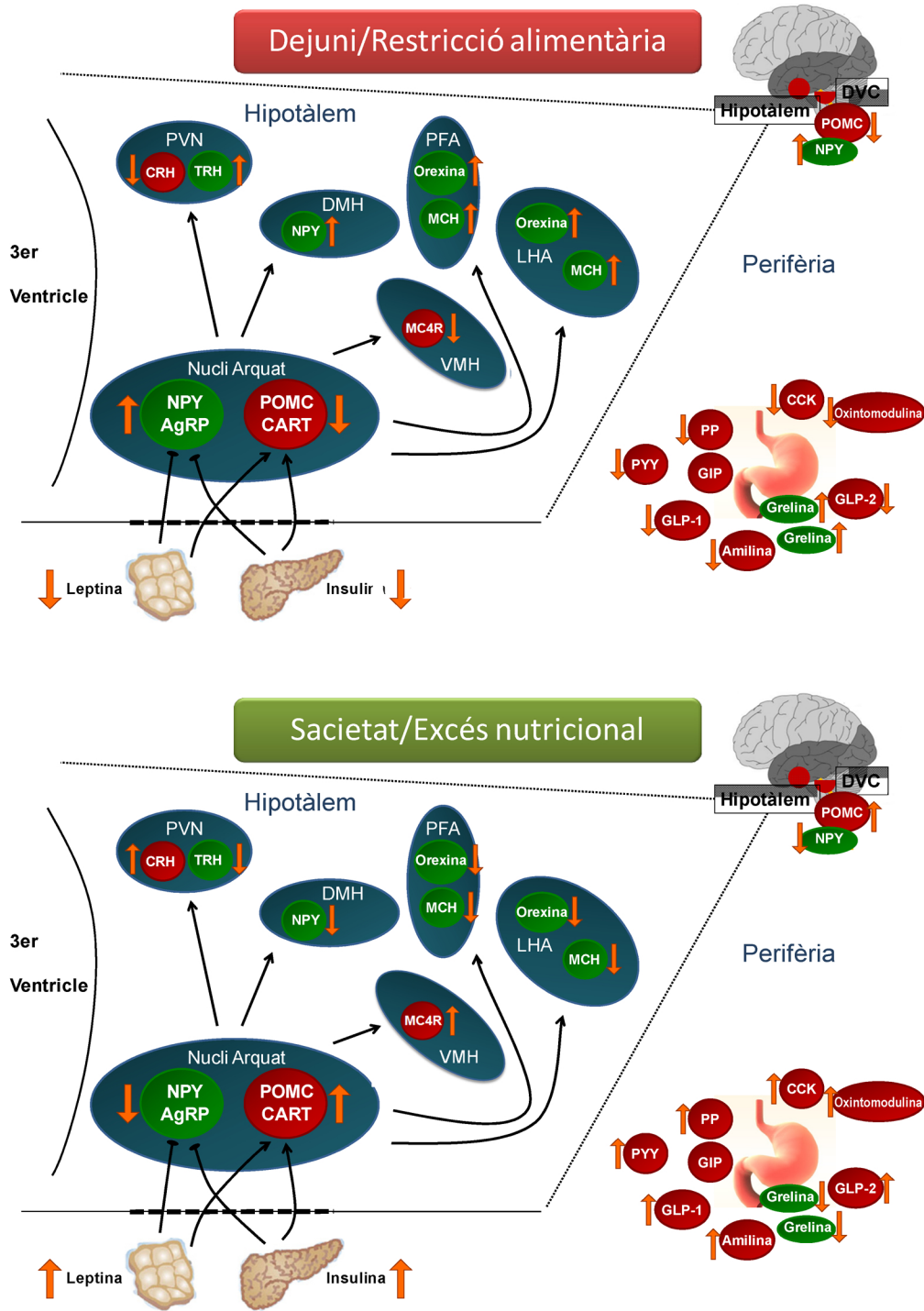


Figura 1. Resposta de diversos factors hipotalàmics, del DVC i de les hormones perifèriques secretades pel tub digestiu en resposta a dejuni, o restricció alimentària, o en sacietat o en períodes d'excés nutricional. En resposta a dejuni o restricció alimentària augmenta l'expressió dels factors orexigènics (en verd) en detriment dels anorexigènics (en vermell), mentre que en l'individu en sacietat o amb un excés nutricional s'incrementa l'expressió dels factors anorexigènics (en vermell) mentre disminueix la dels factors orexigènics (en verd).

Bases neurofisiològiques de la conducta d'ingesta. Les vies hipotalàmiques

Bona part del control de la conducta alimentària es du a terme en el sistema nerviós central (SNC), principalment a nivell d'hipotàlem, una estructura crítica en la regulació del pes corporal que també intervé en la regulació de la pressió sanguínia, la temperatura corporal, el balanç hidroelectrolític i el balanç energètic¹.

En els anys quaranta i cinquanta es van dur a terme estudis de lesions en diferents nuclis de l'hipotàlem que van donar lloc a la teoria de que el control de la conducta d'ingesta es dona principalment en dos centres: el nucli ventromedial de l'hipotàlem (VMN) que seria el "centre de la sacietat", i el nucli lateral hipotalàmic (LHA), que seria el "centre de la gana". D'altra banda, el nucli arqueat (ARC) té un paper integrador dels senyals perifèrics que regulen la gana², ja que té una barrera hematoencefàlica dèbil que permet el pas d'hormones circulants com el pèptid YY (PYY) i el pèptid similar al glucagó (GLP-1), l'insulina i la leptina³⁻⁷.

En el nucli arqueat hi conviuen dos circuits neuronals oposats: un circuit integrat per una població de neurones anomenades anorexigèniques, que inhibeixen la ingesta i expressen *pro-opiomelanocortina* (POMC) i el transcrit regulat per cocaïna i amfetamina (CART), i un altre integrat per les neurones anomenades orexigèniques, que estimulen la ingesta expressant Neuropeptid Y (NPY) i la proteïna relacionada amb agouti (AGRP)⁸. Ambdós circuits són influïts per hormones perifèriques com la leptina i la insulina, que poden creuar la barrera hematoencefàlica i activar les cèl·lules anorexigèniques (POMC i CART), al mateix temps que inhibir les neurones orexigèniques (NPY i AGRP)^{9,10}. Finalment, ambdós circuits envien els seus senyals al PVN i a altres nuclis hipotalàmics secundaris que modulen aspectes cognitius i autonòmics del comportament alimentari i del pes corporal a través de diverses molècules de senyalització, com són l'orexina, l'hormona concentradora de melanina (MCH), l'hormona alliberadora de corticotropina (CRH), l'hormona alliberadora de tirotròpina (TRH), el neuropeptid Y (NPY) i el factor neurotròfic derivat de cervell (BDNF)¹¹ (Figura 1).

Factors hipotalàmics anorexigèncs del nucli arquat

Els principals factors hipotalàmics anorexigèncs són el *cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART) i les melanocortines i els seus receptors. CART es coexpressa amb la pro-opiomelanocortina (POMC), en la població de neurones anorexigèniques del nucli arquat. CART té un paper clarament anorexigènic, ja que els animals privats d'aliment mostren una reducció del mRNA de CART en ARC, i responen a leptina, marcador d'adipositat incrementant la seva expressió¹².

Les melanocortines estan formades pels productes d'escisió de POMC que donen lloc a l'hormona estimuladora de melanòcits (MSHs), la corticotropina (ACTH) i la β -Endorfina. Els nivells en hipotàlem de POMC són reflex de l'estat nutricional, i es redueixen durant el dejuni i s'incrementen després d'administració de leptina. Les MSHs i l'ACTH s'uneixen als receptors de melanocortina. Els receptors 3 i 4 (MC3R i MC4R) s'expressen en ARC, en el nucli paraventricular de l'hipotàlem (PVN) i el nucli ventromedial (VMH).

Factors hipotalàmics orexigèncs del nucli arquat

En la població de neurones orexigèniques del nucli arquat s'expressen la proteïna relacionada amb agouti (AGRP)^{*} i el neuropèptid Y (NPY). AGRP incrementa la seva expressió en dejuni i és un antagonista competitiu de alfa-MSH¹³. El seu efecte antagonista en el cervell causa obesitat¹⁴. Experiments que eliminen les neurones que expressen AGRP/NPY en hipotàlem causen inanició i disminució del pes corporal en el ratolí adult¹⁵. El Neuropèptid Y (NPY) és un dels neurotransmissors més abundants del cervell i els seus nivells en hipotàlem són un reflex de l'estat nutricional. Durant el dejuni, els seus nivells es troben elevats, mentre que disminueixen després dels àpats^{16,17}. Consistentment, l'administració de NPY causa hiperfàgia, obesitat i redueix el ritme metabòlic¹⁸.

* Agouti és la proteïna que dona color ros del pèl del ratolí fent d'antagonista del receptor MC1R que només s'expressa a la perifèria. En el ratolí mutant *agouti*, aquesta proteïna s'expressa en cervell causant obesitat. AGRP té una homologia parcial amb la proteïna agouti.

Vies hipotalàmiques de senyalització de segon ordre

Les neurones del nucli arquat projecten cap a diversos altres nuclis hipotalàmics com són el nucli paraventricular (PVN), l'hipotàlem dorso-medial (DMH), l'àrea hipotalàmica lateral (LHA), l'àrea perifornical (PFA) i el nucli ventromedial (VMH)¹⁹ (Figura 1). En aquestes estructures de segon ordre s'expressen l'hormona concentradora de melanina (MCH) i l'orexina, que són potents orexigènics^{20,21}. Els nivells de MCH es veuen incrementats en resposta al dejuni i el model transgènic de sobreexpressió presenta hiperfàgia i obesitat, mentre que els *knock-outs* són prims, hipofàgics i tenen elevat desgast energètic^{20,22,23}.

Els nivells d'orexina augmenten durant el dejuni i l'administració central d'orexina A provoca un increment de la ingesta diürna, tot i que l'administració crònica no té cap efecte en el pes corporal²¹. Curiosament, en ratolins, l'ablació genètica de neurones que expressen orexina resulta en un fenotip molt similar a la narcolèpsia i en una obesitat tardana, tot i que menjen menys que els seus germans de camada, fet possiblement degut a una desregulació del desgast energètic²⁴. El *knock-out* del gen de l'orexina és considerat un model de narcol·lèpsia. Així, en circumstàncies de dejuni, l'orexina provoca un desvetllament i activació alhora que sensació de gana que mou a l'animal a la cerca d'aliment²⁵.

Senyals aferents que s'integren a l'hipotàlem

La serotonina, la dopamina i la noradrenalina són els principals neurotransmissors implicats en la ingesta. La serotonina (5-hydroxitriptamina, 5-HT) és un neurotransmissor monoaminèrgic capaç de modular diverses funcions fisiològiques i conductuals que inclouen l'activitat motora, la conducta alimentària i sexual, la termoregulació i les funcions respiratòries i cardiovasculars. Els somes cel·lulars que expressen 5-HT s'agrupen en els nuclis del rafe, localitzats al llarg del tronc encefàlic i que innerven la totalitat del SNC²⁶. La 5-HT exerceix la seva funció mitjançant els receptors serotoninèrgics i els efectes de la serotonina en la pèrdua de pes ja es van conèixer a la dècada dels 70, quan es va descriure una correlació inversa entre els nivells de serotonina i el pes corporal²⁷⁻²⁹.

Recentment s'ha descrit que la 5-HT modula la ingesta mitjançant l'activació del receptor 4 de la melanocortina³⁰.

La dopamina té un paper important en la regulació de la vetlla, l'activitat locomotora, l'estat d'ànim i en els mecanismes de recompensa, tal com mostren els estudis realitzats en ratolins deficients per dopamina^{31,32}. Aquests ratolins no mengen en resposta a privació de glucosa³³, administració de PYY o deficiència de leptina³⁴, cosa que suggereix que la senyalització de dopamina és necessària en les vies per sota del sistema de la melanocortina³⁵. Hi ha diverses evidències que donen suport al fet que l'activitat dopaminèrgica en l'àrea tegmental ventral (VTA) pot estar modulada per senyals de leptina i insulina, que inhibeixen l'acció dopaminèrgica, i de grelina, que l'activa^{36,37}. Així, es creu que els senyals metabòlics podrien modular l'aspecte motivacional de la ingesta³⁵.

La noradrenalina (NE) és un neurotransmissor sintetitzat principalment al *locus ceruleus*, que projecta a diverses àrees del cervell, l'hipotàlem d'entre d'elles, on du a terme diverses funcions homeostàtiques com ara estimular la ingesta³⁸.

Vies del complex dorso-vagal (DVC)

A part dels nuclis hipotalàmics, el complex dorso vagal (DVC), format pels nuclis del tracte solitari (NTS), el nervi vagus i el tronc encefàlic, també participa en la regulació alimentària. Les neurones del NTS reben aferències del nervi vagus que porten estímuls de sacietat. Les neurones del NTS tenen connexions recíproques amb àrees del cervell anterior com el nucli paraventricular i tenen els substrats hormonals necessaris per tal de respondre a pèptids efectors centrals involucrats en l'homeòstasi energètica. En el NTS hi ha, per exemple, una alta densitat de receptors de NPY i les neurones que expressen NPY d'aquesta regió projecten al PVN. A més, hi ha evidències de l'existència d'un sistema de melanocortina independent del nucli arquat, amb presència de cèl·lules que expressen POMC, sensibles a l'administració de colecistoquinina (CCK). Tanmateix, l'administració d'agonistes de MC3R/MC4R en el nervi vagus redueix la ingesta, alhora que els seus antagonistes l'incrementen³⁹. Això permet que el sistema de la melanocortina integri els

senyals a llarg termini de l'estat energètic a través de la leptina i la senyalització clàssica de la melanocortina en l'hipotàlem juntament amb els senyals de sacietat a curt termini en el DVC³⁹.

Senyals perifèrics que modulen la regulació central de la ingesta

Els senyals perifèrics inclouen els senyals d'adipositat, principalment la leptina, la insulina i l'adiponectina, i les hormones secretades pel tub digestiu.

La leptina és una hormona secretada en el teixit adipós que influencia l'homeòstasi energètica, el sistema immunitari i la funció neuroendocrina. La restricció alimentària en redueix els nivells, que es reverteixen amb la realimentació. Els nivells circulants de leptina correlacionen amb la quantitat de reserves de greix. La leptina també influencia el desgast energètic en rosegadors, el control hipotalàmic-pituitari-gonadal, l'eix adreno-tiroidal i la resposta immunitària. En resum, la leptina és capaç d'integrar el dèficit d'energia del cos amb la resta de funcions corporals⁴⁰.

El receptor de la leptina s'expressa en ARC, VMH, DMH i LHA de l'hipotàlem⁴¹ i en l'NTS, fet que fa que l'administració de leptina, tant de forma perifèrica com de forma central, causi una reducció de la ingesta i del pes corporal. Molts dels subjectes obesos pateixen resistència a la leptina, és a dir que tenen nivells elevats de leptina i no responen a leptina exògena⁴².

La insulina és la principal hormona sintetitzada pel pàncrees i el primer marcador d'adipositat que es va descriure. A diferència de la leptina, la insulina es secreta ràpidament després dels àpats. Els ratolins deficients pel receptor de la insulina són obesos i amb els nivells incrementats d'insulina⁴³. Els receptors de la insulina es troben altament expressats en hipotàlem, particularment en ARC, DMH, PVN i regions supraquiasmàtiques i periventriculars, cosa que és consistent amb la resposta d'aquests nuclis als senyals perifèrics d'insulina⁴⁴.

L'adiponectina és una proteïna similar a la del complement que s'expressa exclusivament en teixit adipós i els seus nivells en plasma correlacionen negativament amb

l'adipositat^{45,46}. Els seus nivells s'incrementen després de restricció alimentària i després de pèrdua de pes⁴⁵⁻⁴⁷.

Regulació de la ingesta pel sistema digestiu

Una de les principals hormones que regulen la ingesta és la grelina, que és un lligand endogen dels receptors d'hormones alliberadores d'hormona de creixement (GHS-R, de *growth-hormone-secretagogue receptor*). És alliberada per les cèl·lules parietals de l'estómac i l'intestí i, donat que és l'única hormona circulant que té efectes orexigènics, es coneix com l'hormona de la gana⁴⁸. En humans, els nivells circulants de grelina es troben elevats durant el dejuni i decauen després dels àpats⁴⁹. Els ratolins *knock-outs* pel receptor de grelina (GHS-R) són resistent a l'obesitat induïda per la dieta (DIO, de *diet induced obesity*)[†], tenen preferència per una dieta rica en greixos i atenuen la diabetis en el ratolí *ob/ob*, deficient pel gen de la leptina^{50,51}. Els antagonistes de GHS-R s'han proposat per tractar l'obesitat mentre que els seus agonistes per tractar l'anorèxia associada a certes patologies⁵²⁻⁵⁴.

El gen que codifica per la grelina també codifica per un pèptid anomenat obestatina. Hi ha controvèrsia respecte si aquest pèptid té o no un efecte oposat al de la grelina⁵⁵⁻⁵⁹.

A part de la grelina hi ha altres factors de sacietat que s'alliberen després dels àpats que són el pèptid YY (PYY)⁶⁰, la colecistoquinina (CCK1)⁶¹, el polipèptid pancreàtic (PP)^{62,63}, l'amilina⁶⁴, el polipèptid insulinoatròpic dependent de glucosa (GIP)^{65,66} i els pèptids derivats de pre-proglucagó, GLP-1, GLP-2 i l'oxintomodulina⁶⁷⁻⁶⁹.

Les vies de recompensa

La motivació per menjar no és regulada només per mecanismes fisiològics que mantenen la homeòstasi energètica i els balanços nutricionals, sinó que en la decisió de menjar també existeixen motivacions generades per la palatabilitat d'un element o l'esforç

[†]Després d'alimentar-los durant unes vuit o dotze setmanes amb dieta rica en greix, aquests ratolins esdevenen obesos, hiperglicèmics, i desenvolupen una mala tolerància a la glucosa. Aquest model, anomenat d'obesitat induïda per la dieta (DIO) és utilitzat per a l'estudi dels mecanismes fisiològics i genètics de l'obesitat i la diabetis tipus II.

requerit per a obtenir-lo. Així, alhora que la cerca de plaer pot estimular la ingesta fins i tot en absència de dèficit energètic, la sensació del gust pot estar disminuïda en moments de sacietat comparat amb els moments de gana.

Els centres de plaer són complexos i es creu que, juntament amb el sistema dopaminèrgic^{70,71} serotoninèrgic o dels endocannabinoides endògens⁷², els opioïdes hi poden jugar un paper important⁷³.

Bona part dels factors exposats en aquest capítol s'han trobat alterats en pacients amb TCA (Taula 1)

Taula 1. Alteracions bioquímiques en factors reguladors d'ingesta descrites en pacients amb trastorns de l'alimentació

Proteïna	Subtipus clínic	Espècimen analitzat	Orexigènic/Anorexigènic	Regulació	Referència
AgRP	AN	plasma	orexigènic	↑	74
Leptina	AN	plasma	anorexigènic	↓	75,76
NPY	AN	plasma	orexigènic	↓	76
Adiponectina	AN	sèrum	orexigènic	↑	77
Grelina	AN	plasma	orexigènic	↑	78
Grelina	BN	plasma	orexigènic	↑	79
PYY	AN	sèrum	anorexigènic	↓	60
PP	AN	sèrum	anorexigènic	↑	80,81
GLP-1	AN	sèrum	anorexigènic	↑	60
CCK	ANR	sèrum	anorexigènic	↑	80
β-Endorfina	AN	LCR	orexigènic	↓	82
Anandamida	AN/BED	plasma	orexigènic	↑	83
NE	AN	plasma/LCR	orexigènic	↓	84,85

*LCR: Líquid cefaloraquidi

Els trastorns de la conducta alimentària

Els trastorns la conducta alimentària (TCA) es caracteritzen per una alteració severa de la conducta alimentària i de la percepció de la imatge i el pes corporal.

El Manual Diagnòstic i Estadístic dels Trastorns Mentals (DSM-IV-R) classifica els TCA en Anorèxia Nerviosa (AN), Bulímia Nerviosa (BN) i un tercer grup en el que s'inclouen aquelles alteracions del comportament alimentari que no compleixen els criteris mínims d'AN o BN (EDNOS)^{86,87}.

La prevalença dels TCA ha augmentat en els últims 30 o 40 anys. Aproximadament un 1% de les dones d'adolescència tardana o adultes compleixen criteris per a l'AN, mentre que entre un 1 i un 3% compleixen criteris per a la BN⁸⁸⁻⁹⁰. Altrament, un 10% de les dones en adolescència tardana presenten algun símptoma de TCA, tot i no satisfer els criteris mínims de diagnòstic. S'ha descrit que intervencions en aquests darrers subjectes podrien prevenir una evolució cap al trastorn real.

Malgrat que la majoria de pacients amb TCA són dones, entre un 5 i 10% de pacients amb TCA són homes i compleixen els mateixos criteris de diagnòstic que les dones. Un dels pocs estudis extensius que han inclòs homes amb TCA ha estimat una prevalença del 0.3% comparat amb el 2% en dones. S'ha estimat també que les mesures d'ansietat, depressió, fòbies, trastorn de pànic i dependència d'alcohol són similars a les observades en dones⁹¹.

Diagnòstics

Anorèxia Nerviosa

Els pacients amb anorèxia nerviosa es caracteritzen per tenir una obsessió per mantenir un pes corporal inferior al que correspon a l'edat i l'alçada, por a augmentar de pes, una percepció de la imatge corporal distorsionada i, en nombroses ocasions, la presència d'amenorrea en dones postmenàrquiques. Els pacients es mantenen amb un pes per sota del 85% que els pertoca per la seva edat i alçada, corresponent a un índex de massa corporal inferior a 17.5 Kg/m² aproximadament. Segons el comportament alimentari, l'AN

es pot classificar en dos subtipus clínics. Els pacients amb AN de tipus restrictiu (ANR) mantenen l'estat de malnutrició mitjançant restricció alimentària, dieta estricta o excés d'exercici. Els individus amb AN de tipus purgativa (ANP) presenten episodis d'ingesta compulsiva (afartaments) o accions purgatòries com la inducció del vòmit, laxants, ènemes o diürètics. Aquest símptomes es presenten, com a mínim, una vegada per setmana.

Bulímia Nerviosa

Les principals característiques dels pacients amb bulímia nerviosa (BN) són els afartaments i les activitats compensatòries inadequades, que es donen com a mínim dues vegades per setmana i durant un període mínim de tres mesos. Aquests episodis d'afartaments es produeixen durant un espai limitat de temps i s'acompanyen d'una sensació de pèrdua del control i de culpabilitat. Els pacients amb BN purgativa (BNP) compensen la ingesta mitjançant la inducció del vòmit en la majoria dels casos, però també és freqüent l'ús de laxants o de diürètics. Els pacients amb BN de tipus no purgatiu (BNNP) compensen d'altres maneres, com per exemple amb exercici excessiu o amb restricció alimentària.

Els individus amb BN donen excessiva importància a la imatge corporal i la fan la base de la seva autoestima. Tanmateix, presenten molta similitud amb els pacients amb AN en la seva por a guanyar pes corporal i desig de perdre'n.

Trastorns alimentaris no especificats

En la categoria de trastorns de l'alimentació no especificats (EDNOS, *de Eating Disorders not otherwise specified*), s'inclouen els trastorns alimentaris que no compleixen criteris per a cap dels subtipus esmentats anteriorment. Alguns exemples de individus classificats en aquesta categoria serien els següents:

- 1- Dones que compleixen tots els criteris per AN, amb l'excepció que tenen una menstruació regular.
- 2- Pacients que compleixen tots els criteris de AN, exceptuant que tenen un índex de massa corporal dins del rang de la normalitat.

- 3- Pacients que compleixen tots els criteris de BN, exceptuant que els afartaments i els mecanismes compensatoris tenen lloc amb una freqüència inferior a dues vegades per setmana o una durada inferior a tres mesos.
- 4- L'ús irregular de conductes compensatòries després de menjar petites quantitats de menjar (per exemple inducció del vòmit després de menjar dues galetes).
- 5- Mastegar i escopir, però no ingerir, grans quantitats de menjar.
- 6- Trastorn per afartament: Repetits episodis d'afartaments en absència de conductes compensatòries.

Trastorn per afartament

El trastorn per afartament (BED, de *Binge Eating Disorder*) es caracteritza per la presència d'afartaments freqüents, acompanyats de pèrdua de control, seguits de sensació de malestar i de culpabilitat. A diferència dels pacients amb BN, no tenen conductes compensatòries després d'un afartament. Els individus que pateixen aquest trastorn mengen més ràpidament del normal durant els episodis d'afartament, inclús quan no tenen gana, i sovint en solitari, per evitar l'avergonyiment. Habitualment tenen sobrepès o obesitat, representant entre un 10 i un 15% dels individus amb sobrepès als Estats Units. Al mateix país, un 3,5% de dones i un 2% d'homes reconeixen haver patit durant algun període de la seva vida BED⁹². Malgrat que el DSM-IV engloba aquest trastorn dins dels trastorns alimentaris no especificats, diversos autors proposen la inclusió de criteris de diagnòstic per a aquest trastorn en la versió revisada del text DSM-IV-R (DSM-V)⁹³.

Aspectes psicopatològics dels trastorns de la conducta alimentària.

Els TCA es caracteritzen també per tenir una alta comorbiditat amb altres trastorns psiquiàtrics de l'eix I, que inclouen depressió, trastorns d'ansietat i abús de substàncies, però també amb trastorns de personalitat de l'eix II. La prevalença de la depressió és d'un 72% en pacients amb TCA i apareix habitualment després del TCA, possiblement com a conseqüència de l'estrès que suposa la malnutrició, especialment en els pacients amb

AN^{94,95}. En canvi, el trastorn obsessiu-compulsiu (OCD), amb una prevalença al voltant del 40% en TCA, acostuma a manifestar-se abans del TCA, especialment en AN⁹⁶. Diversos autors suggereixen que pot ser una de les causes que contribueixen al desenvolupament dels TCA, mentre que d'altres postulen que els efectes de la inanició en AN podrien potenciar els trets obsessius preexistents dels pacients⁹⁴. La comorbiditat amb l'abús de substàncies o alcohol és clarament diferenciada en pacients amb AN o BN. Si bé en BN un percentatge més elevat de l'estimat en població general presenta història d'abús de substàncies, són poques les pacients amb AN que el presenten. En models animals s'ha vist que la restricció alimentària incrementa l'autoadministració de drogues, la qual cosa estaria d'acord amb la freqüent aparició del TCA abans de l'abús de substàncies⁹⁷.

Per avaluar la psicopatologia i els trets de personalitat s'utilitzen una sèrie de qüestionaris d'avaluació. Els més utilitzats són el TCI-R (de l'anglès, *Temperament and character inventory test*)⁹⁸, que mesura quatre dimensions del temperament i tres dimensions del caràcter, i l'SCL-90R (de l'anglès, *Symptom Check List 90 Revised*)^{99,100}, que mesura les manifestacions psicossomàtiques i trets psicopatològics com la obsessió-compulsió, l'ansietat o la depressió. En general, tant una major severitat com un pitjor pronòstic de la malaltia es troben associats a alts nivells en trets psicopatològics com la depressió, l'ansietat, la impulsivitat i l'obsessionalitat^{95,96,101-107}. D'altres qüestionaris són específics dels TCA, com l'EDI-2 (Eating Disorder Inventory; Garner 1991), l'EAT-40 (Eating attitudes test;¹⁰⁸) i el BITE (Bulimic Investigatory Test Edinburgh;¹⁰⁹). L'EDI-2 mesura les dimensions psicològiques i conductuals característiques dels TCA, com la insatisfacció corporal i l'obsessió pel pes, entre d'altres. L'EAT-40 permet diferenciar mitjançant una puntuació de tall entre un subjecte patològic i un no patològic, i el BITE mesura principalment la presència de símptomes bulímics.

Epidemiologia genètica dels TCA

L'etiologia TCA és complexa i multifactorial, on és probable que, en aquells individus susceptibles, participin interaccions genètico-ambientals en l'aparició del trastorn. En estudis familiars s'ha estimat que el risc relatiu de desenvolupar un trastorn alimentari en parents de pacients amb AN o BN és de 4 a 12 vegades superior al de la població general¹¹⁰. Per a l'AN, els estudis en bessons han demostrat una concordança entre bessons monozigòtics del 52%, comparada amb l'11% en bessons dizigòtics¹¹¹, i s'ha estimat una heretabilitat aproximada del 56%¹¹². Per la BN, els estudis en bessons han estimat una heretabilitat d'entre el 54% i el 83%^{110,113-116}.

Mètodes d'identificació de gens de susceptibilitat

Hi ha dues possibles aproximacions per mapar el gen o els gens subjacents a un tret complex. El primer és l'estudi global del genoma o cribatge a l'atzar, que testa el lligament o associació del tret a marcadors polimòrfics, escollits principalment per la seva facilitat de genotipació i localització en un mapa genètic. El segon és el despistatge genòmic directe, que estudia el lligament i/o associació a marcadors polimòrfics escollits per la seva localització dins o a prop de gens funcionals identificats prèviament com a candidats per la malaltia sota estudi.

Pel que fa a la metodologia estadística que es pot emprar en l'anàlisi, hi ha dos tipus d'estudis, els de lligament i els d'associació. El lligament genètic es refereix a la tendència dels al·lels de dos loci a segregar-se junts en una família si estan físicament a prop en un cromosoma. L'associació busca un augment en la compartició d'al·lels, genotips o haplotips d'un marcador entre persones que tenen el mateix fenotip en comparació a una població no afectada pel fenotip.

Els estudis d'associació es divideixen en cas-control i estudis d'associació familiar. En els estudis cas-control es comparen les freqüències al·lèliques, genotípiques o haplotípiques d'una sèrie d'individus afectes no relacionats amb una sèrie de controls. Aquest tipus

d'estudi és susceptible de produir resultats espuris degut a fenòmens d'estratificació poblacional^{†117}. En canvi, els estudis d'associació familiar no es veuen afectats per l'estratificació poblacional. En aquest cas, els principals mètodes utilitzats són el test de desequilibri de transmissió (TDT, de *transmission disequilibrium test*) i els estudis d'associació basats en famílies (FBAT, de *family based association study*). El TDT utilitza trios, és a dir, un individu afectat i els seu pares, i compara la proporció dels al·lels transmesos a la descendència respecte els no transmesos¹¹⁸. L'FBAT és una generalització del TDT que permet treballar amb famílies més complexes, diversos models d'herència i fer anàlisi d'haplotips^{119,120}.

Actualment els estudis globals d'associació del genoma (GWAS, de *genome wide association studies*), que consisteixen en la genotipació de centenars de milers d'SNPs que cobreixen la major part de la variabilitat del genoma han permès la identificació de nous gens de susceptibilitat per diverses malalties complexes. Aquest tipus d'estudis, però, tenen un elevat cost econòmic, i requereixen genotipar gran nombre de casos i controls, ja que la correcció per tal nombre de tests redueix dramàticament el poder estadístic. De moment no existeix cap estudi publicat de GWAS en TCA. Els GWAS que es porten a terme en l'actualitat han estat possibles gràcies a dos avenços tecnològics importants. En primer lloc, el desenvolupament de plataformes de genotipació a gran escala, que permeten analitzar centenars de milers de variants en un sol experiment mitjançant tecnologia de microarrays. En segon lloc, la informació alliberada pel projecte HapMap, que ha caracteritzat els patrons de variació genètica de tot el genoma en diverses poblacions mundials. Això permet la selecció dels TagSNPs, SNPs que serveixen de marcadors d'altres variants que estan en desequilibri de lligament, reduint el nombre de SNPs a genotipar i reduint així el cost de genotipat (Requadre 1)¹²¹.

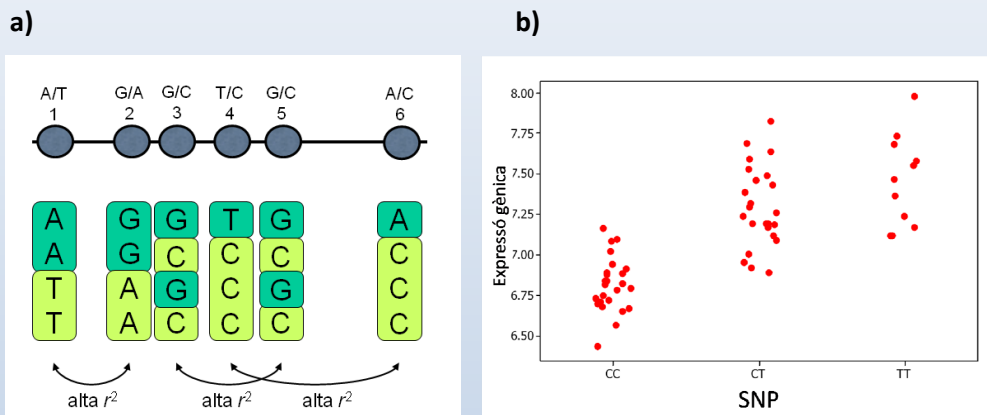
[†]Estratificació poblacional: Fenomen en que els casos i els controls tenen diferents freqüències al·lèliques a causa de la diversitat en el bagatge genètic de la població independentment de l'afectació de la malaltia.

Requadre 1. El projecte HapMap

El HapMap (www.hapmap.org) és un catàleg de variants genètiques comunes en un total de 270 humans de quatre poblacions diferents:

- 30 trios Youruba d'Idaban, Nigèria
- 45 individus no relacionats de Tòquio, Japó
- 45 individus no relacionats de Beijing, Xina
- 30 trios d'ancestre europeu provinents de l'inventari del *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH)

Els SNPs són el principal tipus de variant que s'ha analitzat en aquest individu, tot i que en els darrers anys s'han anat alliberant dades de variants estructurals, com per exemple variants de número de còpia, insercions/deleccions i inversions¹²². El projecte HapMap permet a l'investigador treure profit de l'organització d'aquestes variants al llarg del genoma. El fet que hi hagi variants que s'hereten conjuntament en blocs (haplotips), fa que no sigui necessari genotipar totes les variants. Per exemple, sempre que trobem una T en el *locus* 4, hi haurà una A en el *locus* 6, i per tant n'hi haurà prou amb genotipar el *locus* 4 (veure Figura a). Amb aquesta idea s'han definit els TagSNPs (SNPs marcadors), que capturen la variabilitat d'aquells SNPs que es troben en desequilibri de lligament. Amb el genotip d'un TagSNP es pot estimar el genotip de la resta d'SNPs que s'hereten conjuntament, disminuint així el cost de genotipació.



Actualment s'han genotipat uns 3 milions d'SNPs en aquest panell d'individus, que, malgrat que correspon a un terç del total de SNPs estimats¹²¹, capturen la major part de la variabilitat que existeix en humans. En la població europea s'estima que genotipant poc més de 500.000 TagSNPs es pot capturar tota la variabilitat del genoma, mentre que en la població africana es necessitarien prop d'un milió d'SNPs. Això fa factible el cribatge de la variació en tot el genoma d'un individu mitjançant xips de microarrays comercials. Les dades d'aquest projecte són útils també per a projectes més petits, ja que serveixen per seleccionar TagSNPs que capturen variació en regions concretes del genoma o per fer estudis de gens candidats, estalviant així el cost de genotipació sense perdre informació.

El projecte HapMap també ha permès fer estudis poblacionals, com per exemple la identificació de regions que han patit selecció positiva en humans¹²³ o la identificació de variants que influeixen els nivells d'expressió de gens en línies limfoblastoides d'aquests individus^{124,125}. En la figura b s'observa com els nivells d'expressió d'un determinat gen depenen del genotip en un determinat *locus*.

Estudis de lligament en TCA

Els estudis de lligament realitzats en famílies amb TCA han revelat algunes regions genòmiques d'interès, tant per AN com per BN. Un primer estudi en AN va trobar lligament significatiu al cromosoma 1p¹²⁶. Estudis posteriors van trobar associació amb dos gens dins d'aquesta regió, receptor opioid 1D (OPR1D) i receptor de serotonina 1D (HTR1D)^{126,127}. En una anàlisi posterior, ajustant per covariables que podien afectar la significança, va detectar un nou pic de lligament al cromosoma 1q¹²⁸. En el cas de la BN, un altre estudi va trobar un pic de lligament a la regió 10p12-10p13. Excepte per a la regió del cromosoma 1p, no hi ha estudis publicats que hagin trobat associació en gens d'aquestes regions de lligament¹²⁹.

També s'han trobat regions de lligament a trets relacionats amb els TCA com són l'ansietat, l'edat de la menarquia, l'obsessionalitat, l'índex de massa corporal, entre d'altres¹³⁰. En una exploració per fenotips relacionats amb els TCA es va trobar un pic de lligament a la regió 4q21.1 amb índex mínim de massa corporal (minBMI) en BN, 14q22.1 a preocupació pels errors i obsessió relacionada amb el menjar i 16p13.3 amb preocupació pels errors¹³⁰.

Estudis d'associació en trastorns de l'alimentació

Per tal d'identificar gens de susceptibilitat a patir TCA, s'han dut a terme cribatges en diversos gens implicats en el control de la ingesta, el control del pes corporal o implicats en altres malalties psiquiàtriques. S'ha estudiat, per exemple, el NPY, la AgRP, els gens de la via de la melanocortina, de la serotonina, la dopamina o factors neurotròfics com BDNF. En moltes ocasions, els resultats no s'han replicat, probablement a causa del poc poder estadístic que tenen les mostres petites o d'una possible associació espúria en el primer estudi degut a estratificació poblacional.

En la Taula 2 es mostra una taula amb una selecció de les associacions significatives que s'han trobat als diferents subtipus de TCA, tant d'estudis d'associació familiar com cas-control.

Taula 2. Associacions significatives de variants comuns en TCA

Gen candidat (símbol)	Polimorfisme	Subtipus TCA	Significació	Ref.	Tipus d'estudi
Via de la serotonina					
Receptor 2C (<i>HTR2C</i>)	Cys23Ser	AN	p = 0.026	131	CC/F
		AN	p = 0.0001	132	CC
Receptor 2A (<i>HTR2A</i>)	-1438G>A	AN	p = 0.022	133	CC
		AN	p = 0.0001	134	CC
		AN	p = 0.0001	135	CC
		AN	p = 0.0001	136	CC
		AN	p = 0.005	137	CC
		BN	p = 0.0001	136	CC
		BN	p = 0.01	138	CC
Transportador de serotonina (<i>SCL6A4</i>)	VNTR* en la regió promotora ó 5HTTLPR	AN	p = 0.0001	139	CC
		AN	p = 0.027	140	CC
		AN	p = 0.005	141	CC
		BN	p = 0.0001	139	CC
		BED	p < 0.05	142	CC
Receptor 1D (<i>HTR1D</i>)	1080C>T rs674386/ rs856510	AN	p = 0.01	126	CC/F
		ANR	P < 0.05	127	CC
Neuropèptids i factors de regulació d'ingesta					
Agouti related protein (<i>AGRP</i>)	760G>A Ala67Thr	AN	p = 0.015	143	CC
		AN	P < 0.05	144	CC
Grelina (<i>GHRL</i>)	G152>A	BED	p = 0.01	145	CC
	Leu72Met	AN	P = 0.05	144	CC
	171T>C	BN	p = 0.035	146	CC
<i>BDNF</i>	Val66Met	ANR	p = 0.016	147	CC
		TCA	p < 0.001	148-151	CC/F
		AN	p < 0.05	152	
		AN	p = 0.015	149-151	

<i>NTRK2</i>	-69C>G	BNP	p = 0.015	147	CC
		ANP	p = 0.016	153	CC
Altres gens candidats					
Receptor opioid (<i>OPRD1</i>)	47821A>G	AN	p = 0.01	126	CC/F
	rs569356/rs521809/rs4654327	ANR	p < 0.05	127	
Canal de potassi <i>HSKCA3</i>	VNTR	AN	p = 0.005	154	CC
Receptor d'estrògens 2 (<i>ESR2</i>)	1082G>A	AN	p = 0.003	155	CC
Receptor de NMDA 2B (<i>NR2B</i>)	5073T>G	AN	p = 0.025	156	F
Canal de potassi (<i>KCNN</i>)	VNTR	AN	p = 0.001	156	F
Catechol-O-metiltransferasa (<i>COMT</i>)	Val58Met	TCA	p < 0.001	157	CC
	Val58Met	AN	p = 0.015	158	F
Colecistoquinina (<i>CCK</i>)	rs11129946	AN	p = 0.02	159	CC
COMT/ARVCF	158ValMet	ANR	p = 0.001	160	F
Transportador de Norepinefrina (<i>SLC6A2</i>)	VNTR	ANR	p = 0.0052	161	F
Receptor de dopamina 2D (<i>DRD2</i>)	-141 Indel	AN	p < 0.05	162	CC/F
Receptor Cannabinoide 1 (<i>CNR1</i>)	(AAT)n	ANP	p = 0.05	163	F
Associacions epistàtiques					
<i>SLC6A4*MAOA</i>	5HTTLPR*MAOA-VNTR	ANR	p = 0.0021	164	F
<i>SLC6A2*MAOA</i>	NETpPR*MAOA-VNTR	ANR	p < 0.05	165	CC

*VNTR: Variable Number of Tandem Repeat; Indel: polimorfisme d'inserció delecíó; CC: Cas-control, F: estudi familiar.

Factors neurotròfics i TCA

Les neurotrofines són una família de factors de creixement que promouen la supervivència, creixement i diferenciació de les neurones. La família de les neurotrofines està formada per quatre proteïnes, anomenades factor neurotròfic del nervi (NGFB), factor neurotròfic derivat de cervell (BDNF), neurotrofina 3 (NTF3) i neurotrofina 4/5 (NTF4/5). Aquest factors actuen unint-se a receptors tirosina cinasa d'alta afinitat (NTRKs), cadascun d'ells amb una afinitat preferent per una o més neurotrofines. Així, NGFB s'uneix a NTRK1, BDNF i NTF4/5 a NTRK2 i NTF3 a NTRK3. Paral·lelament existeix un receptor de baixa afinitat per a totes les neurotrofines (p75), que també és capaç de formar complexes amb els altres NTRKs i modular la seva activitat^{166,167} (Figura 2).

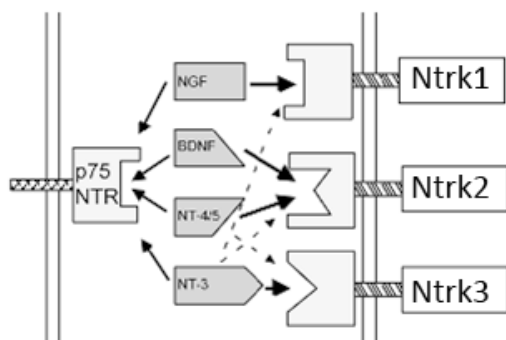


Figura 2. Neurotrofines i la seva unió als receptors

Les neurotrofines tenen un paper crucial durant el desenvolupament, permetent la proliferació, diferenciació i supervivència de les neurones del sistema nerviós central i perifèric. En adults, controlen la plasticitat neuronal i regulen l'activitat sinàptica i la síntesi de neurotransmissors¹⁶⁸.

Hi ha evidències de que una desregulació de la plasticitat sinàptica podria jugar un paper important en la fisiopatologia de diversos trastorns mentals inclosos la depressió, els trastorns d'ansietat, l'esquizofrènia i l'addicció a les drogues. La hipòtesi seria que aquesta plasticitat sinàptica inadequada s'explicaria, en part, per un mal funcionament de les neurotrofines¹⁶⁹⁻¹⁷².

BDNF i trastorns de l'alimentació

El gen del *BDNF* codifica per una neurotrofina essencial per a la supervivència i la plasticitat neuronal¹⁷³⁻¹⁷⁵ i, juntament amb el seu receptor d'alta afinitat, NTRK2, s'expressa en nuclis de l'hipotàlem associats al control de la ingesta, com el PVN, ARC, DMH, i VMN¹⁷⁵. Hi ha moltes observacions, majoritàriament en models animals, que fonamenten la participació de BDNF en la regulació del balanç energètic i la conducta alimentària. En rates, s'ha observat que la infusió de BDNF a nivell del sistema nerviós central suprimeix la gana i provoca pèrdua de pes¹⁷⁶. Els models de ratolí deficientes pel gen *Bdnf* presenten hiperfàgia i obesitat^{169,177}, un fenotip similar a l'observat en ratolins deficientes pel seu receptor específic *Ntrk2*¹⁷⁸. En estudis més recents, s'ha demostrat que l'expressió de BDNF està influïda pel receptor de la melanocortina MC4R, i que després de 48 hores de dejuni es produeix una important reducció de l'expressió de BDNF en el nucli hipotalàmic ventromedial^{178,179}. Els agonistes de MC4R provoquen un alliberament de BDNF que és necessari per l'inducció d'anorèxia, mentre que l'anorèxia mediada per antagonistes del receptor cannabinoide 1 (CNR1) no depen de BDNF, fet que demostra que BDNF actua específicament en la via de les melanocortines¹⁷⁹. Altres estudis han demostrat que l'administració de BDNF en el PVN de l'hipotàlem redueix la ingesta alimentària disminuint els nivells de NPY i incrementant el desgast energètic mitjançant l'augment del ritme etabòlic^{180,181}. A més d'actuar a nivell de l'hipotàlem, Bariohay i col·laboradors han demostrat que BDNF actua també en el complex dorso-vagal (DVC), ja que en aquesta regió, la infusió de BDNF causa anorèxia i pèrdua de pes, i la seva expressió endògena disminueix després de 48 hores de dejuni. Finalment, hi ha un augment de l'expressió de BDNF en DVC en resposta a leptina i la colecistoquinina¹⁸² (Figura 3).

S'ha de tenir present que la manera com BDNF regula el metabolisme no és exclusivament a través del seu paper anorexigènic a l'hipotàlem i el DVC, sinó també de forma directa en òrgans endocrins perifèrics, com per exemple en el pàncrees, modulant la secreció de glucagó^{183,184}. Finalment, és interessant destacar que l'expressió de BDNF està regulada pels nivells d'estrògens^{185,186}, i que els seus nivells d'expressió es veuen afectats pels canvis fisiològics en els nivells circulants d'hormones esteroidees. El fet que la prevalença d'AN i de BN és més alta en dones, i que els símptomes s'inicien durant la pubertat, quan els nivells d'estrògens són més elevats, fa de BDNF un bon candidat a participar en l'etiopatogènia de l'AN i la BN.

A nivell genètic molecular, s'ha descrit una variant en el gen que codifica per BDNF que resulta en una substitució aminoacídica -valina per metionina o Val66Met- en l'exó codificant del gen, corresponent a rs6265¹⁸⁷. Aquest polimorfisme està localitzat en la regió de la pre-proteïna de BDNF que és eliminada durant el processament post-traducciona. Hi ha una segona variant, coneguda com a -270C/T, localitzada a 270 bases abans de la regió codificant, i que consisteix en una transició C/T a l'exó 2 del gen. Mentre que no hi ha assaigs per aquesta darrera variant, els estudis funcionals han demostrat que l'al·lel Met66 del polimorfisme Val66Met afecta la secreció de BDNF depenent de despolarització i el tràfic intracel·lular de la proteïna en neurones hipocampals¹⁸⁷. A més, l'al·lel Met66 s'ha associat a una funció neuronal hipocampal anòmala i a un deteriorament de la memòria episòdica en subjectes humans sans^{187,188}. Aquests experiments demostren que BDNF és un element crític en la modulació dels canvis sinàptics associats amb comportaments adaptatius o d'aprenentatge.

El polimorfisme Val66Met s'ha trobat associat a AN de tipus restrictiu¹⁴⁹. L'associació es va replicar mitjançant un estudi cas-control i d'associació familiar en una mostra provinent de vuit poblacions diferents^{150,151}. Aquests estudis han estat replicats per alguns autors^{147,189}, però d'altres no han confirmat els resultats^{144,167,190}. Un estudi posterior va trobar una associació d'aquest polimorfisme amb l'índex mínim de massa corporal (minBMI) en individus sans¹⁹¹. Finalment, un estudi recent ha trobat que la interacció entre un

polimorfisme a DRD4 i l'al·lel Metionina del polimorfisme Val66Met a BDNF s'associen a un major màxim índex de massa corporal (maxBMI) en dones amb bulímia¹⁹².

El paper del receptor d'alta afinitat per BDNF, NTRK2, també ha estat extensament analitzat en relació amb el control de l'alimentació. En ratolins, l'expressió reduïda d'aquest receptor causa obesitat i hiperfàgia, alhora que mutacions en el gen de NTRK2 causen obesitat en humans^{178,193,194}. Curiosament, agonistes de NTRK2 tenen un efecte oposat a l'efecte que tenen de forma central quan són administrats en la perifèria, causant un augment de la gana en primats¹⁹⁵. L'únic estudi que hi ha de variants en aquest gen i TCA, un estudi cas-control que va identificar polimorfismes en el gen de NTRK2 associats a AN i a minBMI¹⁵³.

Altres neurotrofines i trastorns de l'alimentació

Diverses publicacions suggereixen la participació d'altres neurotrofines en el control de la regulació del pes corporal i de l'alimentació. Per exemple, NGF causa hipofàgia quan és administrat de forma central¹⁹⁶, la restricció dietària produeix un increment de la producció de BDNF i de NTF3¹⁹⁷ i el ratolí *knock-out* pel gen *Ntf4* presenta una alteració en la sacietat^{198,199}. De fet, l'administració de NTF4 en el ratolí heterozigot per BDNF pot revertir part del seu fenotip obès i hiperfàgic¹⁶⁹.

Donat el paper neuroprotector de factor neurotròfic del gangli ciliar (CNTF), s'han dut a terme assaigs clínics per tractar malalties de neurones motores com l'esclerosi lateral amiotròfica i es va observar que l'administració de CNTF s'associava a una pèrdua substancial de pes²⁰⁰. Estudis posteriors han demostrat que CNTF pot activar, mitjançant una via independent de la leptina, altres vies que també s'activen per l'administració d'aquesta, com ara el sistema de NPY-AgRP²⁰¹.

A més, CNTF és capaç de millorar els paràmetres diabètics com són els nivells de glucosa, insulina, triglicèrids, colesterol i àcids grassos lliures en models murins d'obesitat induïda per la dieta²⁰², un model considerat similar a l'obesitat comuna humana, en què la obesitat

pot ser desencadenada per una dieta rica en greixos. Finalment, CNTF és capaç d'inhibir la ingesta sense els senyals de gana que acostumen a acompanyar la restricció dietària²⁰³.

Models murins utilitzats per a l'estudi de l'anorèxia

Existeixen diversos models murins per a l'estudi de l'anorèxia nerviosa que mimetitzen l'hipofàgia que s'observa en l'anorèxia en humans. Els models es poden classificar en ambientals o genèticament modificats.

Models ambientals:

Models d'estrès. La hipofàgia en rosegadors es pot induir a través de diverses tècniques que estressen els animals, com la punció de la cua, la natació en aigua freda, l'estimulació elèctrica del cervell o la inducció farmacològica de l'estrès. Un dels models més efectius, però, és la separació de les cries de la mare. En aquest model, les cries són separades d'aquesta només quan se'ls dona de menjar, la qual cosa induïx una hipofàgia ràpida sense necessitat de lesions físiques. El fenomen de l'hipofàgia induïda per estrès ha estat poc investigat, però s'ha suggerit que les hormones de l'eix hipotàlem-hipofisari hi estarien implicades a través de l'alliberament de serotonina en el còrtex prefrontal, el nucli *accumbens*, l'amígdala i l'hipocamp dorsal⁷¹.

Models d'activitat. En rates, una activitat física excessiva provoca una supressió de la gana i una pèrdua de pes considerable²⁰⁴. En aquest paradigma, les rates tenen lliure accés a l'exercici físic dins la gàbia (rodes giratòries) i després se'ls restringeix l'aliment durant dues hores diàries. Sota aquestes condicions, les rates desenvolupen anorèxia per activitat, una síndrome que inclou múltiples símptomes d'AN com pèrdua de pes, hiperactivitat i disrupció del cicle reproductiu ovàric. La causa d'aquest fenotip és desconeguda, però s'hipotetitzava que un increment en l'activitat serotoninèrgica podria contribuir a la pèrdua de pes, tot i que resta per dilucidar com l'exposició a aquest paradigma canvia el sistema serotoninèrgic.

Models de restricció: En els models de restricció alimentària es redueix l'aportació calòrica a l'animal. Tot i que la restricció alimentària és voluntària en els pacients amb AN i en aquest model és imposada per l'investigador, la majoria de canvis neuroendocrins que s'observen en els pacients anorèxics és mimetitzada en aquests models experimentals. S'ha descrit, per exemple, que una restricció alimentària del 25% en rosegadors augmenta l'esperança de vida i, depenent del grau de restricció, pot beneficiar o empitjorar les capacitats cognitives dels animals^{205,206}. Pel que respecta a BDNF, s'han detectat nivells augmentats d'aquesta proteïna en còrtex i en hipocamp de ratolins que segueixen un patró de restricció alimentària^{197,207,208}. Això suggereix que els factors neurotròfics induïts per la restricció en la dieta poden tenir un efecte neuroprotector i demostren que la dieta pot afectar la seva expressió.

Models genèticament modificats

Recentment s'han generat diversos models de ratolí deficient per una sèrie de gens implicats en la regulació de la conducta alimentària que han donat lloc, en alguns casos, a models amb fenotip anorèxic o hipofàgic. Cal destacar que les vies orexigèniques són més redundants que no pas les vies anorexigèniques, ja que la malnutrició d'un animal pot causar la seva mort amb molta més probabilitat que no pas el sobrepès. És per això que alguns models *knock-out*, com és el cas del ratolí deficient pel NPY o AGRP, no han resultat en cap fenotip anorèxic, tot i l'evidència fisiològica i farmacològica del paper orexigènic de NPY en la regulació de la conducta alimentària^{209,210}. A continuació es resumeixen els models *knock-out* que han resultat en un fenotip anorèxic.

Ratolí deficient per la dopamina. Consisteix en la disrupció del gen tirosina hidroxilasa (TH), que codifica per a un enzim limitant en la biosíntesi de les catecolamines en el sistema nerviós central i perifèric, incloses la dopamina, la noradrenalina i l'adrenalina. El ratolí deficient per a la dopamina (DD) només consumeix petites quantitats de menjar i mor a les 3-4 setmanes d'edat. Tot i això, el fenotip pot ser revertit mitjançant el tractament diari amb L-Dopa o l'administració oral de dieta líquida, cosa que demostra que la causa de la mort dels ratolins és la manca de nutrients⁷¹.

Ratolí deficient pel receptor 3 muscarínic. Els diferents membres dels receptors muscarínics d'acetilcolina (M1 a M5), tenen un paper central en la regulació de gran nombre de funcions fisiològiques fonamentals. El ratolí deficient pel receptor 3 Muscarínic presenta una alimentació deficient, baix pes corporal i nivells molt baixos de leptina i d'insulina²¹¹. Els efectes orexigènics de l'administració exògena de MCH i orexina A van ser els mateixos en el *knock-out* que en el salvatge, mentre que el *knock-out* no responia a l'administració d'AgRP. D'aquests estudis es conclou que hi ha una via colinèrgica dependent del receptor muscarínic que regula la gana immediatament més avall de les dianes hipotalàmiques de la leptina, però en vies prèvies al sistema MCH/orexina. La baixa expressió de MCH i la manca de resposta a AgRP són els principals responsables del fenotip hipofàgic del ratolí M3R -/-.

Ratolí deficient per l'hormona concentradora de melanina (MCH). MCH és un important factor orexigènic, ja que l'administració exògena de MCH estimula la ingesta, mentre que els nivells de mRNA s'incrementen en dejuni i quan hi ha deficiència de leptina. La disrupció del gen MCH provoca un fenotip prim i un ritme metabòlic incrementat. Els nivells d'expressió de NPY, AgRP i orexina no estan modificats en el ratolí MCH-/-, mentre que l'expressió de POMC en el nucli arcuat es troba disminuïda. Aquests experiments confirmen que MCH és un factor essencial en la regulació del balanç energètic controlat pel sistema de leptina i POMC/melanocortina. La resistència al dejuni també és inferior en els ratolins MCH -/-, el 75% dels quals moren després de 48 hores de dejuni²³.

Ratolí deficient pel receptor 2 de l'hormona alliberadora de corticotropina (Crhr2). L'hormona CRH té un paper crític en la coordinació de l'eix hipotàlem-hipofisari-adrenal. Els ratolins deficients per *Crhr2* tenen una conducta ansiosa i són hipersensibles a l'estrès. Els nivells basals d'ingesta i pes corporal no són diferents dels seus germans salvatges, però els mutants consumeixen un 75% de l'aliment que consumeixen els animals control després d'un dejuni de 24 hores. De totes maneres, no queda clar si això és un efecte directe del metabolisme o si és una conseqüència del fenotip ansiós dels ratolins²¹².

Ratolí deficient pel receptor cannabinoide 1 (CNR1). El tetrahidrocannabinol i els endocannabinoides estimulen la ingesta en ratolins i en humans. Al mateix temps, l'antagonista del receptor CNR1, el SR141716A, inhibeix la ingesta²¹³. Els ratolins deficients pel receptor CNR1 no tenen un pes ni un consum d'aliment diferent dels controls, però el seu consum és inferior al dels del ratolins salvatges després de 18 hores de dejuni. Aquest model és interessant perquè el fenotip hipofàgic resulta de la combinació dels factors genètics i ambientals, en un paradigma similar al que pateixen els pacients amb TCA²¹⁴.

Ratolí deficient per la contactina. La contactina és una molècula d'adhesió i reconeixement que s'expressa en el neuròpil del còrtex, hipocamp i cerebel, que té un paper clau en la formació de projeccions axonals durant el desenvolupament del sistema nerviós central²¹⁵. El ratolí deficient per contactina també té defectes en la guia dels axons[§] derivant en un fenotip atàxic²¹⁶. Els animals pateixen pèrdua de pes a partir del dia 10 postnatal i moren abans de les tres setmanes d'edat. A més, presenten nivells elevats de neuropèptid Y, d'AgRP en els somes del nucli arqueat, de MCH en l'àrea LHA i nivells disminuïts de POMC en el nucli arqueat²¹⁷.

Mutant espontani anx/anx.

El 1984 es va descriure una mutació espontània en ratolí que es va anomenar anorèxia (*anx*)²¹⁸. Els animals homozigots per a la mutació presenten emaciació, inhibició del creixement, aparença prima i mort als 22 dies d'edat²¹⁸ (Figura 4). A més, tenen hiperactivitat, tremolors corporals i marxa descoordinada. El gen responsable d'aquesta mutació recessiva encara no s'ha identificat, tot i que les anàlisis de lligament genètic han mapat la mutació en el cromosoma 2 prop del locus *Pallidin*.

[§]Guia dels axons: La guia dels axons és una disciplina del desenvolupament neuronal que estudia el procés mitjançant el qual les neurones envien els seus axons cap als seus llocs diana. Els axons sovint segueixen camins molt precisos en el SNC i la manera com troben el seu camí encara no s'ha elucidat.

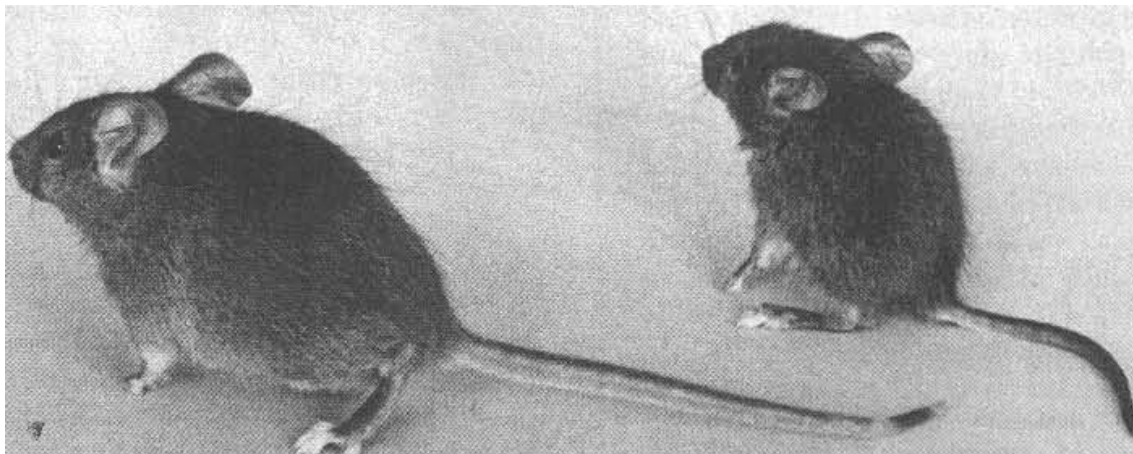


Figura 4. Ratolí *anx/anx*, a la dreta al costat d'un germà de camada. Imatge de Maltais et al. 1984²¹⁸.

Els ratolins *anx/anx*, homozigots per la mutació, es poden distingir a partir de 5 a 8 dies d'edat per l'aprimament del coll i la cua, i a partir del 5è dia postnatal presenten menys contingut d'aliment a l'estómac que els seus germans de ventrada heterozigots o homozigots salvatges. El fet que la corba d'aliments ingerits des del naixement fins al dia postnatal 20 sigui paral·lela, tot i que a uns nivells inferiors en ratolins *anx/anx* comparat amb controls, indica que aquests ratolins mengen menys perquè no regulen adequadament la quantitat d'aliment consumit i no pas per alguna altra raó fisiològica. La major part dels òrgans i teixits pesen igual en *anx/anx* que en controls un cop normalitzats pel pes corporal excepte la melsa, que té un pes inferior, i el cervell i el timus, que tenen un pes superior a 15 dies d'edat. En sang tenen presència de nivells elevats de colesterol, àcid úric, fosfatasa alcalina i urea. Els nivells de leptina en sèrum estan disminuïts, probablement a causa del poc greix que tenen aquests mutants²¹⁸.

Maltais i col·laboradors van demostrar que la marxa anòmala i descoordinada és, almenys en part, conseqüència de l'excés de serotonina, ja que la injecció de precursors de serotonina causa tremolors i descoordinació en els ratolins control, mentre que els antagonistes de la serotonina en disminueixen els símptomes. En els ratolins *anx/anx* també s'ha observat un increment en el nombre i la densitat de fibres serotoninèrgiques en el nucli arquat i en el prosencèfal^{219,220}.

microRNAs

Els microRNAs (miRNAs) constitueixen una família de RNAs petits no codificants d'uns 21 nucleòtids de llargada presents en metazous, plantes i en almenys un organisme unicel·lular²²¹. Constitueixen un nou nivell de complexitat en la regulació de l'expressió gènica, i estudis funcionals indiquen que participen en la regulació de gairebé tots els processos cel·lulars que s'han investigat^{222,223}. Tanmateix, canvis en els seus nivells d'expressió s'han trobat en diverses patologies, especialment en càncer. En humans s'han descrit més de 500 miRNAs tot i que prediccions bioinformàtiques calculen que n'existeixen almenys un miler i que el 30% de gens codificants poden estar regulats per miRNAs²²⁴⁻²²⁶. Cada miRNA controla l'expressió gènica de forma post-transcripcional, regulant la traducció o l'estabilitat de nombrosos mRNAs diana. Els miRNAs interaccionen amb regions del 3' no traduït (3'UTR) dels mRNAs diana que presenten una complementarietat parcial amb el miRNA^{224,227}.

Biogènesi de microRNAs

Els miRNAs són processats a partir de molècules precursoras anomenades pri-miRNAs, que poden ser transcrits independentment o dins de porcions d'introns de gens codificants. Sovint un simple pri-miRNA pot contenir seqüències de diversos miRNAs. Els pri-miRNAs són processats per endonucleases d'RNA de tipus III anomenades *Drosha* i *Dicer*. *Drosha* forma un complex proteic juntament amb la proteïna del gen de la regió crítica de la síndrome de *DiGeorge* 8 (*Dgcr8*) i processa els pri-miRNAs a fragments d'uns 70 nucleòtids amb regions de complementarietat imperfecta replegats en estructures en forma de llaç anomenats pre-miRNAs^{228,229}. En alguns casos, els pre-miRNAs sorgeixen de l'escissió de certs introns (mirtrons), estalviant-se així el procés per *Drosha-Dgcr8*²³⁰. Els pre-miRNAs són transportats del nucli al citoplasma mitjançant l'exportina 5 on maduren després de l'escissió mediada per *Dicer* acomplexat amb la proteïna *Trbp* per obtenir fragments de doble cadena d'uns 21 parells de bases. Normalment, una de les dues cadenes es

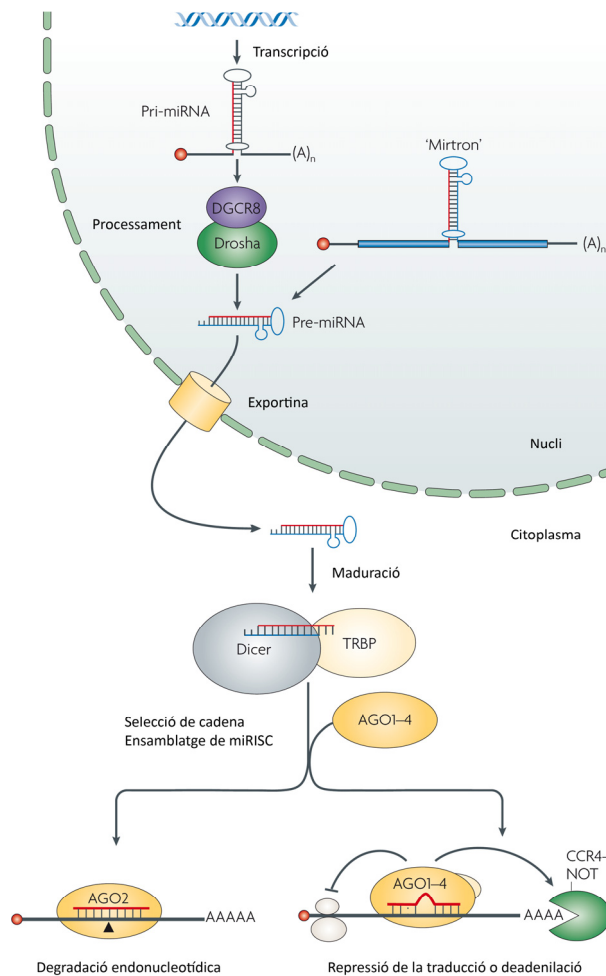


Figura 5. Biogènesi de miRNAs

selecciona per funcionar com a miRNA madur i l'altra és degradada, tot i que en alguns casos les dues cadenes donen lloc a miRNAs madurs^{228,229}.

Durant i després del processament dels miRNAs, es formen els complexos de ribonucleoproteïnes anomenats microRNPs (miRNPs) o complexos silenciadors induïts per miRNAs (miRISC). Uns components clau dels miRNPs són les proteïnes de la família dels Argonautes (AGO1-4)**. Algunes d'aquestes proteïnes funcionen també en la via del RNAs petits d'interferència (siRNA), en el cas de mamífers, AGO2. A part dels AGOs, els miRNPs estan formats per altres proteïnes essencials per la repressió de la traducció, com són la proteïna del síndrome de l'X fràgil (FMRP) i alguns components dels cossos P (P-bodies) com GW182 i RCK/P54.

Principis de la interacció miRNA-mRNA

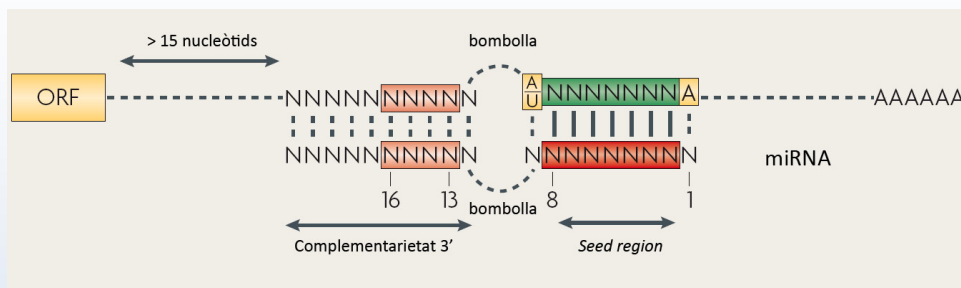
Així com en plantes els miRNAs i els mRNAs tenen una complementarietat gairebé total i la seva repressió és mitjançant la degradació de l'mRNA, en la majoria de metazous, s'aparellen de forma imperfecta amb els seus mRNAs diana^{224,227,231-233}. El criteri més

**Argonautes: Cadascun dels cinquanta-cinc companys de Jàson que, embarcats amb la nau Argó, participaren en la recerca del velló d'or. Els més famosos foren Heracles, Dioscurs i Orfeu. Probablement aquesta paraula s'ha aplicat a aquest tipus de proteïnes pel seu paper de guiar els RNAs petits en la seva funció repressora.

astriuent és l'aparellament complert dels nucleòtids 2-8 del miRNA, representant el que s'anomena *seed region* (Requadre 2).

Requadre 2. Principis de l'aparellament microRNA/mRNA

En la majoria dels casos, en metazous, els miRNAs s'aparellen amb una complementarietat imperfecte en la regió 3' dels mRNAs seguint una sèrie de lleis que s'han anat identificant mitjançant anàlisis bioinformàtics i experimentals^{224,227,231-233}.



1. Complementarietat perfecta dels nucleòtids 2 a 8 del miRNA (*seed region*). Els desaparellaments o les parelles GU desafavoreixen en gran mesura la repressió.
2. La presència de desaparellaments o bombolles en la regió central del miRNA és necessària per permetre la degradació de l'mRNA mediada per la proteïna Argonaute (AGO).
3. Un altre factor és que hi ha d'haver una certa complementarietat en la regió 3' del miRNA. En aquesta regió s'admeten diversos desaparellaments tot i que un bon aparellament, especialment en els nucleòtids 13-16 del miRNA milloren la repressió del miRNA
4. Altres factors implicats són la presència de regions veïnes riques en AU, una posició no molt llunyana de la cua poli-A ni del codó de terminació de la regió 3' de l'mRNA o l'accessibilitat dels lloc d'unió de l'mRNA²³⁴.
5. Sovint, regions 3' dels mRNAs contenen diversos lloc d'unió per miRNAs i s'ha vist que aquests actuen sinèrgicament en la repressió del gen, essent el seu efecte repressor superior a la suma de l'efecte individual de cada un dels llocs d'unió²³³.

Mètodes repressors dels miRNAs

Els principals mecanismes de repressió de síntesi proteica dels miRNAs són la inhibició de la traducció i la desestabilització dels mRNAs²³⁵.

La traducció dels mRNAs es pot dividir en tres fases: iniciació, elongació i terminació. La iniciació comença amb el reconeixement de l'extrem 5' m⁷GpppN de l'mRNA, per la subunitat del factor eucariòtic d'iniciació IF4E. Aquest factor s'uneix amb IF4G, que alhora

es troba conjugat amb la proteïna d'unió a l'extrem poli-A dels mRNAs, de forma que els extrems 3' i 5' queden aproximats i s'afavoreix la unió de la proteïna ribosòmica 40S. Alguns mRNAs inicien la seva traducció independentment del reconeixement de m⁷GpppN per IF4E, reclutant la seva subunitat 40S mitjançant la interacció amb un lloc d'unió a ribosoma intern (IRES, de *internal ribosome entry site*). La posterior adhesió de la subunitat 60S en el codó AUG precedeix la fase d'elongació de la traducció.

Inhibició de l'inici de traducció. La major part de treballs *in vitro* i *in vivo* donen suport a la repressió de l'inici de traducció, mitjançant la unió a factors del miRISC a la regió cap del 5' del mRNA o bé reclutant factors, com per exemple les proteïnes AGO, que interfereixen amb la interacció entre els factors eucariòtics d'iniciació IF4E i IF4G²³⁵.

Deadenilació i degradació dels mRNAs. Diversos estudis demostren que la degradació dels mRNAs mitjançant la degradació de la cua poli-A és un mecanisme freqüent d'acció dels miRNAs^{236,237}. Consistentment, en estudis de microarrays d'expressió gènica, en els que els miRNAs són sobreexpressats, o en que la seva funció ha estat inhibida, s'ha vist una alteració en l'expressió dels seus mRNAs diana predits, d'acord amb el paper dels miRNAs en la seva funció desestabilitzadora dels mRNAs diana²³⁸⁻²⁴².

Compartimentalització de la repressió mediada per miRNAs. Els mRNAs que són traduccionalment inactius generen mRNPs que s'acumulen en determinats *focis* coneguts com cossos P (*P-bodies* o *GW-bodies*)²⁴³. En resposta a diversos estímuls d'estrès, també es formen els grànuls d'estrès (SGs, de *stress granules*), que també acumulen mRNAs inactius²⁴⁴. Més recentment s'ha descrit que en els *P-bodies* i en els SGs també s'emmagatzemen mRNAs que tenen la traducció aturada temporalment. El fet que les proteïnes AGO, els miRNAs i els mRNAs diana regulats pels miRNAs es trobin enriquits en els *P-bodies*, impliquen aquestes estructures en la repressió per miRNAs i en el destí dels mRNAs diana reprimits^{245,246}. Així mateix, l'anul·lació de diversos components dels *P-bodies* com DCP1, DCP2, GW182, ja sigui individualment o bé combinacions d'ells, evita la inhibició dels mRNAs diana pels miRNAs. Tanmateix, també s'ha descrit que la inhibició de proteïnes implicades en el silenciament pels miRNAs també anul·la la formació dels *P-*

bodies, suggerint que la formació d'aquestes estructures és una conseqüència de l'activació del complex RISC²⁴⁷.

microRNAs i malalties mentals

Una gran proporció dels miRNAs coneguts s'expressen en cervell i en línies cel·lulars de neurones, molts d'ells de forma exclusiva²⁴⁸. Alguns d'ells tenen una expressió espaciotemporal específica en el cervell^{249,250}. La proteïna de la síndrome de retard mental de l'X fràgil (FMRP), que té un paper crucial en la sinaptogènesi, forma part del complex RISC. A la vegada, altres proteïnes del complex RISC s'han trobat en terminals dendrítiques i axonals. S'ha postulat que els miRNAs tenen un paper potencial en la plasticitat sinàptica silenciant els mRNAs diana mentre es transporten al llarg dels exons i les dendrites, permetent així l'expressió local de determinades proteïnes^{251,252}. Schratt i col·laboradors van descriure el primer miRNA específic de dendrita, miR-134, que regula negativament la mida del botó dendrític mitjançant la inhibició del gen *Limk1*, regulant així la plasticitat sinàptica. A més, aquest procés podia ser revertit mitjançant BDNF que era capaç d'inactivar la funció de miR-134²⁵³.

Així, els miRNAs podrien també estar implicats en malalties mentals. Per exemple s'ha descrit una expressió diferencial de diversos miRNAs en cervells *post-mortem* d'individus amb esquizofrènia, alhora que polimorfismes i mutacions en miRNAs o en dianes de miRNAs, han estat associats a diverses malalties mentals com la malaltia de Parkinson, l'esquizofrènia i la síndrome de Gilles de la Tourette²⁵⁴⁻²⁵⁶.

La microdeleció del cromosoma 22q11 causa una síndrome caracteritzada per deficiències conductuals i cognitives i incrementa el risc de patir esquizofrènia²⁵⁷. El gen *DGCR8* mapa en aquesta regió i un estudi amb un model de ratolí mostra que aquesta microdeleció causa una deficiència en la biogènesi dels miRNAs alhora que la deficiència d'aquest gen causa anormalitats cognitives similars a les que pateixen els subjectes amb la microdeleció²⁵⁸. Finalment, l'absència de miRNAs mitjançant l'ablació de Dicer en el SNC

causa neurodegeneració, atàxia i incrementa la toxicitat de les expansions de poliglutamina²⁵⁹⁻²⁶¹.

microRNAs i metabolisme

Els miRNAs tenen també un paper important en la regulació de la insulina i l'homeòstasi de la glucosa i dels lípids²⁶². El miR-375 és un miRNA específic d'illot de pàncrees que inhibeix la secreció d'insulina en resposta a glucosa. La supressió d'aquest miRNA també va revelar defectes en el desenvolupament del pàncrees^{263,264}. El miR-122 és un dels miRNAs més abundants del fetge, la seva inhibició causa una disminució dels nivells de colesterol i de la síntesi d'àcids grassos, i s'ha proposat com a possible diana terapèutica per tractar la síndrome metabòlica^{240,265}. De fet, recentment s'ha demostrat que el bloqueig de miR-122 mitjançant LNA-antagomirs^{††} és capaç de reduir els nivells de colesterol en primats i rosegadors²⁶⁶. Finalment, una combinació d'anàlisi d'expressió i assaigs funcionals va identificar miR-143 com un factor indispensable per la diferenciació d'adipocits²⁶⁷.

^{††}Els antagomirs són una nova classe d'oligonucleòtids sintètics utilitzats per al silenciament dels miRNAs. Els LNA-antagomirs estan formats de Locked Nucleic Acids, molècules de DNA modificades químicament que atorgant més especificitat i més sensibilitat per la seva molècula diana, en aquest cas el miRNA.

2. Hipòtesis i Objectius

La present tesi doctoral té com a objectiu general l'estudi de les bases genètiques dels trastorns de la conducta alimentària. Aquest objectiu general té dos aspectes: per una banda, l'estudi de la implicació de variants genètiques en gens candidats en la susceptibilitat a patir TCA en humans. Per altra banda, l'estudi de models murins que puguin explicar aspectes fenotípics o etiopatogènics relacionats amb l'anorèxia en humans.

Sota el supòsit de la implicació de les neurotrofines en la susceptibilitat a patir TCA en humans, s'han plantejat tres objectius concrets:

1. Analitzar la possible implicació del gen *BDNF* a través d'un estudi d'associació familiar, estudiant si els nivells de BDNF en plasma estan alterats en pacients amb TCA i si aquests nivells varien en funció del genotip portador al gen *BDNF*.
2. Avaluar si existeix una correlació entre els trets psicopatològics i la concentració de BDNF circulant.
3. Estudiar la implicació genètica d'altres gens pertanyents a la família de les neurotrofines en pacients amb TCA.

Pel que fa a l'estudi de models murins, i sota el supòsit de la seva utilitat en l'estudi dels processos implicats en l'anorèxia en humans, ens hem plantejat quatre objectius concrets:

1. Generar i estudiar ratolins transgènics portadors de les variants Val66 i Met66 pel gen *BDNF*.
2. Realitzar un mapatge de lligament genètic de la mutació responsable del model murí d'anorèxia *anx/anx*.
3. Analitzar el transcriptoma en hipotàlem del ratolí *anx/anx*.
4. Estudiar el perfil de l'expressió de miRNAs i la seva relació amb l'expressió dels seus mRNA diana predits.

3. Resultats

Els resultats d'aquesta tesi s'estructuren en set treballs separats en dos grans blocs. El primer bloc consta de tres treballs que fan referència a estudis en humans en els que s'ha aprofundit en el paper que tenen les neurotrofines en la susceptibilitat a desenvolupar trastorns de l'alimentació. En el segon bloc, format per quatre treballs, s'exposen els resultats obtinguts estudiant dos models murins, un transgènic de sobreexpressió de BDNF i el model *anx/anx*, un model de ratolí d'anorèxia.

Estudis en humans

Aquests tres treballs s'han dut a terme en col·laboració amb el Dr Fernando Fernández-Aranda de la Unitat de Trastorns de l'Alimentació de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB), que ens ha proporcionat les mostres i les dades clíniques dels pacients.

Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia

Mercader JM, Ribasés M, Gratacòs M, González JR, Bayés M, de Cid R, Badía A, Fernández-Aranda F, Estivill X
Genes Brain Behav. 2007 Nov;6(8):706-16

En aquest treball es presenten els resultats d'un estudi d'associació familiar amb totes les variants de la regió genòmica de *BDNF* conegudes en el moment de l'estudi, la relació dels nivells de BDNF en plasma amb els trastorns de l'alimentació, i com aquests s'associen a les diferents variants de *BDNF*.

Blood levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with several psychopathological symptoms in anorexia nervosa patients

Mercader JM, Fernández-Aranda F, Gratacòs M, Ribasés M, Badía A, Villarejo C, Solano R, González JR, Vallejo J, Estivill X
Neuropsychobiology. 2007;56(4):185-90

En aquest treball es presenten evidències de la relació entre els nivells de BDNF en plasma i la psicopatologia en els pacients amb TCA.

Association of NTRK3 and its interaction with NGF suggest an altered cross-regulation of the neurotrophin signaling pathway in eating disorders

Mercader JM, Saus E, Agüera Z, Bayés M, Boni C, Carreras A, Cellini E, de Cid R, Dierssen M, Escaramís G, Fernández-Aranda F, Forcano L, Gallego X, González JR, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Nacmias B, Puig A, Ribasés M, Ricca V, Romo L, Sorbi S, Versini A, Gratacòs M, Estivill X
Hum Mol Genet. 2008 May 1;17(9):1234-44

En aquest treball es va explorar si altres factors neurotròfics o els seus receptors podien estar igualment relacionats amb els trastorns de la conducta alimentària, i es va analitzar la variabilitat en 10 gens que conformen aquesta via en pacients de tres poblacions europees. Aquest estudi va ser possible gràcies a la col·laboració amb l'Hospital Louis Mourier de Paris (Dr. Philip Gorwood) i la universitat d'Essen (Dr. Johannes Hebebrand), que van proporcionar mostres i dades clíniques a l'estudi.

Estudis en models murins

Estudi de la sobreexpressió de les dues variants del polimorfisme Val66Met de BDNF dirigida pel promotor Thy-1

En aquest treball, que no ha estat publicat, es presenten els resultats de la generació i caracterització de transgènics de sobreexpressió de *BDNF* humà amb els dos al·lels de la variant aminoacídica funcional Val66Met.

Anàlisi de lligament de la mutació causant del fenotip anorèxic en el ratolí *anx/anx* i cribatge de mutacions en els gens *Bdnf* i *Ppp1r14d*

En aquest treball, que no ha estat publicat, es presenten els resultats del mapatge genètic de la mutació responsable del fenotip *anx/anx* i els cribatges mutacionals en dos gens candidats: *Bdnf* i *Ppp1r14d*.

Hypothalamus transcriptome profile suggests an anorexia-cachexia syndrome in the anx/anx mouse model

Mercader JM, Lozano JJ, Sumoy L, Dierssen M, Visa J, Gratacòs M, Estivill X.

En aquest treball, sotmès a publicació, es presenten els resultats obtinguts de l'anàlisi global del transcriptoma de l'hipotàlem del ratolí *anx/anx*.

Overabundance of microRNA targets in hypothalamus while scarcity in cortex suggest altered miRISC machinery in anx/anx anorexia mouse.

Mercader JM, González JR, Lozano JJ, Bak M, Kauppinen S, Sumoy L, Dierssen M, Visa J, Gratacòs M, Estivill X

Aquest treball, en procés de preparació per a ser sotmès a publicació, correspon a l'anàlisi del perfil de microRNAs en hipotàlem i en còrtex del ratolí *anx/anx* i l'expressió dels seus mRNA diana predits. Aquest estudi s'ha fet en col·laboració amb el Drs Sakari Kauppinen i Mads Bak del *Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research*, de l'Universitat de Copenhagen.

Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia

Mercader JM, Ribasés M, Gratacòs M, González JR, Bayés M, de Cid R, Badía A, Fernández-Aranda F, Estivill X

Genes Brain Behav. 2007 Nov;6(8):706-16

Contribució del doctorand:

- Experiments de quantificació de la concentració de BDNF per ELISA
- Anàlisi estadística dels resultats
- Participació en la redacció del manuscrit

Mercader JM, Ribasés M, Gratacòs M, González JR, Bayés M, de Cid R, Badía A, Fernández-Aranda F, Estivill X.

[Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia.](#)

Genes Brain Behav. 2007 Nov;6(8):706-16. Epub 2007 Mar 21.

Blood Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor Correlate with Several Psychopathological Symptoms in Anorexia Nervosa Patients

Mercader JM, Fernández-Aranda F, Gratacòs M, Ribasés M, Badía A, Villarejo C, Solano R, González JR, Vallejo J, Estivill X

Neuropsychobiology. 2008 Mar 13;56(4):185-190

Contribució del doctorand:

- Experiments d'ELISA per a la quantificació de BDNF en plasma
- Anàlisi estadística dels resultats
- Participació en la redacció del manuscrit

Mercader JM, Fernández-Aranda F, Gratacòs M, Ribasés M, Badía A, Villarejo C, Solano R, González JR, Vallejo J, Estivill X.
[Blood levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with several psychopathological symptoms in anorexia nervosa patients.](#)
Neuropsychobiology. 2007;56(4):185-90. Epub 2008 Mar 13.

Association of NTRK3 and its interaction with NGF suggest an altered cross-regulation of the neurotrophin signaling pathway in eating disorders

Mercader JM, Saus E, Agüera Z, Bayés M, Boni C, Carreras A, Cellini E, de Cid R, Dierssen M, Escaramís G, Fernández-Aranda F, Forcano L, Gallego X, González JR, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Nacmias B, Puig A, Ribasés M, Ricca V, Romo L, Sorbi S, Versini A, Gratacòs M, Estivill X

Hum Mol Genet. 2008 May 1;17(9):1234-44

Contribució del doctorand:

- Anàlisi estadística dels resultats
- Anàlisi de l'expressió de NTRK3 en hipotàlem de ratolí anx/anx
- Participació en la redacció del manuscrit

Mercader JM, Saus E, Agüera Z, Bayés M, Boni C, Carreras A, Cellini E, de Cid R, Dierssen M, Escaramís G, Fernández-Aranda F, Forcano L, Gallego X, González JR, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Nacmias B, Puig A, Ribasés M, Ricca V, Romo L, Sorbi S, Versini A, Gratacòs M, Estivill X.

[Association of NTRK3 and its interaction with NGF suggest an altered cross-regulation of the neurotrophin signaling pathway in eating disorders.](#)

Hum Mol Genet. 2008 May 1;17(9):1234-44. Epub 2008 Jan 18.

Estudi de la sobreexpressió de les dues variants del polimorfisme Val66Met de *BDNF* dirigida pel promotor *Thy-1*

Contribució del doctorand:

- Generació de la construcció
- Caracterització molecular dels fundadors i els seus descendents
- Caracterització fenotípica dels fundadors i dels seus descendents

Introducció

El gen del factor neurotròfic derivat de cervell (Brain Derived Neurotrophic Factor; *BDNF*) codifica per una neurotrofina essencial per a la supervivència i la plasticitat neuronals¹⁷³⁻¹⁷⁵ i, juntament amb el seu receptor d'alta afinitat (receptor neurotròfic tirosina cinasa de tipus 2; NTRK2), s'expressa en nuclis de l'hipotàlem associats al control de la ingesta, com el nucli paraventricular de l'hipotàlem (PNV), el nucli arqueat (ARC), el nucli dorso-medial (DMH), i el nucli ventro-medial (VMN)¹⁷⁵. Les evidències de la participació de *BDNF* en la conducta alimentària provenen majoritàriament de models animals. En rates, s'ha observat que la infusió de *BDNF* a nivell del sistema nerviós central suprimeix la gana i provoca pèrdua de pes¹⁷⁶. En models de ratolí deficientes pel gen *BDNF* els animals presenten hiperfàgia i obesitat^{169,176}, un fenotip similar a l'observat en ratolins deficientes pel seu receptor específic NTRK2¹⁷⁸. En estudis més recents, també en ratolins, s'ha demostrat que l'expressió de *BDNF* està influïda pel receptor de la melanocortina MC4R, i que després de 48 hores de dejuni es produeix una important reducció de l'expressió de *BDNF* en el nucli hipotalàmic ventromedial¹⁷⁸. Aquestes observacions fonamenten la participació de *BDNF* en la regulació del balanç energètic i el comportament alimentari.

El nostre grup va trobar que una variant no sinònima (Val66Met o rs6265) i una variant en posició 5'UTR (-270C/T), localitzades en el gen *BDNF*, mostraven una associació amb la susceptibilitat a patir trastorns de l'alimentació en una mostra de pacients de diverses poblacions europees¹⁴⁹⁻¹⁵¹. El polimorfisme Val66Met consisteix en una substitució aminoacídica -valina per metionina- en la regió de la pre-proteïna de *BDNF* que és eliminada durant el processament post-traducciona. No hi ha assajos funcionals de la variant -270C/T, però sí de la variant Val66Met, que han demostrat que l'al·lel Met66 afecta la secreció de *BDNF* depenent de despolarització i el tràfic intracel·lular de la proteïna en neurones hipocampals transfectades amb l'al·lel Met66¹⁸⁷. A més, l'al·lel Met66 s'ha associat a una funció neuronal hipocàmpica anormal i a un deteriorament de la memòria episòdica en subjectes humans sans¹⁸⁸. Aquests experiments demostren que *BDNF* és un element crític en la modulació dels canvis sinàptics associats amb

comportaments adaptatius o d'aprenentatge, i que l'al·lel Met66 n'impedeix la correcta funció.

Per tal d'avaluar, *in vivo*, l'efecte funcional del polimorfisme Val66Met en la regulació de la ingesta s'han generat línies de transgènics de sobreexpressió dels dos al·lells d'aquesta variant de la regió codificant de *BDNF* humà. Per tal de dirigir l'expressió en el sistema nerviós central vam utilitzar el promotor Thy-1, específic de neurona adulta o postmitòtica²⁶⁸.

Cribatge de fundadors Thy1-Met-BDNF

Dels tres fundadors obtinguts portadors del transgen Thy1-Met-BDNF, un va morir abans de les tres setmanes d'edat i dos no van presentar un fenotip aparent. D'aquests dos, el fundador Met-3 va resultar infèrtil. L'altre, Met-17, era fèrtil i va transmetre el transgen a la descendència. Malgrat això, ni aquest ni en els seus descendents portadors del transgen, no es va poder observar l'expressió del transgen en cervell (Figura 2) i no presentaven cap fenotip aparent. Donada aquesta situació, vam decidir centrar aquest treball en els portadors del transgen Thy1-Val-BDNF.

Cribatge de fundadors Thy1-Val-BDNF

Es van obtenir nou fundadors portadors de la construcció Thy1-Val-BDNF. Quatre d'ells van morir als dies 18, 25, 30 i al primer dia post-natal (IRO-17, IRO-31, IRO-38, IRO-30, Taula 1). L'única dada fenotípica que es coneix d'aquests animals és que tenien un pes corporal inferior als dels seus germans de camada. Un cinquè fundador es va mantenir en vida però no va transmetre el transgen a la descendència (IRO-34). Un sisè fundador (IRO-11) va morir al tretzè dia d'edat, i es va poder observar que tenia un pes inferior que la resta de germans de camada, severs tremolors i marxa atàxica ([Vídeo 1](#), Figura 2). Per RT PCR es va comprovar que aquest animal expressava el transgen en cervell. Un setè animal (IRO-18), femella, va presentar unes tremolors molt lleus i va transmetre el transgen a sis dels seus 115 descendents (5,2%, comparat al 50% esperat). Curiosament, aquests sis animals descendents tenien una major amplificació del DNA del transgen per PCR que la

seva progenitora i un fenotip sever, marcat per severos tremolors, baix pes corporal i també van morir abans de les tres setmanes d'edat (Figura 2 i [Vídeo 2](#)). A més, es va comprovar mitjançant PCR l'expressió del transgen en un dels sis descendents esmentats. Això ens va permetre deduir que aquesta femella probablement havia inserit el transgen després d'un o més cicles de divisió del zigot i que per tant presentava el transgen amb mosaïcisme, cosa que explica la baixa transmissió del transgen, el seu fenotip lleu i la lleu amplificació del transgen per PCR.

Els dos fundadors restants (IRO-21 i IRO-22) també van presentar tots dos tremolors severes, pes i índex de massa corporal inferior a l'esperat per edat. ([Vídeo 3](#), Figura 3). Aquests dos fundadors van ser sotmesos a proves bàsiques de neurodesenvolupament i neuroconducta.

Taula 1. Fundadors que es van obtenir portadors del transgen Thy1-Val-BDNF.

ID fundador	Fenotip	Comentaris	Video
IRO-7	més petit que germans camada	mort a P18	
IRO -31	més petit que germans camada	mort a P30	
IRO -34	no fenotip aparent	no transmet el transgen	
IRO -38	més petit i prim que els demés	mort a P25	
IRO-11	tremolors i pes corporal inferior	mort a P13	Vídeo 1
IRO-18	tremolors molt lleus	transmet el transgen en un 5% de descendents	
IRO-21	tremolors i pes corporal inferior	mort a P35	Vídeo 3
IRO-22	tremolors i pes corporal inferior	mort a P35	Vídeo 3
IRO-30	mort posnatal	mort a P0	

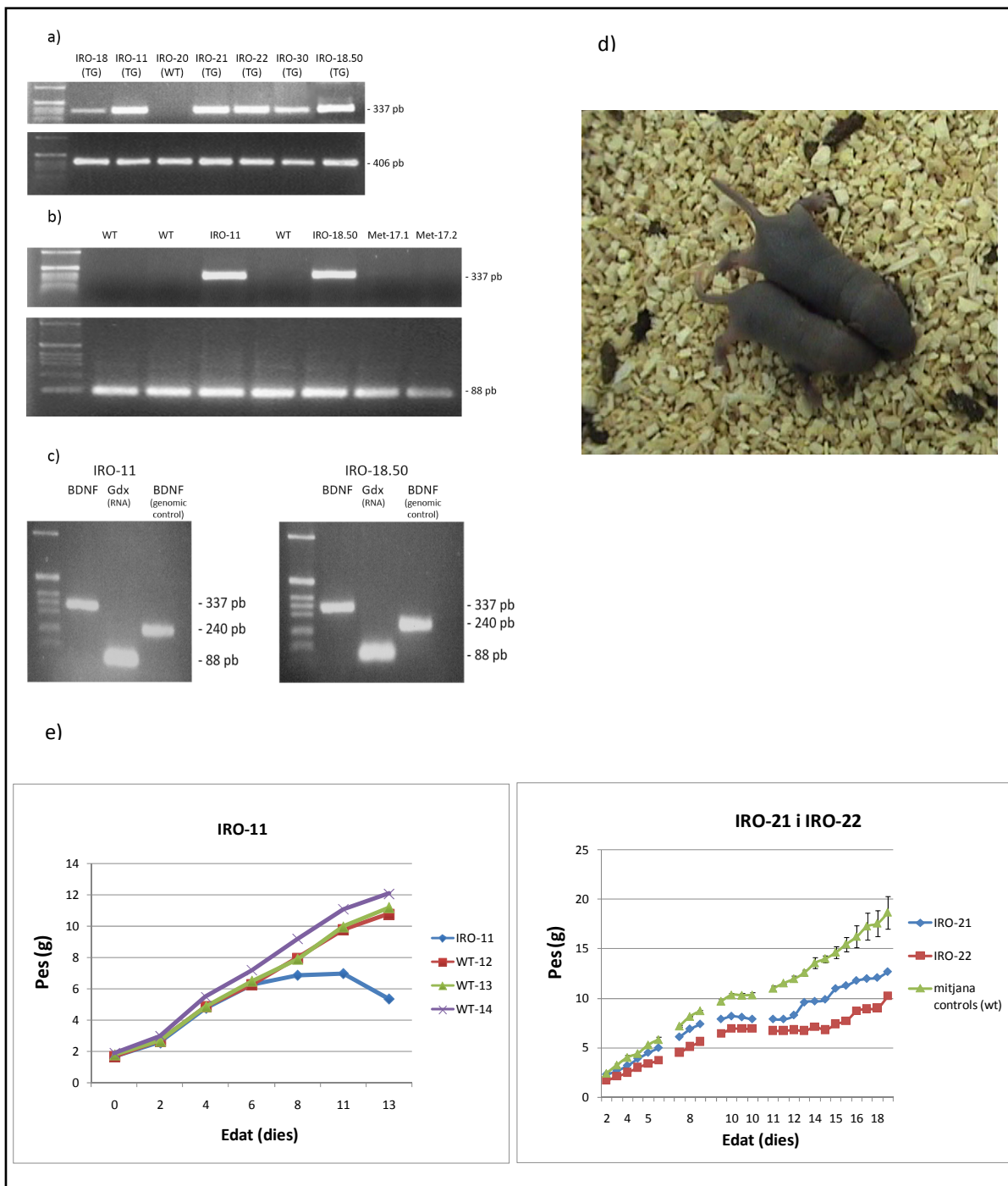


Figura 2. Caracterització molecular i fenotípica dels transgènics Thy1-Met-BDNF i Thy1-Val-BDNF. a) Anàlisi de presència del transgen mitjançant amplificació per PCR d'un fragment específic pel constructe Val/Thy (337 pb), amb un control positiu de PCR (406 pb). b) Avaluació de l'expressió del transgen en el fundador IRO-11 i un descendent de IRO-18. Els descendents de Met-17 no van mostrar expressió en cervell (banda 337 pb). El control positiu de presència d'RNA mostra una banda de 88 pb en tots els carrils. c) Control de contaminació de genòmic mostra absència d'amplificació de la banda de 240 pb d'*Ubl4*. d) La imatge mostra un dels fundadors al costat d'un dels seus germans de camada. Corva de creixement de IRO-11, i de IRO-21 i IRO-22 comparada amb la dels seus germans de camada. TG: Transgènic; WT: Salvatge

Caracterització de fenotípica

El desenvolupament somatomètric a través de la corba de creixement es va calcular en tres dels fundadors, IRO-11, IRO-21 i IRO-22 i es van comparar en cada cas amb la dels seus germans de camada. Es va poder apreciar, com ja s'ha comentat, un pes significativament inferior (p de Wilcoxon < 0.05) en els tres casos a partir dels vuit dies d'edat, acompanyat d'un índex de massa corporal també significativament inferior a l'esperat (p de Wilcoxon < 0.05) a partir dels 11 dies postnatal.

Neuroconducta i neurodesenvolupament

Dos dels fundadors (IRO-21 i IRO-22) es van sotmetre a proves bàsiques de neurocondesenvolupament i neuroconducta. Respecte a les fites del desenvolupament, no es van observar diferències significatives entre els animals transgènics i els seus germans de camada. En l'estudi neuromotor, o test de la marxa, es va observar que els animals portadors del transgen romanien menys segons en latència a PD6 (set i dos segons, respectivament, mentre que la resta de germans de camada salvatges trigaven més de 30 seg en iniciar la marxa). Aquest augment en l'activitat de pivot és un índex de la maduració motora i de la maduració general del sistema nerviós central, que en aquest cas seria un signe d'hiperactivitat. A part d'això, i com ja s'ha comentat, en tots els animals portadors del transgen excepte la femella IRO-18, que presentava un nombre de còpies baix, es va observar la presència de marcades tremolors que s'iniciaven cap al segon dia de vida. Aquestes tremolors, que entorpien la marxa normal dels animals, es podien observar tant durant el moviment com en repòs, emulant la tremolor essencial observada en humans²⁶⁹. A més, una característica que van presentar tots els ratolins portadors del transgen va ser la tendència a abraçar-se a les extremitats posteriors en el moment en que l'investigador els sospenia per la cua ([Vídeo 4](#)).

Anàlisi de lligament de la mutació causant del fenotip anorèxic en el ratolí *anx/anx* i cribatge de mutacions en els gens *Bdnf* i *Ppp1r14d*

Contribució del doctorand:

- Creació i manteniment de la colònia
- Obtenció del DNA
- Genotipació de marcadors microsatèl·lits
- Anàlisi de lligament
- Cribatge de mutacions en el gen de *Bdnf*

Introducció

El ratolí *anx/anx* és un mutant espontani que presenta inanició, retard en el creixement, aparença prima i mort a les tres setmanes d'edat²¹⁸. L'anàlisi del contingut de l'estómac demostra que els ratolins *anx/anx* mengen menys que els seus germans. A més, aquests ratolins tenen tremolors corporals i marxa atàxica i descoordinada. Consistent amb el poc greix que tenen, els mutants tenen nivells de leptina en sèrum disminuïts²⁷⁰. Estudis d'immunohistoquímica en l'hipotàlem mostren que el ratolí presenta acumulacions de neuropèptid Y (NPY) i *agouti related protein* (AGRP) en el soma neuronal del nucli arqueat, que podria ser la causa principal del fenotip hipofàgic en aquest model, ja que ambdós factors són orexigènics^{271,272}. L'activitat serotoninèrgica també està incrementada en aquest model i s'ha demostrat que l'administració intra-peritoneal d'un antagonista de serotonina reverteix les anormalitats neurològiques, incloses els tremolors corporals^{219,273}.

El gen responsable de la mutació encara no s'ha identificat, tot i que estudis de lligament basats en fenotips observables realitzats prèviament per Maltais, et al.²¹⁸ van localitzar la mutació prop del marcador fenotípic *Pallidin* (*Pldn*), situat aproximadament entre 54 i 73 centimorgans (cM) del centròmer en el cromosoma 2.

L'objectiu d'aquest estudi va ser, en primer lloc, intentar localitzar més finament la mutació causant del fenotip hipofàgic mitjançant l'anàlisi de lligament genètic per tal d'identificar gens candidats. En segon lloc, el fet que *Bdnf* es trobi localitzat en el mateix interval dins del cromosoma 2, concretament a 66 cM del centròmer, proper al *locus Pldn*, ens va fer pensar que una mutació en aquest gen podria estar relacionada amb el fenotip anorèxic. De fet, hi ha una entrada a la base de dades pública NCBI (GI:18072168) anomenada "*anorexia Bdnf*" en el que es reporta una substitució aminoacídica d'àcid glutàmic per àcid aspàrtic (E/D) en el gen *Bdnf* de ratolí. Aquest canvi està a dos residus d'aminoàcids de la posició on el seu ortòleg humà conté la variant funcional val66met (rs6265), prèviament associada a trastorns de l'alimentació¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Tenint en compte aquestes evidències, vam fer un cribatge mutacional en el gen de *Bdnf* per discernir si

aquesta o altres variants podien estar d'alguna manera relacionades amb el fenotip del ratolí *anx/anx*.

Resultats

Cribatge de mutacions en el gen *Bdnf*

Paral·lelament a l'anàlisi de lligament es va fer un cribatge mutacional del gen *Bdnf* en quatre animals homozigots, dos animals no afectes (heterozigots o wt) i cinc portadors de la mutació en heterozigosi. Es van seqüenciar els cinc exons de la regió 5' no traduïda i la regió codificant de l'exó 6 de *Bdnf*. Es van identificar dues variants, la -114 C/T, a l'exó 2, i la variant IVS7-67G/A a l'intró 7 (Figura 1). Tot i que els canvis no corresponien a cap dels SNPs descrits a les bases de dades, cap de les dues variants segregava amb el fenotip *anx* del model i per tant vam considerar que es tractava de polimorfismes específics de la soca. La substitució aminoacídica descrita prèviament, com a "anorexia BDNF" a la base de dades pública NCBI (GI:18072168) no es va confirmar en els nostres ratolins afectes.

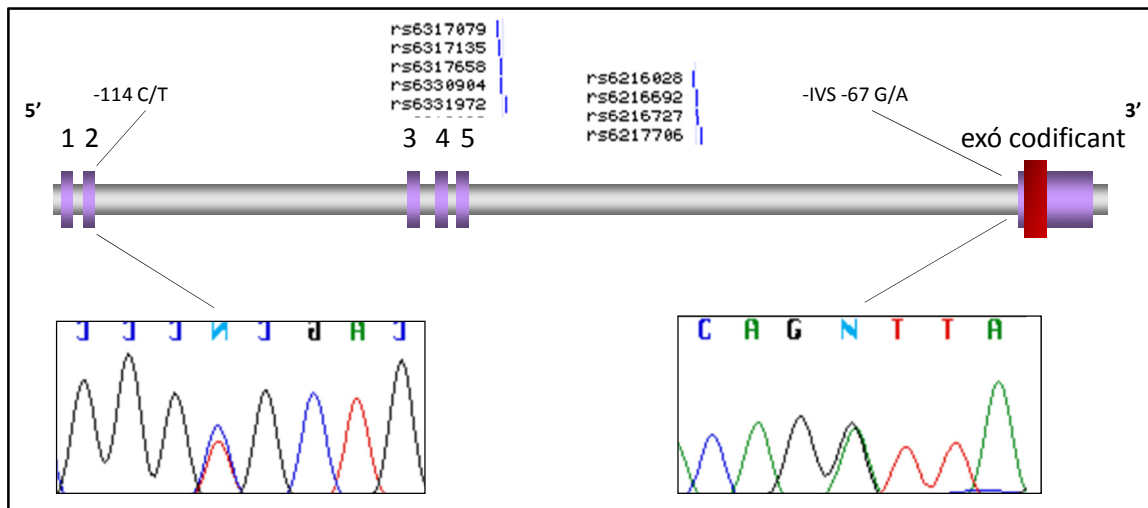


Figura 1. Estructura genòmica del gen *Bdnf* del ratolí. Les caixes liles representen les regions no codificants dels exons, i la caixa gruixa representa la regió codificant. Es mostren els dos polimorfismes trobats i els seus corresponents cromatogrames. S'indiquen els SNPs descrits en les bases de dades públiques (dbSNP) estan indicats per sobre la representació genòmica de *Bdnf*

Anàlisi de lligament amb marcadors microsatèl·lits

Tant l'anàlisi paramètrica com la no paramètrica a dos punts va identificar un pic màxim de lligament en el marcador *D2Mit395*, localitzat a 119Mb al cromosoma 2 de ratolí (LOD score = 14.26; NPL = 5.47; $p = 4.41 \times 10^{-12}$) (Taula 1). Aquest marcador està entre els marcadors *Tx119* (119.1 Mb) i *Tx119.7* (119.7 Mb), delimitant la regió candidata a un interval d'unes 600 kb.

L'anàlisi de lligament a múltiples punts dona un màxim lligament a 66.6 cM just sobre el marcador *Tx119* (LOD = 18.08; NPL = 7.65479; $p = 4.7 \times 10^{-21}$) (Figura 2).

Taula 1. LOD_score i LOD_score no paramètric (NPL) a dos punts per a diversos marcadors del cromosoma 2 de ratolí que mostren lligament amb el *locus anx*.

Marcador	LOD_score	NPL_score	p-valor	Informativitat
D2Mit221	1.22	0.46	0.238	0.02
D2Mit184	1.07	0.46	0.238	0.02
D2Mit163	-0.01	0.28	0.325	0.06
D2Mit101	0.14	0.28	0.325	0.06
TX118	0.14	0.28	0.325	0.05
D2Mit484	6.27	2.08	0.002	0.26
D2Mit444	4.75	1.76	0.007	0.27
<i>Ppp1r14d (rs27438733)</i>	12.77	4.49	5.22E-09	0.43
Tx119	12.47	4.55	3.41E-09	0.51
D2Mit395	14.26	5.47	4.41E-12	0.52
Tx119.7	10.46	3.22	1.00E-05	0.49
Tx120.17	4.43	1.85	0.005	0.32
Tx120.7	1.87	0.86	0.103	0.12
D2Mit134	3.00	2.03	0.002	0.26

LOD_score: logarithm (base 10) of odds; NPL: nonparametric linkage statistic

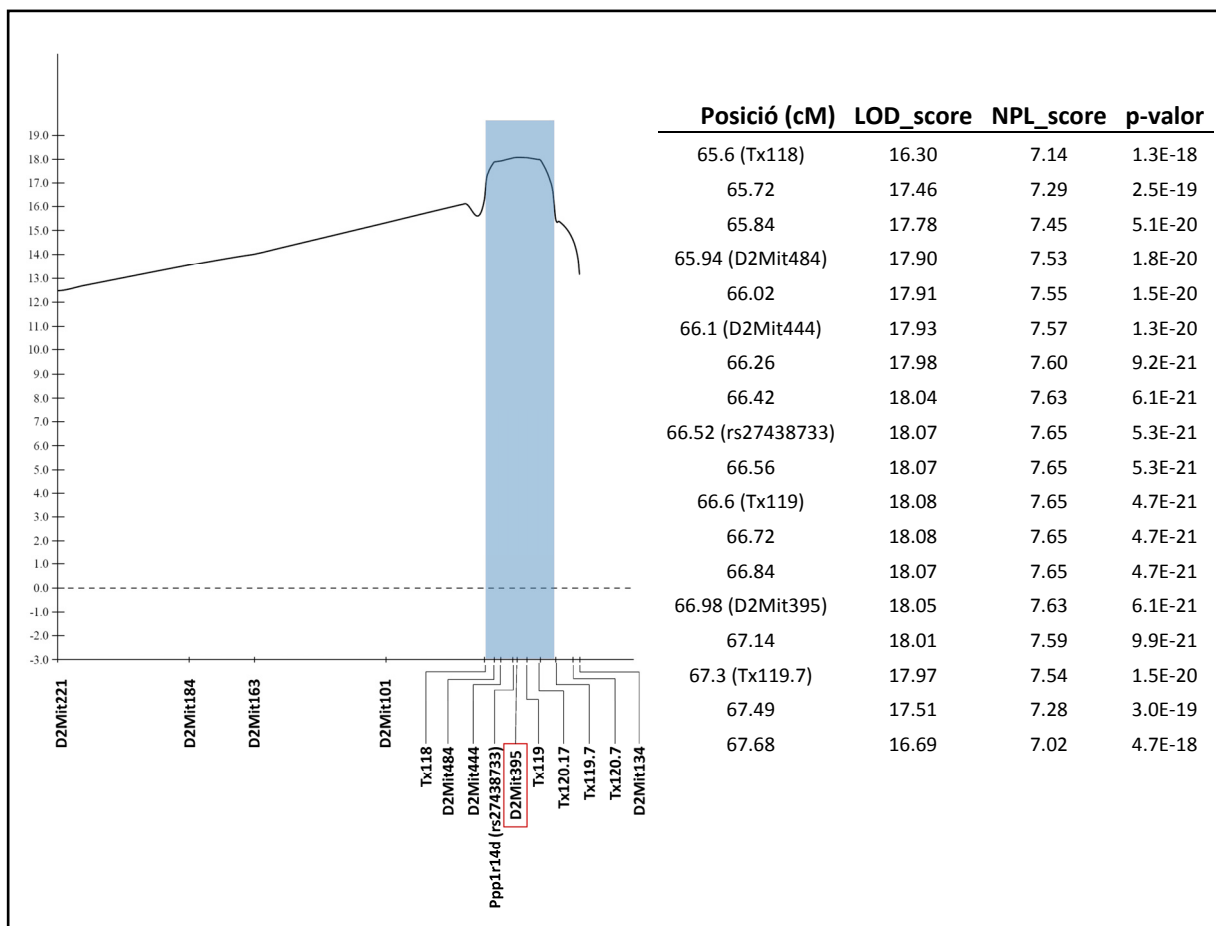


Figura 2. Gràfics de l'anàlisi de lligament paramètric i no paramètric de múltiples punts en la regió estudiada. Tant el LOD score com el NPL tenen màxim lligament a prop del marcador *D2Mit395*. La taula mostra resultats parcials de la zona on hi ha un lligament més fort.

La regió candidata, que conté 20 gens anotats, no inclou el gen *Bdnf* i presenta sintènia amb el cromosoma 15q15.1 d'humà (Taula 2 i Figura 3). D'entre ells, el gen *Ppp1r14d* codifica per a una subunitat d'una proteïna inhibidora de proteïnes fosfatases anomenada DARPP-32 (de l'anglès, *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of apparent Mr 32,000*). En la cèl·lula, és necessari un balanç adequat de fosforilació, mediada per les cinases, i de desfosforilació, mediada per les fosfatases. Gràcies als inhibidors de les fosfatases les proteïnes poden esquivar la seva desfosforilació en el moment en què han de romandre fosforilades. DARPP-32 s'expressa abundantment en cervell, ronyó i adipòcits, on té un paper essencial en l'adipogènesi²⁷⁴. En el cervell, la fosforilació de

DARPP-32 està regulada per diversos factors, inclosos la dopamina, la serotonina, el GABA i el glutamat, entre d'altres²⁷⁵. A més a més, el *knock-out* d'aquest gen presenta una resposta atenuada a cocaïna en l'activitat locomotora²⁷⁶. Donat que el ratolí *anx/anx* presenta problemes locomotors, funció dopaminèrgica alterada i un dèficit de teixit adipós, vam considerar que era un bon candidat a contenir la mutació responsable del fenotip.

Taula 2. Gens localitzats en l'interval genòmic del cromosoma 2 de ratolí lligat a la mutació *anx*.

Nom del gen	Refseq	Crom	Inici	Final
Dnajc17	NM_139139	chr2	118998235	119034510
Zfyve19	NM_028054	chr2	119034692	119042785
Ppp1r14d	NM_028104	chr2	119043858	119055588
Spint1	NM_016907	chr2	119063095	119075249
Rhov	NM_145530	chr2	119094936	119096957
Vps18	NM_172269	chr2	119114492	119124189
Dll4	NM_019454	chr2	119151564	119161392
Chac1	NM_026929	chr2	119176993	119180117
Inoc1	NM_026574	chr2	119198778	119303365
Exdl1	NM_172857	chr2	119345139	119373363
1500003O03Rik	NM_019769	chr2	119373442	119412758
Oip5	NM_001042653	chr2	119435267	119444241
Nusap1	NM_001042652	chr2	119444033	119475896
Ndufaf1	NM_027175	chr2	119481186	119488534
Itpka	NM_146125	chr2	119568072	119576989
Ltk	NM_206942	chr2	119577061	119586167
Rpap1	NM_177294	chr2	119589699	119613233
Tyro3	NM_019392	chr2	119625249	119643839
Mga	NM_013720	chr2	119722963	119795317
Mapkbp1	NM_011941	chr2	119798434	119853132

*Basat en assemblatge *Build 36*

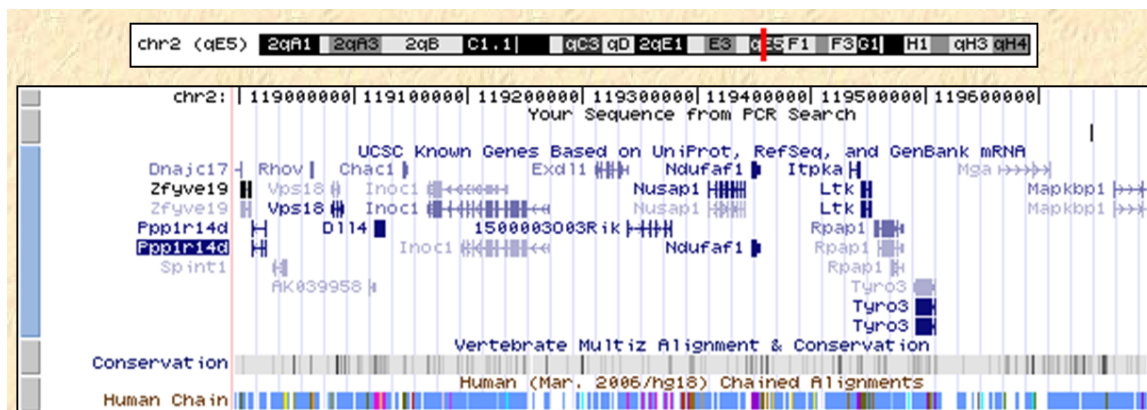


Figura 3. Plana del Genome Browser que mostra la regió putativa del locus *anx*. L'interval conté 20 gens anotats, mostra sintènia amb el cromosoma 15 humà i està entre 118.9 i 119.7 Mb en el cromosoma 2 de ratolí segons l'ensamblatge del genoma de ratolí del 2006 del UCSC.

Cribatge de mutacions en el gen Ppp1r14d

Un cop acotada la regió de lligament, vam considerar que el gen *Ppp1r14d* era un bon candidat a contenir la mutació *anx*. Per això es van seqüenciar, en els mateixos animals utilitzats per al cribatge de *Bdnf*, tots els exons anotats del gen *Ppp1r14d* en les bases de dades públiques de l'Universitat de Califòrnia de Santa Cruz (UCSC). Es van identificar cinc variants que, mitjançant una cerca de seqüències homòlogues mitjançant BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), vam veure que corresponien a SNPs prèviament descrits. Concretament, vam trobar els SNPs rs27438732 a l'intró 1, rs27438733 a l'intró 2, i els SNPs rs27438750, rs46818821 i rs48222615 a l'exó 3' no traduït. Els SNPs rs27438750 i rs46818821 eren SNPs contigus (Figura 4).

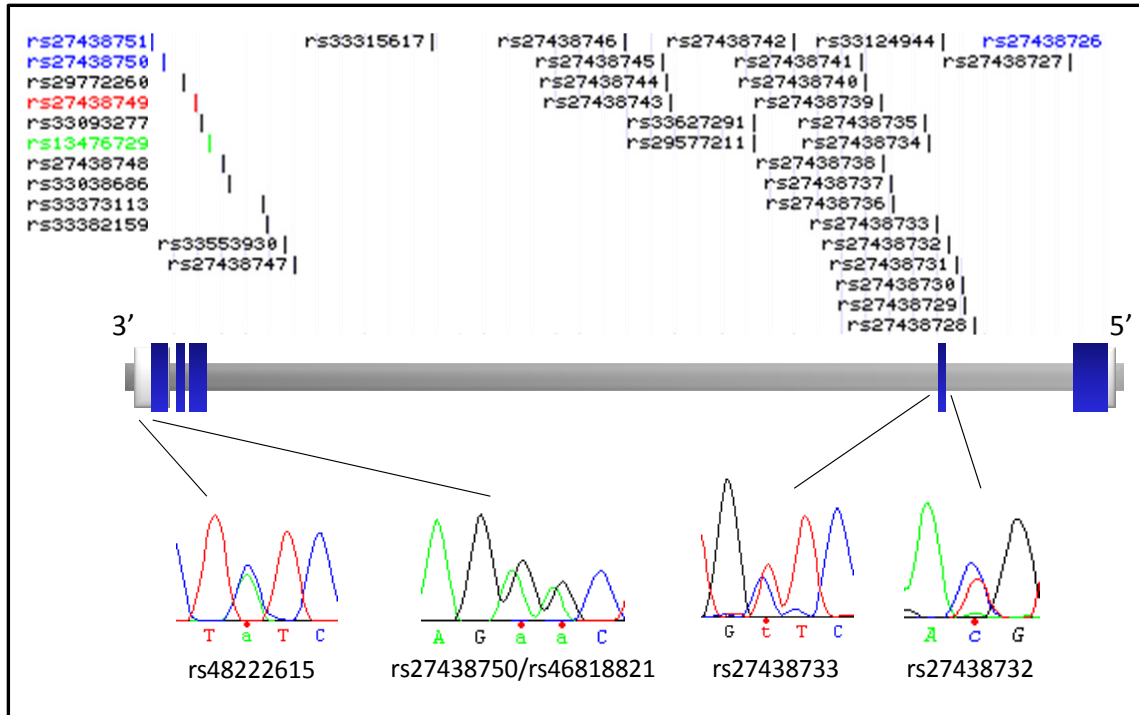


Figura 4. Estructura genòmica del gen *Ppp1r14d* del ratolí. Les caixes blanques representen els exons, i la caixa blava representa la regió codificant de l'exó codificant. Es mostren les variants trobades i els seus corresponents cromatogrames. Els SNPs descrits en les bases de dades públiques (rs) estan indicats a sobre la representació gràfica del gen.

Hypothalamus transcriptome profile suggests an anorexia-cachexia syndrome in the anx/anx mouse model

Mercader JM, Lozano JJ, Sumoy L, Dierssen M, Visa J, Gratacòs M, Estivill X

(Article sotmès a publicació)

Contribució del Doctorand:

- Manteniment de la colònia de ratolins
- Obtenció de les mostres i extracció d'RNA
- Disseny i realització dels experiments de validació per TaqMan
- Anàlisi estadística i bioinformàtica dels resultats
- Participació en la redacció del manuscrit

Hypothalamus transcriptome profile suggests an anorexia-cachexia syndrome in the *anx/anx* mouse model

Josep Maria Mercader^{1,2}, Juan José Lozano^{3,4}, Lauro Sumoy³, Mara Dierssen^{1,5}, Joana Visa⁶, Mònica Gratacòs^{2,1} and Xavier Estivill^{1,2,7}

¹Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

²CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

³Bioinformatics and Genomics Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), Barcelona, Catalonia, Spain

⁴CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 08036 Barcelona, Catalonia, Spain

⁵CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

⁶Servei Estabulari, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain

⁷Experimental and Health Sciences Department, Pompeu Fabra University, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

ABSTRACT

The *anx/anx* mouse displays poor appetite and lean appearance and is considered a good model for the study of anorexia nervosa. To identify new genes involved in feeding behavior and body weight regulation we performed an expression profiling in the hypothalamus of the *anx/anx* mice. Using commercial microarrays we detected 156 differentially expressed genes and validated 92 of those using TaqMan low-density arrays. Our results showed enrichment in deregulated genes involved in cell death, cell morphology and cancer as well as an alteration of several signaling circuits involved in energy balance including neuropeptide Y and melanocortin signaling. The expression profile along with the phenotype led us to conclude that *anx/anx* mice resemble the anorexia-cachexia syndrome typically observed in cancer, infection with human immunodeficiency virus or chronic diseases, rather than starvation, and that *anx/anx* mice could be considered a good model for the treatment and investigation of this condition.

Introduction

Energy balance and body weight regulation are major homeostatic processes, and the disruption of their regulatory mechanisms can cause several complications, leading to death in the worst cases. In humans, deregulation of these mechanisms occurs in patients with eating disorders (ED), such as anorexia (AN) and bulimia nervosa (BN), and obesity. ED and obesity are major health problems in adolescents which are associated with elevated risk for a broad range of physical and mental disorders during early adulthood (1, 6, 65). In developed countries, the incidence of AN or BN has dramatically increased in the last years (37). Though, other diseases such as cancer or chronic infections can be also associated to an energy balance impairment, characterized by progressive weight loss and depletion of adipose and skeletal muscle reserves, known as cachexia, which can aggravate the outcome of the disease (69). In these cases, anorexia appears in response to acute and chronic infections, inflammation, and trauma, followed by severe loss of body weight due to a deregulation of the appetite-regulating hypothalamic circuitry.

One animal model proposed for the study of AN is the *anx/anx* mouse, a mutant that harbors a recessive mutation in chromosome 2, not yet identified, close to the *Pallidin* gene (34, 46). These mice display poor appetite resulting in growth failure and emaciated appearance, accompanied by abnormal behavior and neurological symptoms including body tremors, head weaving, hyperactivity and uncoordinated gait (46). At the biochemical level, these mice show a reduced expression of several neuropeptides, such as pro-opiomelanocortin (POMC), neuropeptide Y (NPY) (11), and cocaine-amphetamine related transcripts in the arcuate nucleus (33), as well as a general hyperserotonergic activity and altered dopamine signaling in the striatum (31, 35, 66).

To our knowledge, the only available expression profile study performed in the *anx/anx* model found a deregulation of the orexigenic NPY/AGRP system and an up-regulation of different sets of genes of the immune/inflammatory response in the hypothalamus (42). The authors pointed to a relationship between the inflammatory process revealed by the expression profile, and the anorexic phenotype observed in these mice. However, the

study only validated the differential expression of few genes with a real-time PCR alternative method and much biological information, especially concerning genes with a mild effect, might still be unraveled.

To obtain a greater understanding of the pathogenetic mechanisms involved in the anorexic phenotype of *anx/anx* mice, we profiled its transcriptome in the hypothalamus, a critical brain area involved in the chemical encoding of feeding behavior. For that purpose we used oligonucleotide DNA microarrays to screen approximately 44,000 probes and further performed an extensive post hoc validation of 92 differentially expressed genes by real time quantitative RT-PCR low-density arrays (TaqMan). We also included 87 additional assays of candidate genes involved in obesity, eating behavior, and ED selected from literature searches.

Materials and Methods

Animals, tissue dissection and sex genotyping

Homozygous anorexia mice were produced from heterozygous breeder pairs (B6C3Fe a/a-anx/J) obtained from the Jackson Laboratory. Postnatal day 16 weanling mice housed with their parents were separated into two groups: *anx/anx* and control mice. *anx/anx* mice were identified by their reduced body weight, body tremor, and mild hyperactivity. Because homozygous and heterozygous mice cannot be phenotypically nor genotypically distinguished from wild types, control groups probably contained both genotypes (wt/wt or wt/anx). *anx/anx* and control mice were allowed *ad libitum* access to the mother, food, and water. Three *anx/anx* and three control mice were anesthetized with isoflurane, decapitated and hypothalamus was dissected. Tissues were immediately frozen with liquid nitrogen and stored until the experiments were performed. RNA was extracted from the tissue using Trizol (Invitrogen), following manufacturer's recommendations. All RNAs used had RIN (RNA integrity number) ranging between 8.4 and 8.9, and 28S/18S ratios between 1.3 and 1.6. Sex was determined by a simplex PCR assay as described (15).

Microarray hybridization

Microarray expression profiles were obtained using the 44K Whole Mouse Genome, (ref: G4122A) oligonucleotide platform (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and the RNA labelling and hybridization process was performed following the manufacturer's instructions. Dye swap experiments were performed in order to avoid a bias towards genes that are differentially hybridized when labeled to a particular dye. Fluorescent images were obtained using an Agilent G2565BA scanner. Microarray images were quantified using GenePix 6.0 (Axon) software. Only spots with signal intensities twice above the local background, not saturated and not flagged by GenePix, were considered reliable and used for subsequent analysis. Extracted intensities were subtracted from the local background and the log₂ ratios were normalized in an intensity-dependent fashion by global lowess. Target genes were considered as differentially expressed when below 0.001

false discovery rate (FDR), using significant analysis of microarrays (SAM) test implemented in R (71). All quantitative and statistical analyses were performed using the Limma package in the R environment (64).

TaqMan low-density arrays

Selection of ABI assays

92 Differentially expressed genes below 0.001 false discovery rate (FDR), corresponding to 92 “made to order” assays, the ones available to perform TaqMan low density arrays, were selected, through the ABI web server (www.applied.biosystems.com). Assays for 87 additional candidate genes were also selected from several web resources, literature collection and data obtained from our laboratory. In total, we selected a total of 176 non-redundant assays. 15 additional putative housekeeping genes were selected in order to search for the less variable endogenous controls to use as normalization factors. Supplementary Table 2 summarizes all the selected ABI assays and their criteria used for selection. cDNA was obtained using the cDNA with High Capacity Archive Kit from Applied Biosystems (Foster City, Ca). PCR master mix, prepared with TaqMan® Universal PCR Master mix and cDNA, was loaded to taqMan low density array card and run in a 9700 HT Applied Biosystems Real Time PCR machine following manufacturer instructions (Applied Biosystems).

TaqMan data analysis

Real Time amplification curves and Ct values were calculated using SDS software version 2.1.1 software (Applied Biosystems). For each cDNA sample, two replicate TLDA assays were performed. To calculate the relative quantities for each sample, we used qbase software (26). We tried two methods in order to calculate the relative delta-CT values: the classical method normalizing the expression by a single endogenous control, and normalizing for the three most stable genes (less variable across conditions) using *GeNorm* software v3.4 (72). Log2 linear regression analysis was performed in order to assess how well real time PCR using TLDA correlated with microarray Agilent results. Rsquare and

coefficients, including the b constant were calculated using the classical method, normalizing by a single endogenous control, B-actin, or normalizing by the geometric mean of the three most stable genes selected using *GeNorm*. When plotting all the genes not many differences were observed between the Rsquare coefficients using the two methods but large differences for the b constant (the Y value when x = 0) were observed between *GeNorm* method and classical method: -0.0092 vs 0.46 (log2 ratio values). Therefore, *GeNorm* method adjusted much better to the microarray results as the b constant was closer to 0 in both tissues, so it was used to perform the analysis. The three most stable genes for hypothalamus were *Tbp*, *Ywhas* and *Xpr1* (Supplementary Table 2).

SAM test based on paired t-tests were performed in order to obtain a statistical significance of the differentially expressed genes. A 0.05 FDR threshold was used to consider genes significantly differentially expressed in the validation assay.

Quality control

A correlation coefficient of 0.99 was obtained between DeltaCt values from replicate values, giving high confidence to technical replicates (data not shown). When normalizing by the three least variable genes in each tissue (see materials and methods section) the TaqMan results followed the same pattern in about 80% of the differentially expressed genes detected with Agilent microarrays, with 48% of them significant above 0.05 FDR (Table 1a). Log2 ratios of genes determined to be differentially expressed genes by microarray analysis were plotted against the log2 ratios obtained by TLDA analysis. A Pearson correlation coefficient of 0.65 ($p = 3.0 \times 10^{-13}$) comparing the two techniques was obtained.

Gene ontology and Ingenuity Pathway analysis

The microarray results were used to generate *networks*, *canonical pathways* and *functions* through the use of Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). A data set containing gene identifiers and corresponding expression values was uploaded into into the application. Each gene identifier was mapped to its

corresponding gene object in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. A 0.001 FDR threshold cutoff was set to identify genes whose expression was significantly differentially regulated. These genes, called focus genes, were overlaid onto a global molecular network developed from information contained in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. Networks of these focus genes were then algorithmically generated based on their connectivity.

Results

To identify differentially expressed genes, we compared the hybridization signals of RNA transcripts obtained from hypothalamus from three male *anx/anx* mice vs. three male control mice. Since the phenotype is recessive, control mice included both animals heterozygous for the mutation or homozygous which do not carry the mutation. We confined our analysis to genes with a false discovery rate (FDR) of 0.001. Under this criterion, a total of 155 non-redundant genes were differentially expressed: 141 and 14, upregulated and downregulated, respectively (Table S1).

To test the validity of the results of the transcriptome analysis, we designed a customized panel of low-density arrays, including TaqMan inventoried gene expression assays for our set of candidate genes. Target validation included 92 genes that were found deregulated in the array plus 87 additional assays from literature-candidate genes (Table S2).

The results of the qRT-PCR analyses demonstrated that the expression levels of 85% of the mRNAs were in the same up or down-regulated direction revealed by the microarray (Pearson correlation coefficient of 0.65). The correlation between the microarray results and TLDA results was good ($p < 10^{-13}$), even though in a proportion of cases, the TaqMan and the Agilent probes were not mapping to the same exon of a given gene. Thus, among the 92 initially selected genes, 51 were confirmed as differentially expressed genes and considered as true positives (FDR below 0.05; Table 1a). The vast majority of the TaqMan tested genes were upregulated (mean fold change: 1.38) although 7 genes were downregulated (mean fold: -1.67) (Table 1 and Figure 1).

The microarray results were used to generate *networks*, *canonical pathways* and *functions* through the use of Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity[®] Systems, www.ingenuity.com). According to our qRT-PCR results, when all the genes that appeared to be differentially expressed in hypothalamus were loaded to perform a core IPA analysis, the most significantly enriched network was *cell death, cell morphology and cancer* ($p = 10^{-28}$). This network centers on Tumor Necrosis Factor (TNF) and is involved in the regulation

of a wide variety of biological processes related to acute phase response signaling, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism and coagulation. 13 out of the 35 genes that defined the network were differentially expressed in *anx/anx* hypothalamus (Figure 2).

When we looked for enriched metabolic and cell signaling pathways we found that two of the most significant ones were the PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) signaling and activation cascades. Interestingly, molecules contained in this pathway overexpressed in the *anx/anx* mouse were the coactivator 1 alpha of the peroxisome proliferative activated receptor gamma, (*Pparg1a*), nuclear receptor co-repressor 1 (*Ncor*) and phospholipase C beta 1 (*Plcb*). These genes are specifically involved in fatty acid oxidation and degradation, lipid homeostasis, adipocyte differentiation and glucose and insulin homeostasis. Other specific pathways were identified for the hypothalamus, although often the analysis assigned a given gene to more than one pathway, and included the Huntington's disease path (with focus genes involved in neurodegeneration) and the estrogen receptor signaling.

We also used real-time PCR to check the expression profiles of a set of genes that did not reach our very stringent threshold for considering the genes to be differentially expressed (FDR = 0.001), but for which compelling evidence of their involvement of eating behavior has been demonstrated. Twenty-nine out of 87 were found deregulated by low-density arrays analysis (Table 3). In three cases, the upregulation was more than two fold: adrenergic receptor alpha 2b (*Adra2b*), gamma-aminobutyric acid (*Gaba-a*) receptor, subunit alpha 4 (*Gabra4b*) and the muscarinic cholinergic receptor 3 (*Chrm3*). Other deregulated pathways in *anx/anx* mice when observing all literature-nominated genes were the adrenergic signaling (*Adra2a*, *Adra2b*), melanocortin signaling (*Cart*, *Mc1r*, *Mc2r*, *Npy2r*, *Npy6r*, *Mchr1*, *Pcsk1n*, *Pomc*), neurotrophin signaling (*Ntrk3*, *Ntf3*, *Cntfr*, *Nradd*), GABA signaling (*Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* and *Gabra5*, *Reln*) serotonin pathway (*Slc6a4*), dopamine signaling (*Drd3*, *Drd5*), and genes involved in hypothalamic fatty acid sensing

(*Acadvl*, *Acs11*, *Fa2h*, *Fasn*). In addition, several genes that when disrupted cause anorexia (*Crhr1*, *Chrm3*) or obesity (*Gh*, *Lpin*) where deregulated.

Discussion

The aim of the present study was to identify differentially expressed genes in the hypothalamus of a widely accepted anorexia mouse model (*anx/anx*) using a microarray assay as a hypothesis-generating tool. We hypothesized that the expression profile may show in part deregulation of genes etiologically related to the anorexic phenotype, but also genes related to the prolonged food deprivation that mice were suffering, and thus a reflection of the compensatory responses in brain.

In the present work, initially, we determined the statistical significance using a very stringent FDR value to take into account correction for multiple testing and to reduce the number of false positives, since fold change alone does not address the reproducibility of the observed differences. Second, we used real time RT-PCR through TaqMan low-density array cards, which permitted us to perform 176 simultaneous real-time PCR reactions, therefore validating 85% of the statistically significant differentially expressed genes. This strategy allowed us to obtain valuable information from the entire set of microarray data and to have a broader insight into the global transcriptome of the *anx/anx* model.

The most significant network we identified, which was *cell death, cell morphology and cancer*, contains 13 deregulated genes out of 35 focus genes contained in the network. This network centers on TNF, which is a proinflammatory cytokine known to induce anorexia and cachexia when a disconnection of anabolic pathways occurs, and is typically upregulated in pathological processes, such as cancer, infection with human immunodeficiency virus or sepsis (21). Experimentally, it has been demonstrated that TNF- α induces anorexia by reducing the magnitude and duration of eating episodes (54). Moreover, its infusion is known to increase leptin secretion despite the decrease in food intake that would normally suppress leptin expression (23, 25, 57). Leptin levels are reduced in *anx/anx* mice (46), a fact that could be interpreted as a compensatory mechanism in response to decreased food intake. Moreover, cytokines are also able to induce robust anorexia even in the absence of leptin (7, 22), and low leptin levels have been reported in tumor-bearing rats (17) or in patients with cancer cachexia (9, 32, 62,

74). Hence, taken together these data suggest the activation of inflammatory cascades in *anx/anx* mice rather than a unique hypothalamic derived anorexia phenotype.

Our findings echo the results of Lachuer, et al. that found differential expression of several genes cytokines in *anx/anx* mice hypothalamus (42), and a recent neuropathological study that found activated microglia in several brain regions, supporting a central nervous system (CNS) inflammation / neurodegeneration associated process (51). Although the underlying mechanisms are unknown, glia can be activated after injury, releasing chemical mediators such as CNS cytokines. These cytokines are able to modulate neuronal activity and synaptic strength through the release of hypothalamic histamine, serotonin, norepinephrine, and dopamine, all of them involved in the control of feeding (61, 63). We found low serotonin transporter (*Slc6a4*) levels in the hypothalamus, that have also been reported in the raphe nuclei of *anx/anx* mice (30), which are probably the consequence of the increased serotonin activity observed in this animal model. In addition, reduced dopamine signaling but increased levels of dopamine synthesis genes have been described in *anx/anx* striatum (35). In our study, we observed an upregulation of *Drd3* and *Drd5* receptors, which could be a compensatory response to the reduced dopamine signaling. Finally, we found an intense upregulation of four GABA receptors, namely *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* and *Gabra5*. The increase in the expression of these genes could reflect a compensatory effect, since activation of the TNF- α cascade causes an endocytosis of GABAA receptors, resulting in fewer surface receptors (68).

Laucher et al. found a downregulation of the NPY or AGRP mRNA genes in the *anx/anx* mice (42), thus confirming previous findings from other studies that also found altered levels of these two genes (12, 13, 31). Several data from our study also support a reduced responsiveness of the NPY circuitry in *anx/anx* mice. We found, for example, an upregulation of *Cck*, which inhibits orexigenic signals, or an increase in the expression of NPY receptors 2 and 6. Y2 receptors are abundant in the arcuate nucleus of the hypothalamus, and Y2 agonists inhibit NPY release from hypothalamic slices (38), which agrees with a strong inhibition of the NPY circuitry. Taken together, the expected

compensatory effect of this pathway, which is usually induced by food deprivation, appears to be defective in the *anx/anx* mice, which might explain the persistent anorexia characteristic of this model.

In summary, the transcriptome profile of this model does not actually fit with the typical hypothalamic neuropeptide circuitry alteration in response to starvation, but seems closer to an anorexia-cachexia syndrome like the classically observed in a cancer processes. Cachexia and starvation are the two major paradigms of malnutrition. Starvation is characterized by pure caloric deficiency. The organism responds with an increase in appetite, adapts metabolically to conserve lean mass and increase fat metabolism (14), changes that can be reversed by appropriate feeding. In contrast, cachexia is associated with inflammatory or neoplastic conditions that evoke an acute-phase response, with diminished appetite concomitant with an increase in metabolic rate and a relative wasting of lean mass. In starvation, the positive energy balance is accomplished through the increased production, release or action of NPY. During cachexia, the organism is maintained in a constant negative energy balance in which there is a persistent inhibition of the NPY orexigenic network, inducing anorexia and unopposed weight loss (29).

Some additional evidences from our results point towards the cachexia paradigm. We found, for instance, an upregulation of the PPAR activation pathway and signaling in *anx/anx* mice. Similar to other nuclear hormone receptors, PPARs act as ligand-activated transcription factors deeply involved in the maintenance of lipid and glucose homeostasis, by directly stimulating the transcription of genes involved in fatty acid oxidation (58).

In particular, the PPAR γ signaling is activated by prostaglandins and leukotrienes, inflammatory mediators derived from the oxidative metabolism of arachidonic acid (19). On the other hand, the activator of the PPAR γ (Pparg1, unregulated in the *anx/anx* mice) is able to activate uncoupling proteins, which stimulate thermogenesis in adipose tissue, elevating the resting energy expenditure and causing hypermetabolism, a cardinal feature of cachexia, but not of starvation (19, 39).

Intuitively, those genes known to induce appetite that are downregulated, and those ones that are appetite suppressors that are upregulated are more likely to be responsible of the pathophysiology of this model, and probably contributing to the cachexia phenotype that these mice have. That is the case of melanocortin receptors 1 and 2 (*Mc1r* and *Mc2r*, respectively) or melanin-concentrating hormone receptor (*Mchr*), that although known to suppress feeding, are upregulated in *anx/anx* hypothalamus (45, 48, 50). Two other examples are the muscarinic receptor 3 (*Chrm3*) and fatty acid synthase (*Fasn*) that cause hypophagia and weight loss when disrupted (76), and are decreased in *anx/anx* hypothalamus. The reduction of FASN, for instance, is a known mechanism of the repression of lipogenic factors that contributes to the impairment in the lipid storing capacity of adipose tissue in cancer cachexia (9).

We also found results that may suggest a more complex anorexic profile, such a decrease of *Hsd11b1* and *Cart* expression, both of them anorexigenic, the later one shown to be reduced by in situ hybridization in arcuate nucleus and dorsomedial hypothalamic area of *anx/anx* mice (Johansen, 2000). Moreover, we also found a decrease of *Cntf*, which has been reported to cause a reduction in both NPY availability and the NPY induced feeding response (75). These results might reflect the activation of pathways promoting food intake, which may be considered as compensatory to the cachectic state, even though their downstream effects may be countered by the activation of anorexigenic and catabolic pathways originating in different hypothalamic nuclei.

When the *anx/anx* mice were first described, they were found to have elevated levels of total blood urea nitrogen (BUN) and cholesterol (46). BUN is commonly used as a marker of protein intake, and in case of malnutrition is usually low, while higher levels reflect an increase in protein catabolism, a characteristic response of the acute-phase response in cachexia (31). On the other hand, increased lipid blood levels, specifically triglycerides and cholesterol, occur in cachexia but not starvation, reflecting an increase in adipocyte lipolysis that leads to fat mass loss (2).

In summary, our analysis shows that, at the transcriptome level, the *anx/anx* mice appear to have an increased systemic / CNS inflammatory response which, possibly through hypothalamus signaling, triggers a complex metabolic state comprising of decreased appetite and significant weight loss. The data that we present not only open new insights on to the biological consequences of the undiscovered mutation that those mice harbor, but, surprisingly, it also turns out that the *anx/anx* mice might be a better anorexia-cachexia syndrome than a starvation model, as initially stated.

Although the stronger predictor of outcome is the severity of the underlying disease, the central objective of the prevention and treatment of the cachexia syndrome is to ameliorate the life quality of the patient. It is thus probable that the *anx/anx* mice can be used as a cachexia animal model to understand the physiopathological alterations mediating this complex disease-accompanying condition and to test nutritional or pharmacological therapies.

Acknowledgements

We thank Anna Wald for critically reading the manuscript, David Otero for performing the hybridizations, Stefanie Plaza and Roger Anglada for their technical assistance with TaqMan low density arrays for and Moisès Buset for his helpful suggestions to analyze Real-Time PCR data.

The expression data reported in this paper has been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) database (Series GSE11426)

Grants

Financial support was received from the Ministry of Education and Science (SAF2005-01005, SAF2007- 60827 and GEN2003-20651-C06-03), the “Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, FIS” (PI040632; PI040619), the Department of Health (“Generalitat de Catalunya”), and the Department of Universities, Research and Information Society (2005SGR00008; 2005SGR 00322) (“Generalitat de Catalunya”). Josep M. Mercader was supported by the CRG under project SAF2002-00799 (Spanish Ministry of Science and Education), and by fellowship of the Danone Institute. We thank also the support from Genome Spain to the National Genotyping Center (CeGen). We thank Anna Wald for critically reading the manuscript. This work was funded by two grants from the Spanish Ministry for Science and Technology SAF2003-05266 and SAF2004-06976 to LS. LS has a singular research team recognition SGR2005-00404 by the Generalitat de Catalunya.

References

1. **Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, and Leitzmann MF.** Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 355: 763-778, 2006.
2. **Argiles JM, Alvarez B, and Lopez-Soriano FJ.** The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 17: 477-498, 1997.
3. **Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, and Lee KF.** Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410-414, 2000.
4. **Beck B.** Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1159-1185, 2006.
5. **Bergen AW, Yeager M, Welch RA, Haque K, Ganjei JK, van den Bree MB, Mazzanti C, Nardi I, Fichter MM, Halmi KA, Kaplan AS, Strober M, Treasure J, Woodside DB, Bulik CM, Bacanu SA, Devlin B, Berrettini WH, Goldman D, and Kaye WH.** Association of multiple DRD2 polymorphisms with anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 30: 1703-1710, 2005.
6. **Berkman ND, Lohr KN, and Bulik CM.** Outcomes of eating disorders: a systematic review of the literature. *Int J Eat Disord* 40: 293-309, 2007.
7. **Bessesen DH, and Faggioni R.** Recently identified peptides involved in the regulation of body weight. *Semin Oncol* 25: 28-32, 1998.
8. **Beverly JL, and Martin RJ.** Increased GABA shunt activity in VMN of three hyperphagic rat models. *Am J Physiol* 256: R1225-1231, 1989.
9. **Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, and Jenkins JR.** Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* 95: 1028-1037, 2006.
10. **Bray MS, Boerwinkle E, and Hanis CL.** Sequence variation within the neuropeptide Y gene and obesity in Mexican Americans. *Obes Res* 8: 219-226, 2000.
11. **Broberger C, Johansen J, Brismar H, Johansson C, Schalling M, and Hokfelt T.** Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (*anx/anx*) mouse hypothalamus. *J Neurosci* 19: 7130-7139, 1999.
12. **Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, and Hokfelt T.** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043-15048, 1998.
13. **Broberger C, Johansen J, Schalling M, and Hokfelt T.** Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia (*anx/anx*) mutation: altered processing of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 387: 124-135, 1997.
14. **Cahill GF, Jr.** Starvation in man. *N Engl J Med* 282: 668-675, 1970.
15. **Clapcote SJ, and Roder JC.** Simplex PCR assay for sex determination in mice. *Biotechniques* 38: 702, 704, 706, 2005.

16. **Coscina DV, and Nobrega JN.** Anorectic potency of inhibiting GABA transaminase in brain: studies of hypothalamic, dietary and genetic obesities. *Int J Obes* 8 Suppl 1: 191-200, 1984.
17. **Chance WT, Sheriff S, Moore J, Peng F, and Balasubramaniam A.** Reciprocal changes in hypothalamic receptor binding and circulating leptin in anorectic tumor-bearing rats. *Brain Res* 803: 27-33, 1998.
18. **Cheng JT, and Kuo DY.** Both alpha1-adrenergic and D(1)-dopaminergic neurotransmissions are involved in phenylpropanolamine-mediated feeding suppression in mice. *Neurosci Lett* 347: 136-138, 2003.
19. **Desvergne B, and Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688, 1999.
20. **Donahue LR, and Beamer WG.** Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol* 136: 91-104, 1993.
21. **Esper DH, and Harb WA.** The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract* 20: 369-376, 2005.
22. **Faggioni R, Fuller J, Moser A, Feingold KR, and Grunfeld C.** LPS-induced anorexia in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor-deficient (db/db) mice. *Am J Physiol* 273: R181-186, 1997.
23. **Finck BN, Kelley KW, Dantzer R, and Johnson RW.** In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology* 139: 2278-2283, 1998.
24. **Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Drevets W, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Wagner A, Hoge J, Ziolkowski S, Barbarich-Marsteller N, Weissfeld L, and Kaye WH.** Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Biol Psychiatry* 58: 908-912, 2005.
25. **Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, and Feingold KR.** Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 97: 2152-2157, 1996.
26. **Hellems J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, and Vandesompele J.** qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8: R19, 2007.
27. **Hu Z, Cha SH, van Haasteren G, Wang J, and Lane MD.** Effect of centrally administered C75, a fatty acid synthase inhibitor, on ghrelin secretion and its downstream effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3972-3977, 2005.
28. **Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, and Kuhar MJ.** CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 15: 454-459, 2004.
29. **Inui A.** Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 52: 72-91, 2002.
30. **Jahng JW, Houpt TA, Joh TH, and Son JH.** Differential expression of monoamine oxidase A, serotonin transporter, tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter

- mRNA by anorexia mutation and food deprivation. *Brain Res Dev Brain Res* 107: 241-246, 1998.
31. **Jahng JW, Houpt TA, Kim SJ, Joh TH, and Son JH.** Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res* 790: 67-73, 1998.
 32. **Jensen PB, Blume N, Mikkelsen JD, Larsen PJ, Jensen HI, Holst JJ, and Madsen OD.** Transplantable rat glucagonomas cause acute onset of severe anorexia and adipisia despite highly elevated NPY mRNA levels in the hypothalamic arcuate nucleus. *J Clin Invest* 101: 503-510, 1998.
 33. **Johansen JE, Broberger C, Lavebratt C, Johansson C, Kuhar MJ, Hokfelt T, and Schalling M.** Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (*anx/anx*) mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 84: 97-105, 2000.
 34. **Johansen JE, Fetissov S, Fischer H, Arvidsson S, Hokfelt T, and Schalling M.** Approaches to anorexia in rodents: focus on the *anx/anx* mouse. *Eur J Pharmacol* 480: 171-176, 2003.
 35. **Johansen JE, Teixeira VL, Johansson C, Serrao P, Berggren PO, Soares-Da-Silva P, Schalling M, and Bertorello AM.** Altered dopaminergic transmission in the anorexic *anx/anx* mouse striatum. *Neuroreport* 12: 2737-2741, 2001.
 36. **Kaye WH, Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, and Wagner A.** Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: new insights from imaging studies. *Physiol Behav* 85: 73-81, 2005.
 37. **Keski-Rahkonen A, Hoek HW, Susser ES, Linna MS, Sihvola E, Raevuori A, Bulik CM, Kaprio J, and Rissanen A.** Epidemiology and course of anorexia nervosa in the community. *Am J Psychiatry* 164: 1259-1265, 2007.
 38. **King PJ, Williams G, Doods H, and Widdowson PS.** Effect of a selective neuropeptide Y Y(2) receptor antagonist, BIIIE0246 on neuropeptide Y release. *Eur J Pharmacol* 396: R1-3, 2000.
 39. **Kotler DP.** Cachexia. *Ann Intern Med* 133: 622-634, 2000.
 40. **Kuo DY.** Further evidence for the mediation of both subtypes of dopamine D1/D2 receptors and cerebral neuropeptide Y (NPY) in amphetamine-induced appetite suppression. *Behav Brain Res* 147: 149-155, 2003.
 41. **Kuo DY.** Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) and the attenuation of hyperphagia in streptozotocin diabetic rats treated with dopamine D1/D2 agonists. *Br J Pharmacol* 148: 640-647, 2006.
 42. **Lachuer J, Ouyang L, Legras C, Del Rio J, and Barlow C.** Gene expression profiling reveals an inflammatory process in the *anx/anx* mutant mice. *Brain Res Mol Brain Res* 139: 372-376, 2005.
 43. **Lam TK, Schwartz GJ, and Rossetti L.** Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8: 579-584, 2005.
 44. **Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, and Wiegand SJ.** Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4652-4657, 2001.

45. **Luthin DR.** Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Life Sci* 81: 423-440, 2007.
46. **Maltais LJ, Lane PW, and Beamer WG.** Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *J Hered* 75: 468-472, 1984.
47. **Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, and Flier JS.** A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166-2170, 2001.
48. **McQuade JA, Benoit SC, Xu M, Woods SC, and Seeley RJ.** High-fat diet induced adiposity in mice with targeted disruption of the dopamine-3 receptor gene. *Behav Brain Res* 151: 313-319, 2004.
49. **Mercader JM, Ribases M, Gratacos M, Gonzalez JR, Bayes M, de Cid R, Badia A, Fernandez-Aranda F, and Estivill X.** Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav* 6: 706-716, 2007.
50. **Millington GW.** The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)* 4: 18, 2007.
51. **Nilsson I, Lindfors C, Fetisov SO, Hokfelt T, and Johansen JE.** Aberrant agouti-related protein system in the hypothalamus of the anx/anx mouse is associated with activation of microglia. *J Comp Neurol* 507: 1128-1140, 2008.
52. **Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, and Grino M.** Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2701-2705, 2002.
53. **Phan J, and Reue K.** Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 1: 73-83, 2005.
54. **Plata-Salaman CR.** Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. *Nutrition* 16: 1009-1012, 2000.
55. **Polak J, Moro C, Klimcakova E, Hejnova J, Majercik M, Viguerie N, Langin D, Lafontan M, Stich V, and Berlan M.** Dynamic strength training improves insulin sensitivity and functional balance between adrenergic alpha 2A and beta pathways in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Diabetologia* 48: 2631-2640, 2005.
56. **Rosmond R, Bouchard C, and Bjorntorp P.** Allelic variants in the GABA(A)alpha6 receptor subunit gene (GABRA6) is associated with abdominal obesity and cortisol secretion. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 938-941, 2002.
57. **Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, and Alexander HR.** Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 185: 171-175, 1997.
58. **Schoonjans K, Staels B, and Auwerx J.** The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302: 93-109, 1996.
59. **Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty RM, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH, and Friedman JE.**

CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *J Biol Chem* 282: 15717-15729, 2007.

60. Shimizu H, Inoue K, and Mori M. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 193: 1-9, 2007.

61. Shintani F, Kanba S, Nakaki T, Nibuya M, Kinoshita N, Suzuki E, Yagi G, Kato R, and Asai M. Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J Neurosci* 13: 3574-3581, 1993.

62. Simons JP, Schols AM, Campfield LA, Wouters EF, and Saris WH. Plasma concentration of total leptin and human lung-cancer-associated cachexia. *Clin Sci (Lond)* 93: 273-277, 1997.

63. Smagin GN, Swiergiel AH, and Dunn AJ. Peripheral administration of interleukin-1 increases extracellular concentrations of norepinephrine in rat hypothalamus: comparison with plasma corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* 21: 83-93, 1996.

64. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3, 2004.

65. Solomon CG, and Manson JE. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr* 66: 1044S-1050S, 1997.

66. Son JH, Baker H, Park DH, and Joh TH. Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopmental mouse mutant, Anorexia (*anx*). *Brain Res Mol Brain Res* 25: 129-134., 1994.

67. Squadrito F, Sturniolo R, Arcadi F, Arcoraci V, and Caputi AP. Evidence that a GABAergic mechanism influences the development of obesity in obese Zucker rats. *Pharmacol Res Commun* 20: 1087-1088, 1988.

68. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, and Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 25: 3219-3228, 2005.

69. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2: 862-871, 2002.

70. Tsujii S, and Bray GA. GABA-related feeding control in genetically obese rats. *Brain Res* 540: 48-54, 1991.

71. Tusher VG, Tibshirani R, and Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-5121, 2001.

72. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034, 2002.

73. Vicentic A, and Jones DC. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 499-506, 2007.

74. Wallace AM, Sattar N, and McMillan DC. Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res* 4: 2977-2979, 1998.

75. Xu B, Dube MG, Kalra PS, Farmerie WG, Kaibara A, Moldawer LL, Martin D, and Kalra SP. Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology* 139: 466-473, 1998.

76. **Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, and Wess J.** Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410: 207-212., 2001.

Table 1. Validation of genes by TaqMan Low Density Arrays

a) Confirmation rate of selected differentially expressed genes with 0.001 FDR according to Agilent arrays

Diff. Expr. Genes FDR<0.001 Agilent Arrays			
	Total Genes tested by TaqMan	Validated by TaqMan (%)	Significant by TaqMan SAM < 0.05 FDR (%)
Upregulated	81	68 (84)	44 (54)
Downregulated	11	10 (91)	7 (64)
Total	92	78 (85)	51 (55)

FDR, False discovery rate.

b) Real Time TaqMan quantification of literature selected genes

Literature based selected genes		
Total genes selected	Significant by TaqMan SAM <0.05 FDR (%)	
87	Upregulated	12 (13.8)
	Downregulated	17 (19.6)

FDR, False discovery rate.

Table 2. Significant differentially expressed genes selected according to Agilent arrays confirmed by TaqMan (SAM <0.05 FDR)

Gene Symbol	TaqMan Probe	Differentially Expressed Hypothalamus (number of significant probes)	TaqMan Fold Change HT	Gene Name
2610033H07Rik	Mm00804627_m1	UP (1)	1.16	RIKEN cDNA 2610033H07 gene
3110050K21Rik	Mm00546532_m1	UP (2)	1.21	RIKEN cDNA 3110050K21 gene
5330430C04Rik	Mm00547202_s1	UP (1)	1.72	RIKEN cDNA 5330430C04 gene
Alcam	Mm00711623_m1	UP (1)	1.34	activated leukocyte cell adhesion molecule
App	Mm00431827_m1	UP (1)	1.48	amyloid beta (A4) precursor protein
Atp2c1	Mm00723486_m1	UP (2)	1.13	ATPase, Ca ⁺⁺ -sequestering
AV344025	Mm00619212_s1	UP (1)	1.58	expressed sequence AV344025
Brunol4	Mm00659682_m1	UP (1)	1.19	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)
C230094A16Rik	Mm00524591_m1	UP (1)	1.3	RIKEN cDNA C230094A16 gene
Cacna1b	Mm00432226_m1	UP (1)	1.21	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit
Cdc42ep1	Mm00840486_m1	DW (1)	-1.67	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
Cspg6	Mm00484015_m1	UP (1)	1.58	chondroitin sulfate proteoglycan 6

D13Bwg1146e	Mm00712799_m1	UP (1)	1.35	DNA segment, Chr 13, Brigham & Womens Genetics 1146 expressed
D430033N04Rik	Mm00524728_m1	UP (1)	1.14	RIKEN cDNA D430033N04 gene
Ddx1	Mm00506205_m1	UP (1)	1.22	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1
Dek	Mm00662582_m1	UP (1)	1.4	DEK oncogene (DNA binding)
Dlgh2	Mm00457160_m1	UP (1)	1.33	discs, large homolog 2 (Drosophila)
Dmxl2	Mm00555326_m1	UP (1)	1.48	Dmx-like 2
Eml5	Mm00617921_m1	UP (1)	1.61	echinoderm microtubule associated protein like 5
Endog	Mm00468248_m1	DW (1)	-1.72	endonuclease G
Epha4	Mm00433056_m1	UP (1)	1.99	Eph receptor A4
Fign	Mm00517634_m1	UP (1)	1.46	fidgetin
Gabra2	Mm00433435_m1	UP (2)	1.85	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2
Grip1	Mm00503833_m1	UP (1)	1.53	glutamate receptor interacting protein 1
Hsd11b1*	Mm00476182_m1	DW (1)	-1.58	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
Igsf4a	Mm00457551_m1	UP (1)	1.27	immunoglobulin superfamily, member 4A
Kcnd2	Mm00498065_m1	UP (1)	1.49	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2

Lair1	Mm00618113_m1	UP (1)	1.35	leukocyte-associated Ig-like receptor 1
Malt1	Mm00555961_m1	UP (1)	1.51	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
March7	Mm00480418_m1	UP (1)	1.27	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7
Metrnl	Mm00522681_m1	DW (1)	-1.85	meteorin, glial cell differentiation regulator-like
Mtdh	Mm00482588_m1	UP (1)	1.28	Metadherin
Mtpn	Mm00456070_m1	UP (1)	1.28	myotrophin
Ncor1*	Mm00448681_m1	UP (1)	1.22	nuclear receptor co-repressor 1
Ncor1*	Mm00623596_g1	UP (1)	1.42	nuclear receptor co-repressor 1
Nol3	Mm00446066_m1	DW (1)	-1.44	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
Nr2f2	Mm00772789_m1	UP (1)	1.29	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Nucks1	Mm00620696_m1	UP (1)	1.3	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
Odz1	Mm00600053_m1	UP (1)	1.51	odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)
Odz3	Mm00496227_m1	UP (1)	1.61	odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)
Plcb1*	Mm00479987_m1	UP (2)	1.22	phospholipase C, beta 1

Pop5	Mm00503231_m1	DW (1)	-1.78	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family (S. cerevisiae)
Ppargc1a*	Mm00731216_s1	UP(1)	1.22	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
Rnf20	Mm00812895_m1	UP (1)	1.38	ring finger protein 20
Rpe	Mm00481815_m1	UP (1)	1.18	ribulose-5-phosphate-3-epimerase
Sp4	Mm00599719_m1	UP (1)	1.2	trans-acting transcription factor 4
Syt1	Mm00436855_m1	UP (2)	1.56	synaptotagmin I
Tmem10	Mm00463365_m1	DW (1)	-1.66	transmembrane protein 10
Zfp148	Mm00711990_m1	UP (1)	1.49	zinc finger protein 148
Zfp291	Mm00615854_m1	UP (1)	1.38	zinc finger protein 291
Zfp608	Mm00558913_m1	UP (1)	1.38	zinc finger protein 608

*these genes have a role in body weight and eating behavior regulation: Hsd11b1, Orexigenic^{277,278}; Ncor1, PPARG signaling²⁷⁹; Plcb1, PPARG signaling²⁷⁹; Ppargc1a, PPARG signaling²⁷⁹

Table 3. Significant differentially expressed literature-based candidate genes as assessed by Taqman (SAM <0.05 FDR)

Gene Symbol	TaqMan id	TaqMan Fold Change (HT)	Gene_Name	Reference
Adrenergic Receptors				
Adra2a	Mm00845383_s1	-1.35	adrenergic receptor, alpha 2a	280
Adra2b	Mm00477390_s1	3.65	adrenergic receptor, alpha 2b	281
Dopamine Signalling				
Drd3	Mm00432887_m1	1.98	dopamine receptor 3	162,282-284
Drd5	Mm00658653_s1	1.37	dopamine receptor 5	162,282-284
GABA signalling				
Gabra2	Mm00433435_m1	1.85	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2	285-289
Gabra3	Mm00433440_m1	1.33	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 3	285-289
Gabra4	Mm00802631_m1	3.16	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 4	285-289
Gabra5	Mm00621092_m1	1.64	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 5	285-289
Reln	Mm00465200_m1	1.39	reelin	285-289
Hypothalamic fatty acid sensing				
Acadvl	Mm00444296_m1	-1.32	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long	290

			chain	
Acs11	Mm00484217_m1	-1.33	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	290
Fa2h	Mm00626259_m1	-1.47	fatty acid 2-hydroxylase	290
Fasn	Mm00662319_m1	-1.57	fatty acid synthase	291
Anorexia knock-out models				
Crhr1	Mm00432670_m1	-1.52	corticotropin releasing hormone receptor 1	212
Chrm3	Mm00446300_s1	-2.04	cholinergic receptor, muscarinic 3	211
Obesity knock-out models				
Gh	Mm00433590_g1	>10*	growth hormone	292
Lpin1	Mm00550511_m1	-1.33	lipin 1	293
Melanocortin pathway				
Cart	Mm00489086_m1	-1.72	cocaine and amphetamine regulated transcript	294,295
Mc1r	Mm00434851_s1	3.35	melanocortin 1 receptor	296
Mc2r	Mm00434865_s1	2.6	melanocortin 2 receptor	296
Mchr1	Mm00653044_m1	1.32	melanin-concentrating hormone receptor 1	297
Npy2r	Mm00435350_m1	1.72	neuropeptide Y receptor Y2	298
Npy6r	Mm00440546_s1	8.72	neuropeptide Y receptor Y6	298
Neurotrophin signaling				

Cntfr	Mm00516697_m1	-1.31	ciliary neurotrophic factor receptor	201,203,299
Nradd	Mm00509016_g1	1.2	neurotrophin receptor associated death domain	300
Ntf3	Mm00435413_s1	1.59	neurotrophin 3	299
Ntrk3	Mm00456222_m1	1.35	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	300
Pcsk1n	Mm00457410_m1	-1.63	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	201,299
Serotonin				
Slc6a4	Mm00439391_m1	-1.64	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	301

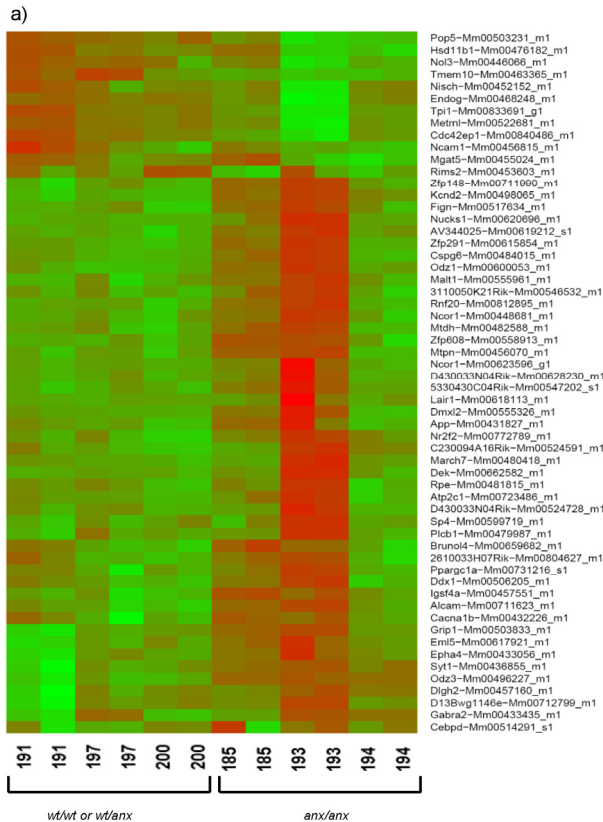
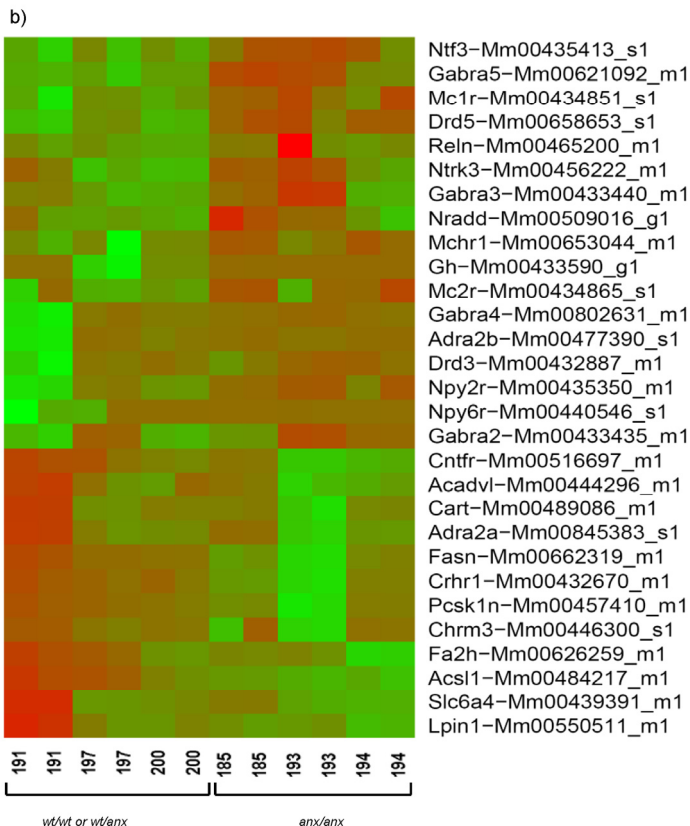


Figure 1. Heatmap of genes showing differential expression above the 1% False Discovery Rate (FDR), by real time PCR using TaqMan low density arrays. SAM test was performed genes selected based on 0.001 FDR in agilent arrays (a), and genes selected based on literature search (b).



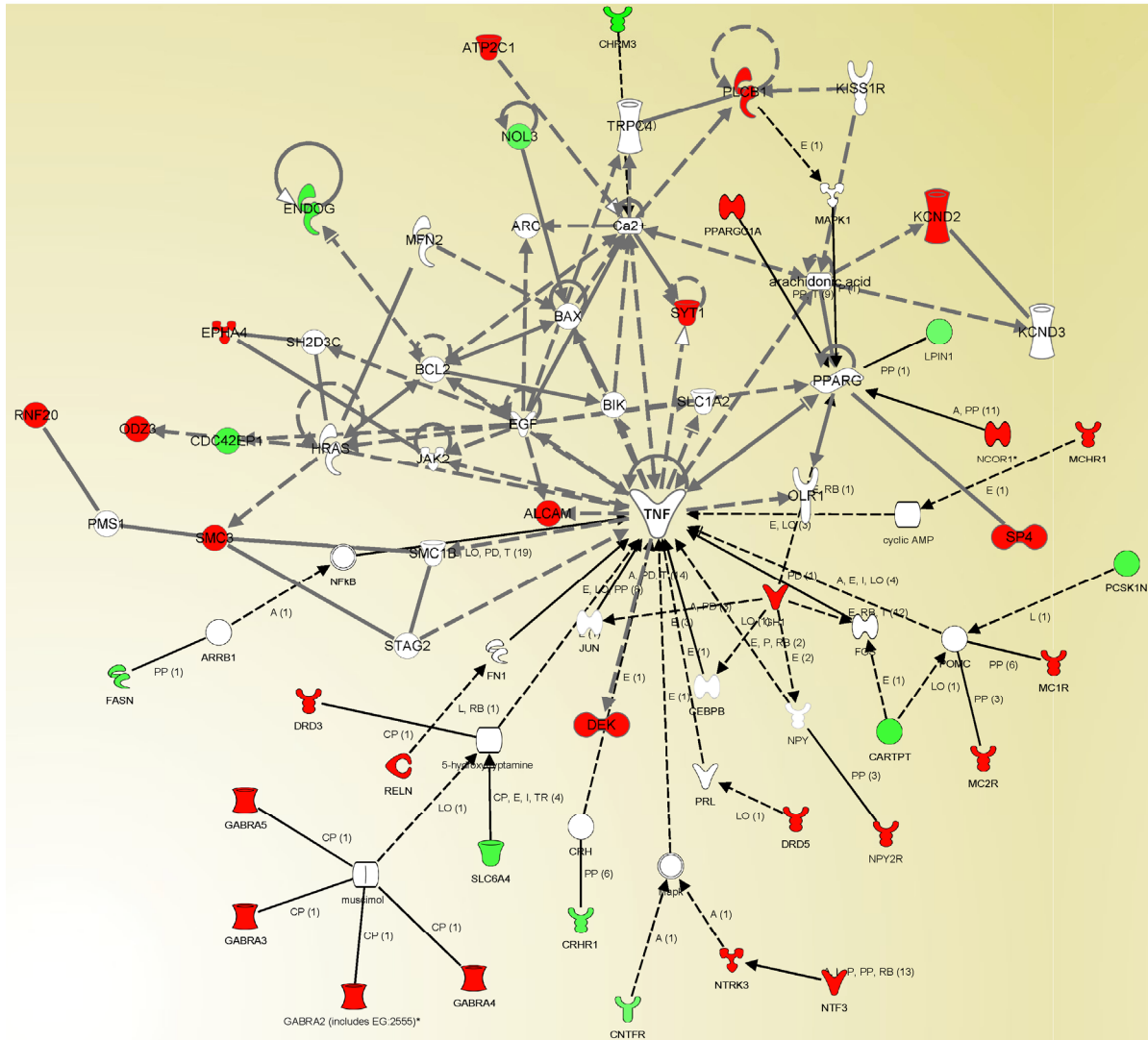


Figure 2. Deregulated genes according to our TaqMan results were enriched in *Cell death, cell morphology and cancer* network genes. Upregulated genes are represented in red, downregulated in green. Genes related to body weight regulation that were selected from the literature and were deregulated in *anx/anx* were linked to this network through literature database search (black lines). ALCAM: activated leukocyte cell adhesion molecule; ARC: activity-regulated cytoskeleton-associated protein; ARRB1: arrestin, beta 1; ATP2C1: ATPase, Ca⁺⁺ transporting, type 2C, member 1; BAX: BCL2-associated X protein; BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2; BIK: BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing); Ca²⁺; CARTPT: CART prepropeptide; CDC42EP1: CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1; CEBPB: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta; CHRM3: cholinergic receptor, muscarinic 3; CNTFR: ciliary neurotrophic factor receptor; CRH: corticotropin releasing hormone; CRHR1: corticotropin releasing hormone receptor 1; cyclic AMP; DEK: DEK oncogene (DNA binding); DRD3: dopamine receptor D3; DRD5: dopamine receptor D5; EGF: epidermal growth factor (beta-urogastrone); ENDOG: endonuclease G; EPHA4: EPH receptor A4; FASN: fatty acid synthase; FN1: fibronectin 1; FOS: v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; GABRA2 (includes EG:2555): gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2; GABRA3: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3; GABRA4: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4; GABRA5: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5; GH1: growth hormone 1; HRAS:

v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog; JAK2: Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase); JUN: jun oncogene; KCND2: potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2; KCND3: potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3; KISS1R: KISS1 receptor; LPIN1: lipin 1; Mapk: Map Kinase, Mapk protein, NGF/EGF DEPENDENT KINASE; MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1; MC1R: melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor); MC2R: melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone); MCHR1: melanin-concentrating hormone receptor 1; MFN2: mitofusin 2; NCOR1: nuclear receptor co-repressor 1; NFkB: NF-KAPPA B; NOL3: nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain); NPY: neuropeptide Y; NPY2R: neuropeptide Y receptor Y2; NTF3: neurotrophin 3; NTRK3: neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3; ODZ3: odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (*Drosophila*); OLR1: oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1; PCSK1N: proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor; PLCB1: phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific); PMS1: PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (*S. cerevisiae*); POMC: proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ beta-lipotropin/ alpha-melanocyte stimulating hormone/ beta-melanocyte stimulating hormone/ beta-endorphin); PPARG: peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PPARGC1A: peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha; PRL: prolactin; RELN: reelin; RNF20: ring finger protein 20; SH2D3C: SH2 domain containing 3C; SLC1A2: solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2; SLC6A4: solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4; SMC1B: structural maintenance of chromosomes 1B; SMC3: structural maintenance of chromosomes 3; SP4: Sp4 transcription factor; STAG2: stromal antigen 2; SYT1: synaptotagmin I; TNF: tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2); TRPC4: transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4

Overabundance of microRNA targets in hypothalamus while scarcity in cortex suggest altered miRISC machinery in anx/anx anorexia mouse.

Mercader JM, González JR, Lozano JJ, Bak M, Kauppinen S, Sumoy L, Dierssen M, Visa J, Gratacòs M, Estivill X

(Article en preparació)

Contribució del doctorand:

- Manteniment de la colònia de ratolins
- Obtenció de les mostres d'RNA
- Anàlisi estadística i bioinformàtica dels resultats
- Participació en la redacció del manuscrit

Overabundance of microRNA targets in hypothalamus while scarcity in cortex suggest altered miRISC machinery in *anx/anx* anorexia mouse.

Josep M Mercader^{1,2}, Juan R González^{3,4}, Juanjo Lozano^{5,6}, Mads Bak⁷, Sakari Kauppinen⁷, Lauro Sumoy⁵, Mara Dierssen^{1,8}, Joana Visa⁹, Xavier Estivill^{1,2,10} and Mònica Gratacòs^{2,1}

¹Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

²CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

³National Center of Genotyping (CEGEN), Barcelona Node, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Center for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

⁵Bioinformatics and Genomics Program, Center for Genomic Regulation (CRG-UPF), Barcelona, Catalonia, Spain

⁶CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 08036 Barcelona, Catalonia, Spain

⁷MicroRNA Research Unit, Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research, Institute of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Denmark

⁸CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

⁹Servei Estabulari, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain

¹⁰Experimental and Health Sciences Department, Pompeu Fabra University, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

ABSTRACT

The anorexia mouse model, *anx/anx*, carries a spontaneous mutation not yet identified and homozygous mutants are characterized by poor appetite, growth failure and abnormal behavior, such as head weaving uncoordinated gait and hyperactivity. In order to detect miRNAs that could be influencing the phenotype of this mouse, and their relationship with the expression of their targets, RNA samples from mutant and wild type hypothalamus and cortex were hybridized to microarray chips based on LNA probes allowing the detection of 279 mouse miRNAs and to Agilent 44k chips to analyze the whole mRNA transcriptome.

We found a highly significant overrepresentation of upregulated mRNAs among predicted miRNA targets in *anx/anx* hypothalamus, which was irrespective of miRNA expression but was lineally dependent on the number of miRNAs that were targeting each mRNA (p trend = 10^{-108}). On the other hand, a highly significant overrepresentation of downregulated mRNAs in *anx/anx* cortex was observed within miRNA targets (Wilcoxon p value $< 10^{-85}$). Our microarray results also point to 10 upregulated miRISC associated genes in hypothalamus, including *Dicer*, and *Dgcr8* and *Fmr1*.

These results put forward to an impairment of miRISC machinery in *anx/anx* mice. Further functional studies and the cloning of the *anx* gene should be done in order to elucidate the causality of miRNA machinery impairment to the *anx/anx* phenotype and to propose this mouse as a model for miRNA research.

Introduction:

anx/anx anorexia mouse model harbors a mutation not yet identified in chromosome 2 close to *Pallidin* gene which entails decreased food intake, growth retardation and emaciated appearance, head weaving, as well as uncoordinated gait, body tremors, and hyperactivity (1, 2). Impairment in the expression of several neuropeptides involved in feeding regulation, such as Pro-opiomelanocortin (POMC), Neuropeptide Y, and cocaine-amphetamine related transcripts in the arcuate nucleus has been described in *anx/anx* mice, together with a general hyperserotonergic activity and altered dopamine signaling which could be related to their motor abnormalities (3-7).

MicroRNAs are non-coding RNAs known to play a role in fine tuning gene expression of approximately one third of mammalian genes, either through translational repression or mRNA degradation (8, 9). Each miRNA can bind to regions in the 3'UTR of hundreds of mRNA genes that have partial complementary to the miRNA (10, 11). A great amount of the miRNAs are expressed in brain, many of them exclusively, and some of them in a very specific space-time manner (12, 13). It is widely accepted that miRNAs are essential for a proper development of the nervous system, as suppression of miRNA function through the ablation of Dicer, a key miRNA processing enzyme, causes embryonic death before neurulation. Moreover, conditional deletion of the same enzyme in postnatal cerebellum or forebrain causes apoptosis of the differentiating neurons, leading to ataxia development (14-16). In addition, several specific miRNAs have been implicated in neuronal differentiation. Some examples are miR-273, which is necessary to specify asymmetry of chemosensory neuron pairs in nematodes, and miR-124 which is highly able to induce and maintain neuronal identity through the suppression of the expression levels of non-neuronal genes (17), and mir-133b which mediates differentiation of dopaminergic neurons (18).

The effect of miRNAs on the levels of their predicted target mRNAs has been demonstrated by several authors (19, 20), either through *in vitro* overexpression of

specific miRNAs or through the analysis of the correlation between the expression of certain miRNAs and their predicted targets. This level of repression has been shown to be comparable to the level of protein downregulation that is caused by a miRNA (21). In addition, the level of downregulation of a given miRNA target has been shown to be lineally dependent on the number of miRNA target sites in the 3' UTR, and also dependent on the conservation of the seed region (10).

Other authors have explored the presence of network motifs between miRNAs and their predicted target mRNAs, showing that miRNAs can be both positive and negatively coregulated with their targets forming what is known as coherent and incoherent feedforward loops(22). In “coherent” feedforward loops (FFL), the miRNA expression is enhanced by upstream factors that repress the expression of the miRNA target gene at the same time. In contrast, in “incoherent” FFL, a common upstream factor induces both the miRNA and the target gene (23).

As we hypothesized that altered miRNA expression could participate in the pathophysiology of the *anx/anx* mice, including the altered feeding behavior and the motor problems, we performed a miRNA profile using a locked nucleic acid (LNA) based microarray in *anx/anx* and wild type hypothalamus, which is the brain area where the main feeding and homeostasis centers are located (24), and in cortex, involved in the cognition and reward layers of eating behavior, and where the primary motor cortex lies (25-27). To test if there was either positive or negative coregulation between the expression of miRNAs and their targets, we hybridized the same RNA to Agilent 44 k mRNA chips and analyzed the relationship between the expression of the miRNAs and that of their predicted targets.

Results

miRNA profiling

Total RNA from hypothalamus and cortex of three *anx/anx* and 3 control male mice was isolated and hybridized to miRNA microarray chips. A total of 16 probes for miRNAs showed upregulation in *anx/anx* hypothalamus at a genome-wide level (False discovery Rate (FDR) = 0.05, mean fold change = 3.74), corresponding to the following 14 miRNAs: miR-103/107 (two probes), miR-140, miR-190, miR-212/132 (two probes), miR-221/222, miR-223, miR-31, miR-324-3p, miR-138, miR-148a/152, miR-199a/199b, miR-217, miR-376b and miR-187 (Figure 1, Suppl Figure 1). Noticeably, the significant overexpression of miR-103/107 and miR-212/132 was achieved by two different probes each. In cortex no statistically differentially expressed miRNAs could be detected.

Data quality control

As some of the miRNAs had more than one probe on the chip, we performed a correlation analysis to evaluate how replicable the results were. A strong correlation was observed (p value = 3.12E-16, r = 0.433), which indicates good reproducibility of our results. In addition, two probes in miR-212/132 and miR-103/107 showed genome-wide significant upregulation, which increases the likelihood of these miRNAs as being upregulated in *anx/anx*.

mRNA microarray:

The same RNA used for the miRNA profiling was hybridized to a 44K Agilent chip as previously described in Mercader et al (28). A subset of genes was selected and the gene expression was quantified using TaqMan low density arrays. The correlation between microarray and TaqMan results was strong with a slope close to 1, ($\beta = 0.8$; r = 0.65; p = 5.6 x 10⁻¹⁷).

Effect of hypothalamus upregulated miRNAs on the expression of their predicted miRNA targets.

We downloaded the miRNA conserved predicted targets for each of the 14 differentially expressed miRNAs from Targetscan 4.1 as it is, to our knowledge, the most robust method for miRNA prediction (11, 21). For each miRNA, the log₂ ratio distribution from the comparison between *anx/anx* and control mice of the mRNAs predicted to be targets was compared to the log₂ ratio distribution of the rest of the mRNAs (non-target mRNAs). Wilcoxon rank sum test p values were derived from this comparison and we performed 1000 random permutations to assess a correction for multiple testing, defining a corrected significant p value when below 0.00335. Among the 14 upregulated miRNAs, 12 showed a positive coregulation with their predicted miRNA targets showing a significant enrichment of upregulated miRNA targets in the 12 cases (p values ranging from 10⁻⁵ to 10⁻¹⁷).

*Enrichment of overexpressed mRNAs within the miRNA targets in the *anx/anx* hypothalamus irrespective of the miRNA expression, while depletion in cortex*

In order to disclose if the difference between the mean expression levels of the targets versus the mean of the non-targets was exclusive of these 14 differentially expressed miRNAs, we repeated the previous analysis calculating the differences between targets and non-targets, but taking into account the complete the set of miRNAs with conserved target prediction in Targetscan database (Version 4.1) (11, 21). A total of 162 conserved miRNA families were represented both in Targetscan database and in the miRNA microarray. For each miRNA, Wilcoxon rank sum test p values were derived from the comparison of the mean log₂ ratio observed within the targets and the mean log₂ ratio of the rest of mRNAs (non-targets). We performed 1000 random permutations to correct for multiple testing, defining a corrected significant p value when below 0.00033. Surprisingly, in *anx/anx* hypothalamus, the targets of 124 out of 162 miRNAs target sets that were analyzed had significantly higher log₂ ratios than their respective non-targets sets (p < 0.00033, by permutation testing; Table 1; Table S1), which indicates that this effect was

independent of the differential expression of the given miRNA. Consequently, we also did the same analysis in cortex, where had not detected any differentially expressed miRNA. 33 out of 162 miRNAs presented significant differences when comparing the targets with respect to the non-targets. In that case, the target genes were more downregulated than the non-targets in all 33 cases (Wilcoxon $p < 0.00034$, by permutation testing; Table S1). Density plots of the log₂ ratio distributions of the targets compared to the non targets for three miRNAs in hypothalamus and cortex are represented in Figure 2.

The expression of the miRNAs did not correlate with the difference between the targets and non-targets, either in hypothalamus or in cortex ($p > 0.05$, Pearson correlation), which discards the involvement of either positive or negative coregulation between the miRNAs and miRNA target genes.

Some genes can have more than one target site for a single and/or several miRNA. It has been demonstrated that several miRNA target sites can act synergistically, enhancing the repressive effect of a single or several miRNA (21). We therefore explore the possibility that the results shown before were dependent on the total number of miRNA target sites contained by each gene. For that, we performed General Linear Model regressions using the number of miRNA sites of each mRNA as a dependent variable (General Linear Model (GLM)) and the log₂ ratios as the independent variable. In hypothalamus, we observed that the mean mRNA log₂ ratio expression increased in a linear manner as the number of miRNA target sites of the mRNA increased ($pTrend = 1.52 \times 10^{-108}$, Figure 3). On the contrary, in cortex, log₂ ratios of all mRNAs with at least one miRNA target site were much lower than log ratios without any target site, although it did not lineally dependent on the number of miRNA target sites (Wilcoxon p value $< 10^{-85}$, $pTrend = 1.91 \times 10^{-10}$; Figure 3). The summary of these results are that, there was an accumulation of mRNAs that are targeted by miRNAs in *anx/anx* hypothalamus, whereas there was a depletion of mRNAs with miRNA targets in *anx/anx* cortex.

miRNA targets are enriched in anx/anx hypothalamus and depleted in anx/anx cortex in a set of TaqMan validated genes

To test the validity obtained using microarray data, we performed the same analysis with a subset of 380 transcripts that were validated using TaqMan low density arrays in a previous report (28), submitted). We found that in hypothalamus, the log₂ratios were lineally dependent on the number of miRNAs (T value = 3.36; p trend = 0.0008) and in cortex log₂ ratios were lower for those mRNAs with at least 1 miRNA target site (Wilcoxon p value = 0.01), which confirmed our results obtained analyzing the microarray data.

Enrichment of upregulated miRISC genes in anx/anx hypothalamus

We then investigated the possibility that there was an alteration in the miRNA induced silencing complex (miRISC) that could explain this excess of miRNA targets in the hypothalamus and the scarcity in the cortex. After being transcribed and processed, mature miRNAs are incorporated into the miRNA-induced silencing complex (miRISC) to target mRNAs based on sequence complementarity in the 3' untranslated regions (UTRs). We tested if there was a deregulation in the expression in a set of genes involved in miRISC complex assembly selected from literature search (29), gene ontology database (GO(30)) and from a dataset of AIN-2 (GW182 homolog) co-immunoprecipitated proteins in *C. elegans* (31). In the last study Zhang, et al. were able to isolate new unknown miRNAs, miRNA targets, and miRISC associated proteins through co-immunoprecipitation with AIN-1 and AIN-2 (GW182 homologs) key components of P-bodies). 25 proteins associated to miRISC formation could be mapped to their mouse orthologs which were represented by 49 probes contained in the Agilent 44k chip. Several of these probes were significantly upregulated below 0.05 FDR in *anx/anx* hypothalamus, including those targeting Dicer, DiGeorge syndrome critical region gene 8 (*Dgcr8*) and Fragile X mental retardation protein (*Fmr1*). In fact, probes 14 out of 49 probes were upregulated below a 0.05 False Discovery Rate (FDR), which was four fold what was expected by chance (14 out of 49 probes vs total

of 3385 total differentially expressed probes out of 41534; $p = 2.7 \times 10^{-6}$; Table 1). Such enrichment was not found in *anx/anx* cortex.

Discussion:

In order to disclose if deregulated miRNA participate in the pathophysiology of the *anx/anx* mouse, characterized by starvation, low body weight, uncoordinated gait and body tremors, we have a genome-wide profiling of miRNAs in the hypothalamus and cortex of *anx/anx* mice and compared it with control littermates. We have identified a total of 14 miRNAs that were upregulated in *anx/anx* hypothalamus. The presented data is really robust, as there was a strong correlation between different probes that map to the same miRNA. In addition, miR-103 and miR-107, which are paralogous miRNAs, and two different probes of miR-212 were both significantly upregulated in *anx/anx* hypothalamus according to our stringent criteria, which gives robustness to our results.

As it is known that miRNAs can form network motifs with their target mRNAs, mainly as feedforward loops (32), we wanted to test the differences on the distribution of mRNA log₂ ratios comparing *anx/anx* vs wild type, depending on if they were predicted to be targeted by miRNAs or not. Surprisingly, we found that in the hypothalamus, most of the miRNA predicted targets were preferentially upregulated in *anx/anx*, irrespectively of the expression of the miRNAs themselves. More strikingly, the log₂ ratio differences observed when comparing *anx/anx* and wild type hypothalamus were lineally dependent on the number of miRNA target sites of each mRNA. In contrast, in cortex, the mRNAs targeted by miRNAs were strongly preferentially downregulated. These results point to a general impairment of the miRNA/target mRNA machinery, probably the miRISC complex, being the consequence an accumulation of mRNAs targeted by miRNAs in the hypothalamus, while there is a depletion of miRNA targets in the cortex region. Of striking interest is the inverse relationship between the two different tissues examined. It seems then, that the miRNA machinery is affected in both tissues, but in a tissue specific manner. The fact that we obtained the same results when analyzing a subset of 380 genes whose expression was analyzed using TaqMan low-density arrays gives more strength to our results.

P-bodies, also known as GW-bodies, are discrete granules localized in the eukaryotic cytoplasm, which are enriched in proteins involved in mRNA translational repression and are known to be expressed in neuronal cells (33). There, translationally repressed mRNAs are bound by specific RNA binding proteins, translational repressors, and motor proteins, and form diverse mRNPs, which are transported along dendrites and axons (34). Recent evidence suggests that there is a link between P-bodies and the function of small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs), as several miRISC complex proteins localize in P-bodies (35-37). Hillebrand et al. propose a model where the mRNAs targeted by miRNAs are translationally repressed while they are transported along the dendrites and axons. When the repressed mRNAs reach the dendrite branch points or the synapse, they can reenter translation, resulting in local protein synthesis, playing a major role in synaptic plasticity (38). Our microarray results suggest that the overabundance of miRNA targets in *anx/anx* hypothalamus is accompanied by an accumulation of miRISC genes, as there is a significant enrichment of several upregulated genes associated to miRISC complex and P-bodies, including *Dicer*, *Dgcr8* and *Fmr1*. This suggests that miRISC complex and P-bodies, coupled with the miRNA targets could be accumulated in the hypothalamus.

The cause of this impairment in miRNA machinery and how it leads to the *anx/anx* phenotype remains to be clarified. Conceivably, as the hypothalamus is a key area for homeostasis, the overabundance of several miRNA targets, including key signaling molecules, could cause a general homeostatic deregulation. In that case, the starvation phenotype would be the most sounded due to its fatal consequences. In fact, accumulation of agouti related protein (*Agrp*), and Neuropeptide Y (*Npy*), two key orexigenic peptides, has been described in *anx/anx* cell bodies of arcuate nucleus, which is located in the hypothalamic area, being suggested by the authors that a deficiency in molecular transport is present in *anx/anx* mice (39). *Agrp* harbors miRNA target sites for miR-331, miR-698, miR-501, whereas *Npy* has miRNA target sites for miR-33, miR-143, miR-381, miR-546 and miR-140.m. It is thus tempting to say that altered miRISC machinery might be recruiting these mRNAs which could lead to the accumulation of these two key

neuropeptides for feeding regulation, causing the anorectic phenotype in the *anx/anx* mice.

The other marked phenotypes that can be observed in *anx/anx* mice are the ataxia and body tremors. The ablation of *Dicer* in brain, which leads to deficiency in miRNAs, can cause neurodegeneration and ataxia. In that sense, the mislocalization of miRNA target genes and the overexpression of miRISC complex genes in hypothalamus (including *Dicer*), could explain the ataxias observed in *anx/anx* mice.

Despite the results are encouraging, this study has several limitations. First, this is an *in silico* analysis and the miRNA-mRNA target interactions have not been validated experimentally as this is a genome wide expression study and it would be technically exhausting to validate all possible miRNA-target sites. However, we chose in our opinion the most robust method for target prediction and, despite a considerable number of expected the false-positive miRNA-target interactions, we still found highly significant differences between the predicted targets and non-predicted targets. Although a validation of the miRNA microarray results with an alternative method is lacking we considered that this was not necessary, as the results described here are independent on the expression of the miRNAs, but on the presence of miRNA target sites. It would be also of interest to check if there was an overload of miRNAs in general in the hypothalamus and paucity in cortex, which would confirm that miRISC complex, including miRNA targets, miRNAs and mRNAs coding for miRISC accumulates in *anx/anx* hypothalamus.

This *in silico* and statistical analysis, which could be applied to other model organisms and microarray data sets, has been useful to detect a very plausible impairment of miRISC machinery in the *anx/anx* mice. It would be of much interest to perform deeper functional studies in order to confirm these results as well as to clone the *anx* mutation, to shed light on the mechanism that causes this specific accumulation of miRNA target genes in *anx/anx* hypothalamus. If the disruption of miRISC complex is confirmed, the *anx/anx* mouse should be considered an interesting model for miRNA research.

Material and Methods

Animals, tissue dissection and sex genotyping

Homozygous anorexia mice were produced from heterozygous breeder pairs (B6C3Fe *a/a-anx/J*) obtained from the Jackson Laboratory. Weanling mice postnatal day 16 housed with parents were separated into two groups: *anx/anx* and control mice. *Anx* mice were identified by their reduced body weight, body tremor, and mild hyperactivity. Because homozygous and heterozygous mice cannot be phenotypically nor genotypically distinguished, control groups probably contained both genotypes. *anx/anx* and control mice were allowed ad libitum access to the mother, food, and water. Three *anx/anx* and three control mice animals were anesthetized with isofluran, decapitated and different brain areas, including hypothalamus and cortex were dissected. Tissues were immediately frozen with liquid nitrogen and stored until the experiments were performed.

RNA was extracted from the tissue using Trizol, following manufacturer's recommendations.

Sex was determined by a simplex PCR assay as described in (40).

Microarray hybridization

Microarray expression profiles were obtained using the 44K Whole Mouse Genome, (ref: G4122A) oligonucleotide platform (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and the RNA labelling and hybridization process was performed following the manufacturer's instructions. Dye swap experiments were performed in order to avoid a bias towards genes that are differentially hybridized when labeled to a particular dye. Fluorescent images were obtained using an Agilent G2565BA scanner. Microarray images were quantified using GenePix 6.0 (Axon) software. Only spots with signal intensities twice above the local background, not saturated and not flagged by GenePix, were considered reliable and used for subsequent analysis. Extracted intensities were subtracted from the

local background and the log₂ ratios were normalized in an intensity-dependent fashion by global lowess.

Microarray validation with TaqMan low density arrays

We used our data published in (28) to assess the correlation between Agilent microarray expression data and the real time TaqMan expression data of several genes that were validated. Pearson correlation was used to assess the significance of the correlation.

miRNA profiling

Microarray analysis was performed as previously described (13). Briefly, LNA-modified oligonucleotide probes (Exiqon) for all mouse microRNAs annotated in miRBase version 7.1 were printed onto Codelink slides (GE Healthcare) using a MicroGrid TAS II arrayer (Biorobotics). Total RNA (4 µg) was 3'end-labeled using T4 RNA ligase and a Cy3-labeled RNA linker (41, 42). Labeled RNA (8µl) was combined with 22 µl hybridization buffer (final concentrations: 4X SSC, 0.1% SDS, 38% formamide, 0.5 µg/µl herring sperm DNA), denatured and hybridized to the microarray for 16-20 hours at 65°C. Post hybridization washes were in 4X SSC at 60°C to remove the coverslip, followed by three times in 2X SSC, 0.025% SDS for 5 min each, three times in 0.8X SSC for 2 min each and two times in 0.4X SSC for 3 min each.

Microarray slides were scanned using an ArrayWorx Biochip Reader (Applied Precision) and scanning images were analyzed using GridGrinder (<http://gridgrinder.sourceforge.net/>).

Target genes were considered as differentially expressed when above 5% false discovery rate (FDR), using significant analysis of microarrays (SAM), setting the Wilcoxon test option for unpaired samples implemented in R (43).

The effect of upregulated miRNA on its predicted targets

All mouse miRNA target predictions were obtained using data from Targetscan 4.1 (<http://www.targetscan.org/>)(11, 21) dataset and only conserved target predictions were used for the analysis. From our miRNA chip, we obtained data and target prediction from a total of 162 miRNAs.

Statistical analysis

For each miRNA we computed the differences of the log₂ ratios observed on all mRNA grouping them as genes having at least one miRNA target and genes having no targets for that miRNA. The p values were derived from Wilcoxon test, also known as Mann-Whitney test as implemented in R software (<http://www.r-project.org/>). In order to correct for multiple testing, we performed 1000 permutations shuffling the expression values. We assessed corrected significant threshold when p below 0.00033, and below 0.00034 for hypothalamus and cortex respectively. We also computed a general linear model to estimate if the differences between targets and non-targets were lineally dependent on the number of miRNA target sites.

Acknowledgements

Financial support was received from the Ministry of Education and Science (SAF2005-01005), the “Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, FIS (PI040632; PI040619), the Department of Health (Generalitat de Catalunya), and the Department of Universities, Research and Information Society (2005SGR00008; 2005SGR 00322) (Generalitat de Catalunya). Josep M. Mercader was supported by the CRG under project SAF2002-00799 (Spanish Ministry of Science and Education), and by fellowship of the Danone Institute. We thank also the support from Genome Spain to the National Genotyping Center (CeGen). We finally thank Ester Saus and Maya Muiños for critically reading the manuscript.

References:

1. Johansen, J.E., Fetissov, S.O., Bergstrom, U., Nilsson, I., Fay, C., Ranscht, B., Hokfelt, T. and Schalling, M. (2007) Evidence for hypothalamic dysregulation in mouse models of anorexia as well as in humans. *Physiol Behav*, **92**, 278-82.
2. Maltais, L.J., Lane, P.W. and Beamer, W.G. (1984) Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *J Hered*, **75**, 468-72.
3. Broberger, C., Johansen, J., Brismar, H., Johansson, C., Schalling, M. and Hokfelt, T. (1999) Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (anx/anx) mouse hypothalamus. *J Neurosci*, **19**, 7130-9.
4. Son, J.H., Baker, H., Park, D.H. and Joh, T.H. (1994) Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopmental mouse mutant, Anorexia (anx). *Brain Res Mol Brain Res*, **25**, 129-34.
5. Johansen, J.E., Teixeira, V.L., Johansson, C., Serrao, P., Berggren, P.O., Soares-Da-Silva, P., Schalling, M. and Bertorello, A.M. (2001) Altered dopaminergic transmission in the anorexic anx/anx mouse striatum. *Neuroreport*, **12**, 2737-41.
6. Jahng, J.W., Houpt, T.A., Kim, S.J., Joh, T.H. and Son, J.H. (1998) Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res*, **790**, 67-73.
7. Johansen, J.E., Broberger, C., Lavebratt, C., Johansson, C., Kuhar, M.J., Hokfelt, T. and Schalling, M. (2000) Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (anx/anx) mouse. *Brain Res Mol Brain Res*, **84**, 97-105.
8. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-97.
9. Rajewsky, N. (2006) microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*, **38 Suppl**, S8-13.
10. Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J. and Burge, C.B. (2007) Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna*, **13**, 1894-910.
11. Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15-20.
12. Kapsimali, M., Kloosterman, W.P., de Bruijn, E., Rosa, F., Plasterk, R.H. and Wilson, S.W. (2007) MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol*, **8**, R173.
13. Bak, M., Silahatoglu, A., Moller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N. and Kauppinen, S. (2008) MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *Rna*, **14**, 432-44.
14. Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, **35**, 215-7.
15. Cuellar, T.L., Davis, T.H., Nelson, P.T., Loeb, G.B., Harfe, B.D., Ullian, E. and McManus, M.T. (2008) Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
16. Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R. and Greengard, P. (2007) Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*, **204**, 1553-8.

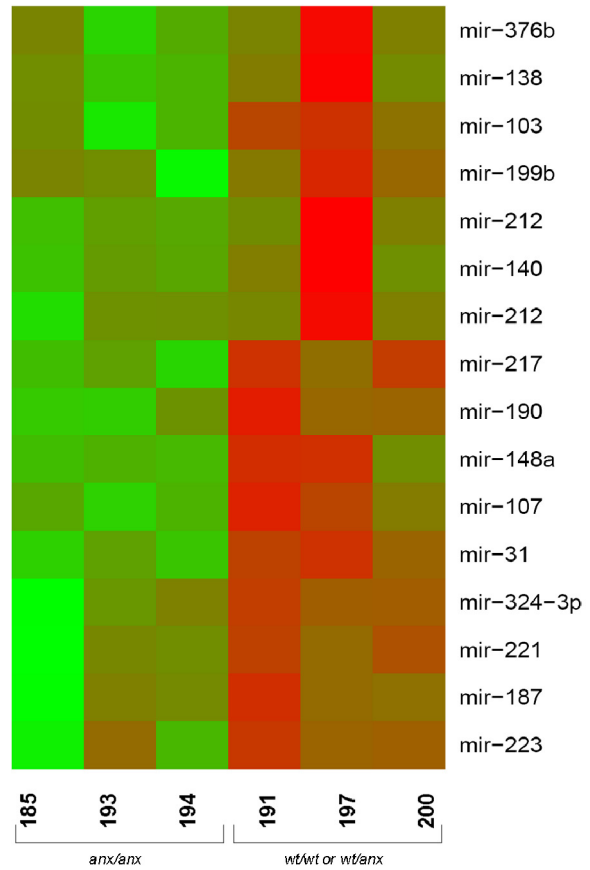
17. Conaco, C., Otto, S., Han, J.J. and Mandel, G. (2006) Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2422-7.
18. Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G. and Abeliovich, A. (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*, **317**, 1220-4.
19. Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-73.
20. Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G. and Rajewsky, N. (2006) Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2746-51.
21. Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P. and Bartel, D.P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**, 91-105.
22. Tsang, J., Zhu, J. and van Oudenaarden, A. (2007) MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Mol Cell*, **26**, 753-67.
23. Alon, U. (2007) Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat Rev Genet*, **8**, 450-61.
24. Stellar, E. (1994) The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev*, **101**, 301-11.
25. Meyer, G. (1987) Forms and spatial arrangement of neurons in the primary motor cortex of man. *J Comp Neurol*, **262**, 402-28.
26. Alonso-Alonso, M. and Pascual-Leone, A. (2007) The right brain hypothesis for obesity. *Jama*, **297**, 1819-22.
27. Simon, S.A., de Araujo, I.E., Gutierrez, R. and Nicolelis, M.A. (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 890-901.
28. Mercader, J.M., Lozano, J., Sumoy, L., Dierssen, M., Gratacòs, M. and Estivill, X. (2008) New differentially expressed brain genes in response to starvation: A comprehensive expression analysis in an anorexia mouse model. *Submitted*.
29. Ding, L. and Han, M. (2007) GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol*, **17**, 411-6.
30. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T. et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, **25**, 25-9.
31. Zhang, L., Ding, L., Cheung, T.H., Dong, M.Q., Chen, J., Sewell, A.K., Liu, X., Yates, J.R., 3rd and Han, M. (2007) Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2. *Mol Cell*, **28**, 598-613.
32. Hornstein, E. and Shomron, N. (2006) Canalization of development by microRNAs. *Nat Genet*, **38 Suppl**, S20-4.
33. Kiebler, M.A. and Bassell, G.J. (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*, **51**, 685-90.
34. Wu, C.W., Zeng, F. and Eberwine, J. (2007) mRNA transport to and translation in neuronal dendrites. *Anal Bioanal Chem*, **387**, 59-62.
35. Parker, R. and Sheth, U. (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, **25**, 635-46.

36. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E. (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 9-22.
37. Jakymiw, A., Pauley, K.M., Li, S., Ikeda, K., Lian, S., Eystathioy, T., Satoh, M., Fritzler, M.J. and Chan, E.K. (2007) The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci*, **120**, 1317-23.
38. Hillebrand, J., Barbee, S.A. and Ramaswami, M. (2007) P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal*, **7**, 178-90.
39. Johansen, J.E., Fetissov, S., Fischer, H., Arvidsson, S., Hokfelt, T. and Schalling, M. (2003) Approaches to anorexia in rodents: focus on the anx/anx mouse. *Eur J Pharmacol*, **480**, 171-6.
40. Clapcote, S.J. and Roder, J.C. (2005) Simplex PCR assay for sex determination in mice. *Biotechniques*, **38**, 702, 704, 706.
41. Cole, K., Truong, V., Barone, D. and McGall, G. (2004) Direct labeling of RNA with multiple biotins allows sensitive expression profiling of acute leukemia class predictor genes. *Nucleic Acids Res*, **32**, e86.
42. Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S. and Plasterk, R.H. (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, **309**, 310-1.
43. Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-21.

Table 1. List of miRISC associated proteins that are differentially expressed in anx/anx hypothalamus (FDR = 0.05).

Agilent Probe ID	Symbol	Name	Fold Change	pValue
A_52_P21659	Pck2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	-1.20	0.0013
A_52_P278085	Pabpc4	Poly(A)-binding protein, cytoplasmic pseudogene	1.13	0.0089
A_51_P119106	Pabpc1	Poly A binding protein, cytoplasmic 1	1.44	0.0005
A_52_P204023	Pabpc1	Poly A binding protein, cytoplasmic 1	1.12	0.0155
A_51_P106114	Nef3	Neurofilament 3, medium	1.16	0.0047
A_51_P378079	Fmr1	Fragile X mental retardation syndrome 1 homolog	1.33	0.0178
A_52_P493091	Fmr1	Fragile X mental retardation syndrome 1 homolog	1.17	0.0008
A_52_P637573	Eif4g3	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	1.15	0.0260
A_51_P180001	Eif2c2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2 (Argonaute homolog)	1.26	0.0015
A_52_P101221	Eif2c2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2 (Argonaute homolog)	1.12	0.0067
A_51_P483059	Dicer1	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)	1.26	0.0009
A_52_P105381	Dgcr8	DiGeorge syndrome critical region gene 8	1.50	0.0461
A_52_P573497	Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	1.34	0.0007
A_52_P35960	Ctsd	Cathepsin D	-1.29	0.0041
A_52_P346774	Atp5a1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	1.37	0.0322
A_52_P116134	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	-1.31	0.0004

Figure 1. Heatmap of miRNAs showing differential expression below 5% False Discovery Rate (FDR). FDR was assessed using SAM test implemented in R, using non parametric Wilcoxon test. Note that paralogous miR-103 and miR-107 are differentially expressed, and that two different probes for miR-212 yield statistically significant results



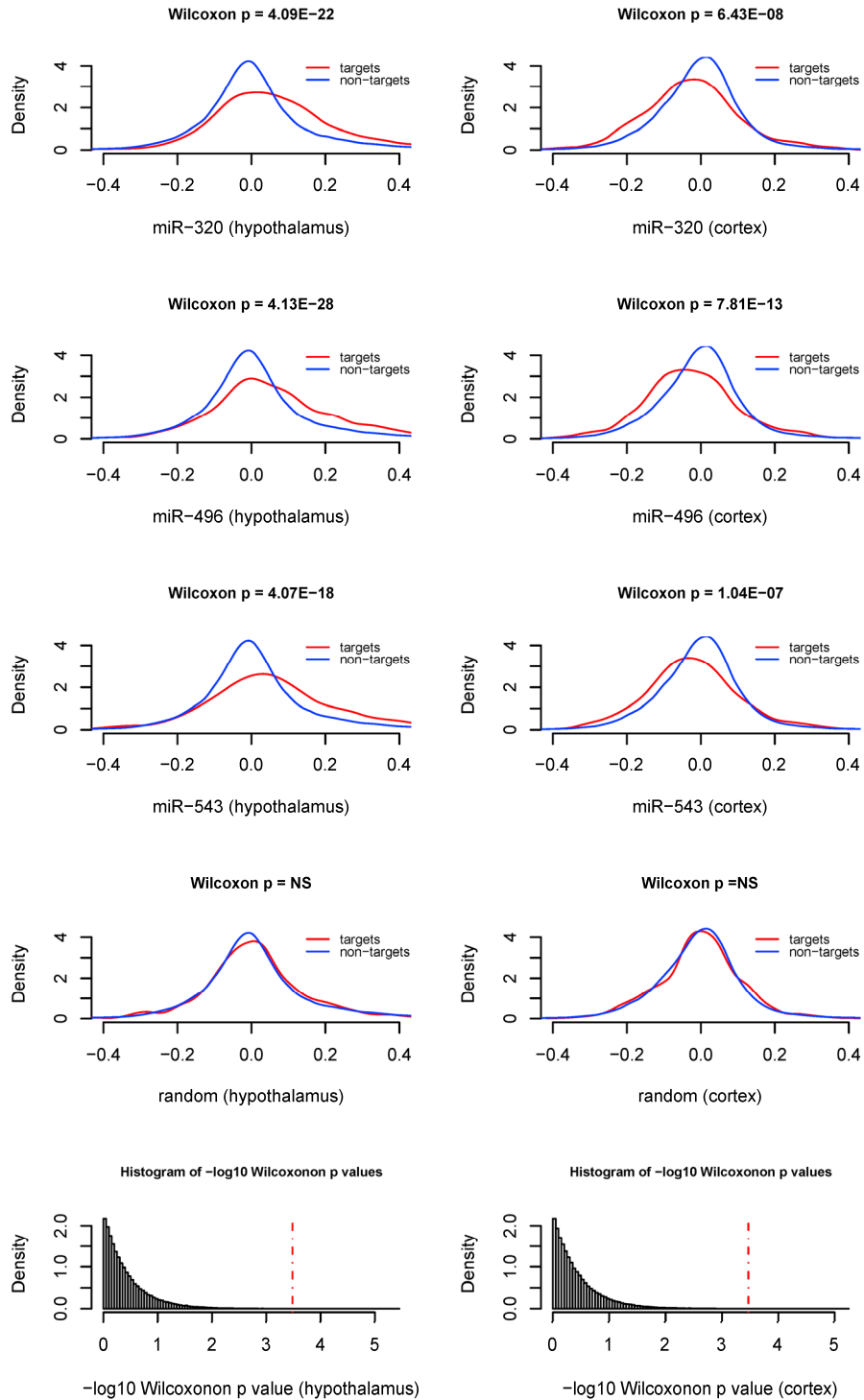


Figure 2. Histogram log₂ ratio density curves for mRNAs probes obtained when comparing the anx/anx vs wild type in hypothalamus and cortex. The red line and the blue line represent the histogram for the predicted targets and non predicted targets, respectively. A representative plot of the results obtained in one of the permutation tests shuffling the location of the targets is also shown. 1000 permutation tests shuffling the expression values were performed in order to asses an empirical corrected significant p value at the level of 0.00033, and 0.00034 for hypothalamus and cortex respectively.

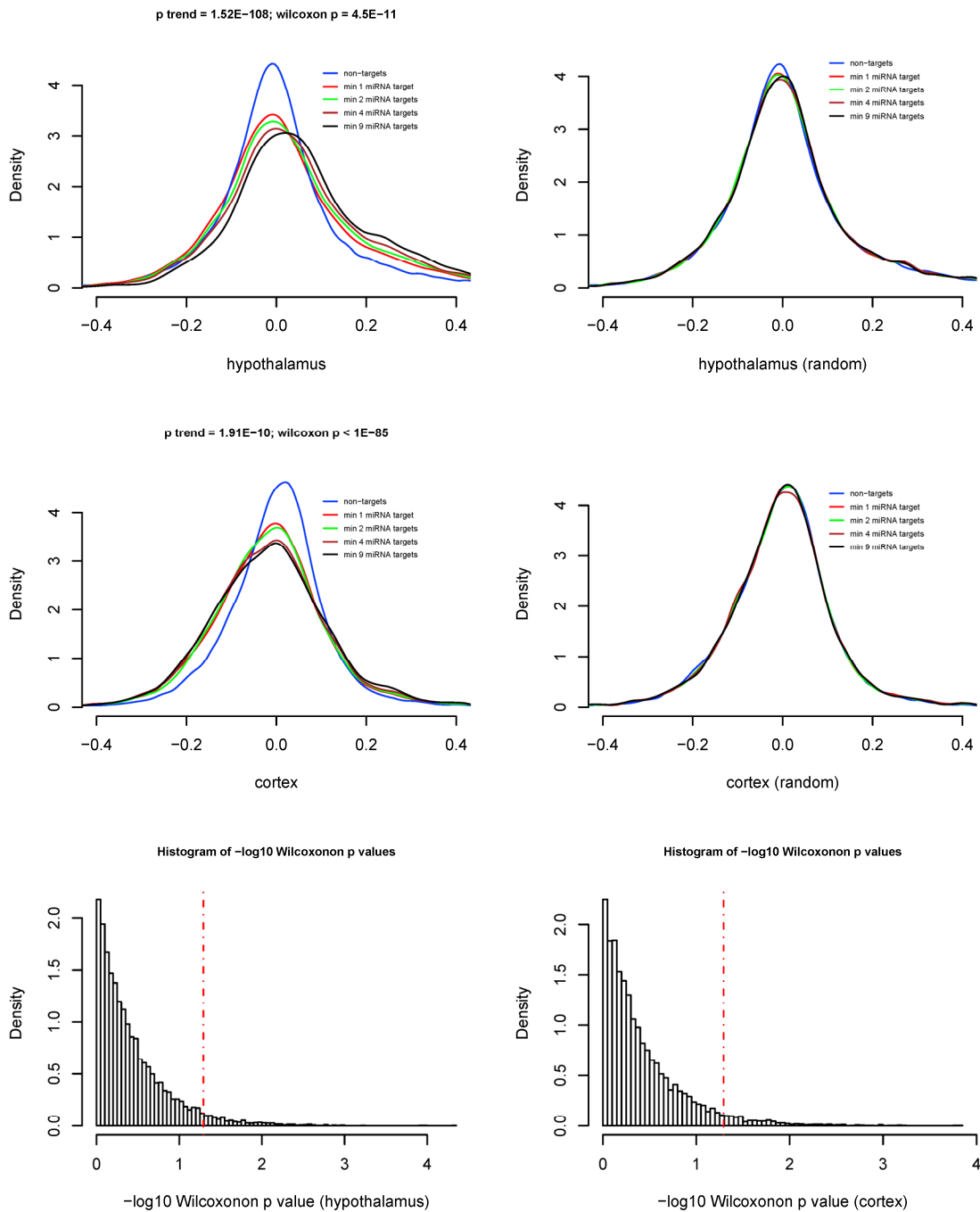


Figure 3. Histogram log2 ratio density curves for mRNAs probes obtained when comparing the *anx/anx* vs wild type in hypothalamus and cortex, according to different minimum number of miRNA target sites contained by the mRNAs. A representative plot of the results obtained in one of the permutation tests shuffling the location of the targets is also shown. 10000 permutation tests shuffling the expression values were performed in order to asses an empirical corrected significant p value at the level of 0.005.

Table S1. HYPOTALAMUS. Mean log2 ratios obtained from the *anx/anx* vs wild type for targets and non-targets of each miRNA. Wilcoxon P and General Linear Model T value and p Trend was calculated. Only miRNAs with significant results are shown.

miRNA-family	num of predicted conserved targets	mean log2 ratio (non-targets)	mean log2 ratio (targets)	dif	Wilcoxon p value	GLM (t.value)	pTrend (GLM)
miR-103-107	697	0.0133	0.0603	0.047	2.0E-10	7.08	1.5E-12
miR-132-212	478	0.0133	0.0795	0.066	1.1E-16	8.40	4.8E-17
miR-138	575	0.0136	0.0493	0.036	2.2E-06	4.80	1.6E-06
miR-140	324	0.0137	0.0595	0.046	2.9E-05	4.78	1.7E-06
miR-148-152	768	0.0132	0.0635	0.050	3.5E-14	8.04	9.5E-16
miR-190	189	0.0135	0.1217	0.108	5.2E-15	8.93	4.6E-19
miR-199	483	0.0136	0.0578	0.044	1.0E-06	5.53	3.2E-08
miR-217	373	0.0134	0.0930	0.080	5.6E-17	8.98	2.9E-19
miR-221-222	421	0.0136	0.0658	0.052	2.8E-07	6.15	7.6E-10
miR-223	319	0.0136	0.0763	0.063	5.4E-10	6.51	7.4E-11
miR-324-3p	290	0.0136	0.0807	0.067	3.6E-09	6.67	2.7E-11
miR-376	257	0.0136	0.0894	0.076	9.3E-12	7.00	2.6E-12
let-7-98	1052	0.0134	0.0431	0.030	5.1E-07	5.49	4.1E-08
miR-1-206	878	0.0132	0.0568	0.044	4.5E-10	7.49	7.1E-14
miR-10	331	0.0137	0.0567	0.043	6.5E-05	4.61	4.0E-06
miR-101	954	0.0129	0.0678	0.055	1.0E-23	9.74	2.1E-22
miR-124-1	1306	0.0132	0.0436	0.030	9.3E-10	6.19	6.1E-10
miR-124-506	1861	0.0130	0.0401	0.027	5.1E-10	6.48	9.1E-11
miR-128	1114	0.0134	0.0427	0.029	4.9E-08	5.52	3.4E-08
miR-129-5p	638	0.0128	0.1067	0.094	5.2E-35	13.67	2.0E-42
miR-130-301	867	0.0132	0.0580	0.045	2.1E-15	7.50	6.5E-14
miR-134	204	0.0138	0.0746	0.061	1.0E-05	4.91	8.9E-07
miR-135	790	0.0130	0.0785	0.066	1.2E-17	10.40	2.7E-25
miR-136	221	0.0138	0.0668	0.053	7.5E-05	4.44	9.1E-06
miR-137	815	0.0132	0.0648	0.052	8.7E-14	8.30	1.1E-16
miR-139	443	0.0135	0.0625	0.049	3.6E-10	6.05	1.5E-09
miR-141-200a	761	0.0133	0.0558	0.043	3.3E-10	6.71	2.0E-11
miR-142-3p	350	0.0136	0.0726	0.059	7.6E-10	6.38	1.8E-10
miR-142-5p	844	0.0134	0.0489	0.036	1.8E-12	5.98	2.2E-09
miR-144	937	0.0129	0.0685	0.056	2.1E-25	9.90	4.5E-23
miR-145	704	0.0133	0.0608	0.048	4.6E-13	7.23	4.9E-13
miR-146	230	0.0136	0.1004	0.087	1.1E-12	7.84	4.7E-15
miR-15-16-195-424-497	1263	0.0134	0.0371	0.024	4.9E-06	4.75	2.1E-06
miR-150	288	0.0138	0.0545	0.041	1.2E-04	3.98	7.0E-05
miR-151	110	0.0137	0.1347	0.121	7.8E-11	7.58	3.6E-14

miR-153	847	0.0129	0.0754	0.062	4.3E-21	10.34	4.9E-25
miR-155	444	0.0136	0.0555	0.042	5.7E-05	5.09	3.6E-07
miR-17-5p-20-93-mr-106-519-d	1236	0.0130	0.0537	0.041	2.5E-15	8.11	5.4E-16
miR-18	247	0.0138	0.0561	0.042	8.6E-06	3.75	1.8E-04
miR-181	1240	0.0127	0.0638	0.051	1.3E-24	10.26	1.1E-24
miR-182	1191	0.0131	0.0510	0.038	1.3E-12	7.47	8.0E-14
miR-183	477	0.0135	0.0624	0.049	4.2E-08	6.25	4.1E-10
miR-185	310	0.0137	0.0550	0.041	1.6E-04	4.11	4.0E-05
miR-186	911	0.0126	0.0876	0.075	9.5E-32	12.94	3.4E-38
miR-188	245	0.0136	0.0971	0.084	1.2E-11	7.76	9.0E-15
miR-19	1194	0.0128	0.0648	0.052	2.6E-20	10.20	2.1E-24
miR-192-215	159	0.0138	0.0704	0.057	3.0E-06	4.14	3.5E-05
miR-193	239	0.0137	0.0765	0.063	2.2E-07	5.68	1.3E-08
miR-194	453	0.0134	0.0753	0.062	1.2E-10	7.63	2.5E-14
miR-196	298	0.0137	0.0614	0.048	1.4E-04	4.74	2.1E-06
miR-200bc-429	1072	0.0131	0.0561	0.043	4.6E-14	8.08	6.9E-16
miR-203-1	780	0.0131	0.0724	0.059	7.2E-19	9.40	5.9E-21
miR-204-211	591	0.0134	0.0623	0.049	7.1E-13	6.95	3.6E-12
miR-205	494	0.0135	0.0642	0.051	5.8E-12	6.53	6.5E-11
miR-208	304	0.0136	0.0774	0.064	5.3E-09	6.41	1.4E-10
miR-21	333	0.0136	0.0721	0.059	9.5E-08	6.18	6.4E-10
miR-216	244	0.0137	0.0765	0.063	1.6E-07	5.63	1.8E-08
miR-218	979	0.0129	0.0685	0.056	8.9E-18	9.75	2.0E-22
miR-219	430	0.0135	0.0679	0.054	1.5E-09	6.51	7.8E-11
miR-224	403	0.0137	0.0430	0.029	7.9E-05	3.43	5.9E-04
miR-23	1085	0.0130	0.0601	0.047	4.6E-14	8.79	1.6E-18
miR-24-	136	0.0138	0.0738	0.060	3.4E-05	3.96	7.6E-05
miR-25-32-92-363-367	1002	0.0132	0.0547	0.042	1.1E-15	7.49	6.8E-14
miR-26	1077	0.0129	0.0651	0.052	5.4E-19	9.77	1.6E-22
miR-27	1310	0.0132	0.0427	0.030	1.3E-08	6.09	1.1E-09
miR-29	1131	0.0133	0.0443	0.031	5.4E-08	5.81	6.3E-09
miR-299-5p	376	0.0134	0.0920	0.079	1.8E-13	8.88	7.1E-19
miR-30-3p	564	0.0132	0.0840	0.071	4.2E-18	9.42	4.7E-21
miR-30-5p	1545	0.0123	0.0660	0.054	8.5E-29	11.97	5.7E-33
miR-320	849	0.0130	0.0689	0.056	4.1E-22	9.32	1.2E-20
miR-323	917	0.0131	0.0641	0.051	1.3E-14	8.83	1.1E-18
miR-324-5p	185	0.0138	0.0747	0.061	1.1E-05	4.85	1.2E-06
miR-325	88	0.0138	0.1238	0.110	9.6E-06	5.71	1.1E-08
miR-329	391	0.0133	0.1037	0.090	9.3E-18	9.95	2.7E-23
miR-33	464	0.0132	0.0896	0.076	1.1E-21	9.71	2.8E-22

miR-330	710	0.0131	0.0760	0.063	3.9E-17	9.53	1.6E-21
miR-335	305	0.0136	0.0795	0.066	2.5E-08	6.64	3.2E-11
miR-338	347	0.0137	0.0512	0.037	4.4E-07	3.88	1.0E-04
miR-339	236	0.0137	0.0807	0.067	2.0E-06	5.92	3.3E-09
miR-34-449	665	0.0135	0.0523	0.039	1.5E-05	5.78	7.6E-09
miR-34b	430	0.0135	0.0666	0.053	2.3E-07	6.30	3.0E-10
miR-362	218	0.0137	0.0783	0.065	2.4E-04	5.45	5.0E-08
miR-363	283	0.0135	0.1057	0.092	7.5E-16	8.96	3.2E-19
miR-369-3p	731	0.0131	0.0736	0.061	8.9E-20	9.29	1.6E-20
miR-374	717	0.0130	0.0835	0.071	3.9E-24	10.77	4.9E-27
miR-375	354	0.0137	0.0569	0.043	1.7E-06	4.62	3.8E-06
miR-376c	282	0.0135	0.0960	0.083	1.3E-12	8.08	6.5E-16
miR-377	497	0.0134	0.0754	0.062	4.5E-16	7.95	1.9E-15
miR-378	604	0.0134	0.0666	0.053	9.0E-12	7.43	1.1E-13
miR-378-	179	0.0138	0.0786	0.065	4.2E-07	4.89	1.0E-06
miR-379	118	0.0139	0.0739	0.060	8.3E-06	3.70	2.1E-04
miR-380-5p	101	0.0139	0.0728	0.059	1.9E-04	3.44	5.9E-04
miR-381	1152	0.0124	0.0801	0.068	1.4E-29	13.13	2.6E-39
miR-382	197	0.0136	0.1069	0.093	3.2E-14	7.81	5.9E-15
miR-383	160	0.0138	0.0806	0.067	7.1E-08	4.96	7.1E-07
miR-384	371	0.0134	0.0838	0.070	4.9E-14	7.91	2.6E-15
miR-409-3p	389	0.0136	0.0602	0.047	7.9E-08	5.35	8.8E-08
miR-410	914	0.0130	0.0663	0.053	4.5E-18	9.34	1.1E-20
miR-421	148	0.0139	0.0583	0.044	6.6E-05	3.04	2.4E-03
miR-431	164	0.0138	0.0855	0.072	9.9E-07	5.25	1.6E-07
miR-433-3p	325	0.0136	0.0737	0.060	8.9E-11	6.25	4.1E-10
miR-448	817	0.0130	0.0734	0.060	2.1E-25	9.91	4.1E-23
miR-450	347	0.0133	0.1071	0.094	5.3E-17	9.96	2.4E-23
miR-452	315	0.0136	0.0745	0.061	1.6E-07	6.29	3.2E-10
miR-455	224	0.0137	0.0802	0.067	1.4E-10	5.87	4.4E-09
miR-485-3p	352	0.0135	0.0935	0.080	1.3E-15	8.36	6.5E-17
miR-486	168	0.0136	0.1271	0.114	1.4E-13	8.36	6.3E-17
miR-490	189	0.0138	0.0781	0.064	6.5E-08	5.01	5.6E-07
miR-493-5p	933	0.0126	0.0857	0.073	2.2E-31	13.07	5.9E-39
miR-494	539	0.0133	0.0809	0.068	6.2E-18	9.03	1.7E-19
miR-495	1063	0.0127	0.0748	0.062	2.0E-26	11.44	2.8E-30
miR-496	1169	0.0126	0.0717	0.059	4.1E-28	11.70	1.4E-31
miR-499	359	0.0136	0.0694	0.056	1.3E-08	6.03	1.7E-09
miR-500	246	0.0137	0.0780	0.064	2.6E-08	5.78	7.6E-09
miR-503	520	0.0136	0.0493	0.036	1.4E-06	4.61	4.0E-06
miR-504	199	0.0138	0.0679	0.054	4.0E-05	4.33	1.5E-05
miR-505	505	0.0133	0.0879	0.075	5.6E-20	9.46	3.1E-21

Resultats

miR-539	692	0.0130	0.0842	0.071	5.0E-15	10.59	3.8E-26
miR-542-3p	331	0.0137	0.0584	0.045	2.5E-06	4.71	2.4E-06
miR-543	815	0.0130	0.0708	0.058	4.1E-18	9.41	5.4E-21
miR-544	475	0.0134	0.0769	0.064	1.4E-14	7.83	4.9E-15
miR-7	490	0.0136	0.0611	0.048	1.2E-08	5.80	6.5E-09
miR-93-hd-291-3p-294-295-302-372-373-520	746	0.0133	0.0603	0.047	1.6E-10	7.19	6.6E-13
miR-96	1207	0.0135	0.0330	0.019	1.1E-04	3.87	1.1E-04
SUM_ALL (total number of miRNA targets per mRNA)*	12658	0.0104	0.0251	0.015	4.6E-11	22.20	1.5E-108

***total number of genes with at least one predicted target. For the GLM model the number of target sites in each mRNA was used as dependent variable.**

Table S2. CORTEX. Mean log2 ratios obtained from the *anx/anx* vs wild type for targets and non-targets of each miRNA- Wilcoxon P and General Linear Model T value and p Trend was calculated. Only miRNAs with significant results are shown.

miRNA-family	num of predicted conserved targets	mean log2 ratio (non-targets)	mean log2 ratio (targets)	dif	Wilcoxon p value	GLM (t.value)	pTrend (GLM)
miR-217	373	-0.0053	-0.0189	-0.0136	2.1E-04	-2.00	4.5E-02
miR-1-206	878	-0.0050	-0.0283	-0.0233	1.1E-10	-5.24	1.6E-07
miR-101	954	-0.0051	-0.0198	-0.0147	2.3E-04	-3.40	6.6E-04
miR-124-1	1306	-0.0048	-0.0271	-0.0223	2.2E-10	-5.95	2.6E-09
miR-124-506	1861	-0.0049	-0.0171	-0.0122	3.7E-06	-3.82	1.4E-04
miR-128	1114	-0.0051	-0.0177	-0.0126	2.3E-04	-3.11	1.9E-03
miR-137	815	-0.0051	-0.0233	-0.0182	2.2E-05	-3.82	1.3E-04
miR-142-5p	844	-0.0049	-0.0313	-0.0264	6.1E-08	-5.81	6.4E-09
miR-144	937	-0.0051	-0.0185	-0.0134	3.1E-04	-3.12	1.8E-03
miR-15-16-195-424-497	1263	-0.0050	-0.0214	-0.0164	4.1E-07	-4.31	1.6E-05
miR-155	444	-0.0051	-0.0366	-0.0315	1.7E-07	-5.00	5.7E-07
miR-181	1240	-0.0050	-0.0212	-0.0162	3.4E-05	-4.26	2.1E-05
miR-182	1191	-0.0051	-0.0166	-0.0115	1.7E-04	-2.97	3.0E-03
miR-186	911	-0.0051	-0.0224	-0.0174	2.8E-06	-3.91	9.2E-05
miR-200bc-429	1072	-0.0049	-0.0263	-0.0214	2.5E-09	-5.24	1.6E-07
miR-203-1	780	-0.0051	-0.0263	-0.0212	7.5E-08	-4.39	1.1E-05
miR-21	333	-0.0052	-0.0339	-0.0287	1.1E-05	-3.97	7.3E-05
miR-224	403	-0.0051	-0.0340	-0.0289	3.5E-06	-4.44	9.2E-06
miR-23	1085	-0.0050	-0.0228	-0.0178	5.7E-06	-4.33	1.5E-05
miR-26	1077	-0.0051	-0.0198	-0.0147	1.5E-05	-3.59	3.3E-04
miR-320	849	-0.0050	-0.0271	-0.0221	6.4E-08	-4.81	1.5E-06
miR-323	917	-0.0051	-0.0221	-0.0171	7.3E-06	-3.86	1.2E-04
miR-365	302	-0.0052	-0.0380	-0.0328	8.3E-06	-4.38	1.2E-05
miR-381	1152	-0.0050	-0.0196	-0.0146	1.4E-05	-3.69	2.3E-04
miR-409-3p	389	-0.0052	-0.0301	-0.0249	3.1E-05	-3.74	1.8E-04
miR-490	189	-0.0053	-0.0372	-0.0320	1.1E-04	-3.25	1.1E-03
miR-494	539	-0.0052	-0.0218	-0.0166	1.6E-04	-2.90	3.8E-03
miR-495	1063	-0.0051	-0.0198	-0.0148	5.4E-05	-3.55	3.9E-04
miR-496	1169	-0.0049	-0.0260	-0.0211	7.8E-13	-5.46	4.8E-08
miR-543	815	-0.0049	-0.0312	-0.0263	1.0E-07	-5.60	2.1E-08
miR-544	475	-0.0052	-0.0235	-0.0183	2.1E-04	-2.95	3.2E-03
miR-9	1406	-0.0049	-0.0214	-0.0165	2.7E-08	-4.62	3.8E-06
miR-96	1207	-0.0050	-0.0187	-0.0137	6.0E-06	-3.57	3.6E-04
SUM_ALL (total number of miRNA targets per mRNA)	12658*	-0.0006	-0.0201	-0.0195	<10 ⁻⁸⁵	-6.37	1.9E-10

*total number of genes with at least one predicted target. For the GLM model the number of target sites in each mRNA was used as dependent variable

4. Material i Mètodes

En aquest capítol es descriuen els materials i mètodes utilitzats dels treballs que no s'han sotmès a publicació.

Material i Mètodes. Estudi de la sobreexpressió les dues variants del polimorfisme Val66Met de *BDNF* dirigida pel promotor *Thy-1*

Disseny i Desenvolupament de la construcció

El cDNA de dos pacients, un homozigot Val66/Val66, i un homozigot Met66/Met66 va ser amplificat per PCR amb els següents encebadors amb extrems específics per generar un lloc diana per l'enzim de restricció *XhoI* en l'amplicó: 5'-CCGCTCGAGCGGCAGTTC-CACCAGGTGAGAAGAG-3' i 5'-CCGCTCGAGCGGGTCTCAATATAATCTAATCTATACAAC-3'. Aquests fragments van ser clonats en un vector pGEM®-T (Promega) i transformats en cèl·lules competents JM109 (Promega). Un cop amplificats els plasmidis, els DNAs es van aïllar per un procediment estàndard de miniprep, es van linealitzar i es van clonar al lloc *XhoI* d'un fragment del gen *Thy-1* que inclou els exons 1a, 1b, 2, i 4 del gen murí en un plasmidi pUC18//*PvuI*, cedit pel Dr. Moechars²⁶⁸ (Figura 1). Els plasmidis resultants, designats Thy1-Val-*BDNF* o Thy1-Met-*BDNF*, en funció de si contenien l'al·lel Val66 o el Met66, es van reseqüenciar amb encebadors específics en un seqüenciador automatitzat 3730XL DNA Analyzer) (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'anàlisi de la seqüència nucleotídica va confirmar l'absència de mutacions i la correcta orientació del constructe.

Els ratolins transgènics van ser generats mitjançant microinjecció del DNA linealitzat en oòcits fecundats i la transferència dels embrions microinjectats a ratolines en un rerefons genètic híbrid B6XCBAF es va dur a terme en la Unitat de Transgènesi del Centre de Regulació Genòmica (CRG). La presència del transgen en els fundadors es va testar mitjançant PCR amb encebadors específics de la regió murina del gen *Thy1* i el fragment de *BDNF* humà clonat en els l'inserts Thy1-Val-*BDNF* o Thy1-Met-*BDNF*, que amplifiquen el fragment d'unió del promotor *Thy1* amb l'insert de *BDNF* humà: 5'-ATTGGCTGGCGATTTCATAAG-3' i 5'-CAGAAGCAGCCCTGGAATAA-3'. Com a control positiu de la PCR es va utilitzar l'amplificació d'una regió ultraconservada del genoma de ratolí: 5'-GAAAGTCTTCACTTTTCCCCTTT-3' i 5'-GCCTTCAGATTCTTCCCAGA-3'.

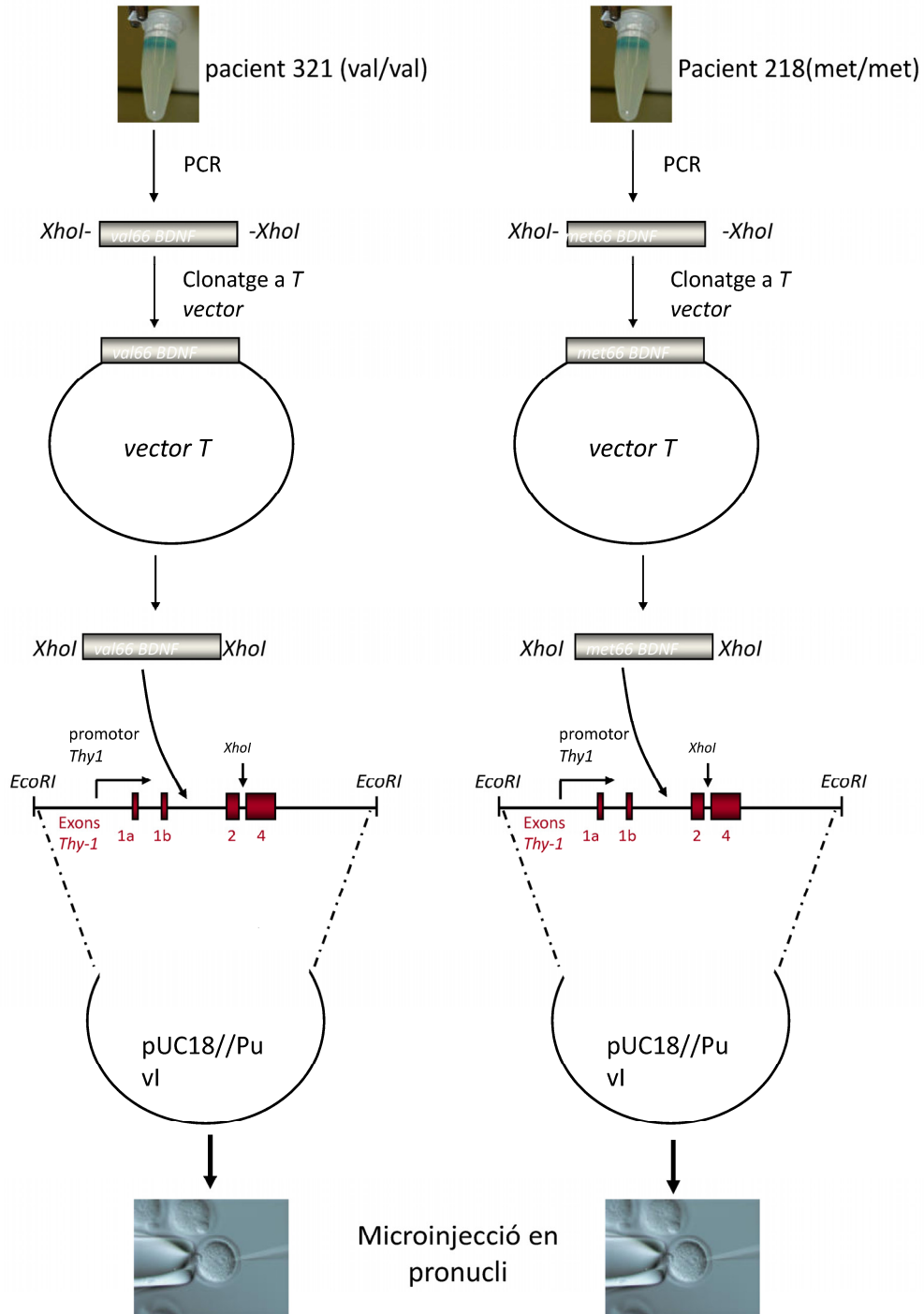


Figura 1. Estratègia d'inserció del cDNA de BDNF en les dues variants del polimorfisme Val66Met sota la direcció del promotor Thy1.

Anàlisi de l'expressió del transgen

Per a l'anàlisi de l'expressió del transgen es va extreure RNA total d'homogenat de cervell utilitzant Trizol (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant. Després d'un tractament amb DNAsa (Ambion, inc, Applied Biosystems), es va retrotranscriure l'RNA total mitjançant el kit de retrotranscripció *High Capacity Archive kit* (Applied Biosystems) basat en encebadors aleatoris i transcriptasa reversa. Els encebadors utilitzats van ser 5'-ATTGGCTGGCGATTCATAAG-3' i 5'-CAGAAGCAGCCCTGGAATAA-3' per a l'expressió del transgen, i encebadors específics del gen Ubiquitin-like 4 (*Ubl14*) 5'-GGCAGCTGATCTC-CAAAGTCCTGG-3' i 5'-AACGTCGATGTCATCCAGTGTTA-3' com a control positiu i per descartar l'amplificació de DNA genòmic, ja que permet diferenciar els amplicons de DNA genòmic dels de mRNA per la mida del fragment.

Caracterització fenotípica

L'anàlisi del fenotip dels models murins es va realitzar a la Unitat de Fenotipació de l'estabulari de l'Institut de Recerca Oncològica. Començant als dos dies d'edat, els nounats es van examinar diàriament per tal d'avaluar el desenvolupament psicomotor a través d'una bateria de proves neurològiques i sensoriomotors. Les cries de ratolí es van enretirar, es van pesar i es va mesurar la longitud del cos i la cua per a obtenir una corba de pes ponderal i somàtic. La valoració del desenvolupament es va realitzar en cries d'ambdós sexes mitjançant el registre diari de l'adquisició de fites pròpies del desenvolupament murí, com l'aparició de determinats trets fenotípics i respostes motores. Es van registrar els següents trets: presència de pèl, obertura ocular bilateral, obertura dels conductes auditius i erupció dels incisius superiors. Es va registrar també l'aparició dels següents reflexes: reflex de volteig, reflex d'aversion a la caiguda, reflex de prensió de les extremitats anteriors/posteriors, reflex d'estremiment al bufar-los el morro, sensibilitat dels bigotis, reflexe de geotàxia negativa, reflexe d'orientació a l'estímul tàctil. Finalment, per a avaluar el desenvolupament neuromotor, els animals van ser enregistrats a les edats post-natals PD6, PD8, P10 i P12 amb una càmera de vídeo digital (Sony Handycam DCR-

HC19E) i els arxius van ser posteriorment editats amb el programa Pinnacle Studio (<http://www.pinnaclesys.com/>).

Material i Mètodes. Mapatge i cribatge mutacional en *anx/anx*

Els ratolins homozigots per la mutació *anx* es van obtenir d'una colònia originada de 13 parelles heterozigotes obtingudes dels laboratoris de Jackson (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) (Figura 5). Els animals anorèxics es van distingir dels normals per la seva pèrdua significativa de pes, marxa descoordinada i tremolor, que són evidents a partir del novè dia del seu naixement, aproximadament. D'un total de 351 descendents, 87 es van classificar com a homozigots, coincidint amb el 25% aproximat que s'espera si la transmissió de la mutació a la descendència és la correcta sota herència recessiva.

Extracció de DNA i genotipació de marcadors microsatèl·lits

Es van genotipar 14 marcadors microsatèl·lits en un total de 351 descendents de 13 parelles d'heterozigots (B6C3Fe-*anxA/+a*) obtingudes dels laboratoris de Jackson (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) (Taula 1, Figura 1).

El DNA de tots 351 descendents es va extreure del teixit de 5 mm de l'extrem de la cua. El teixit va ser digerit amb proteïnasa K durant 24 hores i el DNA va ser extret mitjançant un procés automatitzat basat en la unió a boles magnètiques (Chemagen AG; Baesweiler, Germany). Els marcadors microsatèl·lits es van seleccionar de la base de dades de Mouse Genome Informatics (MGI, DMit Markers) i de repeticions de tetranucleòtids polimòrfiques obtingudes de la base de dades del Genome Browser (www.genome.ucsc.edu). Es van seleccionar 14 marcadors amb una separació mitjana entre ells de 1.6 Mb i cobrint una regió d'aproximadament 27 Mb al voltant del *locus Pldn* (Taula 1). Els fragments es van amplificar per PCR amb un dels dos encebadors marcat amb fluorescència, i el producte es va resoldre en un seqüenciador capil·lar automàtic 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), amb el marcador de tamany ABI ROX-500. L'anàlisi dels resultats es va dur a terme amb el software ABI Genescan 3.0. (Applied Biosystems).

Taula 1. Marcadors microsatèl·lits, posició genòmica i encebadors utilitzats

Marcador	posició genòmica (Mb)	encebador fw	encebador rev	Mida del fragment (bp)	Tª anellament (°C)
D2Mit221	chr2:94.2	5'-ACATTCCATTGTGTACAAGTGTCC-3'	5'-GAGTCTAACACTGAGTACCAATCAGC-3'	130	60
D2Mit184	chr2:99.2	5'-TGCCCTAAAACCTTAATTTACTTAACA-3'	5'-TCTTACAATATCACTAGCAAGTGAACA-3'	136	58.5
D2Mit163	chr2:111.0	5'-TCCAGTGATATCTTATTGCTACA-3'	5'-TGACTGTATCACTCATGCATTCC-3'	127	60
D2Mit101	chr2:114.8	5'-ATAATTCCTGATTTGCTGTTTG-3'	5'-ACATGAAGCCTAGAGGGTGC-3'	190	59.3
TX118	chr2:117.6	5'-TGTACCAGTGACAGCCTCTGA-3'	5'-TCCAAGGACATTGCTTAGCC-3'	390	59.8
D2Mit484	chr2:118.3	5'-AAAAGTGCACGCAGGTACTC-3'	5'-GGTAAGCAGCATGACTGGGT-3'	175	59.8
D2Mit444	chr2:118.5	5'-AGGAGTGGTAAGCATGGTGG-3'	5'-TGCTGCAGGGAGGTAACAG-3'	112	60
(rs27438733)*	chr2:119.1	5'-TTCATGTGCCCTTGAACAAA-3'	5'-GGCAGGTGTTTATGCCAGT-3'	204	60
Tx119	chr2:119.1	5'-GAGCTACACTTCAGAATCCCTATCA-3'	5'-CTGGGTTTGAATCCCTCTG-3'	246	61
D2Mit395	chr2:119.3	5'-AGGTGAGCCTGGACTATATGG-3'	5'-AGCATCCATGGGATAATGGT-3'	125	58.5
Tx119.7	chr2:119.8	5'-GAGTTTGAGGCCAGAACAGC-3'	5'-GAAACTACATCATCCAAACTCC-3'	240	60
Tx120.17	chr2:120.3	5'-TGTGTGTGACCCATCTGTCC-3'	5'-TCTGTGGGTTGTGCTTTTG-3'	299	60
Tx120.7	chr2:120.7	5'-AGGTGACTGAAGCCAGTCT-3'	5'-AGCCAGGGCTACACAGAGAA-3'	252	60
D2Mit134	chr2:121.1	5'-AGATCTCTGTGAGTCTCAGGCC-3'	5'-GAAGAACACAGTCCTTGATCCC-3'	204	60

*correspon a l'SNP trobat en la reseqüenciació del gen *Ppp1r14d*

Anàlisi de lligament genètic

Per fer l'anàlisi de lligament a dos i a múltiples punts, tant paramètric (LOD) com no paramètric (NPL), es va fer servir el programa Genehunter³⁰², considerant freqüències al·lèliques iguals per a tots els marcadors. Es va utilitzar el programa Webprelink (<http://linkage.rockefeller.edu/cgi-bin/webprelink.cgi>) per preparar l'arxiu que ha de contenir els paràmetres d'herència dels marcadors.

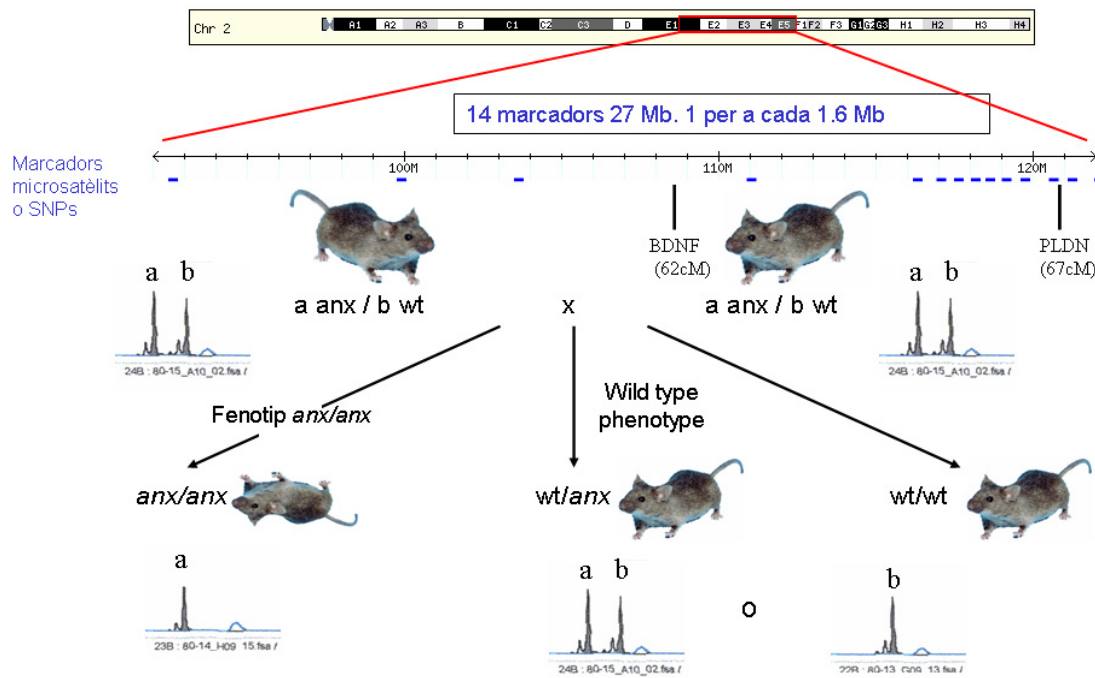


Figura 1. Esquema de l'estratègia utilitzada per al mapatge de la mutació *anx* en el cromosoma 2 de ratolí mitjançant lligament genètic.

La penetració i les freqüències al·lèliques es van ajustar per a obtenir una prevalença de l'al·lel malaltia del 0.1% i no es va permetre la presència de mutació *de novo*, però sí les fenocòpies per tal de tenir en compte possibles errors de fenotipació. Finalment, els factors de penetració utilitzats van ser: dd = 0.0; Dd = 0.05 i DD = 0.95.

Cribatge Mutacional

Per al cribatge mutacional dels gens *Bdnf* i *Ppp1r14d*, es van estudiar quatre animals homozigots, dos animals no afectes (heterozigots o wt) i cinc portadors de la mutació en heterozigosi. Com a referència es va utilitzar la seqüència genòmica anotada a la base de dades NCBI (NM_007540 i NM_028104, respectivament).

Els encebadors per tal d'amplificar fragments d'entre 300 i 600 parells de bases que compreguessin els sis exons descrits del gen *Bdnf* i els cinc exons descrits de *Ppp1r14d* es van dissenyar amb l'aplicació web del programa Primer 3

(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Taula 4). En total es van amplificar per PCR 15 fragments, que es van purificar fent servir Montage SEQ96 Cleanup Kit (Millipore, Bedford, MA). Uns 3-5 µl dels productes purificats es van seqüenciar bidireccionalment amb els encebadors detallats a la taula 4 afegint 1 µl de BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un seqüenciador automàtic ABI Prism 3730 DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Els cromatogrames es van analitzar en el software Vector NTI, (Informax, versió 9.0.0) i les seqüències es van comparar amb el software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Taula 2. Encebadors i primers utilitzats per a amplificar les regions transcrites del gen *Bdnf* (a), i *Ppp1r14d* (b)

a) *Bdnf*

Regió gènica	Encebador fw	Encebador rev	Mida del fragment	T ^a d'anellament
Exó 1a	5'-GCTGCGCTTTCTGGTATTC-3'	5'-AACGCCCTCATTCTGAGAGA-3'	407	60.0
Exó 1b	5'-TAGCAGGGCAATTGGACAGT-3'	5'-GGCAACATGTCAAGATTTTCA-3'	403	60.5
Exó 2	5'-CGATCCTCGATGGATAGTTCTT-3'	5'-CTTCTCCACCTCCACAAACC-3'	304	59.5
Exó 3	5'-TTCGAGGCAGAGGAGGTATC-3'	5'-GGGGGTGAGGAAAGAGAAAG-3'	440	59.5
Exó 4	5'-GCAAGGCGATCAGGGATAC-3'	5'-TGCAGTCCCAACTTCTCA-3'	603	60.5
Exó 5	5'-GCTGTTCACTGTACCTGCT-3'	5'-ACGCTTAGGTCGCTTATCCA-3'	310	59.5
Exó 5a	5'-TCTTGGGGAAAACATTGCAT-3'	5'-CCATAGTAAGGAAAAGGATGGTCA-3'	268	60.5
Exó 6a	5'-CTGCTTCCTCCACAGTTC-3'	5'-TTCGATGACGTGCTCAAAAG-3'	248	60.0
Exó 6b	5'-GGTTCGAGAGGTCTGACGAC-3'	5'-GTAGTTCGGCATTGCGAGTT-3'	485	60.0
Exó 6c	5'-GGTATCCAAAGGCCAACTGA-3'	5'-CACAAATTAAGCAGCATGCAA-3'	542	59.9
Exó 6d	5'-TCCCATGACCTGAAAGGAAA-3'	5'-CGCCAGTAAAGCAATGACAA-3'	376	60.0

b) *Ppp1r14d*

Regió gènica	Encebador fw	Encebador rev	Mida del fragment	T ^a d'anellament
Exó 1	5'-CTCCATTCTGTCCCCTCA	5'-CCCAGATCCATCCACAGTCT-3'	338	60.0
Exó 2 (alternatiu)	5'-TTCATGTGCCCTTGAACAAA	5'-GGCAGGTGTTTTATGCCAGT-3'	204	60.0
Exons 3 i 4	5'-5'-CCAGGTGCTCAGATGTCTGTC	5'-TCCTAAGGCAGTAGCAGAAAGG-3'	284	60.5
Exó 5 i 3'UTR	5'-GCGTTGTGACTGTGATTTCC	5'-CTCTCCCATCCTCAGCATAGA-3'	396	59.3

5. Discussió

Les malalties psiquiàtriques, incloent els trastorns de la conducta alimentària, són malalties complexes, amb una etiologia encara desconeguda i amb una heretabilitat al voltant del 50%. Una de les eines útils per a desglossar l'etiologia d'aquests trastorns és dur a terme estudis d'associació, en els que es pressuposa que, si existeix una variant que augmenta el risc de patir una malaltia és perquè l'expressió i funció correcta del gen on es troba localitzada aquesta variant és necessària per a evitar el desenvolupament d'aquesta afectació. En malalties complexes, el cribatge de variants de susceptibilitat es sol fer de manera indirecta, és a dir, esperant que el *locus* causant es trobi en desequilibri de lligament amb el *locus* analitzat. De totes maneres, la major part de variants de susceptibilitat descrites per a malalties complexes no expliquen l'heretabilitat descrita en estudis de bessons o d'adopció, i les *odds ratio* (OR)^{††} reportades són sovint modestes. Això podria ser degut a la implicació de múltiples gens en la predisposició a la malaltia i a l'heterogeneïtat al·lèlica (més d'un al·lel associat en un mateix gen, *locus* o haplotip), ja que cada al·lel de cada gen s'hauria de detectar per separat. L'epistasi i l'efecte de factors ambientals no inclosos en l'anàlisi també podrien estar contribuint a reduir l'OR d'un al·lel que en realitat sí que està associat a la malaltia.

En els treballs que es presenten en aquesta tesi s'ha tingut en compte tots aquests aspectes en la mesura del possible. En l'estudi d'un únic gen candidat (*BDNF*) s'han tingut en compte totes les variants descrites fins al moment en les bases de dades i l'anàlisi ha inclòs l'estudi d'haplotips. A més, s'han correlacionat les variants i els haplotips trobats amb els nivells de proteïna, intentant explorar les conseqüències biològiques de l'associació. D'altra banda, i tenint en compte l'eventualitat de la contribució de diferents *loci* en la predisposició al fenotip, s'han estudiat altres gens de la via de les neurotrofines i els seus receptors, i s'han buscat tant l'existència d'haplotips comuns associats com possibles interaccions epistàtiques entre variants de diferents gens.

^{††}L'*odds ratio* (OR) és una mesura de l'efecte que té un determinat factor de risc i s'utilitza especialment en estudis cas-control. El terme *odds* s'ha traduït com oportunitat relativa o raó d'avantatge.

Per altra banda, tot i que les malalties psiquiàtriques semblen ser específiques dels humans perquè no s'observen en animals o no es poden mesurar directament, l'interès pel desenvolupament i estudi dels models que les mimetitzen és cada vegada més gran. L'estudi en models murins es basa en el fet que els fenotips humans són suficientment homòlegs als dels ratolins com per a que les influències genètiques se sobreposin i permetin estudiar hipòtesis específiques sota condicions experimentals molt controlades. A més, tenen l'avantatge que els aspectes que compliquen l'estudi de les malalties complexes en humans, com l'heterogeneïtat o la presència de fenocòpies, es poden obviar estudiant ratolins endogàmics. En aquesta tesi s'ha abordat l'estudi dels TCA en dos models de ratolins: per una banda, i donades les evidències de l'associació amb el gen *BDNF*, es van generar ratolins transgènics que sobreexpressessin les dues variants al·lèliques del canvi aminoacídic funcional Val66Met. Per altra banda, s'ha estudiat el model murí anorèxic *anx/anx* a nivell del seu transcriptoma i s'ha mapat finament el locus que conté la mutació, encara desconeguda, mitjançant el lligament genètic. A continuació es discuteixen de forma global els resultats obtinguts per cada un dels treballs presentats.

Implicació de les neurotrofines en la conducta alimentària

El paper de BDNF en la conducta alimentària

En el primer treball presentat es descriu l'associació de variants polimòrfiques contingudes al llarg de la regió genòmica que conté el gen *BDNF* amb els TCA, amb els seus subfenotips (AN i BN) i amb els nivells de BDNF en plasma. Aquest estudi replica els resultats obtinguts anteriorment pel nostre grup i altres que van trobar associació de la variant rs6265 (Val66Met) amb TCA¹⁴⁷⁻¹⁵², i donen peu a pensar que és probable que hi hagi variants en desequilibri de lligament amb rs6265 que presentin una associació significativament més forta amb el trastorn. Dels resultats addicionals que aporta aquest estudi, cal destacar el fet que hi hagi diferents variants significativament associades al llarg de tot el gen, la qual cosa impedeix que es pugui localitzar una regió de susceptibilitat determinada. Això és

degut a que el desequilibri de lligament (LD) de la regió és molt elevat i a que molts dels SNPs associats pertanyen a un mateix bloc.

Respecte a l'associació amb els nivells de BDNF en plasma, hem trobat una relació directa entre certs SNPs i nivells més elevats de proteïna. Per exemple, per a l'SNP rs10835210, els individus amb genotips AA i AC presenten nivells significativament superiors que els individus amb genotips CC, tant en els casos com en els controls. Aquests resultats apunten a una funcionalitat de determinades variants en aquesta regió, tot i que no es pot descartar que hi hagi variants no tipades en alt LD amb aquestes que siguin les realment causants d'aquest efecte. Finalment, també es descriu l'associació significativa entre els mateixos haplotips associats al diagnòstic de BN amb els nivells plasmàtics de BDNF, però no en el cas d'AN. A banda de possibles explicacions basades en diferències respecte a mecanismes o factors implicats en el desenvolupament d'un o altre fenotip, també és possible que la manca d'associació amb AN sigui deguda a un poder estadístic insuficient conseqüència d'una mida petita de la mostra.

S'ha descrit, en estudis animals, que l'administració de BDNF a nivell central causa una disminució de la ingesta i que l'ablació *BDNF* provoca hiperfàgia i obesitat^{169,176,303}. Suposant que els nivells de BDNF en plasma reflecteixin els nivells que hi ha en cervell, aquests nivells anormalment elevats de proteïna podrien estar contribuint a la hipofàgia pròpia dels pacients amb AN. Malgrat que diversos models animals donen suport als nostres resultats, les dades es contraposen a resultats obtinguts per altres grups, que han trobat nivells disminuïts de BDNF en sèrum de pacients amb AN³⁰⁴⁻³⁰⁶. Tanmateix, és probable que la discrepància de resultats es degui a diferències en l'espècimen analitzat (plasma en el nostre cas, sèrum en el cas d'aquests estudis). Malgrat tot, sembla clara la relació entre els nivells proteics de BDNF i la gana en humans, com es desprèn d'un estudi recent que ha descrit una correlació negativa entre nivells perifèrics de BDNF i els nivells d'apetit mesurats mitjançant un qüestionari d'autoavaluació (*The council on Nutrition Appetite Questionnaire*)^{307,308}. Finalment, en un article recent es descriu que els agonistes de NTRK2 tenen un efecte oposat si són administrats en la perifèria, provocant un

augment del consum i en el pes corporal en primats no humans, però sense tenir un efecte en rosegadors¹⁹⁵. Aquest estudi obre noves hipòtesis sobre el paper real de BDNF en perifèria en primats no humans i demostra que BDNF pot tenir una funció en la perifèria independent del seu paper a nivell central. Els sistemes perifèrics on podria actuar BDNF són el sistema nerviós entèric, el sistema neuroendocrí del pàncrees i del tub digestiu, en el nervi vagus i en els òrgans circumventriculars⁵⁵.

Per aclarir si els nivells elevats de BDNF són causa o conseqüència dels trastorns de l'alimentació seria interessant mesurar la concentració de BDNF en pacients recuperats de la malaltia. Si els nivells elevats de BDNF es mantinguessin en pacients recuperats, aquests podrien ser considerats un factor de susceptibilitat per als trastorns de l'alimentació, mentre que si els nivells disminuïssin en la recuperació, BDNF podria ser considerat un marcador de l'evolució de la malaltia.

Els nivells plasmàtics de BDNF no només s'han correlacionat amb altres trastorns psiquiàtrics com la depressió, sinó també amb trets relacionats amb el diagnòstic, com la severitat de la malaltia, el neuroticisme³⁰⁹⁻³¹² o la resposta al tractament^{310,311}. Donat que en els pacients amb TCA s'han descrit nivells elevats de psicopatologia^{95,96,103-107,313}, ens vam plantejar la possibilitat que aquests endofenotips poguessin estar relacionats amb els nivells de BDNF en plasma. Així doncs, el segon treball que es presenta en aquest capítol es refereix a l'estudi de la correlació entre els nivells de BDNF i diversos trets psicopatològics mesurats mitjançant l'escala SCL-90R (*Symptom Check List 90 Revised*). Vam trobar una correlació inversa dels nivells de BDNF i l'índex de severitat global, l'índex de malestar per la simptomatologia positiva, la depressió, l'ansietat, l'obsessió-compulsió, la sensibilitat interpersonal i el psicoticisme en pacients amb AN. Hi ha dues possibles explicacions a aquestes associacions. En primer lloc, podria ser que BDNF estigués directament implicat en aquests trets independentment de la presència del trastorn

⁵⁵Els òrgans circumventriculars es troben situats al marge de les zones ventriculars del cervell i es caracteritzen per tenir una barrera hemato-encefàlica reduïda. Així, les neurones localitzades en aquests òrgans són sensibles a les concentracions de diferents metabòlits de la perifèria, especialment els pèptids hormonals.

alimentari. Això no ho podem confirmar ni descartar, ja que no tenim dades comparables d'aquest qüestionari en les germanes sanes de les pacients. Per altra banda, i donat que els nivells de BDNF estan associats als diagnòstics clínics, és més probable que BDNF actuï com a modulador d'aquests trets en els pacients i que, d'alguna manera, contribueixi a la variabilitat fenotípica i a la severitat del trastorn.

Variants en les neurotrofines i susceptibilitat a trastorns de l'alimentació

En el darrer treball corresponent al primer capítol es postula que, a part de BDNF, la variabilitat genètica d'altres neurotrofines o dels seus receptors poden tenir un paper important en el comportament alimentari. En concret, en aquest treball s'ha estudiat la variabilitat genotípica de 10 gens de factors neurotròfics i els seus receptors en relació amb la presència de TCA. És un estudi d'associació familiar, en que han participat tres centres Europeus, on s'ha trobat una associació significativa de diverses variants del gen *NTRK3*, una d'elles (rs7180942) significativament associada després d'aplicar la correcció de Bonferroni. És interessant que aquesta associació segueixi un model d'herència d'avantatge a l'heterozigot, és a dir, que els genotips de risc són qualsevol dels dos possibles homozigots. El model d'avantatge a l'heterozigot, anomenat també *heterosi molecular* o *sobredominància*, es dona quan els subjectes heterozigots per a un polimorfisme específic presenten un efecte major o menor, en un tret dicotòmic o quantitatiu, respecte als homozigots per a qualsevol dels altres al·lels. Aquest model d'herència ha rebut fins ara poca atenció en la recerca tot i que Cummings i MacMurray³¹⁴ estimen que l'heterosi molecular podria estar present en prop del 50% de les associacions genètiques. Això dona importància a la comparació de les freqüències genotípiques, a part de les freqüències al·lèliques, ja que quan l'heterosi molecular és present, l'associació al·lèlica és molt probable que es perdi perquè les freqüències al·lèliques podrien ser les mateixes en casos i en controls³¹⁴. És interessant tenir això en compte a l'hora d'escollir un mètode estadístic adequat, ja que la major part dels programes dissenyats per a fer estudis d'associació a gran escala, tant per cas-control com per associació familiar, no

permeten utilitzar el model d'avantatge a l'heterozigot, amb el consegüent risc de perdre totes les associacions que segueixen aquest model d'herència.

D'altra banda, en el treball es demostra que el genotip protector per a TCA en l'SNP rs7180942 del gen *NTRK3* està associat a nivells disminuïts d'expressió d'aquest gen en línies cel·lulars limfoblastoides. En el ratolí *anx/anx* també s'han detectat nivells elevats de mRNA de *NTRK3* i del seu lligand d'alta afinitat, la neurotrofina 3 (*NTF3*), la qual cosa permet establir una relació directa entre l'SNP candidat i el control de la ingesta alimentària.

Tenint en compte aquesta associació amb el gen *NTRK3*, vàrem avaluar com la susceptibilitat en els individus que tenien els genotips de risc per a l'SNP rs7180942 variava en funció de la resta de polimorfismes analitzats de la via de les neurotrofines. Així, vam veure que l'al·lel A de l'SNP rs17033706 en el gen *NGF* conferia un risc molt més elevat en individus homozigots per a qualsevol al·lel de rs7180942. Aquest efecte epistàtic probablement no s'hagués observat utilitzant els mètodes habituals per a detectar epistasi, ja que apareix quan un SNP segueix el model d'avantatge per a l'heterozigot (rs7180942) i l'altre SNP un model additiu (rs17033706).

La conclusió global d'aquest capítol és que els trastorns de la conducta alimentària poden ser el resultat d'una desregulació dels diferents membres que conformen la família de les neurotrofines i dels seus receptors. Així, una interacció defectuosa entre lligands, els seus receptors i les seves dianes, impediria el correcte funcionament del balanç homeostàtic i la regulació dels seus senyals de transducció que afectaria a poblacions neuronals tant del sistema nerviós central com del perifèric. Aquesta desregulació tindria conseqüències en diferents regions cerebrals, però també alteraria els senyals nutricionals procedents de la perifèria i redundaria en un fenotip complex com el que s'observa en els trastorns de la conducta alimentària.

Estudis en model murins

Transgènic de sobreexpressió de BDNF

En aquest treball es van generar línies de sobreexpressió de les dues variants del polimorfisme humà Val66Met (rs6265 segons la nomenclatura del dbSNP) amb la intenció d'investigar els efectes funcionals d'aquest SNP *in vivo* en un model de ratolí. Malauradament, no s'ha aconseguit generar línies estables, ja que tots els fundadors obtinguts de la variant Met66 van presentar un fenotip letal, i tots excepte un dels fundadors de la variant Val66 també van morir a curt plaç. Després de veure aquestes dificultats per mantenir línies estables, l'estudi s'ha basat en l'anàlisi dels fundadors portadors de la l'al·lel salvatge o Val66, amb la intenció de mesurar exclusivament l'efecte de la sobreexpressió de *BDNF* sota el promotor *Thy1*.

Els fenotips més clarament observables i repetits en totes les línies de fundadors de la línia *Thy1-Val-BDNF* han estat el baix pes corporal i les tremolors severes. Curiosament, no s'havia descrit abans cap d'aquests fenotips en els transgènics de sobreexpressió publicats³¹⁵⁻³²² (www.jax.org). El fet que haguem observat aquest fenotip en totes les línies que expressaven el transgen descarta la possibilitat de que això sigui un efecte del lloc d'inserció del transgen.

L'únic fundador de la variant Val66 que no va morir, i que presentava un fenotip de tremolors lleus, és probable que fos mosaic per a la inserció del transgen. Això es desprèn del fet que quan es van portar a terme creuaments per obtenir-ne descendència, un 5% aproximadament de les cries presentaven exactament el mateix fenotip de tremolors severes, marxa descoordinada i baix pes corporal presents en els altres fundadors. Donat que la resta de descendents eren fenotípicament i genotípicament normals, es dedueix que el transgen es va insertar després d'un o més cicles de divisió del zigot, cosa que explica la baixa transmissió a la descendència i el seu propi fenotip lleu.

El fenotip letal en transgènics de sobreexpressió de *BDNF* ja ha estat descrit amb anterioritat per Huang et al.³¹⁵, que va generar un transgènic de sobreexpressió de *BDNF*

dirigida pel promotor *CamK2a* amb expressió principalment a prosencèfal. Un 40% dels fundadors generats van morir entre les quatre i dotze setmanes d'edat per causes no especificades en l'article³¹⁵. Tota la resta d'estudis en què s'ha utilitzat aquest model han partit d'una sola línia provinent del mateix fundador cedit per aquest autor^{315,316}. El fet que els nostres animals hagin mort abans de les cinc setmanes d'edat (a excepció de l'esmentada femella mosaic) pot ser degut al promotor utilitzat. *Thy1* té una expressió ubiqua en cervell³²³, mentre que el promotor *Camk2a* dirigeix l'expressió de forma més específica a neocòrtex i a hipocamp, fet que potser també explica la major severitat del nostre model. La resta de línies de transgènics publicades han utilitzat el promotor de la β -actina, d'expressió ubiqua en tots els teixits³¹⁹⁻³²², i el promotor de la cadena pesada de α -miosina, d'expressió a múscul esquelètic, cardíac i en la capa subcutània de ratolí³¹⁷, fent els resultats obtinguts en aquests models difícilment comparables amb els nostres.

Un baix pes i un índex de massa corporal baix és el que s'esperaria d'acord amb els estudis previs realitzats en rosegadors, que mostren que l'administració de BDNF en el SNC causa inanició i pèrdua de pes en rates¹⁷⁶, mentre els ratolins *knock-out* per aquest gen són hiperfàgics i obesos^{169,177}. D'entre les possibles causes d'aquest baix pes, podrien existir factors no relacionats directament amb el gen *BDNF*, com la falta d'alletament. Donat que es va descartar la negligència materna, el més probable és que fos, o bé per efecte directe de la sobreexpressió del gen o bé degut als problemes motors (tremolors i marxa atàxica) que els impedirien alletar-se adequadament.

Un dels mecanismes moleculars implicats en les tremolors és una alteració en la senyalització de l'àcid gamma-aminobutíric (GABA). S'ha descrit que una inadequada expressió dels receptors de GABA pot ser causa de tremolor essencial degut a una inhibició defectuosa del SNC. D'acord amb això, els ratolins deficients per la subunitat α -1 del receptor de GABA (GABRA1) o pel transportador del GABA expressen un fenotip similar a les característiques clíniques dels subjectes que pateixen tremolor essencial^{324,325}. El fet que el tractament amb BDNF causi una disminució de l'expressió de GABRA1, alhora que un increment en l'expressió de les subunitats alfa-4 del receptor del GABA (GABRA4) en

cultius de neurones hipocampals³²⁶, podria ser una possible explicació molecular de les tremolors observades en el nostre model de sobreexpressió de *BDNF*. Un article recent descriu que la sobreexpressió de *Bdnf* millora l'atàxia en ratolins *stargazer*, que presenten una menor expressió de *Bdnf* en cerebel^{327,328}, cosa que fa pensar que tant l'excés com la mancança de *Bdnf* pot causar problemes motors. L'únic tret conductual que s'ha pogut observar ha estat l'hiperactivitat, un tret present també en el ratolí heterozigot deficient per *Bdnf*¹⁶⁹. Tot i que hem procurat analitzar en detall els fundadors que hem obtingut abans de la seva mort, el reduït nombre d'animals analitzats fa difícil l'elaboració de conclusions sòlides respecte el neurodesenvolupament i la conducta.

Malgrat que aquest model s'hauria de caracteritzar amb més profunditat, en aquest treball demostrem una vegada més l'efecte que té BDNF en la regulació del pes corporal i es postula una relació entre BDNF i la fisiopatologia de les tremolors.

Caracterització del model anx/anx

Anàlisi de lligament i cribatge mutacional en el model anx/anx

El cribatge mutacional i l'anàlisi de lligament descarten que una mutació en el gen *Bdnf* sigui la causant del fenotip anorèxic en el mutant *anx/anx*. No obstant, en el model d'anorèxia *anx/anx* no s'han trobat diferències en l'expressió en hipotàlem, però sí que s'han trobat nivells disminuïts en còrtex, que han estat validats posteriorment mitjançant PCR a temps real. Aquests nivells disminuïts en còrtex podrien actuar com a efecte compensatori del pobre estat nutricional que pateixen aquests ratolins, ja que, tot i que no es coneix de forma precisa el paper que BDNF pot tenir en el control de la ingesta en aquesta estructura del cervell, hi ha un estudi que mostra una disminució dels nivells de BDNF en còrtex després de restricció dietària³²⁹.

Amb el número d'animals analitzats (uns 300), s'ha acotat la regió que conté el *locus anx* a uns 0.36 cM distància genètica (600 kb de distància física), donat que 0.63 cM equivalen aproximadament a 1 Mb en ratolins³³⁰. La regió on s'ha acotat el *locus anx* queda

compresa entre els marcadors Tx119 (a 119.1 Mb) i Tx119.7 (a 119.7 Mb), en el cromosoma 2 de ratolí. La regió conté 20 gens aproximadament, i la seva sintènia en humà es troba en el cromosoma 15q15.1.

Cal destacar que ja amb anterioritat s'ha trobat lligament positiu amb trets quantitius que tenen a veure amb la regulació del pes corporal en aquesta regió i en la regió sintènica en humans. Així, per aquesta regió en ratolins s'ha localitzat un *locus* associat al percentatge de greix i al guany del pes tardà en ratolins^{331,332}. En la mateixa línia, en humans, s'ha trobat lligament positiu a la regió 15q15 per nivells de lipoproteïna d'alta densitat 2a (HDL2A) i per la proteïna estimuladora d'acilació (ASP), dos factors de risc associats a la síndrome metabòlica que provoquen obesitat (<http://obesitygene.pbrc.edu/>)³³³. D'entre els gens continguts a la regió acotada, el gen *Ppp1r14d* codifica per a una subunitat d'una proteïna inhibidora de proteïnes fosfatases anomenada DARPP-32 (de l'anglès, *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of apparent Mr 32,000*). DARPP-32 s'expressa abundantment en cervell, ronyó i adipòcits, on té un paper essencial en l'adipogènesi²⁷⁴. En el cervell, la fosforilació de DARPP-32 està regulada per diversos factors com la dopamina, la serotonina, el GABA i el glutamat, entre d'altres²⁷⁵. A més, el *knock-out* d'aquest gen presenta una resposta atenuada a cocaïna en l'activitat locomotora²⁷⁶. Donat que el ratolí *anx/anx* presenta problemes locomotors, funció dopaminèrgica alterada i un dèficit de teixit adipós, vam considerar que era un bon candidat a contenir la mutació responsable del fenotip. Malgrat això, el cribatge mutacional en el gen *Ppp1r14d* i l'anàlisi de lligament addicional amb la variant rs27438733 continguda en aquest mateix gen també van descartar-lo com a responsable del fenotip *anx*. Un cop descartats *Bdnf* i *Ppp1r14d*, no hi ha prou evidències bibliogràfiques de que cap dels gens continguts en la regió de lligament que hem acotat pugui ser millor candidat que un altre, fent-se difícil apostar *a priori* per algun d'ells en concret.

En resum, les estratègies emprades en aquest treball per tal d'identificar la mutació *anx* no han estat exitoses fins al moment, tot i que la regió candidata s'ha acotat

considerablement. Donat que la presència de recombinants en la regió és molt petita, per mapar més finament encara la regió es necessitaria un nombre molt elevat de ratolins i augmentar el nombre de marcadors. El pas següent per tal d'evitar aquest fet és triar una subsèrie d'animals que presentin events recombinants entre els dos marcadors flanquejants i genotipar marcadors addicionals que mapin en l'interval entre aquests. Finalment, l'experiment més apropiat seria la seqüenciació completa de la regió candidata.

Estudis d'expressió

Els estudis d'expressió gènica global (o del transcriptoma) en certs teixits diana també són útils per a revelar, sense una hipòtesi fisiopatològica *a priori*, gens que pel fet d'estar desregulats en el teixit estudiat poden tenir un paper important en l'etiopatogènia de la malaltia. En obesitat, per exemple, els estudis d'expressió en biòpsies de teixit adipós, combinats amb estudis d'associació, han permès la identificació de diversos gens de susceptibilitat^{334,335}. En el cas de les malalties psiquiàtriques, és difícil treballar amb mostres de cervells humans per raons ètiques òbvies, i per això és útil treballar amb models animals que mimetitzin d'alguna manera els trets observats en humans. En aquest sentit, el model *anx/anx* es considera un bon model per a l'AN, tot i que probablement és més un reflex de les conseqüències que pot tenir la desnutrició prolongada, que no pas dels aspectes conductuals que duen a les pacients a desenvolupar el trastorn. L'estudi del transcriptoma en hipotàlem d'*anx/anx* ens ha permès conèixer gens que estan desregulats en aquesta regió del cervell i que, per tant, podrien estar implicats en la regulació de la ingesta. A més, s'ha confirmat la desregulació de prop de la meitat dels gens que la literatura ha relacionat amb la regulació del pes corporal i de la ingesta.

Més enllà de la identificació de possibles nous gens implicats en la conducta alimentària, l'estudi d'ontologia gènica ens ha permès fer un pas més en la caracterització del fenotip del ratolí *anx/anx*, mostrant que el perfil d'expressió d'aquest ratolí emula al que podrien patir pacients amb síndrome caquèxica, un procés d'extrema desnutrició, atròfia muscular

i anorèxia en pacients que no estan procurant la pèrdua de pes. La caquèxia sol acompanyar processos inflamatoris i malalties com el càncer, certes malalties infeccioses com la síndrome d'immunodeficiència adquirida o determinades afeccions autoimmunitàries. D'una banda, els resultats confirmen que la mutació *anx* té relació amb algun fenòmen inflamatori localitzat en el sistema nerviós central i que l'anorèxia és una conseqüència d'aquest, no la causa del fenotip que dona nom el model. Per altra banda, això obre la possibilitat de que aquest model sigui d'utilitat de cara a la investigació sobre l'etiopatogènia de la síndrome caquètica i a l'assaig de fàrmacs en el tractament pal·liatiu dels símptomes d'aquells que la pateixen.

En el darrer treball realitzat en el mateix model *anx/anx*, s'ha fet un estudi d'expressió de miRNAs i la seva relació amb l'expressió dels seus mRNA diana predits. En aquest sentit, hem detectat una putativa disfunció de la maquinària de repressió mediada per microRNAs, ja que l'anàlisi *in silico* mostra un enriquiment en l'expressió de gens amb dianes predites de miRNAs en hipotàlem, mentre que hi un empobriment en l'expressió de gens amb dianes predites per miRNAs en còrtex. La sobreexpressió de diversos gens implicats en el complex miRISC i en la formació dels cossos P dona més suport a aquest fet. A més, una deficiència de Dicer causa atàxia, un dels fenotips que presenta el ratolí *anx/anx*^{260,261,336}. Serà necessari validar la sobreexpressió d'aquests gens implicats en el complex miRISC mitjançant una tècnica alternativa, com per exemple PCR quantitativa, abans de confirmar aquests resultats. El pas següent per a comprovar aquesta hipòtesi és validar experimentalment les interaccions miRNA-mRNA més significatives o interessants des del punt de vista fisiopatològic.

La conclusió global d'aquest capítol és que el fenotip que presenta el ratolí *anx* és el resultat d'una mutació encara desconeguda que probablement provoca un procés inflamatori en el SNC. Queda per dilucidar si aquest mateix procés és causa o conseqüència d'una possible disfunció de la maquinària de silenciament mediada per miRNAs.

6. Conclusions

- Les pacients amb trastorns de la conducta alimentària presenten una concentració proteica de BDNF en plasma més elevada que les seves germanes sanes.
- Un estudi d'associació familiar amb una bateria de SNPs localitzats en el gen *BDNF* mostra una associació de l'haplotip rs7124442T/rs11030102C/rs11030119G amb BN i de l'haplotip rs7934165A/270T amb AN. A més, els nivells de BDNF en plasma són significativament superiors en els subjectes portadors del mateix haplotip associat a BN rs7124442T/rs11030102C/rs11030119G.
- Els nivells de BDNF en plasma de pacients amb AN correlacionen negativament amb els següents trets psicopatològics mesurats amb l'instrument SCL-90R: índex de severitat global, índex de malestar per a la simptomatologia positiva, depressió, ansietat, obsessió-compulsió, sensibilitat interpersonal i psicoticisme.
- En una mostra de 371 famílies nuclears procedents de diferents països europeus, es troben sobrerrepresentats els pacients amb TCA homozigots per la variant rs7180942 en el gen *NTRK3*. A més, el risc dels subjectes portadors de qualsevol dels genotips de risc de l'SNP rs7180942 en el gen *NTRK3* augmenta en aquells individus portadors de l'al·lel A de rs17033706 del gen *NGF*, mostrant una interacció epistàtica sinèrgica.
- L'expressió de *NTRK3* en les línies cel·lulars limfoblastoides dels individus de HapMap portadors dels genotips de risc de l'SNP rs7180942 és significativament superior a la observada en els individus portadors d'altres genotips.
- Els nivells d'expressió de l'ortòleg murí *Ntrk3* i del seu lligand d'alta afinitat, *Ntf3*, es troben augmentats en l'hipotàlem del ratolí *anx/anx*.
- La sobreexpressió de *BDNF* dirigida pel promotor *Thy1* causa tremolors severes, baix pes, índex de massa corporal baix, i mort perinatal.
- L'anàlisi de lligament localitza la mutació *anx* entre 119.1 i 119.7 Mb, en un interval de 600 kb que conté aproximadament 20 gens

- No hi ha evidències de que mutacions en els gens *Bdnf* i *Ppp1r14d* siguin responsables del fenotip dels ratolins homozigots *anx/anx*.
- L'estudi del transcriptoma en hipotàlem del ratolí *anx/anx* suggereix que aquest pot ser un bon model de la síndrome caquètica que acompanya malalties cròniques o inflamatòries com el càncer, la SIDA o malalties autoimmunitàries.
- L'estudi del transcriptoma del model murí *anx/anx* mostra un enriquiment en l'expressió de gens amb dianes predites de miRNAs en hipotàlem, mentre que hi un empobriment en l'expressió de gens amb dianes predites per miRNAs en còrtex, suggerint una possible alteració de la maquinària de repressió mediada per miRNAs en aquest model d'anorèxia caquèxia.

7. Referències

1. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005;**184**(2):291-318.
2. Stellar E. The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev* 1994;**101**(2):301-11.
3. Broadwell RD, Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol* 1976;**166**(3):257-83.
4. Nonaka N, Shioda S, Niehoff ML, Banks WA. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**306**(3):948-53.
5. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 2004;**490**(1-3):5-12.
6. Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 1999;**20**(11):1341-5.
7. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996;**17**(2):305-11.
8. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;**25 Suppl 5**:S63-7.
9. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997;**46**(12):2119-23.
10. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995;**377**(6549):530-2.
11. Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(2):741-6.
12. Kristensen P, Judge ME, Thim L, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;**393**(6680):72-6.
13. Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houtp TA. Hypothalamic NPY, AgRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;**283**(5):R1020-6.
14. Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, et al. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83--132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;**279**(1):R47-52.
15. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 2005;**310**(5748):683-5.
16. Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 1990;**127**(2):730-7.
17. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999;**20**(1):68-100.

18. Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 1986;**7**(6):1189-92.
19. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 1998;**402**(4):442-59.
20. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(5):3240-5.
21. Sakurai T. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;**5**(3):313-25.
22. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996;**380**(6571):243-7.
23. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998;**396**(6712):670-4.
24. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001;**30**(2):345-54.
25. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 2007;**8**(3):171-81.
26. Heisler LK, Cowley MA, Kishi T, et al. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;**994**:169-74.
27. Breisch ST, Zemlan FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* 1976;**192**(4237):382-5.
28. Goudie AJ, Thornton EW, Wheeler TJ. Effects of Lilly 110140, a specific inhibitor of 5-hydroxytryptamine uptake, on food intake and on 5-hydroxytryptophan-induced anorexia. Evidence for serotonergic inhibition of feeding. *J Pharm Pharmacol* 1976;**28**(4):318-20.
29. Garattini S, Mennini T, Samanin R. Reduction of food intake by manipulation of central serotonin. Current experimental results. *Br J Psychiatry Suppl* 1989(8):41-51.
30. Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 2006;**51**(2):239-49.
31. Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002;**36**(2):229-40.
32. Szczypka MS, Rainey MA, Kim DS, et al. Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(21):12138-43.
33. Hnasko TS, Szczypka MS, Alaynick WA, During MJ, Palmiter RD. A role for dopamine in feeding responses produced by orexigenic agents. *Brain Res* 2004;**1023**(2):309-18.
34. Szczypka MS, Rainey MA, Palmiter RD. Dopamine is required for hyperphagia in *Lep(ob/ob)* mice. *Nat Genet* 2000;**25**(1):102-4.
35. Gao Q, Horvath TL. Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci* 2007;**30**:367-98.

36. Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 2007;**30**(8):375-81.
37. Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;**284**(4):R882-92.
38. Ritter RC, Epstein AN. Control of meal size by central noradrenergic action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;**72**(9):3740-3.
39. Fan W, Ellacott KL, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 2004;**7**(4):335-6.
40. Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, et al. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 1995;**96**(3):1658-63.
41. Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1998;**1**(6):445-50.
42. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;**282**(1):R46-54.
43. Kahn CR, Bruning JC, Michael MD, Kulkarni RN. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;**13 Suppl 6**:1377-84.
44. Corp ES, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG. Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* 1986;**70**(1):17-22.
45. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;**270**(45):26746-9.
46. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, et al. 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* 2001;**50**(5):1126-33.
47. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**(6):1595-9.
48. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006;**444**(7121):854-9.
49. Kojima M, Kangawa K. Structure and Function of Ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 2008.
50. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 2006;**89**(1):71-84.
51. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab* 2006;**3**(5):379-86.
52. Strasser F, Lutz TA, Maeder MT, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravenous ghrelin for cancer-related anorexia/cachexia: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-crossover study. *Br J Cancer* 2008;**98**(2):300-8.

53. Neary NM, Small CJ, Wren AM, et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**(6):2832-6.
54. Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, et al. Vaccination against weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**(35):13226-31.
55. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005;**310**(5750):996-9.
56. Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**357**(1):264-9.
57. Gourcerol G, Million M, Adelson DW, et al. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 2006;**27**(11):2811-9.
58. Holst B, Egerod KL, Schild E, et al. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 2007;**148**(1):13-20.
59. Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, et al. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 2007;**148**(1):21-6.
60. Germain N, Galusca B, Le Roux CW, et al. Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of peptide YY, glucagon-like peptide 1, ghrelin, and leptin. *Am J Clin Nutr* 2007;**85**(4):967-71.
61. Bi S, Moran TH. Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides* 2002;**36**(2-3):171-81.
62. Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, et al. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 2003;**124**(5):1325-36.
63. Kojima S, Ueno N, Asakawa A, et al. A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides* 2007;**28**(2):459-63.
64. Ratner R, Whitehouse F, Fineman MS, et al. Adjunctive therapy with pramlintide lowers HbA1c without concomitant weight gain and increased risk of severe hypoglycemia in patients with type 1 diabetes approaching glycemic targets. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;**113**(4):199-204.
65. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 2002;**8**(7):738-42.
66. Kieffer TJ. GIP or not GIP? That is the question. *Trends Pharmacol Sci* 2003;**24**(3):110-2.
67. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;**132**(6):2131-57.
68. Buse JB, Klonoff DC, Nielsen LL, et al. Metabolic effects of two years of exenatide treatment on diabetes, obesity, and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes: an interim analysis of data from the open-label, uncontrolled extension of three double-blind, placebo-controlled trials. *Clin Ther* 2007;**29**(1):139-53.

69. Dakin CL, Small CJ, Park AJ, Seth A, Ghatei MA, Bloom SR. Repeated ICV administration of oxyntomodulin causes a greater reduction in body weight gain than in pair-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;**283**(6):E1173-7.
70. Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, et al. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001;**30**(3):819-28.
71. Siegfried Z, Berry EM, Hao S, Avraham Y. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol Behav* 2003;**79**(1):39-45.
72. Kunos G. Understanding metabolic homeostasis and imbalance: what is the role of the endocannabinoid system? *Am J Med* 2007;**120**(9 Suppl 1):S18-24; discussion S24.
73. Yeomans MR, Gray RW. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;**26**(6):713-28.
74. Moriya J, Takimoto Y, Yoshiuchi K, Shimosawa T, Akabayashi A. Plasma agouti-related protein levels in women with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2006;**31**(9):1057-61.
75. Hebebrand J, Blum WF, Barth N, et al. Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol Psychiatry* 1997;**2**(4):330-4.
76. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Chmielowska M. Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;**22**(5):356-8.
77. Housova J, Anderlova K, Krizova J, et al. Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**(3):1366-70.
78. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, et al. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001;**145**(5):669-73.
79. Monteleone P, Martiadis V, Fabrazzo M, Serritella C, Maj M. Ghrelin and leptin responses to food ingestion in bulimia nervosa: implications for binge-eating and compensatory behaviours. *Psychol Med* 2003;**33**(8):1387-94.
80. Fujimoto S, Inui A, Kiyota N, et al. Increased cholecystokinin and pancreatic polypeptide responses to a fat-rich meal in patients with restrictive but not bulimic anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 1997;**41**(10):1068-70.
81. Kinzig KP, Coughlin JW, Redgrave GW, Moran TH, Guarda AS. Insulin, glucose, and pancreatic polypeptide responses to a test meal in restricting type anorexia nervosa before and after weight restoration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**(5):E1441-6.
82. Kaye WH. Neuropeptide abnormalities in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 1996;**62**(1):65-74.
83. Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 2005;**30**(6):1216-21.

84. Pirke KM. Central and peripheral noradrenalin regulation in eating disorders. *Psychiatry Res* 1996;**62**(1):43-9.
85. Kaye WH, Jimerson DC, Lake CR, Ebert MH. Altered norepinephrine metabolism following long-term weight recovery in patients with anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 1985;**14**(4):333-42.
86. Association AP. DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, D. C.: The American Psychiatric Association, 1994.
87. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;**444**(7118):444-54.
88. Bushnell JA, Wells JE, Hornblow AR, Oakley-Browne MA, Joyce P. Prevalence of three bulimia syndromes in the general population. *Psychol Med* 1990;**20**(3):671-80.
89. Olesti Baiges M, Pinol Moreso JL, Martin Vergara N, et al. [Prevalence of anorexia nervosa, bulimia nervosa and other eating disorders in adolescent girls in Reus (Spain).]. *An Pediatr (Barc)* 2008;**68**(1):18-23.
90. Keski-Rahkonen A, Hoek HW, Susser ES, et al. Epidemiology and course of anorexia nervosa in the community. *Am J Psychiatry* 2007;**164**(8):1259-65.
91. Woodside DB, Garfinkel PE, Lin E, et al. Comparisons of men with full or partial eating disorders, men without eating disorders, and women with eating disorders in the community. *Am J Psychiatry* 2001;**158**(4):570-4.
92. Hudson JI, Hiripi E, Pope HG, Jr., Kessler RC. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biol Psychiatry* 2007;**61**(3):348-58.
93. Wilfley DE, Bishop ME, Wilson GT, Agras WS. Classification of eating disorders: toward DSM-V. *Int J Eat Disord* 2007;**40** Suppl:S123-9.
94. O'Brien KM, Vincent NK. Psychiatric comorbidity in anorexia and bulimia nervosa: nature, prevalence, and causal relationships. *Clin Psychol Rev* 2003;**23**(1):57-74.
95. Fernandez-Aranda F, Pinheiro AP, Tozzi F, et al. Symptom profile of major depressive disorder in women with eating disorders. *Aust N Z J Psychiatry* 2007;**41**(1):24-31.
96. Kaye WH, Bulik CM, Thornton L, Barbarich N, Masters K. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. *Am J Psychiatry* 2004;**161**(12):2215-21.
97. Krahn DD. The relationship of eating disorders and substance abuse. *J Subst Abuse* 1991;**3**(2):239-53.
98. Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR. A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 1993;**50**(12):975-90.
99. Derogatis LR, Melisaratos N. The Brief Symptom Inventory: an introductory report. *Psychol Med* 1983;**13**(3):595-605.
100. Derogatis LR. Cuestionario de 90 síntomas-Manual. Madrid, TEA Editorial 2002.
101. Ro O, Martinsen EW, Hoffart A, Rosenvinge JH. Short-term follow-up of adults with long standing anorexia nervosa or non-specified eating disorder after inpatient treatment. *Eat Weight Disord* 2004;**9**(1):62-8.

102. McDermott B, Forbes D, Harris C, McCormack J, Gibbon P. Non-eating disorders psychopathology in children and adolescents with eating disorders: implications for malnutrition and symptom severity. *J Psychosom Res* 2006;**60**(3):257-61.
103. Fernandez-Aranda F, Jimenez-Murcia S, Alvarez-Moya EM, Granero R, Vallejo J, Bulik CM. Impulse control disorders in eating disorders: clinical and therapeutic implications. *Compr Psychiatry* 2006;**47**(6):482-8.
104. Godart NT, Flament MF, Lecrubier Y, Jeammet P. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: co-morbidity and chronology of appearance. *Eur Psychiatry* 2000;**15**(1):38-45.
105. Grilo CM, Sanislow CA, Skodol AE, et al. Do eating disorders co-occur with personality disorders? Comparison groups matter. *Int J Eat Disord* 2003;**33**(2):155-64.
106. Milos G, Spindler A, Schnyder U. Psychiatric comorbidity and Eating Disorder Inventory (EDI) profiles in eating disorder patients. *Can J Psychiatry* 2004;**49**(3):179-84.
107. Steiger H, Gauvin L, Engelberg MJ, et al. Mood- and restraint-based antecedents to binge episodes in bulimia nervosa: possible influences of the serotonin system. *Psychol Med* 2005;**35**(11):1553-62.
108. Garner DM, Garfinkel PE. The Eating Attitudes Test: an index of the symptoms of anorexia nervosa. *Psychol Med* 1979;**9**(2):273-9.
109. Henderson M, Freeman CP. A self-rating scale for bulimia. The 'BITE'. *Br J Psychiatry* 1987;**150**:18-24.
110. Lilenfeld LR, Kaye WH, Greeno CG, et al. A controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity. *Arch Gen Psychiatry* 1998;**55**(7):603-10.
111. Grice DE, Halmi KA, Fichter MM, et al. Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 2002;**70**(3):787-92.
112. Bulik CM, Sullivan PF, Tozzi F, Furberg H, Lichtenstein P, Pedersen NL. Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry* 2006;**63**(3):305-12.
113. Strober M, Freeman R, Lampert C, Diamond J, Kaye W. Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. *Am J Psychiatry* 2000;**157**(3):393-401.
114. Bulik CM, Sullivan PF, Kendler KS. Heritability of binge-eating and broadly defined bulimia nervosa. *Biol Psychiatry* 1998;**44**(12):1210-8.
115. Kendler KS, MacLean C, Neale M, Kessler R, Heath A, Eaves L. The genetic epidemiology of bulimia nervosa. *Am J Psychiatry* 1991;**148**(12):1627-37.
116. Wade T, Neale MC, Lake RI, Martin NG. A genetic analysis of the eating and attitudes associated with bulimia nervosa: dealing with the problem of ascertainment in twin studies. *Behav Genet* 1999;**29**(1):1-10.
117. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;**361**(9357):598-604.

118. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;**52**(3):506-16.
119. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**(4):301-6.
120. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000;**19 Suppl 1**:S36-42.
121. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;**449**(7164):851-61.
122. Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, et al. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet* 2008;**82**(3):685-95.
123. Sabeti PC, Varilly P, Fry B, et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 2007;**449**(7164):913-8.
124. Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, et al. Population genomics of human gene expression. *Nat Genet* 2007;**39**(10):1217-24.
125. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007;**315**(5813):848-53.
126. Bergen AW, van den Bree MB, Yeager M, et al. Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33-36 linkage region: serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2003;**8**(4):397-406.
127. Brown KM, Bujac SR, Mann ET, Campbell DA, Stubbins MJ, Blundell JE. Further evidence of association of OPRD1 & HTR1D polymorphisms with susceptibility to anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 2007;**61**(3):367-73.
128. Devlin B, Bacanu SA, Klump KL, et al. Linkage analysis of anorexia nervosa incorporating behavioral covariates. *Hum Mol Genet* 2002;**11**(6):689-96.
129. Bulik CM, Devlin B, Bacanu SA, et al. Significant linkage on chromosome 10p in families with bulimia nervosa. *Am J Hum Genet* 2003;**72**(1):200-7.
130. Bulik CM, Bacanu SA, Klump KL, et al. Selection of eating-disorder phenotypes for linkage analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;**139**(1):81-7.
131. Hu X, Giotakis O, Li T, Karwautz A, Treasure J, Collier DA. Association of the 5-HT2c gene with susceptibility and minimum body mass index in anorexia nervosa. *Neuroreport* 2003;**14**(6):781-3.
132. Westberg L, Bah J, Rastam M, et al. Association between a polymorphism of the 5-HT2C receptor and weight loss in teenage girls. *Neuropsychopharmacology* 2002;**26**(6):789-93.
133. Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J. Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. *Lancet* 1997;**350**(9075):412.
134. Enoch MA, Kaye WH, Rotondo A, Greenberg BD, Murphy DL, Goldman D. 5-HT2A promoter polymorphism -1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive-compulsive disorder. *Lancet* 1998;**351**(9118):1785-6.

135. Nacmias B, Ricca V, Tedde A, Mezzani B, Rotella CM, Sorbi S. 5-HT2A receptor gene polymorphisms in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Neurosci Lett* 1999;**277**(2):134-6.
136. Ricca V, Nacmias B, Cellini E, Di Bernardo M, Rotella CM, Sorbi S. 5-HT2A receptor gene polymorphism and eating disorders. *Neurosci Lett* 2002;**323**(2):105-8.
137. Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, Ricca V, Mezzani B, Rotella CM. 5-HT2A promoter polymorphism in anorexia nervosa. *Lancet* 1998;**351**(9118):1785.
138. Nishiguchi N, Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, Shirakawa O, Higuchi S. Association between 5HT2A receptor gene promoter region polymorphism and eating disorders in Japanese patients. *Biol Psychiatry* 2001;**50**(2):123-8.
139. Di Bella DD, Catalano M, Cavallini MC, Riboldi C, Bellodi L. Serotonin transporter linked polymorphic region in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Mol Psychiatry* 2000;**5**(3):233-4.
140. Fumeron F, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Rigaud D. Association of a functional 5-HT transporter gene polymorphism with anorexia nervosa and food intake. *Mol Psychiatry* 2001;**6**(1):9-10.
141. Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, et al. Serotonin transporter regulatory region polymorphism is associated with anorexia nervosa. *Am J Med Genet* 2004;**128B**(1):114-7.
142. Monteleone P, Tortorella A, Castaldo E, Maj M. Association of a functional serotonin transporter gene polymorphism with binge eating disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;**141**(1):7-9.
143. Vink T, Hinney A, van Elburg AA, et al. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2001;**6**(3):325-8.
144. Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, et al. Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinology* 2007;**32**(2):106-13.
145. Monteleone P, Tortorella A, Castaldo E, Di Filippo C, Maj M. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder. *Psychiatr Genet* 2007;**17**(1):13-6.
146. Miyasaka K, Hosoya H, Sekime A, et al. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm* 2006;**113**(9):1279-85.
147. Koizumi H, Hashimoto K, Itoh K, et al. Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am J Med Genet* 2004;**127B**(1):125-7.
148. Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007;**61**(7):911-22.

149. Ribases M, Gratacos M, Armengol L, et al. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. *Mol Psychiatry* 2003;**8**(8):745-51.
150. Ribases M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, et al. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet* 2004;**13**(12):1205-12.
151. Ribases M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, et al. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet* 2005;**13**(4):428-34.
152. Dmitrzak-Weglarczyk M, Skibinska M, Slopian A, et al. BDNF Met66 allele is associated with anorexia nervosa in the Polish population. *Psychiatr Genet* 2007;**17**(4):245-6.
153. Ribases M, Gratacos M, Badia A, et al. Contribution of NTRK2 to the genetic susceptibility to anorexia nervosa, harm avoidance and minimum body mass index. *Mol Psychiatry* 2005;**10**(9):851-60.
154. Koronyo-Hamaoui M, Gak E, Stein D, et al. CAG repeat polymorphism within the KCNN3 gene is a significant contributor to susceptibility to anorexia nervosa: a case-control study of female patients and several ethnic groups in the Israeli Jewish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;**131**(1):76-80.
155. Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2002;**7**(1):86-9.
156. Koronyo-Hamaoui M, Frisch A, Stein D, et al. Dual contribution of NR2B subunit of NMDA receptor and SK3 Ca(2+)-activated K⁺ channel to genetic predisposition to anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 2007;**41**(1-2):160-7.
157. Mikolajczyk E, Smiarowska M, Grzywacz A, Samochowiec J. Association of eating disorders with catechol-o-methyltransferase gene functional polymorphism. *Neuropsychobiology* 2006;**54**(1):82-6.
158. Frisch A, Laufer N, Danziger Y, et al. Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: a family-based study in Israeli patients. *Mol Psychiatry* 2001;**6**(2):243-5.
159. de Krom M, Hendriks J, Hillebrand J, van Elburg A, Adan R. A polymorphism in the 3' untranslated region of the CCK gene is associated with anorexia nervosa in Dutch patients. *Psychiatr Genet* 2006;**16**(6):239.
160. Michaelovsky E, Frisch A, Leor S, et al. Haplotype analysis of the COMT-ARVCF gene region in Israeli anorexia nervosa family trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;**139**(1):45-50.
161. Urwin RE, Bennetts B, Wilcken B, et al. Anorexia nervosa (restrictive subtype) is associated with a polymorphism in the novel norepinephrine transporter gene promoter polymorphic region. *Mol Psychiatry* 2002;**7**(6):652-7.
162. Bergen AW, Yeager M, Welch RA, et al. Association of multiple DRD2 polymorphisms with anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 2005;**30**(9):1703-10.

163. Siegfried Z, Kanyas K, Latzer Y, et al. Association study of cannabinoid receptor gene (CNR1) alleles and anorexia nervosa: differences between restricting and bingeing/purging subtypes. *Am J Med Genet* 2004;**125B**(1):126-30.
164. Urwin RE, Bennetts BH, Wilcken B, Beumont PJ, Russell JD, Nunn KP. Investigation of epistasis between the serotonin transporter and norepinephrine transporter genes in anorexia nervosa. *Neuropsychopharmacology* 2003;**28**(7):1351-5.
165. Urwin RE, Bennetts BH, Wilcken B, et al. Gene-gene interaction between the monoamine oxidase A gene and solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin) member 2 gene in anorexia nervosa (restrictive subtype). *Eur J Hum Genet* 2003;**11**(12):945-50.
166. Schor NF. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog Neurobiol* 2005;**77**(3):201-14.
167. de Krom M, Bakker SC, Hendriks J, et al. Polymorphisms in the brain-derived neurotrophic factor gene are not associated with either anorexia nervosa or schizophrenia in Dutch patients. *Psychiatr Genet* 2005;**15**(2):81.
168. Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2000;**23**(12):639-45.
169. Kerner SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 2000;**19**(6):1290-300.
170. Bersani G, Iannitelli A, Fiore M, Angelucci F, Aloe L. Data and hypotheses on the role of nerve growth factor and other neurotrophins in psychiatric disorders. *Med Hypotheses* 2000;**55**(3):199-207.
171. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;**54**(7):597-606.
172. Lang UE, Jockers-Scherubl MC, Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J Neural Transm* 2004;**111**(3):387-411.
173. Snider WD, Johnson EM, Jr. Neurotrophic molecules. *Ann Neurol* 1989;**26**(4):489-506.
174. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;**270**(5236):593-8.
175. Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 1995;**7**(7):1527-35.
176. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Wellman CL. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol* 1995;**131**(2):229-38.
177. Rios M, Fan G, Fekete C, et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 2001;**15**(10):1748-57.
178. Xu B, EH. G, Zang K, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience* 2003;**6**(7):736-742.
179. Nicholson JR, Peter JC, Lecourt AC, Barde YA, Hofbauer KG. Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol* 2007;**19**(12):974-82.

180. Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**(3):R1003-12.
181. Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**(3):R992-1002.
182. Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology* 2005;**146**(12):5612-20.
183. Hanyu O, Yamatani K, Ikarashi T, et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 2003;**5**(1):27-37.
184. Lucini C, Maruccio L, De Girolamo P, Castaldo L. Brain-derived neurotrophic factor in higher vertebrate pancreas: immunolocalization in glucagon cells. *Anat Embryol (Berl)* 2003;**206**(4):311-8.
185. Blurton-Jones M, Kuan PN, Tuszyński MH. Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression. *J Comp Neurol* 2004;**468**(3):347-60.
186. Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**(24):11110-4.
187. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003;**112**(2):257-69.
188. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 2003;**23**(17):6690-4.
189. Monteleone P, Zanardini R, Tortorella A, et al. The 196G/A (val66met) polymorphism of the BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder. *Neurosci Lett* 2006;**406**(1-2):133-7.
190. Friedel S, Horro FF, Wermter AK, et al. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;**132**(1):96-9.
191. Gunstad J, Schofield P, Paul RH, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology* 2006;**53**(3):153-6.
192. Kaplan AS, Levitan RD, Yilmaz Z, Davis C, Tharmalingam S, Kennedy JL. A DRD4/BDNF gene-gene interaction associated with maximum BMI in women with bulimia nervosa. *Int J Eat Disord* 2008;**41**(1):22-8.

193. Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 2004;**7**(11):1187-9.
194. Gray J, Yeo G, Hung C, et al. Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes (Lond)* 2007;**31**(2):359-64.
195. Lin JC, Tsao D, Barras P, et al. Appetite enhancement and weight gain by peripheral administration of TrkB agonists in non-human primates. *PLoS ONE* 2008;**3**(4):e1900.
196. Williams LR. Hypophagia is induced by intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1991;**113**(1):31-7.
197. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 2002;**80**(3):539-47.
198. Chi MM, Fan G, Fox EA. Increased short-term food satiation and sensitivity to cholecystokinin in neurotrophin-4 knock-in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;**287**(5):R1044-53.
199. Byerly MS, Fox EA. High-fat hyperphagia in neurotrophin-4 deficient mice reveals potential role of vagal intestinal sensory innervation in long-term controls of food intake. *Neurosci Lett* 2006;**400**(3):240-5.
200. Sendtner M, Arakawa Y, Stockli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl* 1991;**15**:103-9.
201. Xu B, Dube MG, Kalra PS, et al. Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotrophic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology* 1998;**139**(2):466-73.
202. Sleeman MW, Garcia K, Liu R, et al. Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(24):14297-302.
203. Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, et al. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(8):4652-7.
204. Watanabe K, Hara C, Ogawa N. Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiol Behav* 1992;**51**(4):827-32.
205. Masoro EJ. Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. *J Gerontol* 1988;**43**(3):B59-64.
206. Ingram DK, Weindruch R, Spangler EL, Freeman JR, Walford RL. Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *J Gerontol* 1987;**42**(1):78-81.
207. Duan W, Lee J, Guo Z, Mattson MP. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. *J Mol Neurosci* 2001;**16**(1):1-12.

208. Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci* 2000;**15**(2):99-108.
209. Qian S, Chen H, Weingarth D, et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 2002;**22**(14):5027-35.
210. Thorsell A, Heilig M. Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 2002;**36**(2-3):182-93.
211. Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, et al. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 2001;**410**(6825):207-12.
212. Bale TL, Contarino A, Smith GW, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000;**24**(4):410-4.
213. Berry EM, Mechoulam, R. Tetrahydrocannabinol endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther* 2002;**95**:185-190.
214. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;**410**(6830):822-5.
215. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996;**274**(5290):1123-33.
216. Berglund EO, Murai KK, Fredette B, et al. Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 1999;**24**(3):739-50.
217. Johansen JE, Fetissov SO, Bergstrom U, et al. Evidence for hypothalamic dysregulation in mouse models of anorexia as well as in humans. *Physiol Behav* 2007;**92**(1-2):278-82.
218. Maltais LJ, Lane PW, Beamer WG. Anorexia, a recessive mutation causing starvation in preweanling mice. *J Hered* 1984;**75**(6):468-72.
219. Son JH, Baker H, Park DH, Joh TH. Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopmental mouse mutant, Anorexia (anx). *Brain Res Mol Brain Res* 1994;**25**(1-2):129-34.
220. Jahng JW, Haupt TA, Joh TH, Son JH. Differential expression of monoamine oxidase A, serotonin transporter, tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter mRNA by anorexia mutation and food deprivation. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;**107**(2):241-6.
221. Molnar A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 2007;**447**(7148):1126-9.
222. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;**23**:175-205.
223. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;**11**(4):441-50.
224. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;**120**(1):15-20.

225. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**(2):281-97.
226. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006;**38** Suppl:S8-13.
227. Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *Rna* 2007;**13**(11):1894-910.
228. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005;**132**(21):4645-52.
229. Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 2007;**26**(5):611-23.
230. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007;**448**(7149):83-6.
231. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004;**18**(5):504-11.
232. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;**3**(3):e85.
233. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;**27**(1):91-105.
234. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 2007;**39**(10):1278-84.
235. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;**9**(2):102-14.
236. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**(11):4034-9.
237. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 2006;**20**(14):1885-98.
238. Krutzfeldt J, Stoffel M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* 2006;**4**(1):9-12.
239. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;**433**(7027):769-73.
240. Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;**3**(2):87-98.
241. Rehwinkel J, Natalin P, Stark A, Brennecke J, Cohen SM, Izaurralde E. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 2006;**26**(8):2965-75.
242. Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**(17):4801-15.

243. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**(1):9-22.
244. Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol* 2006;**172**(6):803-8.
245. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005;**7**(7):719-23.
246. Jakymiw A, Pauley KM, Li S, et al. The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci* 2007;**120**(Pt 8):1317-23.
247. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 2007;**27**(11):3970-81.
248. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004;**5**(3):R13.
249. Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* 2007;**8**(8):R173.
250. Bak M, Silaharoglu A, Moller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *Rna* 2008;**14**(3):432-44.
251. Hillebrand J, Barbee SA, Ramaswami M. P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal* 2007;**7**:178-90.
252. Kye MJ, Liu T, Levy SF, et al. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *Rna* 2007;**13**(8):1224-34.
253. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006;**439**(7074):283-9.
254. Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, et al. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 2008;**82**(2):283-9.
255. Hansen T, Olsen L, Lindow M, et al. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PLoS ONE* 2007;**2**(9):e873.
256. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, et al. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* 2005;**310**(5746):317-20.
257. Arinami T. Analyses of the associations between the genes of 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *J Hum Genet* 2006;**51**(12):1037-45.
258. Schunkert H, Gotz A, Braund P, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 2008;**117**(13):1675-84.
259. Bilen J, Liu N, Bonini NM. A new role for microRNA pathways: modulation of degeneration induced by pathogenic human disease proteins. *Cell Cycle* 2006;**5**(24):2835-8.
260. Cuellar TL, Davis TH, Nelson PT, et al. Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.

261. Schaefer A, O'Carroll D, Tan CL, et al. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* 2007;**204**(7):1553-8.
262. Poy MN, Spranger M, Stoffel M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab* 2007;**9 Suppl 2**:67-73.
263. Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007;**5**(8):e203.
264. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;**432**(7014):226-30.
265. Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004;**1**(2):106-13.
266. Elmen J, Lindow M, Schutz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008.
267. Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004;**279**(50):52361-5.
268. Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *Embo J* 1996;**15**(6):1265-74.
269. Sandroni P, Young RR. Tremor: classification, diagnosis and management. *Am Fam Physician* 1994;**50**(7):1505-12.
270. Johansen JE, Broberger C, Lavebratt C, et al. Hypothalamic CART and serum leptin levels are reduced in the anorectic (anx/anx) mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;**84**(1-2):97-105.
271. Broberger C, Johansen J, Schalling M, Hokfelt T. Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia (anx/anx) mutation: altered processing of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 1997;**387**(1):124-35.
272. Broberger C, Johansen J, Brismar H, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (anx/anx) mouse hypothalamus. *J Neurosci* 1999;**19**(16):7130-9.
273. Jahng JW, Haupt TA, Kim SJ, Joh TH, Son JH. Neuropeptide Y mRNA and serotonin innervation in the arcuate nucleus of anorexia mutant mice. *Brain Res* 1998;**790**(1-2):67-73.
274. Oliver CJ, Shenolikar S. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* 1998;**3**:D961-72.
275. Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;**44**:269-96.
276. Fienberg AA, Greengard P. The DARPP-32 knockout mouse. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;**31**(2-3):313-9.
277. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001;**294**(5549):2166-70.

278. Paulmyer-Lacroix O, Boullu S, Oliver C, Alessi MC, Grino M. Expression of the mRNA coding for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(6):2701-5.
279. Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, et al. CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr*(db/db) mice. *J Biol Chem* 2007;**282**(21):15717-29.
280. Polak J, Moro C, Klimcakova E, et al. Dynamic strength training improves insulin sensitivity and functional balance between adrenergic alpha 2A and beta pathways in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Diabetologia* 2005;**48**(12):2631-40.
281. Cheng JT, Kuo DY. Both alpha1-adrenergic and D(1)-dopaminergic neurotransmissions are involved in phenylpropanolamine-mediated feeding suppression in mice. *Neurosci Lett* 2003;**347**(2):136-8.
282. Frank GK, Bailer UF, Henry SE, et al. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [¹¹C]raclopride. *Biol Psychiatry* 2005;**58**(11):908-12.
283. Kuo DY. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) and the attenuation of hyperphagia in streptozotocin diabetic rats treated with dopamine D1/D2 agonists. *Br J Pharmacol* 2006;**148**(5):640-7.
284. Kuo DY. Further evidence for the mediation of both subtypes of dopamine D1/D2 receptors and cerebral neuropeptide Y (NPY) in amphetamine-induced appetite suppression. *Behav Brain Res* 2003;**147**(1-2):149-55.
285. Coscina DV, Nobrega JN. Anorectic potency of inhibiting GABA transaminase in brain: studies of hypothalamic, dietary and genetic obesities. *Int J Obes* 1984;**8 Suppl 1**:191-200.
286. Squadrito F, Sturniolo R, Arcadi F, Arcoraci V, Caputi AP. Evidence that a GABAergic mechanism influences the development of obesity in obese Zucker rats. *Pharmacol Res Commun* 1988;**20**(12):1087-8.
287. Beverly JL, Martin RJ. Increased GABA shunt activity in VMN of three hyperphagic rat models. *Am J Physiol* 1989;**256**(6 Pt 2):R1225-31.
288. Tsujii S, Bray GA. GABA-related feeding control in genetically obese rats. *Brain Res* 1991;**540**(1-2):48-54.
289. Rosmond R, Bouchard C, Bjorntorp P. Allelic variants in the GABA(A)alpha6 receptor subunit gene (GABRA6) is associated with abdominal obesity and cortisol secretion. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;**26**(7):938-41.
290. Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 2005;**8**(5):579-84.
291. Hu Z, Cha SH, van Haasteren G, Wang J, Lane MD. Effect of centrally administered C75, a fatty acid synthase inhibitor, on ghrelin secretion and its downstream effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**(11):3972-7.
292. Donahue LR, Beamer WG. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like

- growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol* 1993;**136**(1):91-104.
293. Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 2005;**1**(1):73-83.
294. Vicentic A, Jones DC. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;**320**(2):499-506.
295. Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;**15**(9):454-9.
296. Shimizu H, Inoue K, Mori M. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system: regulation of feeding and energy expenditure. *J Endocrinol* 2007;**193**(1):1-9.
297. Luthin DR. Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. *Life Sci* 2007;**81**(6):423-40.
298. Beck B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;**361**(1471):1159-85.
299. Mercader JM, Ribases M, Gratacos M, et al. Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav* 2007;**6**(8):706-16.
300. Bray MS, Boerwinkle E, Hanis CL. Sequence variation within the neuropeptide Y gene and obesity in Mexican Americans. *Obes Res* 2000;**8**(3):219-26.
301. Kaye WH, Frank GK, Bailer UF, et al. Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: new insights from imaging studies. *Physiol Behav* 2005;**85**(1):73-81.
302. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;**58**(6):1347-63.
303. Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(26):15239-44.
304. Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E, et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in female patients with eating disorders. *Biol Psychiatry* 2003;**54**(4):485-90.
305. Monteleone P, Fabrazzo M, Martiadis V, Serritella C, Pannuto M, Maj M. Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to comorbid depression, psychopathology and hormonal variables. *Psychol Med* 2005;**35**(6):897-905.
306. Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V, Serritella C, Fuschino A, Maj M. Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosom Med* 2004;**66**(5):744-8.
307. Wilson GT, Walsh BT. Eating disorders in the DSM-IV. *J Abnorm Psychol* 1991;**100**(3):362-5.
308. Stanek K, Gunstad J, Leahey T, et al. Serum Brain-derived Neurotrophic Factor is Associated with Reduced Appetite in Healthy Older Adults. *J Nutr Health Aging* 2008;**12**(3):183-5.

309. Lang UE, Hellweg R, Gallinat J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 2004;**29**(4):795-8.
310. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 2003;**54**(1):70-5.
311. Aydemir O, Deveci A, Taneli F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;**29**(2):261-5.
312. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 2002;**109**(2):143-8.
313. Bulik CM, Tozzi F. Genetics in eating disorders: state of the science. *CNS Spectr* 2004;**9**(7):511-5.
314. Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol Genet Metab* 2000;**71**(1-2):19-31.
315. Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, et al. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 1999;**98**(6):739-55.
316. Govindarajan A, Rao BS, Nair D, et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both angiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**(35):13208-13.
317. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Lommatzsch M, et al. BDNF overexpression induces differential increases among subsets of sympathetic innervation in murine back skin. *Eur J Neurosci* 1998;**10**(10):3276-83.
318. Botchkarev VA, Kief S, Paus R, Moll I. Overexpression of brain-derived neurotrophic factor increases Merkel cell number in murine skin. *J Invest Dermatol* 1999;**113**(4):691-2.
319. Bao S, Chen L, Qiao X, Thompson RF. Transgenic brain-derived neurotrophic factor modulates a developing cerebellar inhibitory synapse. *Learn Mem* 1999;**6**(3):276-83.
320. Qiao X, Suri C, Knusel B, Noebels JL. Absence of hippocampal mossy fiber sprouting in transgenic mice overexpressing brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 2001;**64**(3):268-76.
321. Tolwani RJ, Buckmaster PS, Varma S, et al. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 2002;**114**(3):795-805.
322. Croll SD, Suri C, Compton DL, et al. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 1999;**93**(4):1491-506.
323. Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, et al. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 2002;**68**(5):568-78.

324. Jankovic J, Noebels JL. Genetic mouse models of essential tremor: are they essential? *J Clin Invest* 2005;**115**(3):584-6.
325. Kralic JE, Criswell HE, Osterman JL, et al. Genetic essential tremor in gamma-aminobutyric acidA receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Clin Invest* 2005;**115**(3):774-9.
326. Roberts DS, Hu Y, Lund IV, Brooks-Kayal AR, Russek SJ. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor alpha 4 subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2006;**281**(40):29431-5.
327. Meng H, Larson SK, Gao R, Qiao X. BDNF transgene improves ataxic and motor behaviors in stargazer mice. *Brain Res* 2007;**1160**:47-57.
328. Qiao X, Hefti F, Knusel B, Noebels JL. Selective failure of brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the cerebellum of stargazer, a mutant mouse with ataxia. *J Neurosci* 1996;**16**(2):640-8.
329. Koizumi H, Hashimoto K, Iyo M. Dietary restriction changes behaviours in brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice: role of serotonergic system. *Eur J Neurosci* 2006;**24**(8):2335-44.
330. Shifman S, Bell JT, Copley RR, et al. A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biol* 2006;**4**(12):e395.
331. Yi N, Diamant A, Chiu S, et al. Characterization of epistasis influencing complex spontaneous obesity in the BSB model. *Genetics* 2004;**167**(1):399-409.
332. Cheverud JM, Vaughn TT, Pletscher LS, et al. Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mamm Genome* 2001;**12**(1):3-12.
333. Martin LJ, Cianflone K, Zakarian R, et al. Bivariate linkage between acylation-stimulating protein and BMI and high-density lipoproteins. *Obes Res* 2004;**12**(4):669-78.
334. Sun G. Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes. *Omic* 2007;**11**(1):25-40.
335. Dahlman I, Arner P. Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2007.
336. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003;**35**(3):215-7.

Agraiments

Un dia de CRG

El matí, mentre pedalo cap al CRG, estic content. Estic content perquè tinc motius de sobres que em fan anar a treballar amb il·lusió. Per exemple, he tingut molta sort amb els directores de tesi que m'han tocat. La Mònica ha estat durant aquests anys la meva segona "mama". Ella ha estat encantada de compartir amb mi tot el que sap i de preocupar-se en tot moment de que les coses surtin bé. També m'ha ensenyat i ajudat a organitzar la xarxa d'idees sovint inconnexes que s'anaven formant al meu cervell durant aquests anys. M'encanta poder compartir amb ella aquelles estones de cafès i cigarretes, tot ensucrat amb el seu increïble sentit de l'humor que mai deixa de banda, igual que la seva sinceritat, que sempre agrairé. També és d'admirar la seva infinita paciència que, tot i l'esforç, no he aconseguit esgotar (crec). Sóc conscient de que treballar amb el Xavier, al seu laboratori, és un privilegi del que no tothom pot gaudir. Tenir un "jefe" amb una ment tan científicament oberta t' il·lusiona dia a dia i et fa sentir particip del projecte que s'està desenvolupant. El seu laboratori és un dels exemples de que no cal ser a sobre de la gent perquè les coses funcionin. I no sé ben bé com s'ho ha fet, però ha aconseguit que en tot moment hi hagi un excel·lent ambient de treball. La motivació i el "bon rollo" es respira en l'aire.

Mentre pujo amb l'ascensor, sento un neguit a l'estómac per l'emoció de tornar a veure tots els meus companys. Ja queda menys!

En entrar pel laboratori, tots els amics i amigues -ja fa molt que han deixat de ser companys-, em saluden amb un entrançable "bon dia" que constitueix el primer estimulants. La Nina em saluda amb el seu entrançable "hola tonto", o de vegades "hola hermós", que m'encanta. Sempre he pensat que té un cor desproporcionadament gran, igual que el seu magnífic sentit de l'humor, farcit de jocs de paraules inesperats. I quan cal, sempre està disposada a ajudar i a escoltar. L'Ester Ballana, si no està en una de les seves estones de rialles aspirades, també em saluda tota contenta com sempre, i em comenta alguna cosa conjugant els verbs com només fan a Torelló, com per exemple: "com és que vinguessis amb bici avui?". Quina sort que tinc de poder comptar amb els seus savis consells, i com m'agraden les esbravades que hem fet últimament... Que bé que pugui observar cada matí el somriure de la Maya! És tan gran que cada dia en miro un tros diferent. Així irradia felicitat i alegria a tothom qui l'observa. M'encanta que hagi estat acompanyant meva de viatge i de congrés, que sigui una mica sapastre com jo, que sigui tan bona, i que em cuidi tant, a mi i a tothom, en tot moment. Qui també m'ha cuidat sempre, com si fos la meva germana gran, i em rep sempre amb un: "Tu..... què?, com estàs?" és l'Ester Saus. M'alegro molt d'haver-la tingut a prop aquests últims anys. No sé per què no va venir abans! Ella sempre ha estat disposada a ajudar-me i sempre és llampant i impecable en tot el que fa. I que bé que estaven aquells esmorzars-reunió, amb la France, l'Ester, i la Mònica... La Marta Morell fa que tot funcioni. I quan dic tot, és tot. I és que sense ella tot funcionaria del revés: les comandes no arribarien mai, el microscopi serviria per mirar les estrelles, les neveres escalfarien, les PCR's centrifugarien, i fins i tot les coses caurien cap al sostre. I tot i això, encara li queda temps i ganes de tenir sentit de l'humor i de ser "carinyosa" amb tots nosaltres, cosa que és d'admirar. El Manel és dels pocs que la comprenen, i tots dos formen un magnífic equip de l'ordre. L'Anna Brunet està bé, perquè és de les poques que

no es posen a parlar de farbalans a les quatre de la tarda, i perquè m'encanten els seus comentaris sarcàstics. La Celia, la més discreta, em saluda amb un baixet "hola Txema" que em fa adonar que tot és al seu lloc. Tot i que sembla que no hi sigui perquè no se la sent, o bé perquè és a Madrid, sempre és a prop nostre, disposada a fer costat a qui sigui. És bo tenir un element de serenor al grup també... Gràcies a tots!. Si hagués de fer una tesi post-doctoral, us prometo que la faria amb tots vosaltres!!!

Després d'aquesta reflexió proposo d'anar a fer un cafè. Una resposta freqüent és: "bueno, va, però cinc minuts que tinc molta feina". I després resulta que ningú té rellotge...

Mentre s'engega l'ordinador, en comptes de perdre el temps recordo la Marta Ribasés. Sé que en part gràcies a ella he tingut un projecte de recerca. Ella em va introduir en el món de la genètica dels trastorns de l'alimentació. La seva tesi doctoral ha estat, primer, la base de la meua, i després, un model a seguir. Va ser un plaer poder treballar i aprendre amb ella durant els dos primers anys. Vaig riure molt, i vaig aprendre molt. I vaig riure molt.

Bé, vaig a treballar una mica...

Ja se m'ha penjat l'ordinador... no et posis nerviós, encara se't penjaria més si no fos pel suport informàtic del CRG, especialment el Diego, que m'ha suportat informàticament... O potser és que no estic utilitzant les eines adequades... Després li preguntaré al Lluís, que ell sempre està disposat a donar un cop de mà. Tenir el Lluís allà em tranquil·litza, perquè sé que trobarà una solució a qualsevol problema informàtic o de bases de dades que pugui tenir, així com a altres problemes més genòmics.

De moment, vaig a passejar pel passadís a veure si quan torno el Windows "volvió a funcionar inesperadament" i si no, aniré a molestar a la Yolanda i la Maya, que sempre és divertit, ara que porten molta estona concentrades... És maco creuar-te amb els companys de la resta de laboratoris. D'ells sempre rebo salutacions amables, i sempre estan disposats a ajudar en tot allò que no és purament genètic o genòmic. Sempre apreciaré els consells savis del Jon i les extenses explicacions de la Núria Andreu, les immunes del Xavi i el tractament de vídeos de l'Ignasi.

Mentre treballa, penso en la dedicació d'altra gent que fa que tot vagi funcionant. A l'hospital de Bellvitge hi ha el Dr. Fernando Fernández, que, juntament amb el seu equip, fa un magnífic treball clínic amb les pacients. Ha estat una sort poder comptar amb la seva professionalitat. A més, des de fa poc, tinc la sort de treballar com a membre en la seva unitat, on, gràcies a la paciència de la Cynthia, la Zaida la Laura, la Eva, el Juanjo, la Isabel i l'Antonio, i la resta de doctores de la unitat, he pogut començar a aprendre què són els trets de personalitat, la psicopatologia, etc. Ha estat molt enriquidor i estic profundament agraït al Fernando d'haver-me permès compaginar l'escriptura de la tesi amb aquesta nova feina a l'Unitat. Gràcies també per trobar-ho tot sempre tant "estupendo". També agraeixo a tots els pacients i familiars la seva participació desinteressada en els estudis presentats en aquesta tesi, alhora que tots els grups col·laboradors que hi han participat.

A l'IRO i a l'estabulari del PRBB hi ha ratolins que han lluitat i han donat la vida per aquest projecte, als que estic profundament agraït. També agraeixo a tots els cuidadors que han fet una tasca indispensable: Joana Visa, Àlex, Rosa, Sílvia, Mireia, Pep i Nati.

Mentre segueixo treballant -ara ja he desendollat i engegat l'ordinador de nou-, estic tranquil. Tranquil de saber que els del lab del CeGen estan disposats a ajudar-me en qualsevol moment. Que l'Anna Carreras, a més de ser una amiga, és una treballadora ràpida i eficient. Que l'Anna Puig trobarà solucions i m'aconsellarà sobre quina és la millor manera de genotipar els micros, i que el Carles extraurà DNA fins i tot d'allà on no n'hi ha. Gràcies a la Cecília, que es quedarà fins l'hora que faci falta, tindrè els resultats que necessito per la xerrada de demà...

Haver de fer les xerrades és un pal, però és quan tinc l'oportunitat de presentar el que he fet, per a que tothom, especialment els post-docs, faci aportacions, que sempre han estat constructives. La Mònica Bayés, el Rafa, l'Eulàlia, la Yolanda i la Kelly han donat idees crucials per encaminar el projecte cap a millor port. A part dels post-docs, les investigadores del programa també m'han ajudat molt amb els seus consells. No sé quina mena de construcció hagués sortit sense l'ajuda de la Cristina Fillat i la Susana de la Luna. Per altra banda la Mara Dierssen ha estat sempre disposada a fer estudis de neuroconducta a qualsevol ésser que se li posi al davant, a més de fer unes excel·lents disseccions de teixit nerviós. Finalment, gràcies a les microinjeccions del Luis Sánchez vam obtenir els transgènics.

Bé, hauria de fer alguns anàlisis estadístics... que bé! Des de que el Juan Ramón em va introduir en el món de l'R, és un petit vici que tinc. Ha estat una sort poder aprendre al seu costat les funcions bàsiques d'aquest entorn estadístic, amb el que ell fa meravelles. Gràcies per ajudar-me i per creure amb el que tu anomenes, "p***** mentals", m'imagino que amb *Carinyo*. També som afortunats de tenir la Geòrgia a prop, que és una gran ajudant, que sempre amb il·lusió i de forma desinteressada, s'ha deixat la pell treballant amb les nostres dades.

Vaja, ja és l'hora de dinar... ja vinc... Avui, a més dels meus *tupers*, m'ha tocat ració extra de llenties de la sogra del JR, una mica de salmó fumat (casolà) de la Marta, i cus-cus del Jordi de l'Ester Saus!!! Què més es pot demanar? Durant el cafè hem rigut una estona més, no diré aquí quins són els temes preferits de conversa...

Abans de seguir treballant baixaré a la Unitat de Microarrays a preguntar uns dubtes al Lauro, sempre servicial. Res seria tan divertit sense les estones que he passat amb el Juanjo, aprenent què carai es pot fer amb un arxiu de 44.000 files. Gràcies per totes les eines que has creat, per les teves ganes desinteressades d'ajudar-me en tot moment, i pel teu sentit de l'humor. Gràcies al "Joincol", la meva qualitat de vida ha millorat.

Ja és hora de plegar. Avui és dilluns, i toca anar a córrer amb el Carles pel Parc Güell. Qui sap, potser sense aquestes sortides hagués esclatat algun dia... ...buf!!! estic esgotat... Però per sort, m'espera una torradeta amb confitura de la Jaia de l'Ester!!!

Avui no, però sovint tot i que últimament no tant, també gaudeixo d'agradables estones amb amics biòlegs, no biòlegs, barcelonins, no barcelonins, antics companys de l'IBB, entre d'altres, que m'han fet companyia en ambients lliures de feina, d'RNA_s, i de tesi pendent d'escriure. Gràcies a tots per ser a prop meu, malgrat haver-me mostrat llunyà últimament...

Em fa feliç cada dia saber que quan arribo a casa m'espera l'Ester. Sé que sóc afortunat d'haver viscut amb ella aquesta etapa, que sense ella hagués estat molt més difícil

d'aguantar. I m'omple d'orgull saber que hem pogut escriure la tesi tots dos (cadascú la seva) alhora, sense que hagi esclatat una guerra nuclear. Moltes gràcies per tot el que m'has ajudat, per tot el que m'has ensenyat, no només referent a la tesi, sinó referent a la vida. I per aguantar-me dia a dia, perquè ja sé que si aguantar-me a mi té el seu punt de dificultat, més dur deu haver estat aguantar-me a mi i a la meva tesi alhora.

Şón les nou, s'acosta l'hora de sopar... Per sort encara ens queden alguns avituallaments suculents que ens va fer arribar la part de família reusenca... Veig que han trucat els meus pares per si volem anar a sopar a casa... ...massa tard. Un altre dia serà. Ells, juntament amb els meus germans i parelles sempre m'han fet costat i han tingut una fe, més o menys cega, amb tot allò que he fet, malgrat que encara em segueixen preguntant com pot ser que hi hagi ratolins anorèxics que es preocupin per la seva cintura. Especialment els meus pares, sempre m'han ajudat en tot, i ho han fet més que bé. I com que ara tinc l'oportunitat de fer-ho constar per escrit, i no sé si en tindrè més, doncs he decidit aprofitar-ho. Moltes gràcies!

Ara ja és hora d'anar a dormir. Estic relativament tranquil perquè ja ho tinc tot fet. Şort que el meu cosí Pau m'ha fet la portada, perquè més temps no em sobra... Gràcies. Abans de posar-me a contar ovelles, em pregunto si realment sóc mereixedor de tenir-vos a tots vosaltres tan a prop. Espero que sí. I desitjo que, algun dia, o que alguna vegada, us torni tot allò que m'heu donat.

Moltes gràcies.