

Elena Bonzón Kulichenko

**ACCIONES LIPOSTÁTICAS DE LA LEPTINA
ACTUANDO VÍA SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL: MECANISMOS MOLECULARES
EN EL HÍGADO Y EN EL TEJIDO ADIPOSEO
BLANCO. EFECTO DE LA RESISTENCIA
CENTRAL A LA LEPTINA**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-560-2



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2007



**UNIVERSIDAD DE
CASTILLA-LA MANCHA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica, Inorgánica y Bioquímica

**Acciones lipostáticas de la leptina actuando vía
sistema nervioso central: mecanismos
moleculares en el hígado y en el tejido adiposo
blanco.**

Efecto de la resistencia central a la leptina.

Elena Bonzón Kulichenko

Abril, 2007

**Tutores: Dra Nilda Gallardo Alpizar
Dr. Antonio Andrés Hueva**

El presente trabajo se ha realizado en el laboratorio “Dra. Cubero Llabrés” del Área de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Castilla-La Mancha, con ayuda de una beca para la formación de personal investigador de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Enero 2003-Diciembre 2007).

Memoria que presenta la licenciada

ELENA BONZÓN KULICHENKO

Para aspirar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Directores de esta Tesis:

Dra. Nilda Gallardo

Dr. Antonio Andrés Hueva

Agradecimientos

Han sido muchas las personas que durante estos años de trabajo me han prestado su apoyo tanto a nivel profesional como personal y han contribuido de algún modo a la realización de esta tesis. Intentaré agradecerles a todas ellas, de la mejor forma que pueda, tratando de no olvidar a nadie.

Ante todo me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, la Dra Nilda Gallardo y el Dr. Antonio Andrés. Aunque me resulta difícil poderles expresar todo el agradecimiento que merecen en unas pocas líneas, les doy las gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto, por la confianza que han depositado en mi, por su incalculable ayuda personal y profesional, y por todo el esfuerzo que han realizado de forma incondicional para que esta tesis pudiera llegar al final en concordancia con mis intereses futuros.

Al Dr Andrej Shevchenko por haberme aceptado en su laboratorio, por todo su apoyo profesional y por todo el enriquecimiento científico que me aportó durante mi estancia en su laboratorio. Asimismo quisiera darle las gracias al Dr. Dominik Schwudke por iniciarme en el mundo de la lipidómica y por el esfuerzo que me dedicó durante los 3 meses que compartimos. A Christer Ejsing, Julio Sampaio, Patrice Waridel y Magno Junqueira por poner a mi disposición sus conocimientos de espectrometría de masas y por las apasionantes discusiones de los resultados experimentales. Igualmente, gracias a Veneeth Surendranath por su sonrisa, consejos y apoyo en general, que junto al resto del grupo de Espectrometría de Masas del Instituto Max-Planck, hicieron de mi estancia en Dresden una etapa inolvidable.

A la Dra. Teresa Fernández Agulló por enseñarme la técnica de la operación intracerebroventricular y por el gran esfuerzo realizado durante las operaciones de más de 150 animalitos...

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio tanto de Ciudad Real, como de Toledo; tanto a los que aún están: el trío de las Cármenes (Martínez, Arribas y Fernández), Pablo, Mairena, María Angeles, José Luis, Macu, Alberto, Sergio, como los que ya no están: Javier, Marga, David, Charo....

A la Dra. María de los Angeles Chávez Plánez (Maya) por ser mi primera tutora y por iniciarme en la ciencia.

A la Universidad de Castilla-La Mancha, y en particular a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha por haber hecho posible la realización de este trabajo mediante la concesión de cuatro años de beca.

A los amigos que en muchos momentos me escucharon y supieron darme ánimo y consejo.

A mi Eduar, mi segunda mitad, mi amor, amigo y compañero incondicional. Ha sido el centro de mi equilibrio tanto en lo personal, como en lo profesional.

Esta Tesis esta dedicada a mis padres porque todo lo que soy se lo debo a ellos. Siempre han sido mi ejemplo y mi apoyo incluso a pesar de la distancia física que hemos tenido que sufrir en los últimos años.

A todos, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

RESUMEN DE LA TESIS

La leptina actuando vía central o periférica disminuye la ingesta, la adiposidad y aumenta la sensibilidad a insulina del organismo como un todo. La dilucidación de las vías de señalización de la leptina y de los mecanismos que provocan la resistencia a la misma, son factores claves para entender el fenómeno de la obesidad y la Diabetes tipo II, así como para permitir el desarrollo de una manera consciente de fármacos que corrijan estas patologías. En la presente tesis se abordan algunos mecanismos moleculares responsables de los efectos lipostáticos y sensibilizantes a insulina de la leptina actuando a través del sistema nervioso central. Específicamente, se ha estudiado el efecto de la leptina suministrada por vía central sobre el metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo epididimal (TAE). Asimismo, en el TAE se analizó la influencia de la leptina central sobre el metabolismo de los esfingolípidos y sobre la cascada de señalización de insulina. Finalmente, en animales envejecidos, que constituyen un modelo con resistencia central a la leptina, se analizaron las alteraciones en el metabolismo lipídico en el hígado y el TAE, y del metabolismo de los esfingolípidos en el TAE. Como resultado, se obtuvo que la leptina actuando solamente sobre el sistema nervioso central y de forma independiente de sus propiedades anorexígenas, provoca adaptaciones metabólicas específicas de tejido en el hígado y el TAE, que limitan la acumulación de TAG y AG libres en ambos tejidos y reducen el contenido de TAG en el plasma. Así, la leptina central promueve un incremento de la β -oxidación de los AG, y a su vez, un aumento de la lipólisis en el TAE. Los AG liberados son capturados y oxidados fundamentalmente por el hígado, donde vía PPAR α y PGC-1 α , se incrementa la expresión de enzimas involucradas en la captura y β -oxidación de AG. Adicionalmente, en el hígado la leptina disminuye la lipogénesis a través de la inhibición de la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis *de novo* de AG vía reducción de la expresión génica de SREBP-1c. En el TAE la leptina también reduce la lipogénesis inhibiendo la expresión de las enzimas involucradas de la síntesis *de novo* de AG y en la gliceroneogénesis bloqueando la maduración proteolítica de SREBP-1c. Además, en este tejido la leptina promueve resistencia a la insulina desde etapas tempranas de la cascada de señalización de insulina (IR, IRS-1, Akt2), traducándose en una menor captura de glucosa estimulada por insulina en este tejido. Asimismo, la leptina inhibe la síntesis *de novo* de ceramida del TAE, lo cual podría mejorar la función fisiológica este tejido de actuar como tampón de las grasas en el organismo, protegiéndolo de la lipoapoptosis. Como resultado de todos estos efectos, la leptina central reduce los niveles plasmáticos de insulina y potencia la acción de un estímulo agudo e *in vivo* de insulina sobre la disminución plasmática de AG. Por otro lado, en un estado de resistencia central a la leptina, aumenta el contenido de grasas en el

hígado y el plasma. La incrementada lipogénesis en el hígado, y no en el TAE, es la responsable de la elevada adiposidad de los animales viejos, explica en parte la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia de estos animales, y podría ser el sitio periférico primario del fallo de la señalización de leptina que precede al desarrollo de la resistencia a insulina en el tejido adiposo y el músculo esquelético. Finalmente, la disminución de la lipólisis, el aumento de la esterificación y el mantenimiento de los niveles de ceramida en valores normales en el TAE, posiblemente gracias a la hiperleptinemia, permiten la hiperplasia de este tejido, constituyendo una adaptación metabólica de supervivencia en los animales viejos.

THESIS ABSTRACT

Leptin reduces food intake, adiposity and increases the whole-body insulin sensitivity. Dysregulations of leptin action result in obesity, insulin resistance and Type 2 diabetes. This thesis explores the molecular mechanisms responsible for the lipostatic and insulin-sensitizing effects of leptin acting only through the brain. Central leptin infusion elicits tissue-specific effects on liver and epididymal white adipose tissue (eWAT), that reduce triacylglycerol (TAG) and total fatty acids (free and acyl-CoA) in both tissues and TAG in plasma. Central leptin promotes β -oxidation of fatty acids (FA) in eWAT by increasing the mRNA levels of the transcription factors involved in lipid oxidation. Additionally, leptin increases the ATGL-mediated lipolysis in this tissue. The released free FA are taken up and oxidized mainly by the liver. Additionally, central leptin down-regulates the expression of lipogenic enzymes in the liver by reducing the mRNA levels of the lipogenic transcription factor SREBP-1c. In eWAT leptin also reduces the expression of lipogenic and glyceroneogenic enzymes, but controlling SREBP-1c post-transcriptionally, inhibiting its proteolytic maturation. Also, in eWAT leptin reduces lipogenesis by promoting insulin resistance from the early steps of the insulin signaling pathway (IR, IRS-1 and Akt2), which results in decreased glucose uptake by this tissue upon insulin stimulation. Additionally, by inhibiting *de novo* ceramide synthesis in eWAT, central leptin appears to protect this tissue from lipotoxicity. As a result, central leptin reduces plasmatic insulin levels and enhances the *in vivo* insulin ability to reduce plasmatic free FA. On the other hand, central leptin resistance (aged rats) is linked to increased contents of lipids in liver, eWAT and plasma. The increased lipogenesis in the liver, but not in eWAT, is the one responsible for the augmented adiposity of the aged rats, and explains their hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. Also, we suggest that the liver could be the primary site for the leptin resistance build-up that precedes the development of insulin resistance in eWAT and skeletal muscle. Finally, the decrease in lipolysis, the increase in esterification and the maintenance of eWAT ceramide contents within normal levels, contribute to eWAT hyperplasia, constituting a survival advantage that prevents the aged rats from becoming diabetic.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN DE LA TESIS.....	5
THESIS ABSTRACT	7
1 INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL EN MAMÍFEROS.....	18
1.1.1 El circuito neuronal regulador del peso corporal.....	18
1.1.2 Homeostasis de la glucosa y las grasas	19
1.2 TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL INTRACELULAR DE LA INSULINA	21
1.3 DIABETES TIPO II Y RESISTENCIA A LA ACCIÓN DE LA INSULINA	24
1.3.1 Mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a la insulina.....	24
1.3.2 Efecto de las grasas sobre la sensibilidad a insulina.....	25
1.3.3 Modelo “lipocéntrico” del desarrollo de la Diabetes tipo II.....	27
1.4 LA LEPTINA Y SU RECEPTOR	28
1.4.1 La leptina: producción y secreción.....	29
1.4.2 El receptor de leptina: expresión y mecanismo de transducción de la señal.....	30
1.5 ACCIÓN DE LA LEPTINA SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO	32
1.6 ACCIÓN DE LA LEPTINA SOBRE ÓRGANOS PERIFÉRICOS VÍA SNC	33
1.7 ACCIÓN DIRECTA DE LA LEPTINA SOBRE ÓRGANOS DIANA	35
1.8 INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LA LEPTINA Y LA INSULINA.....	36
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1 MATERIALES.....	41
3.2 MODELO DE EXPERIMENTACIÓN	41
3.3 IMPLANTACIÓN DE MINI-BOMBAS OSMÓTICAS	41
3.4 TRATAMIENTO “IN VIVO” CON INSULINA.....	43
3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA.....	43
3.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA Y LEPTINA SÉRICAS	43
3.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS EN EL SUERO.....	43
3.8 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DEL TAE	44
3.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	45
3.10 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS (SDS-PAGE).....	45
3.11 TRANSFERENCIA A MEMBRANAS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)	46
3.12 EXTRACCIÓN DE RNA.....	46
3.13 TRANSCRIPCIÓN INVERSA DE MRNA A CDNA	47
3.14 REAL-TIME PCR.....	48
3.15 DETERMINACIÓN DE TAG, AG Y COLESTEROL TOTAL EN HÍGADO Y TAE	49
3.16 ANÁLISIS DEL PERFIL DE AG COMPONENTES DE TAG DE HÍGADO Y TAE.....	50
3.16.1 Purificación de TAG.....	50
3.16.2 Hidrólisis de TAG y metilación de AG.....	51
3.16.3 Cromatografía de gases.....	51
3.17 LIPIDÓMICA DEL TAE Y DE SUS FRACCIONES SUBCELULARES DE MEMBRANA	51
3.17.1 Extracción de lípidos totales a partir de tejido.....	51
3.17.2 Fraccionamiento de ceramidas por cromatografía en capa fina (TLC).....	52
3.17.3 Extracción de lípidos totales a partir de fracciones subcelulares de membrana.....	52
3.17.4 Acetilación de las muestras de fracciones subcelulares de membrana para la determinación de colesterol libre por espectrometría de masas	52
3.17.5 Espectrometría de masas QqTOF.....	53
3.17.5.1 Análisis cualitativo y cuantitativo de esfingomielinas y fosfatidilcolinas.....	53
3.17.5.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de ceramida	54
3.17.5.3 Análisis cuantitativo de colesterol libre.....	58

3.18	ANÁLISIS DE LOS DATOS Y PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO	59
4	RESULTADOS.....	61
4.1	EFFECTO DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS ANIMALES	61
4.2	EFFECTO DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE LAS ACCIONES PERIFÉRICAS DE LA INSULINA IN VIVO.....	62
4.3	EFFECTOS DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL HÍGADO Y EL TAE.....	64
4.3.1	Contenido de lípidos en el hígado y el TAE	64
4.3.2	Expresión génica de enzimas del metabolismo lipídico en el hígado y el TAE	65
4.3.2.1	Expresión de los factores de transcripción del metabolismo lipídico en el hígado y en el TAE.....	67
4.3.2.2	Síntesis de novo de AG en el hígado y en el TAE, y gliceroneogénesis en el TAE.....	68
4.3.2.3	Lipólisis y esterificación en el TAE.....	68
4.3.2.4	Captura y oxidación mitocondrial de AG en el hígado y en el TAE	69
4.3.3	Perfil de AG de los TAG en el hígado y el TAE.....	69
4.4	EFFECTOS DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE EL METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN EL TAE.....	70
4.4.1	Producción de ceramida por síntesis de novo o degradación de esfingomielina.....	70
4.4.2	Contenido de ceramida en Golgi	76
4.4.3	Síntesis de esfingomielina y composición lipídica de la membrana plasmática.....	77
4.5	EFFECTO DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE LA MADURACIÓN DE SREBP-1C EN EL TAE	80
4.6	EFFECTOS DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA A UN ESTÍMULO AGUDO DE INSULINA IN VIVO EN EL TAE.....	82
4.6.1	Niveles de mRNA y de proteína total de IR-A/B, IRS-1 y GLUT4.....	82
4.6.2	Expresión y niveles proteicos de SOCS3.....	84
4.6.3	Etapas tempranas de la vía de señalización de insulina.....	85
4.6.4	Activación de la Akt2 y translocación del GLUT4 a la membrana plasmática	88
4.7	ALTERACIONES DE LOS EFECTOS LIPOSTÁTICOS DE LA LEPTINA EN UN MODELO DE RESISTENCIA CENTRAL A LA HORMONA.....	90
4.7.1	Características biológicas de los animales con resistencia central a la leptina.....	90
4.7.2	Contenido de lípidos en el hígado, el TAE y el suero	91
4.7.3	Expresión génica de enzimas del metabolismo lipídico en el hígado y el TAE	92
4.7.3.1	Factores de transcripción del metabolismo lipídico en el hígado y en el TAE.....	92
4.7.3.2	Síntesis de novo de AG en el hígado y en el TAE, y gliceroneogénesis en el TAE.....	93
4.7.3.3	Lipólisis y esterificación en el TAE.....	93
4.7.3.4	Captura y oxidación mitocondrial de AG en el hígado y en el TAE	94
4.7.4	Producción de ceramida por síntesis de novo o degradación de esfingomielina en el TAE	95
5	DISCUSIÓN.....	98
5.1	ACCIONES LIPOSTÁTICAS DE LA LEPTINA CENTRAL EN EL TAE Y EL HÍGADO	98
5.2	ALTERACIONES EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN EL TAE LUEGO DE UN TRATAMIENTO CENTRAL CON LEPTINA	103
5.2.1	Receptor de insulina.....	104
5.2.2	IRS-1.....	105
5.2.3	Akt2 y GLUT4	106
5.3	IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LAS ACCIONES LIPOSTÁTICAS DE LA LEPTINA EN EL TAE	107
5.4	EFFECTO DE LA LEPTINA CENTRAL SOBRE LAS ACCIONES IN VIVO DE LA INSULINA	110
5.5	ALTERACIONES EN LAS ACCIONES LIPOSTÁTICAS DE LA LEPTINA EN UN MODELO DE RESISTENCIA CENTRAL A LA HORMONA.....	111
6	CONCLUSIONES	118
7	BIBLIOGRAFÍA	121
8	ANEXO I.....	140
9	ANEXO II	141

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Regiones hipotalámicas que controlan la homeostasis energética.....	19
Figura 2. Esquema del mecanismo de transmisión de la señal de la insulina.....	22
Figura 3. Esquema del <i>splicing</i> alternativo del exón 11 del gen del IR.....	23
Figura 4. Esquema de los sitios potenciales de acción de los AG sobre el metabolismo de la glucosa estimulado por insulina en músculo.	26
Figura 5. Isoformas del receptor de leptina y algunas mutaciones en roedores utilizados como modelos de obesidad.	31
Figura 6. Esquema de la transducción de la señal de la leptina.....	32
Figura 7. Localización del receptor de leptina en el cerebro de rata.....	33
Figura 8. Representación esquemática de la implantación de las minibombas osmóticas.	42
Figura 9. Coordenadas del ventrículo lateral en el estereotáxico.	42
Figura 10. Representación esquemática del protocolo de centrifugación diferencial utilizado para aislar las distintas fracciones de membrana y el citoplasma celular a partir del TAE.....	45
Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i>	47
Tabla 2. Naturaleza de los genes analizados mediante PCR en tiempo real con el sistema Taqman-MGB.....	48
Tabla 3. Naturaleza de los genes analizados mediante PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green.....	49
Figura 11. Esquema del diseño de los oligos para la amplificación selectiva de IR-A e IR-B por RT-PCR en tiempo real.	49
Figura 12. Estructura del fragmento iónico de la cabeza de fosforilcolina (m/z 184.07), empleado para la cuantificación de fosfatidilcolinas y esfingomielinas por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.	53
Figura 13. <i>Precursor ion scan</i> representativo del fragmento de la cabeza de fosforilcolina (m/z 187.07) específico para PC y SM, de un extracto lipídico de MP de TAE.....	54
Figura 14. Estructuras de los fragmentos iónicos provenientes de la fragmentación inducida por colisión de una base esfingoide de 18 carbonos, empleados para la cuantificación de ceramida por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.....	55
Tabla 4. Especies de ceramida detectadas en el TAE de rata por espectrometría de masas.....	55
Figura 15. Optimización de la energía de colisión para la cuantificación de ceramida por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.....	56
Figura 16. Efecto de la naturaleza del grupo N-acilo sobre la abundancia relativa de los fragmentos específicos de una base esfingoide de 18 carbonos obtenidos por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.	57

Figura 17. Esquema de la acetilación del colesterol con cloruro de acetilo y de la fragmentación del aducto de amonio del colesterol acetato.	58
Figura 18. La leptina central reduce el peso corporal y la ingesta alimentaria.	61
Tabla 5. Efecto de la leptina central sobre las características biológicas de los animales	61
Figura 19. La leptina central reprime su propia expresión en el TAE.	62
Figura 20. La leptina central aumenta la expresión de la enzima gluconeogénica PEPCK en el hígado.	63
Figura 21. La leptina central potencia la capacidad de la insulina de promover la disminución de ácidos grasos (AG) libres en el suero.	64
Figura 22. La leptina central ejerce efectos anti-esteatóticos sobre el hígado y el TAE.	65
Tabla 6. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el hígado	66
Tabla 7. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el TAE	67
Tabla 8. La leptina central altera la abundancia relativa de AG en los TAG del hígado, pero no del TAE	70
Figura 23. (A) Espectro de masas TOF representativo en modo positivo de un extracto lipídico crudo de TAE. (B) Espectro de masas en tándem representativo de Cer16:0 (<i>m/z</i> 538.6) de un extracto lipídico crudo de TAE.	72
Tabla 9. Cambios en los niveles de ceramidas en un extracto lipídico crudo de TAE luego de un tratamiento i.c.v con leptina.	73
Figura 24. (A) Espectro de masas TOF representativo en modo positivo de un extracto lipídico de TAE purificado por TLC. (B) Espectro de masas en tándem representativo en modo positivo de Cer16:0 (<i>m/z</i> 538.6) de un extracto lipídico de TAE purificado por TLC.	74
Tabla 10. Cambios en los niveles de ceramidas en un extracto lipídico purificado por TLC de TAE luego de un tratamiento i.c.v con leptina.	75
Tabla 11. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo de los esfingolípidos en el TAE	76
Tabla 12. La leptina central reduce los niveles totales de ceramida y altera el perfil de los AG componentes de las ceramidas en el Golgi del TAE.	77
Tabla 13. La leptina central altera la composición lipídica de la MP del TAE.	79
Figura 25. La leptina central inhibe la maduración de SREBP-1c en el TAE.	81
Figura 26. La leptina central no afecta el contenido de colesterol libre en el RE del TAE.	81
Figura 27. La leptina central induce la expresión de INSIG-1 en el TAE.	82
Figura 28. La leptina central no altera la expresión de las isoformas del IR, ni el nivel de proteína total de IR en el TAE.	83

Figura 29. La leptina central reprime la expresión de IRS-1 y GLUT4 en el TAE.	84
Figura 30. La leptina central aumenta los niveles de mRNA y de proteína de SOCS3 en el TAE.	85
Figura 31. La leptina central inhibe la respuesta a insulina del IR en el TAE.....	86
Figura 32. La leptina central inhibe la respuesta a insulina del IRS-1 en el TAE.	87
Figura 33. La leptina central altera la activación de la Akt2 estimulada por insulina en el TAE.	89
Figura 34. La leptina central impide la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática estimulada por insulina en el TAE.	90
Tabla 14. La resistencia central a la leptina resulta en una adiposidad incrementada.	91
Figura 35. La resistencia central a la leptina se caracteriza por acumulación de grasas en el hígado y el TAE, unido a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, manteniendo niveles normales de AG en suero.	92
Tabla 15. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el hígado	93
Tabla 16. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el TAE	94
Tabla 17. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo de los esfingolípidos en el TAE	95
Tabla 18. La resistencia central a la leptina no aumenta los niveles totales de ceramida, pero cambia el perfil de las mismas en el TAE.	96

ABREVIATURAS

?-MSH	?- <i>melanocyte-stimulating hormone</i> (hormona estimuladora de melanocitos, agonista del receptor de melanocortina)
?U	micro unidades
ACC	acetil-CoA-carboxilasa
ACTH	<i>adrenocorticotrophic hormone</i> (hormona adrenocorticotrópica)
AG	ácidos grasos
AgRP	<i>agouti-related protein</i> (péptido homólogo con la proteína agutí)
AMP	adenosina-monofosfato
APS	proteína adaptadora con dominios PH y SH2
ARC	núcleo arcuato hipotalámico
ATGL	<i>adipocyte triglyceride lipase</i> (lipasa de triglicéridos adipocitaria)
BHT	Butil hidroxil tolueno
BSA	bovine serum albumin (albúmina de suero bovina)
C3G	<i>CRK SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor</i> (factor de liberación de nucleótidos de guanina unidos al dominio SH3 de la proteína CRK)
CAP	proteína asociada a Cbl
CART	<i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i> (transcrito regulado por cocaína y anfetamina)
c-Cbl	proto-oncogen
col.	Colaboradores
CPT-1	carnitina palmitoil transferasa
CYT	citoplasma
D6Dsa	delta6-desaturasa de ácidos grasos
DAGT-1	diacilglicerol aciltransferasa-1
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
Dominio PH	dominio de homología a pleckstrina
Dominio PTB	<i>phosphotyrosine-binding domain</i> (dominio de unión a fosfotirosina)
Dominio SH2	dominio 2 de homología a quinasas de la familia Src
Dominio SoH	dominio con homología a sorbina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol (aminoetil éter) tetraacético
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i> (quinasa regulada por señal extracelular)
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i> (hormona estimuladora de folículo)
FAS	<i>fatty acid syntase</i> (sintasa de ácidos grasos)

FAT/CD36	<i>fatty acid translocase</i> (translocasa de ácidos grasos)
Gab-1	<i>Grb2-associated binding protein</i> (enlazador 1 asociado a Grb2)
GABA	<i>gamma-amino-butiric acid</i> (ácido gamma- aminobutírico)
GH	<i>growth hormone</i> (hormona de crecimiento)
Gln	glutamina
GLUT	transportador de glucosa
Grb2	<i>growth factor receptor-binding protein-2</i> (proteína de unión a factor de crecimiento – 2)
GRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i> (hormona liberadora de gonadotropina)
GSK3?	glucógeno sintasa quinasa 3-?
GTP	guanina-trifosfato
HEPES	ácido (n-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etano sulfónico]
HSL	<i>hormona sensitive lipase</i> (lipasa sensible a hormona)
i.c.v.	intracerebroventricular
IML	<i>intermediolateral column</i> (columna intermediolateral)
INSIG-1	<i>insulin induced gene</i> (gen inducido por insulina)
IR	<i>insulin receptor</i> (receptor de insulina)
IRS	<i>insulin receptor substrate</i> (substrato del receptor de insulina)
i.v.	intravenoso
JAK	<i>Janus kinases</i> (tirosina-quinasas de la familia Janus)
Kb	kilobases
Kd	constante de disociación
kDa	kilodalton
LDL	<i>low density lipoproteins</i> (lipoproteínas de baja densidad)
LH	<i>leuteinizing hormone</i> (hormona luteinizante)
LPL	<i>lipoproteic lipase</i> (lipsa lipoproteica)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógenos)
MC3R ó 4R	receptor de melanocortina-3 ó -4
MCD	malonil-CoA-d Descarboxilasa
MCH	<i>melanin-concentrating hormone</i> (hormona concentradora de melanina)
MP	membrana plasmática purificada
MRM	<i>multiple reactions monitoring</i> (análisis de múltiples reacciones)
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (dinucleótido fosfato de nicotinamida)
NaF	fluoruro sódico

NaN ₃	azida sódica
NPY	neuropéptido Y
PC	fosfatidil colina
PDK1	proteína quinasa dependiente de 3'-fosfoinositoles – 1
p(dN) ₆	hexanucleótidos sintéticos degenerados
PEPCK	fosfoenol-piruvato-carboxi-quinasa
PGC-1?	coactivador-1? de PPAR-?
PI3,4,5P3	fosfatidil-inositol-3,4,5-bifosfato
PI3-K	<i>phosphoinositol-3-kinase</i> (fosfoinositol-3-quinasa)
PI4,5P2	fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato
PIS	<i>precursor ion scanning</i> (barrido del ión precursor)
PKB	proteína-quinasa B
PKC	proteína-quinasa C
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
POMC	pro-opiomelanocortina
PP	polipropileno
PPAR-?	<i>peroxisomes proliferator-activated receptor</i> (receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma)
Pro	prolina
PTFE	PoliTetraFluoroEtileno
PTP1B	<i>protein tyrosine phosphatase 1B</i> (fosfotirosina fosfatasa 1B)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
rpm	revoluciones por minuto
SCAP	<i>SREBP-cleavage-activating protein</i> (proteína activadora del procesamiento proteolítico de SREBP)
SCD-1	<i>stearoyl-CoA desaturase-1</i> (estearoil-CoA desaturasa-1)
SDS	dodecil sulfato sódico
SEM	desviación estándar de la media
SM	esfingomielina
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso parasimpático
SNS	sistema nervioso simpático
SOCS-3	<i>suppressor of cytokine signaling</i> (supresor de la señalización por citoquinas)

SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i> (proteína de unión al elemento regulado por esteroles)
SSA	sistema simpático-adrenérgico
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> (transductores de la señal y activadores de la transcripción)
TAE	tejido adiposo epididimal
TAG	triacilglicéridos
T _m	temperatura media de fusión
TNF- α	<i>tumor necrosis factor</i> (factor de necrosis tumoral alfa)
Tris	trishidroximetilaminometano
Tween 20	polioxietilén sorbitán monolaurato
Tyr	tirosina
UI	unidades internacionales
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i> (lipoproteínas de muy baja densidad)
xg	gravidades

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación del peso corporal en mamíferos

El peso y las reservas de energía del organismo tienden a permanecer constantes a pesar de las grandes variaciones diarias en la ingesta de nutrientes. Este hecho indica que existe un mecanismo de regulación muy preciso que intenta equilibrar la ingesta y el gasto energético. Así, se ha comprobado que cambios en el peso corporal resultan en cambios compensatorios del gasto energético, que intentan recuperar el peso corporal inicial.

La precisión en el mantenimiento del peso y la composición corporal requiere de mecanismos que contrarresten el almacenamiento de energía en forma de grasa. Sin embargo, el desequilibrio crónico entre la ingesta y el gasto energético puede conllevar obesidad. También existen otros factores que afectan el equilibrio energético como son la composición de la dieta, los procesos neuroendocrinos y metabólicos responsables de la oxidación/almacenamiento de los nutrientes, entre otros (Milagro y Marques-López, 2002).

Los mecanismos básicos que regulan el balance energético residen en el SNC (Leibowitz y Hoebel, 1998), el cual realiza un análisis constante y preciso del estado energético global (ingesta, gasto y reservas energéticas) gracias a señales metabólicas, nerviosas y endocrinas. Por ejemplo, la ingesta de alimentos conlleva el desarrollo de distintas señales de ritmo circadiano, señales gastrointestinales y de nutrientes, las cuales llegan al SNC para modular el apetito. Algunas de estas señales actúan a corto plazo, con el objetivo de poner fin a un episodio de ingesta, modulando así el tamaño de las comidas. Por otro lado, el SNA y diversas hormonas circulantes (leptina, insulina, cortisol, grelina) regulan las respuestas metabólicas a la ingesta de alimentos, e incluso pueden ejercer sus efectos durante semanas o meses (Jéquer y Tappy, 1999). Todas estas señales, originadas de la ingesta, generan mecanismos eferentes que conllevan un ajuste cuantitativo y cualitativo, no solo de la ingesta, sino también del metabolismo energético, constituyendo un proceso de control multifactorial (Schwartz y col., 1999).

1.1.1 El circuito neuronal regulador del peso corporal

Aunque la regulación del balance energético reside en distintos niveles del encéfalo, es el hipotálamo la parte del SNC más estudiada e importante en relación con la regulación de la ingesta alimentaria (Fig. 1). En el hipotálamo existen conexiones nerviosas con la hipófisis para interactuar con la regulación endocrina; con el área posterior del cerebro, con el fin de modular los reflejos orales, sensitivos y motores relacionados con el acto de comer; y con el área frontal del cerebro, para influir sobre el comportamiento voluntario (Robbins y Everitt, 1996; Everitt y col., 1999). Las neuronas hipotalámicas contienen péptidos orexígenos (AgRP, NPY, MCH) y anorexígenos (α -MSH, CART), que son liberados ante señales periféricas en otras zonas

cerebrales, afectando la ingesta, regulando el funcionamiento del sistema nervioso autónomo y el metabolismo energético (Saper y col., 2002).

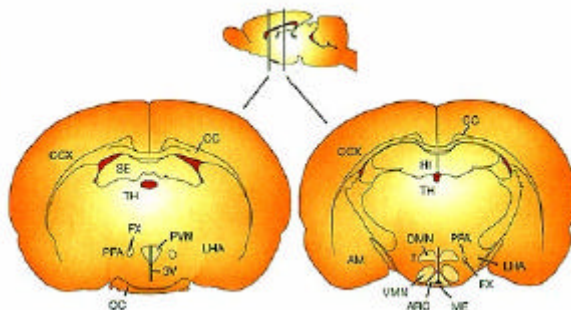


Figura 1. Regiones hipotalámicas que controlan la homeostasis energética.

Se muestran secciones sagitales del cerebro de ratona. La sección de la derecha estaría situada en línea con los ojos y la boca del animal. La sección de la derecha muestra el hipocampo (HI), el tálamo (TH) y los distintos núcleos del hipotálamo: arcuato (ARC), ventromedial (VMN) y dorsomedial (DMN). En la sección de la izquierda también se observa el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN) (Tomado de <http://www.easdllectures.org/copenhagen/index.php?menu=view&chart=8&id=157>).

Por otra parte, los tejidos responden no solo a los neurotransmisores liberados por el sistema nervioso autónomo, sino también a la adrenalina, noradrenalina y hormonas esteroideas secretadas por la glándula suprarrenal. Así, se conoce como sistema simpático-adrenérgico (SSA) a la integración de las señales provenientes tanto del SNS como de la glándula suprarrenal. El SSA regula la presión arterial, la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, el funcionamiento del tracto gastrointestinal, la secreción pancreática y el metabolismo energético (DeIRio, 2000).

1.1.2 Homeostasis de la glucosa y las grasas

A pesar de las grandes variaciones en la ingesta de nutrientes que se producen en la vida diaria, en un individuo normal los niveles plasmáticos tanto de la glucosa como de las grasas se mantienen en un intervalo muy estrecho de concentraciones: 90 – 110 mg/dL para la glucosa, 1 mM para los TAG y 0.6 mM para los AG libres. Se establece un equilibrio preciso entre la entrada de glucosa al torrente sanguíneo procedente de la absorción intestinal y del hígado, y la captura de ésta por los diferentes tejidos periféricos. Lo mismo sucede con las grasas: existe un balance entre los AG liberados por el tejido adiposo, la captura de los TAG por los tejidos periféricos, pero sobre todo por el tejido adiposo, y la síntesis de TAG endógenos en el hígado. El mantenimiento de la homeostasis de glucosa y grasas depende fundamentalmente de la acción de dos hormonas con efectos antagónicos, como son la insulina y el glucagón, aunque como se discutirá más adelante, la leptina también juega un papel central.

En términos generales, tras una ingesta se produce un rápido incremento de la concentración de glucosa en sangre, lo cual, junto con los elevados niveles de AG libres en plasma debido al

ayuno, provoca la liberación de insulina por las células β del páncreas. La insulina estimula la captura de glucosa al interior celular en los tejidos periféricos sensibles a la misma, como son el tejido adiposo, el músculo esquelético y el corazón, entre otros. Esto induce el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno en el músculo y en forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo. Además, la insulina bloquea la exportación de glucosa por el hígado, estimulando en este tejido la síntesis de glucógeno y reprimiendo la síntesis *de novo* de glucosa. Más recientemente, se ha postulado que el cerebro detecta el incremento de los niveles circulantes de insulina y envía una señal nerviosa al hígado, el cual disminuye la exportación de glucosa al plasma (la Fleur y col., 2000).

En cuanto al metabolismo de las grasas, la insulina secretada tras una ingesta estimula la captura por el tejido adiposo de los TAG a partir de los quilomicrones circulantes, debido a un aumento en la expresión y actividad de la lipasa-lipoproteica en dicho tejido. En este proceso también juegan un papel importante las vías de entrada de los ácidos grasos a las células a través de proteínas transportadoras de la membrana plasmática (FAT/CD36), así como la actividad de enzimas citosólicas claves para el metabolismo lipídico, como la acil-CoA-sintasa (Schaffer, 2002). Aunque la mayor parte de los TAG circulantes es capturada por el tejido adiposo, el músculo, el corazón, el páncreas y el hígado también participan en este proceso. Por otro lado, la insulina suprime la lipólisis en el tejido adiposo, ya que inhibe la lipasa sensible a hormona en dicho tejido; favorece la captura de los AG plasmáticos por este tejido y bloquea en hígado la exportación de TAG en forma de VLDL a la sangre (Frayn, 2002). Además, al bajar el suministro de AG del adiposo al hígado, en este último tejido aumenta la glicólisis y disminuye la exportación de glucosa al plasma (Sindelar y col., 1997).

Durante un ayuno, al bajar los niveles de glucosa, las células α pancreáticas secretan glucagón, el cual bloquea la síntesis de glucógeno y TAG en el hígado. Además, el glucagón estimula la liberación hepática de glucosa, al activar por un lado la glucogenolisis, y por otro, la gluconeogénesis, a partir de lactato, glicerol y aminoácidos captados de la sangre. La glucosa liberada por el hígado es utilizada por los tejidos, y especialmente por el cerebro, ya que éste carece de reservas energéticas importantes y depende enteramente de la oxidación de la glucosa para su funcionamiento. Si el ayuno se prolonga, en el tejido adiposo el glucagón activa la lipasa sensible a hormona, lo que se traduce en una mayor liberación de los AG a la sangre. Éstos, junto con los cuerpos cetónicos producidos por el hígado, son utilizados como fuente de energía por los tejidos aerobios (Frayn, 2002).

La homeostasis de la glucosa y de las grasas es uno de los procesos más importantes en mamíferos, y su desregulación puede conducir a una serie de patologías que se discutirán más adelante.

1.2 Transmisión de la señal intracelular de la insulina

Como ya se ha comentado anteriormente, la insulina estimula la captación, utilización y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas de la sangre por los tejidos periféricos, inhibiendo a la vez el catabolismo de estas biomoléculas. La insulina ejerce sus efectos fisiológicos a través de la unión a su receptor específico en la membrana plasmática de las células diana. Dicha unión provoca la autofosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina, así como fosforilaciones, interacciones proteína-proteína y reorganización subcelular de una serie de sustratos que el receptor utiliza para transmitir y amplificar su señal al interior celular. Un esquema de las principales vías mediadas por la insulina se recoge en la Figura 2.

Dentro de las múltiples vías de señalización intracelular mediadas por insulina, parte de este trabajo se ha dedicado al estudio de la vía que estimula el transporte de glucosa en el tejido adiposo epididimal (TAE), uno de los principales tejidos de la acción de la insulina y objeto de numerosos estudios anteriores de nuestro grupo.

El receptor de insulina es una glicoproteína integral de membrana heterotetramérica que posee 2 subunidades α extracelulares de unión a insulina, y dos subunidades β transmembrana con actividad tirosina-quinasa intrínseca. Existen dos isoformas del receptor de insulina maduro, el IR-A y el IR-B, que son generadas por *splicing* alternativo del transcrito primario del gen del receptor. La isoforma A, a diferencia de la B, carece de 12 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad β , que son codificados por el exón 11 del gen del receptor de insulina (Seino y Bell, 1989) (Fig. 3). Ambas isoformas se expresan de manera específica de tejido y presentan diferencias en la unión y señalización de insulina (Seino y Bell, 1989; Kellerer y col., 1992).

La unión de la insulina al dominio extracelular de su receptor activa el dominio tirosina-quinasa intracelular del mismo, el cual se autofosforila y a su vez fosforila en Tyr una serie de sustratos intracelulares que son necesarios para la propagación de la señal. Entre éstos están la familia de los IRS, el Shc, Gab-1, APS, c-Cbl. (Fig. 2) (van Obberghen y col., 2001). Cada una de estas proteínas recluta a su vez otras proteínas intracelulares con dominios SH2 o PTB que interactúan de forma específica con distintos contextos de secuencias fosforiladas en Tyr. Por ejemplo, el IRS recluta a la PI3-K a la membrana plasmática y la acerca a su sustrato, el PI4,5P2, generando PI3,4,5P3 (Backer y col., 1993). A su vez, el PI3,4,5P3 atrae y activa la serina/treonina quinasa PDK1 (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000), la cual es un activador de dos serina/treonina quinasas: la PKB y la PKC atípica (isoformas α y β) (Standaert y col., 2001). Aunque los sustratos fisiológicos tanto de la PKB como de las PKC α/β no se conocen, existen evidencias que vinculan a estas quinasas en la translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática estimulado por insulina (Grillo y col., 1999).

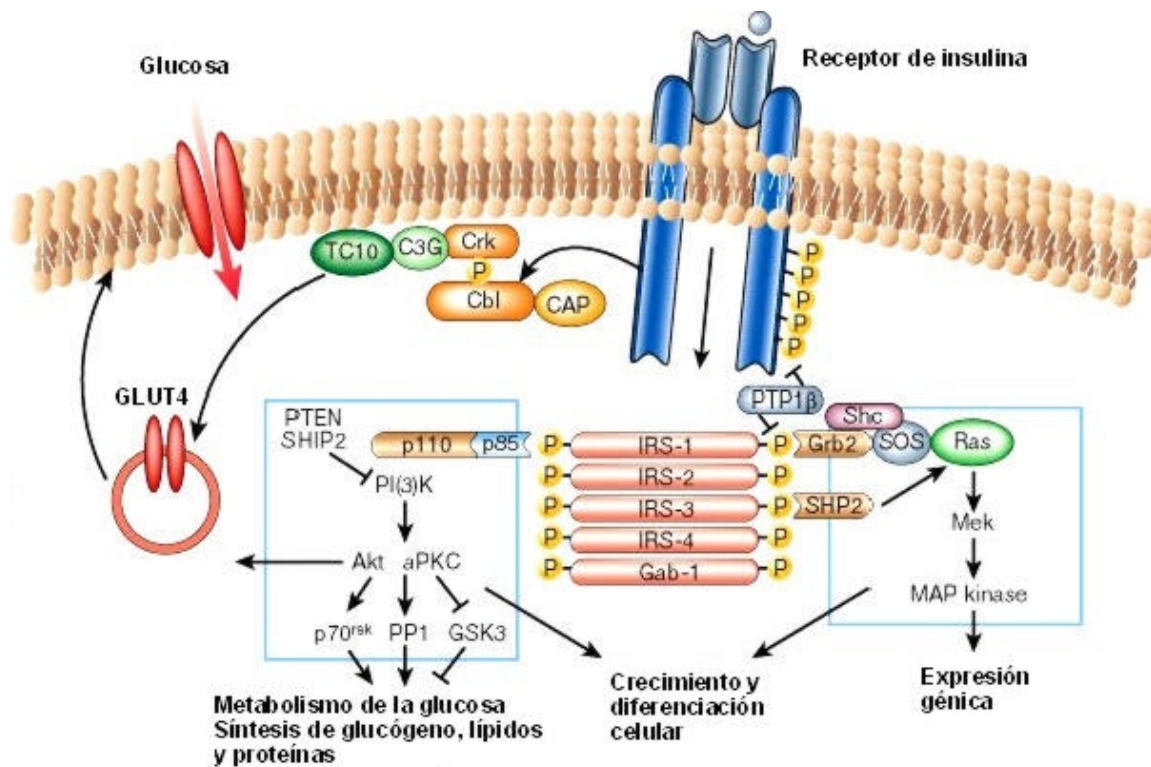


Figura 2. Esquema del mecanismo de transmisión de la señal de la insulina.

(Tomado de Saltiel y Kahn, 2001).

Por otro lado, algunos resultados sugieren la existencia de otra vía de señalización de insulina, independiente de la PI3-K, que también participa en la regulación de la translocación del GLUT-4 (Fig. 2). Esta vía se desarrolla en microdominios ricos en caveolina de la membrana plasmática, conocidos como balsas de lípidos (*lipid rafts*). En estos microdominios se encuentra la proteína CAP, asociada a la flotilina (Kimura y col., 2001), y al dominio rico en Pro de la Cbl, que sitúa a CAP en la cercanía del dominio intracelular del receptor de insulina. Al llegar la insulina, se estimula la fosforilación en Tyr de Cbl por el IR, usando la proteína APS como adaptadora (Liu y col., 2002), creándose un sitio de reconocimiento para el complejo CrkII-C3G. El C3G es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina con el TC10 y otras proteínas de unión a GTP (Feller, 2001). Su activación por la insulina promueve la translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática, pero los intermediarios entre el TC10 y el GLUT-4 están aún por descubrir.

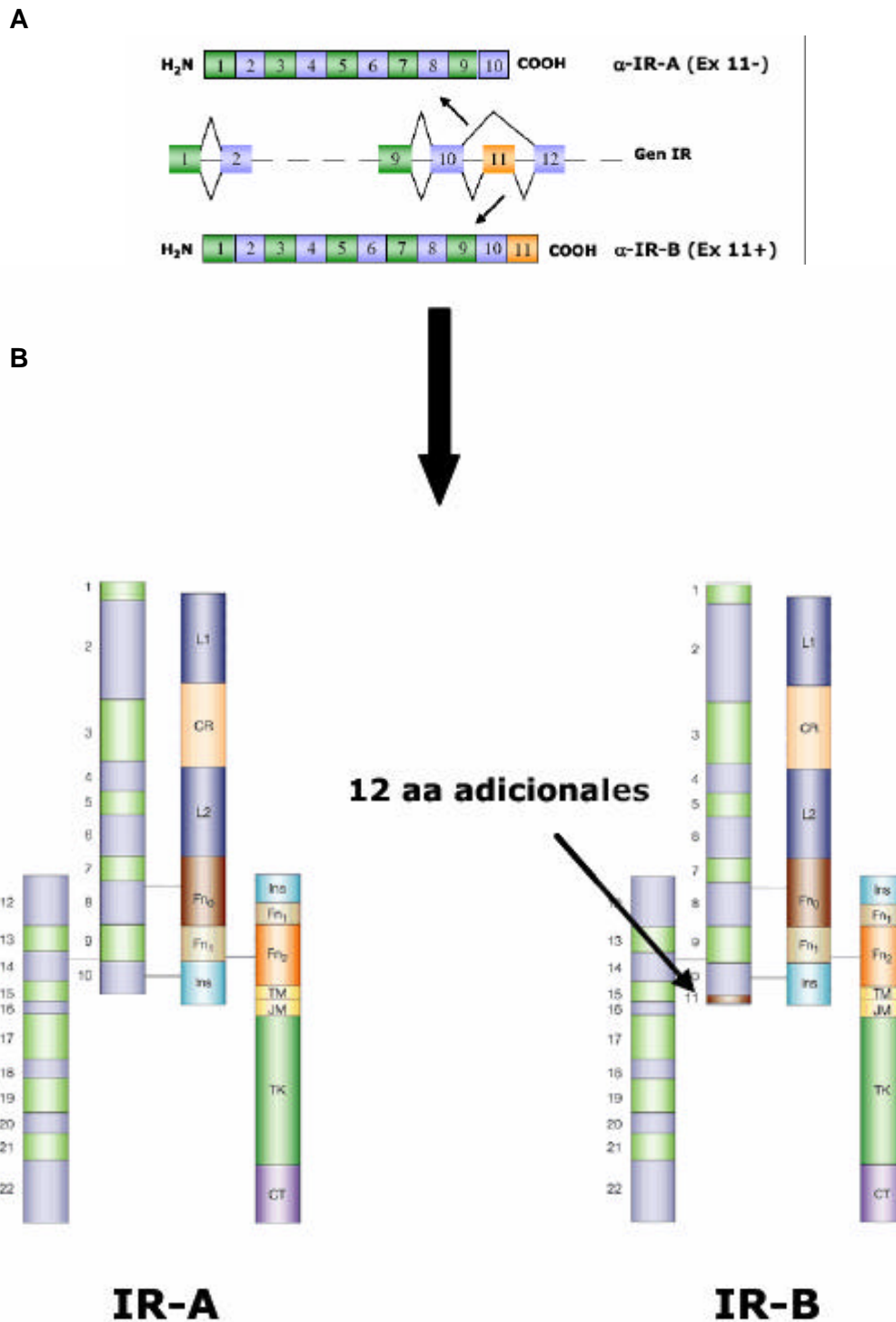


Figura 3. Esquema del *splicing* alternativo del exón 11 del gen del IR.

(A) El *splicing* alternativo del exón 11 del gen del IR da lugar a las dos isoformas de este receptor: IR-A (Isoforma exón 11-) e IR-B (Isoforma exón 11+), que se diferencian en 12 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la subunidad α . (B) Dibujo esquemático de la estructura $\alpha_2\beta_2$ del IR. La mitad izquierda de ambas isoformas del IR representa los 22 exones que forman el gen, mientras que la mitad derecha representa los dominios funcionales de la proteína. L1,L2: *Large domains*, con repeticiones ricas en Leu; CR: dominio rico en Cys; Fn: dominios fibronectina tipo III; TM: dominio transmembrana; JM: dominio juxtamembrana; TK: dominio tirosina quinasa; CT: dominio carboxilo terminal.

1.3 Diabetes tipo II y resistencia a la acción de la insulina

La Diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más común y es una de las causas principales de mortalidad en las sociedades desarrolladas. La Organización Mundial de la Salud estima que al menos 1.1 millón de personas murieron en el año 2005 a causa de esta enfermedad. En España la prevalencia de esta enfermedad se sitúa entre el 2 y el 6 % de la población, pero se espera que esta cifra aumente en un 50% en los próximos 10 años.

La Diabetes tipo I, representando menos del 10 % de los casos, generalmente se diagnostica en la infancia, y se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre debido a que el organismo no produce o produce poca insulina. En estos casos se necesitan inyecciones diarias de insulina para sobrevivir.

La Diabetes tipo II corresponde aproximadamente al 90% de todos los casos de diabetes y generalmente se presenta en la edad adulta, aunque su incidencia se desplaza cada vez más hacia edades más tempranas debido al aumento de la obesidad infantil. La Diabetes tipo II es una condición patológica en la que existe resistencia a la acción de la insulina, con lo cual el metabolismo de carbohidratos y lípidos no es regulado de manera adecuada por la hormona. Esta patología se caracteriza por hiperglucemia, hiperlipidemia, acumulación de grasas en tejidos no adiposos como el hígado o el músculo esquelético, y la hipoinsulinemia. En estas condiciones el organismo necesita del aporte de grandes cantidades de insulina exógena (Saltiel, 2001), y en ausencia de un tratamiento adecuado, esta enfermedad puede derivar en ceguera, fallos renales, accidentes cerebrales y cardiovasculares, amputaciones, entre otros (Kahn, 1998).

La Diabetes tipo II es una enfermedad multifactorial con raíces poligénicas, así como de naturaleza ambiental relacionadas con la dieta, una vida sedentaria, etcétera (Fujimoto, 2000). Así, a diferencia de la Diabetes tipo I, la Diabetes tipo II está fuertemente asociada a la obesidad. Sin embargo, existe un consenso general de que la aparición de la Diabetes tipo II se debe al desarrollo previo de resistencia a la insulina, que es un estado fisiológico en el que los tejidos diana de la hormona presentan una respuesta disminuida ante un estímulo insulínico normal (Kahn, 1978).

1.3.1 Mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a la insulina

Entre los mecanismos responsables de la resistencia a la insulina encontramos la presencia en sangre de anticuerpos anti-insulina, que interfieren en el contacto entre la insulina y su receptor, defectos estructurales de base genética en el receptor (Taylor y Arioglu, 1998), disminución del número de receptores situados en la membrana de la célula diana (Goodyear y col., 1995), así como disminución de la actividad quinasa del receptor por fosforilaciones reguladoras en serina o treonina, o por incremento en la actividad de tirosina fosfatasa, como PTP1B y LAR (Pessin y Saltiel, 2000). También se han descrito alteraciones de la expresión génica, de la distribución

subcelular o de las fosforilaciones en la vía de transmisión de señales de la insulina a nivel de los sustratos del receptor de insulina, de la PI3K, la PKB o el GLUT4 (Saltiel, 2001; Carvalho y col., 1996).

Además, existen evidencias de que la hormona del crecimiento o la pancreastatina (Sánchez-Margalet, 1999), así como algunas citoquinas pro-inflamatorias derivadas del tejido adiposo, como el TNF- α (Hotamisligil, 2003) o la resistina (Steppan y col., 2001), pueden bloquear la acción de la insulina.

1.3.2 Efecto de las grasas sobre la sensibilidad a insulina

Durante mucho tiempo los lípidos fueron considerados meros macronutrientes o elementos estructurales de membranas biológicas. Sin embargo, en los últimos 10 años, esta visión de los lípidos ha cambiado, ya que se ha demostrado que estas moléculas juegan un papel importante en procesos de señalización intracelular y actúan como sensores del estatus de las membranas biológicas, regulando de esta forma múltiples procesos celulares. Además, las propiedades biofísicas de los distintos lípidos, incluso cuando estos se encuentran a bajas concentraciones, o en dominios específicos de la membrana como "*lipid rafts*", pueden alterar significativamente las propiedades de la membrana o las actividades enzimáticas que dependen de las membranas (Opekarova y Tanner, 2003).

Una vez dentro de la célula, los AG libres son convertidos a Acil-CoA gracias a la acción de las acil-CoA-sintetasas, de las cuales ya se han descrito 6 isoformas (Coleman y col., 2000). Los Acil-CoA pueden ser utilizados para la obtención de energía mediante la β -oxidación mitocondrial, o pueden ser incorporados a lípidos más complejos como los diacilglicéridos, los triacilglicéridos o los fosfolípidos. Tanto los Acil-CoA, como los diacilglicéridos y los fosfolípidos pueden ejercer profundos efectos sobre la transducción de señales intracelular, así como sobre la expresión génica.

En la actualidad cada vez son más los autores que postulan que la alteración en la homeostasis de los lípidos no es un resultado del estado diabético, sino que es una de las causas fundamentales y más frecuentes para el desarrollo de la resistencia a insulina. En este sentido, numerosas evidencias señalan que la sensibilidad a insulina de todo el organismo no se correlaciona tanto con el contenido total de grasa corporal, sino con la localización de dicha grasa. Específicamente, la sensibilidad a insulina presenta una correlación negativa con el contenido de TAG en tejidos no-adiposos como el músculo esquelético mucho más ajustada que la establecida con otros marcadores frecuentemente utilizados como el índice de masa corporal (BMI) o el cociente cintura/cadera (Stein y col., 1997). Sin embargo, se cree que los TAG como tal no interfieren en la acción de la insulina, sino que son meros marcadores de otras especies lipídicas

derivadas de los AG libres, como son los Acil-CoA de cadena larga o las ceramidas, que sí son conocidos por inhibir la señalización de insulina a distintos niveles.

Por ejemplo, Randle (Randle y col., 1963) propuso un mecanismo, en el cual en el músculo se establecía una competencia entre la glucosa y los lípidos por ser oxidados. Así, un incremento de la β -oxidación lipídica resultaría en la acumulación de NADH y acetil-CoA, lo cual inhibiría la piruvato deshidrogenasa. El consecuente incremento de citrato inhibe la fosfofructoquinasa, conllevando un incremento de los niveles de glucosa-6-fosfato, lo cual a su vez inhibe a la hexoquinasa II y disminuye la captura de glucosa por el músculo (Randle y col., 1963) (Fig. 4).

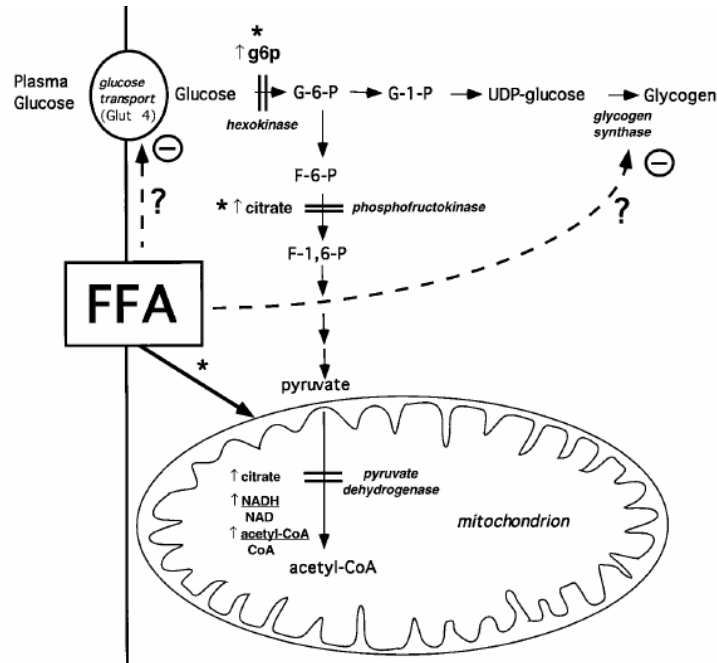


Figura 4. Esquema de los sitios potenciales de acción de los AG sobre el metabolismo de la glucosa estimulado por insulina en músculo.

Se señalan con un asterisco los sitios afectados propuestos por Randle y col. (1963). g6p: glucosa-6-fosfato; G-1-P: glucosa-1-fosfato; F-6-P: fructosa-6-fosfato; F-1,6-P: fructosa 1,6-bifosfato. (Tomado de Roden y col., 1996).

Sin embargo, otros autores (Dresner y col., 1999; Yu y col., 2002), han propuesto un mecanismo diferente, sugiriendo que el incremento de los niveles de Acil-CoA de cadena larga genera diacilglicerol que activa a la PKC β en el músculo o la PKC δ en el hígado. Esta serina-quinasa a su vez fosforila al IRS-1 en Ser307, suprimiendo la estimulación por insulina de la fosforilación en tirosina del IRS-1 y de la actividad de la PI3-K asociada al IRS-1. Como resultado, se inhibe la traslocación del GLUT4 a la superficie celular estimulada por insulina en el músculo, mientras que en el hígado merma la capacidad de la insulina de reprimir la glucogenolisis, y por tanto, la producción hepática de glucosa. Adicionalmente, los AG reprimen la expresión de GLUT4

en músculo y la activan en el tejido adiposo, desviando la glucosa hacia la síntesis de TAG (Fabris y col., 2001).

Por otro lado, estudios *in vitro* indican que los diacilgliceroles compuestos por AG poli-insaturados, sobre todo el 1-estearoil-2-araquidonoil-glicerol, son agonistas de la PKC mucho más potentes, que DAG compuestos por AG saturados (Marignani y col., 1996). Por tanto, parece ser que distintos tipos de AG inducen resistencia a insulina a través de mecanismos diferentes. Así, se sugiere que los AG insaturados emplean como intermediario al diacilglicerol (Yu y col., 2002), mientras que los AG saturados parecen actuar a través de la ceramida (Chavez y col., 2003; Shimabukuro y col., 1998).

Los niveles de ceramida están incrementados en músculos resistentes a insulina de humanos (Adams y col., 2004; Strackowski y col., 2004) y roedores (Turinsky y col., 1990). Se ha propuesto que un efecto agudo de la ceramida inhibe la señalización de insulina promoviendo la desfosforilación de Akt a través de la proteína fosfatasa 2A, y bloqueando su translocación a la membrana plasmática vía PKC? (Chavez y Summers, 2003). Por otro lado, un efecto crónico se traduce en reprimir la expresión del GLUT4 (Long y Pekala, 1996).

Por otra parte, existe una interacción entre la glucosa y las grasas en la regulación de la secreción de insulina por las células beta del páncreas (Prentki y Corkey, 1996). Un efecto agudo de los AG se traduce en una acción sinérgica con la glucosa en la estimulación de la secreción de insulina (Stein y col., 1996). Esta podría ser la razón por la cual el 80% de los obesos, con resistencia a insulina, no desarrollan diabetes tipo II, ya que estos individuos son capaces de compensar su resistencia a insulina inducida por los AG, con una mayor secreción de la hormona, también estimulada por estos compuestos (Boden, 2003). El efecto “insulinotrópico” de los AG aumenta con la longitud de su cadena y su grado de saturación (Stein y col., 1997), y parece ir mediado por receptores huérfanos acoplados a proteína G (GPR40) situados en la membrana plasmática de las células beta pancreáticas (Briscoe y col., 2003). Sin embargo, un efecto crónico de los AG resulta en una reducida biosíntesis (Poitout y col., 2006) y secreción (Prentki y col., 2002) de insulina por las células beta pancreáticas, y en su muerte por apoptosis mediada por ceramida (Unger y Orci, 2001).

1.3.3 Modelo “lipocéntrico” del desarrollo de la Diabetes tipo II

Por todo lo anterior, McGarry (2002) ha propuesto un modelo “lipocéntrico” para describir el desarrollo de la diabetes tipo II. De acuerdo a este modelo, un incremento de los niveles intracelulares de AG-CoA debido a un desequilibrio crónico entre la ingesta y el gasto energético, o a una alteración en los sistemas enzimáticos que regulan los niveles intracelulares de AG libres, puede causar resistencia a insulina por los mecanismos antes descritos en una etapa temprana de la enfermedad, es decir, antes de que los niveles de AG y TAG en plasma comiencen a aumentar.

En el músculo este efecto disminuiría la captación de glucosa estimulada por insulina, mientras que en el tejido adiposo, bajarían las acciones anti-lipolíticas de la hormona. Como resultado, en una etapa posterior de la enfermedad, aumentan los niveles de AG libres en sangre, los cuales favorecen la expresión de enzimas gluconeogénicas (Ej. PEPCK y glucosa-6-fosfatasa) en el hígado y merman la capacidad anti-gluconeogénica de la insulina en ese órgano, sin afectar la lipogénica (Massillon y col., 1997). De esta forma, aumentan los niveles plasmáticos de glucosa, que actuando de forma sinérgica con los AG libres en plasma, inducen a las células acinares del páncreas a secretar más insulina, generando un estado de hiperinsulinemia compensada. En estas condiciones en el hígado aumenta la síntesis *de novo* de AG, favoreciendo su esterificación a TAG frente a su oxidación. Esto se traduce en un aumento de los niveles de TAG en sangre, lo cual hace que se acumulen aún más AG-CoA en los diferentes tejidos, hasta un punto que sobrepasan la inhibición de CPT-1 por malonil-CoA, incrementando la β -oxidación de los AG. Este efecto, vía inhibición de la piruvato deshidrogenasa y de la fosfofructoquinasa-1, agrava aún más la resistencia al transporte de glucosa estimulado por insulina en los diferentes tejidos, y en el hígado promueve aún más la gluconeogénesis (Randle y col., 1988). Finalmente, la acumulación de AG-CoA en las células β del páncreas, provoca lipoapoptosis mediada por ceramida y la consecuente hipoinsulinemia (Forouhi y col., 1999; Ryysy y col., 2000).

Lamentablemente aún se desconoce el defecto primario responsable de la resistencia a insulina. En la actualidad hay autores que postulan que dicho defecto primario podría residir en el sistema de señalización de la leptina (Zhang y col., 1994; Spiegelman y Flier, 2001). Sin embargo, la vía de señalización de la hormona en condiciones de normalidad aún no está completamente dilucidada.

1.4 La leptina y su receptor

La obesidad y los trastornos del apetito como la anorexia o la bulimia ponen en peligro la vida de millones de personas en todo el mundo. Afortunadamente en la última década ha habido un progreso substancial en la dilucidación de los mecanismos moleculares y neuroendocrinos mediante los cuales se desarrollan estas alteraciones extremas del balance energético. En este sentido, han sido de gran relevancia la identificación y caracterización del producto del gen *ob*, la leptina, en ratones *ob/ob* (Zhang y col. (1994), y de su receptor, Ob-R, en ratones *db/db* por Tartaglia y col. (1995). Ambos tipos de ratones son *knockouts* naturales de estos dos genes respectivamente y presentan una marcada obesidad y resistencia a insulina.

La leptina es una hormona producida principalmente en el tejido adiposo y en menor medida en el epitelio gástrico, la placenta y el músculo esquelético (Bado y col., 1998; Wang y col., 1998; Hoggart y col., 2001; Sobhani y col., 2000). En individuos normales, sus niveles plasmáticos aumentan en casos de balance energético positivo, es decir, cuando la ingesta y absorción de

nutrientes excede el gasto energético global. Luego de ser secretada, la leptina actúa tanto a través del SNC, como a través de diferentes receptores sobre órganos diana, disminuyendo la ingesta y aumentando el gasto energético, para evitar la acumulación excesiva de grasa corporal. En cambio, en estados de restricción calórica, antes de que se produzcan cambios en el depósito de grasa, los niveles plasmáticos de leptina caen, lo cual resulta en un aumento del apetito y una disminución del gasto energético, favoreciendo la supervivencia en esos casos. Sin embargo, en el 90% de los individuos obesos, esta patología se logra mantener a pesar de los elevados niveles de leptina en sangre, lo que indica un estado de resistencia a la hormona.

Además de regular la ingesta y el metabolismo energético, se ha demostrado que la leptina juega un papel vital en la regulación de la acción de la insulina, en el crecimiento, la maduración sexual, en la fertilidad y en el sistema inmune (Bjorbaek y Kahn, 2004).

1.4.1 La leptina: producción y secreción

La leptina es el producto del gen *ob* (Zhang y col., 1994), y es una proteína de 167 aminoácidos, cuya secuencia comienza con un péptido señal de secreción hidrófobo de 21 aminoácidos. Tanto en ratón como en humanos la leptina circula en sangre con un peso molecular de aproximadamente 16 kDa (Halaas y col., 1995), a niveles plasmáticos de 1 - 10 ng/mL en condiciones fisiológicas normales (Friedman, 2002).

La expresión de leptina se regula de forma positiva por la glucosamina intracelular, el TNF- α , la insulina, la endotelina-1 y los glucocorticoides (Wang y col., 1998; Zhang y col., 2000; Saladin y col., 1995; Bradley y Cheatham, 1999). Los ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) también estimulan la producción de leptina a través del receptor huérfano acoplado a proteína G (GPR41) de adipocitos (Xiong y col., 2004).

Por otra parte, las tiazolidinonas (anti-diabéticos sintéticos) reprimen la expresión de leptina a través de la activación del PPAR- γ , un factor de transcripción que promueve la diferenciación adipocitaria (DeVos y col., 1996). Otros reguladores negativos de la expresión de leptina son las catecolaminas, andrógenos, agonistas de AMP cíclico, agonistas de receptores β -adrenérgicos, ésteres de forbol y la hormona tiroidea (Mohamed-Ali y col., 1998; Casanueva y Diéguez, 1999). Existe también una hipótesis sobre la autorregulación de la expresión del gen *ob* por parte de la propia leptina, actuando de manera paracrina a través del Ob-Rb expresado en el tejido adiposo (Zhang y col., 1994; Guerre-Millo, 1997).

También hay factores extrínsecos que modulan la expresión de leptina. Por ejemplo, tanto en individuos sanos como en los obesos, la leptina presenta un ritmo circadiano, aunque el mecanismo responsable de este ritmo diario no se conoce (Considine y col., 1996). Además, la expresión de leptina exhibe un dimorfismo sexual, siendo los niveles de leptina en sangre considerablemente mayores en el sexo femenino que en el masculino (Rosenbaum y col., 1996).

Finalmente, la restricción nutricional prolongada reduce la expresión de leptina (Havel y col., 1996).

Los mecanismos de tráfico intracelular, mediante los cuales se secreta la leptina, están muy poco explorados. Aunque se conoce que la insulina aumenta la secreción de leptina, algunos resultados parecen indicar que la mayor parte de la leptina es secretada de forma constitutiva y sólo una pequeña fracción es regulada por la insulina vía exocitosis (Bradley y col., 2001; Barr y col., 1997; Roh y col., 2001). Una vez secretada a la sangre, la leptina puede encontrarse en forma libre o unida a proteínas unidoras de leptina, como el Ob-Re, aumentando el tiempo de vida media de la hormona (Zastrow y col., 2003).

En cuanto a las fluctuaciones de los niveles de leptina en el líquido céfalo-raquídeo (LCR), se ha observado que mientras que la leptina plasmática varía en un intervalo de 25 veces, la leptina en el LCR lo hace en un intervalo de 2 veces. Además, el pico nocturno en la concentración de leptina en plasma, no ocurre en el LCR, lo cual parece indicar que el transporte a través de la barrera hemato-encefálica es un proceso fácilmente saturable a las concentraciones fisiológicas de leptina (Wong y col., 2004).

1.4.2 El receptor de leptina: expresión y mecanismo de transducción de la señal

El receptor de leptina es el producto del gen *db* (Chung y col., 1996). Debido a un *splicing* alternativo de la zona correspondiente al carboxilo terminal del mRNA del receptor se generan 5 isoformas posibles: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Re (Tartaglia y col., 1995). El Ob-Rb es la denominada forma larga del receptor, el Ob-Re es una forma soluble sin dominio transmembrana, mientras que los Ob-Ra, c y d poseen dominios intracelulares cortos (Fig. 5a) (Tartaglia y col., 1995; Lee y col., 1996, Bjorbaek y col., 1997). Todas las isoformas con región intracelular (Ob-Ra-d) contienen en la zona de 29 aminoácidos citoplasmática común el motivo rico en prolina *box1*, el cual es un sitio de unión de proteínas JAK. El Ob-Rb contiene además otras estructuras en el dominio intracelular, como son el motivo *box2* entre los residuos 50 y 60, también reconocido por JAK, y sitios de unión para proteínas STAT (Fig. 5a) (Ghilardi y Skoda, 1997; Cioffi y col., 1996).

La unión de la leptina a su receptor provoca la activación del mismo (Fig. 6), y esto resulta en la activación de las JAK por fosforilación cruzada en Tyr. A su vez, la JAK-2 fosforila al receptor en Tyr985 y Tyr1138 de su dominio intracelular, creando sitios de unión de la proteína-fosfotirosina-fosfatasa-SHP y de STAT3, respectivamente. La fosfotirosina-fosfatasa-SHP, una vez fosforilada en Tyr por la JAK-2, activa la vía p21ras – ERK (Ihle y col., 1994). El STAT3 es un factor de transcripción que, una vez fosforilado en Tyr por la JAK-2, viaja al núcleo, donde modula la transcripción de genes diana (Krebs y Hilton, 2001).

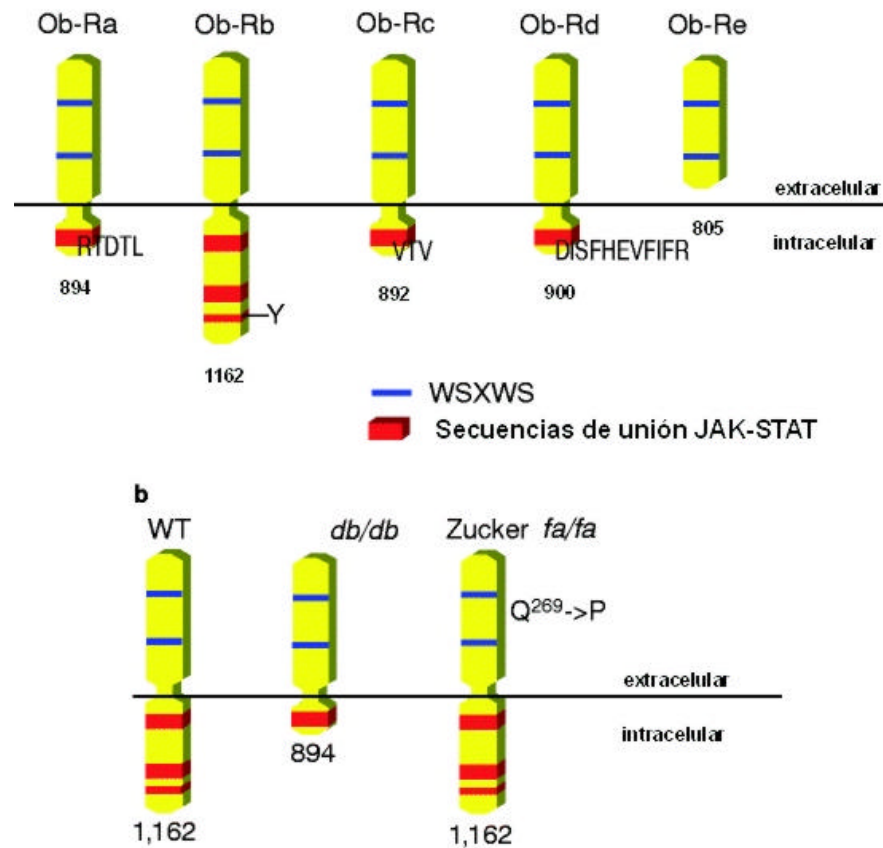


Figura 5. Isoformas del receptor de leptina y algunas mutaciones en roedores utilizados como modelos de obesidad.

A. Existen al menos 5 isoformas del receptor de leptina. Sus dominios extracelulares de unión a leptina son idénticos. Solo el ObRb posee todas las secuencias capaces de activar la vía de señalización JAK-STAT. El Ob-Re no posee dominio transmembrana y es soluble. B. Mutaciones en el Ob-R en ratones *db* y ratas *fa*. WT – genotipo silvestre.

Por otro lado, se han descrito inhibidores de la señal de leptina como son el SOCS-3 y la PTP1B. El STAT-3 fosforilado debido a una señal de leptina activa la transcripción de SOCS-3, el cual se une a la Tyr985 del Ob-Rb, impidiendo la unión de JAK-2 al receptor de leptina. La PTP1B, localizada en la superficie del retículo endoplasmático, desfosforila a JAK-2 luego de la internalización del complejo del receptor de leptina (Zobolotny y col., 2002; Bates y Myers, 2003).

Se plantea que la expresión del receptor de leptina es inhibida por los glucocorticoides (Sliker y col. 1996). Por otro lado, cambios en los niveles de leptina en sangre parecen modular la expresión del Ob-Rb en cerebro (Baskin y col., 1998).

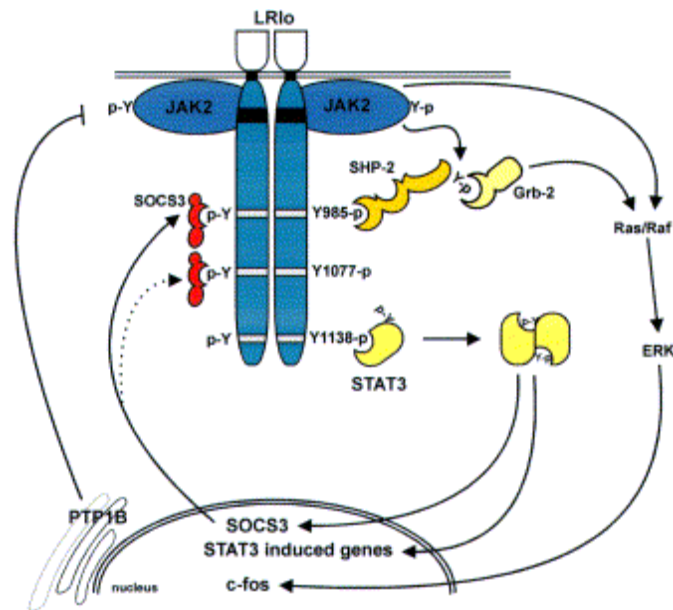


Figura 6. Esquema de la transducción de la señal de la leptina.

(Tomado de Zabeau y col., 2003).

1.5 Acción de la leptina sobre el sistema nervioso

Cada vez son más las evidencias que señalan que una gran parte de los efectos de la leptina se deben a su acción sobre el sistema nervioso central (SNC). La leptina junto con la insulina forma parte de las señales que regulan el funcionamiento del SNC para disminuir la ingesta y estimular la oxidación tanto de los glúcidos como de las grasas en los diferentes tejidos periféricos. Actualmente es un hecho aceptado que ni la leptina ni la insulina se sintetizan a niveles significativos en el cerebro adulto, y que toda la hormona que se encuentra en el cerebro proviene de la circulación periférica. En este sentido se ha comprobado que el paso de ambas hormonas a través de la barrera hemato-encefálica hacia el líquido cefalo-raquídeo (LCR) es un proceso saturable, mediado por receptores específicos (King y Johnson, 1985; Kastin y Pan, 2000; Maresh y col., 2001). En el caso de la leptina esta función parece ejercerla el receptor corto de la hormona, el Ob-Ra, situado en el plexo coroideo y en los vasos sanguíneos cerebrales (Hileman y col., 2002). En algunos modelos de obesidad, el transporte de leptina hacia el LCR está disminuido, lo que implica una menor disponibilidad de señales adipocitarias hacia el SNC (Banks y col., 1999).

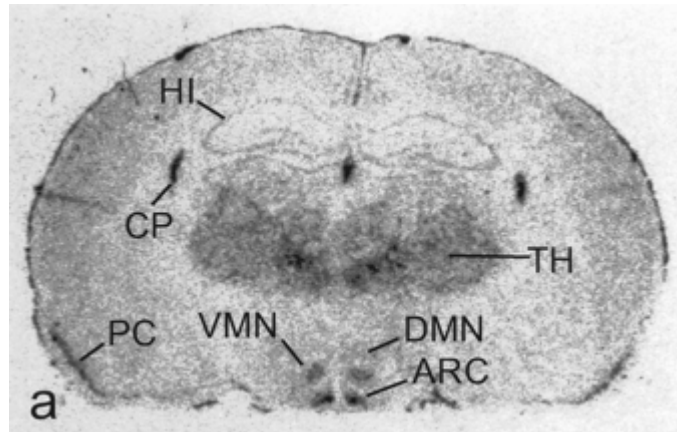


Figura 7. Localización del receptor de leptina en el cerebro de rata.

Se muestra un experimento de hibridación *in situ* frente al mRNA del receptor de leptina (detecta todas las isoformas del receptor) en un corte sagital del cerebro de rata. TH: tálamo, HI: hipocampo, CP: plexo coroideo, ARC: núcleo hipotalámico arcuato, VMN: núcleo hipotalámico ventromedial, DMN: núcleo hipotalámico dorsomedial, PC: corteza piriforme (Tomado de Schwartz y col., 1996).

El receptor de leptina se expresa en la corteza, el tálamo, el hipocampo y el hipotálamo (Fig. 7). Sin embargo, es el hipotálamo, sobre todo el núcleo arcuato, la zona del cerebro que tiene mayor concentración de receptores de leptina (ObRb), y es también la más estudiada (Schwartz y col., 1996). En los núcleos hipotalámicos la leptina afecta la actividad de una gran variedad de neuronas, promoviendo la liberación de neuropéptidos anorexígenos (α -MSH y CART) e inhibiendo la transcripción de los neuropéptidos orexígenos NPY y de AgRP (Bates y Myers, 2003). Estas señales a su vez activan otras vías neuronales, que permanecen aún por dilucidar, y controlan el sistema neuroendocrino y el metabolismo energético (Schwartz y col., 1996; Fei y col., 1997; Elmquist y col., 1998).

La relación de la leptina con el sistema nervioso autónomo también ha sido extensamente estudiada. Se ha comprobado que para que la leptina ejerza sus efectos anorexígenos y de regulación del metabolismo energético es necesario que el sistema nervioso simpático esté intacto (Minokoshi y col., 2002).

1.6 Acción de la leptina sobre órganos periféricos vía SNC

Numerosos estudios *in vivo* demuestran, que el sistema nervioso, además de ser una diana de acción para la leptina con el fin de regular la saciedad, constituye un medio para la transmisión de la señal de ésta a distintos órganos periféricos, claves para el metabolismo energético. Entre estos órganos se encuentran el hígado y el tejido adiposo blanco, en los cuales se ha centrado este trabajo, ya que son los principales tejidos lipogénicos del organismo, juegan un papel central en la regulación del metabolismo energético, y en el caso del tejido adiposo, es un importante órgano endocrino.

En el tejido adiposo blanco, actuando vía receptores adrenérgicos β_3 , la leptina disminuye la captación de glucosa y la sensibilidad a insulina (Minokoshi y col., 1999; Haque y col., 1999; Wang y col., 1999a).

En el hígado, algunos autores postulan que la leptina induce una redistribución de los flujos intrahepáticos de glucosa, de forma similar a como ocurre durante una restricción nutricional. En particular, provoca un aumento en la expresión de la PEPCK, disminuye el contenido de glucógeno y aumenta la exportación de glucosa a la sangre (Liu y col., 1998). Sin embargo, empleando la técnica del clamp euglicémico-hiperinsulinémico se ha observado que la leptina potencia la capacidad de la insulina de disminuir la producción hepática de glucosa por supresión de la glucogenólisis (Rossetti y col., 1997). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en los ambientes hormonales entre ambos tipos de experimentos, y en particular, en la relación insulina/glucagón (Roden y col., 1996).

En cuanto al metabolismo de las grasas tanto en el hígado, como en el tejido adiposo blanco, la leptina vía intracerebroventricular (i.c.v.) (10 μ g/día) provoca una disminución de la expresión de la esteroil-CoA-desaturasa-1 (SCD1), una enzima microsomal lipogénica, involucrada en la biosíntesis de AG monoinsaturados, y como consecuencia, de los TAG (Lin y col., 2003). Así, una infusión i.c.v. y crónica de leptina disminuye el contenido de TAG en hígado y plasma, en comparación con animales controles alimentados *ad libitum*, mientras que una infusión i.c.v. aguda de la hormona no reduce los niveles de TAG hepáticos (Huang y col., 2006; VanPatten y col., 2004). Otros estudios sugieren que la disminución de la masa del tejido adiposo inducida por leptina no sólo se debe a la movilización de las reservas grasas, sino también a la eliminación de las células adiposas debido a la apoptosis (Della-Fera y col., 2001).

En el páncreas la leptina disminuye la secreción de insulina de forma independiente de los receptores Ob-R en las células beta, es decir, vía central a través de receptores de melanocortina (Muzumdar y col., 2003). También provoca una disminución en la expresión de enzimas lipogénicas como la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) y la ácido graso-sintasa (FAS) (Fruhbeck y Salvador, 2000).

En el tejido adiposo marrón la leptina incrementa la expresión de la lipasa lipoproteica y de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), aumentando de esta manera la termogénesis (Sarmiento y col., 1997). También aumenta la expresión del GLUT4, incrementando la sensibilidad a insulina. Estos efectos parecen producirse a través de la melanocortina liberada por las neuronas POMC/CART del ARC, que enervan las neuronas IML del SNS, conocidas por inervar directamente el tejido adiposo marrón. En este caso el mediador periférico de la leptina es la noradrenalina, y los receptores adrenérgicos que transmiten la respuesta a la señal leptina-noradrenalina son del tipo β_1 y β_2 (Sivitz y col., 1999).

En corazón y músculo esquelético, vía receptores adrenérgicos del tipo β acoplados a proteínas-quinasa activadas por AMP (Minokoshi y Kahn, 2003), la leptina aumenta la captación de glucosa y la sensibilidad a insulina (Minokoshi y col., 1999; Haque y col., 1999; Wang y col., 1999a). Además, en el músculo soleus, la leptina disminuye el contenido de TAG y aumenta la oxidación de los AG exógenos, contribuyendo de esta manera al mantenimiento de la sensibilidad a la insulina (Spiegelman y Flier, 2001; Steinberg y col., 2002; Minokoshi y col., 2002).

Aunque el mecanismo mediante el cual la señal central de leptina se convierte en señal periférica, conllevando cambios en el metabolismo de la glucosa y las grasas, está aún por dilucidar, sí se ha demostrado que muchos efectos metabólicos de la leptina son marcadamente distintos de las respuestas que se dan ante una reducción de la ingesta.

1.7 Acción directa de la leptina sobre órganos diana

Además de ejercer sus efectos vía hipotálamo, la leptina tiene efectos directos, a través del receptor de leptina Ob-Rb, sobre distintos órganos claves en el metabolismo de la glucosa y las grasas, como son el páncreas, el hígado, el corazón, el tejido adiposo y el músculo esquelético. La concentración del Ob-Rb en estos tejidos no es muy elevada, pero sí es indicativa de que la leptina podría actuar sobre tejidos periféricos mediante una vía distinta al SNC.

La hiperleptinemia inducida por adenovirus (Chen y col., 1995; Zhou y col., 2000; Kakuma y col., 2000) reduce las reservas de TAG y promueven la β -oxidación de los AG en el páncreas (Kakuma y col., 2000; Shimabukuro y col., 1997), el corazón (Atkinson y col., 2002), el músculo esquelético (Shimabukuro y col., 1997; Muoio y col., 1997) y el hígado (Kakuma y col., 2000; Shimabukuro y col., 1997). Por tanto, se ha propuesto que una de las funciones de la leptina es impedir la acumulación de lípidos en los tejidos no-adiposos, previniendo de esta forma la lipotoxicidad (Unger, 2003).

En el tejido adiposo blanco el efecto de la leptina sobre el metabolismo lipídico no ha sido completamente caracterizado y sigue siendo controvertido. Así, la hiperleptinemia inducida por adenovirus induce la expresión de enzimas de la oxidación de los AG, como la acil-CoA oxidasa (ACO) y la carnitina palmitoil transferasa (CPT-1), y reduce el contenido de TAG en este tejido sin provocar un incremento en los niveles circulantes de AG (Zhou y col., 2000; Shimabukuro y col., 1997). Por tanto, los autores postularon que la leptina favorecía la oxidación de los AG dentro de los adipocitos. Además, el tratamiento de adipocitos de rata con leptina *in vitro* aumenta la expresión de ACOX, CPT-1, UCP-2 y PPAR γ , involucrados en la oxidación de lípidos (William y col., 2002). Adicionalmente, estudios *in vivo* (Frühbeck y col., 1998) e *in vitro* (Frühbeck y col., 1997) indican una estimulación paracrina/autocrina de la lipólisis en adipocitos de roedores por la leptina, mientras que en adipocitos humanos la leptina no estimula la lipólisis, pero inhibe la lipogénesis estimulada por insulina (Elimam y col., 2002). Asimismo, adipocitos incubados con

leptina aumentan la oxidación de las AG exógenos, pero no de los endógenos, y presentan un incremento en la hidrólisis de los TAG con una concomitante liberación de los AG por las células (William y col., 2002).

En cuanto al metabolismo de la glucosa, se ha descrito que adipocitos de rata incubados con leptina presentaron una disminución en el transporte de glucosa y de la síntesis de TAG ante un estímulo con insulina (Muller y col., 1997). Sin embargo, Ranganathan y col. (1998), trabajando tanto en adipocitos de rata aislados, como en cultivo de células 3T3-L1, muestran que la leptina no afecta ni el transporte de glucosa basal, ni el estimulado por insulina.

También se ha descrito que en cultivo de hepatocitos la leptina inhibe la glucogenolisis y la gluconeogénesis (Aiston y Agius, 1999; Ceddia y col., 1999).

En células musculares L6 de rata, un tratamiento de 30 min con leptina (2 ó 100 nM) no afectó la captación basal de glucosa, pero bloqueó la estimulada por insulina, sin afectar la translocación del GLUT4. Tampoco se afectó la activación del IR, de los IRS-1/2, de la PI3-K ni de la PKB. Sin embargo, la leptina inhibió la activación de las p38-MAP-quinasas por insulina, las cuales podrían estar involucradas en el incremento de la actividad intrínseca del GLUT4 (Sweeney y col., 2001). En paralelo con estas observaciones, Ishisuka y col. (1998), trabajando con músculo esquelético de rata *in vitro* e incubando 1 h con concentraciones de leptina del orden de los nanomoles, sugieren que la leptina inhibe en un 50% el transporte de glucosa estimulado por insulina. Por otro lado, en células musculares C2C12 30 min de leptina 100 ng/mL provoca un aumento de la captación de glucosa y de la translocación de GLUT4 a la superficie celular (Berti y Gammeltoft, 1999). Finalmente, la leptina aumenta la captura de glucosa y la síntesis de glucógeno en el músculo soleus en cultivo (Ceddia y col., 1999)

Como se observa, los resultados *in vitro*, además de ser contradictorios, se contraponen a los que se obtienen con los tratamientos *in vivo*, donde se ha visto que la leptina aumenta la sensibilidad a insulina en soleus, diafragma, corazón y adiposo marrón. Sin embargo, la importancia de éstos resultados radica en señalar que en determinadas circunstancias, como puede ser un estado de hiperleptinemia crónica, que normalmente acompaña a la obesidad, la leptina tiene el potencial de generar resistencia a insulina.

1.8 Interacción funcional entre la leptina y la insulina

En la mayoría de los casos de obesidad humana la resistencia a insulina y leptina coinciden, por lo cual la interacción entre leptina e insulina ha sido el objeto de muchas investigaciones. Por ejemplo, se ha propuesto la existencia de un eje adipo-insular, en el cual la insulina estimula la expresión de la leptina, pero que a su vez la leptina disminuye los niveles de insulina y glucosa plasmáticas en el estado post-absortivo en ratas normales, lo cual se traduce en un aumento de la sensibilidad a insulina (Kieffer y Habener, 2000).

El efecto de la leptina sobre la sensibilidad a insulina es específico de tejido, ya que aunque en soleus, diafragma, corazón y adiposo marrón se produce un incremento del transporte de glucosa estimulado por insulina, en el tejido adiposo blanco el efecto de la leptina es lo contrario (Cusin y col., 1998). En algunos tejidos como el soleus o el corazón, los efectos de la leptina y la insulina en cuanto a aumentar el transporte de glucosa, son aditivos, mientras que en el tejido adiposo marrón son sinérgicos (Haque y col., 1999). Por otro lado, en algunos experimentos con cultivo de células se han detectado efectos contrarios entre las dos hormonas (Kraus y col., 2002). Dichos resultados sugieren que en algunos tejidos ambas hormonas cooperan, en otros actúan de manera independiente, y en otros pueden tener efectos antagónicos. En este sentido, tanto *in vivo* como *in vitro* se ha visto que las vías de señalización de leptina e insulina están interconectadas a varios niveles como son el IR, los IRS, la PI3-K, la MAPK, el STAT-3, la fosforilasa a, la PTP1B, la PD3B, SOCS-3. (Kraus y col., 2002; Szanto y Kahn, 2000; Kim y col., 1998; Kim y col., 2000; Aiston y Agius, 1999; Zabolotny y col., 2002; Zhao y col., 2002; Krebs y Hilton, 2003).

La asociación entre leptina e insulina se ha visto también en modelos animales que presentan obesidad. Por ejemplo, los ratones *ob/ob*, los cuales carecen de leptina, presentan resistencia a insulina y desarrollan diabetes (Pelleymounter y col., 1995). Sin embargo, los ratones *db/db* y ratas *fa/fa* presentan hiperleptinemia y también son resistentes a insulina (Halaas y col., 1995). Estos resultados sugieren que los bajos niveles de leptina en sangre no son los responsables de la inducción de la resistencia a la insulina, sino que la causa más probable sería la disminución de la señalización de leptina a nivel central (Lin y col., 2002), ya sea por una disminución del transporte de la hormona a través de la barrera hemato-encefálica, o debido a fallos a nivel post-receptor en el hipotálamo, o incluso a etapas posteriores de señalización neuronal de leptina. Además, una vez que se establezca la resistencia central a leptina, se podría romper la regulación negativa sobre la secreción de insulina, lo cual conllevaría hiperinsulinemia.

Adicionalmente, los ratones *ob/ob* y *db/db* son obesos e hiperfágicos a pesar de sus elevados niveles de insulina en sangre y en LCR. Este hecho indica que se requiere de una vía de señalización de leptina intacta para que la insulina pueda actuar sobre el SNC y disminuir la ingesta. Por tanto, parece ser, que la resistencia a leptina también conduce a un estado de resistencia central a insulina (Porte Jr. y col., 1998).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

La dilucidación de las vías de señalización de la leptina y de los mecanismos que provocan la resistencia a la misma, son factores claves para entender el fenómeno de la obesidad y la Diabetes tipo II, así como para permitir el desarrollo de una manera consciente de fármacos que corrijan estas patologías.

Sobre las vías de acción de la leptina han surgido dos grandes hipótesis, que no son mutuamente excluyentes: luego de una ingesta y del aumento de los niveles de insulina, la leptina es secretada por los adipocitos. Esta viaja por la sangre hasta el ARC, o es translocada hacia el LCR a través de la barrera hemato-encefálica hasta llegar al resto de los núcleos del hipotálamo. Las neuronas hipotalámicas sensibles a leptina transmiten la información tanto al resto del SNC como a los órganos periféricos (vía disminución de la ingesta y cambios en el flujo de nutrientes) y modulando las señales neuroendocrinas y del SNA, que resultan en un aumento de la oxidación de glúcidos y grasas, y una mejora en la sensibilidad a insulina del organismo como un todo. La segunda hipótesis postula que existe además un efecto directo de la leptina sobre los órganos encargados del metabolismo energético (hígado, páncreas, músculo y adiposo).

Continuando los estudios realizados en nuestro grupo de investigación, en el presente trabajo se abordan los mecanismos moleculares responsables de los efectos lipostáticos y sensibilizantes a insulina de la leptina actuando a través del sistema nervioso central. Los objetivos del presente trabajo se pueden resumir en:

1. Estudiar el efecto de la leptina suministrada por vía central sobre:
 - a) el metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo blanco;
 - b) el metabolismo de los esfingolípidos en el tejido adiposo blanco;
 - c) la capacidad de respuesta a insulina en el tejido adiposo blanco;
 - d) las acciones de la insulina in vivo sobre los lípidos plasmáticos;
2. Analizar en un modelo experimental con resistencia central a la leptina las consecuencias sobre:
 - e) el metabolismo lipídico en el hígado y el tejido adiposo blanco.
 - f) el metabolismo de los esfingolípidos en el tejido adiposo blanco;
3. Estudiar en un modelo experimental con resistencia central a la leptina los mecanismos moleculares responsables de evitar la aparición de Diabetes tipo II.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Todos los reactivos y productos utilizados son de grado analítico y han sido suministrados por distintas casas comerciales, fundamentalmente: Sigma y Merck. Se han utilizado además una serie de productos más específicos cuya procedencia se indica en el texto.

3.2 Modelo de experimentación

Se emplearon ratas macho de la raza Wistar albino de 3 y 24 meses de edad, que corresponden al estado adulto y a la esperanza de vida media del animal. Las ratas se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, en condiciones estériles, con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas, humedad relativa del 50-55% y temperatura de 20-25°C. Los animales se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio y acceso libre al agua.

3.3 Implantación de mini-bombas osmóticas

Las mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 2001, Palo Alto, Calif. USA), cargadas con leptina de rata (Sigma) (0.2 µg/día) o suero salino (PBS), y mantenidas a 37°C en condiciones estériles, fueron implantadas por vía intracerebroventricular (*i.c.v.*) según Halaas y col (1997). Esta dosis de leptina es más de 1000 veces superior a la concentración fisiológica de leptina en el LCR (Wang y col., 1999a).

Las ratas fueron ayunadas 12 horas antes de la operación y anestesiadas por inyección intraperitoneal (*i.p.*) con 0.2 mL/100 g de peso del animal de una mezcla preparada de forma extemporánea y protegida de la luz, de 2.5 mL ketolar 50 mg/mL (Ketamina, PARKE-DAVIS), 2 mL valium 5 mg/mL (Diazepam, Roche) y 0.5 mL atropina 1 mg/mL (Braun). Una vez anestesiado el animal, se colocó su cabeza en el estereotáxico (David Kopf, Tujunga, Calif. USA), fijando la barra nasal 3.3 mm por debajo de la línea interaural. Se hizo una incisión en el cuero cabelludo hasta despejar el cráneo. En el punto situado a -1.6 mm lateral, y 0.8 mm anterior al bregma, se realizó una perforación unilateral del hueso craneal, empleando un taladro dental (Zenit, España) (Fig. 8). Dicho punto corresponde a uno de los ventrículos laterales del cerebro de la rata (Fig. 9), donde se implantó una cánula (4x0.36, longitud x diámetro en mm) conectada a una mini-bomba osmótica. La cánula se fijó con cemento dental (KETAC CEM radiopaque, Glass Ionomer Cement, ESPE) y la mini-bomba se colocó de forma subcutánea en la región interescapular, en un espacio creado mecánicamente con una pinza. La herida en el cuero cabelludo fue suturada con grapas quirúrgicas (Autoclip Wound Clips, #427631, Becton Dickinson, USA). Al finalizar la operación, los animales se colocaron en jaulas independientes con libre acceso al agua, y al calor de una

lámpara, para evitar la hipotermia durante la recuperación de la anestesia. Las ratas implantadas con mini-bombas de leptina y de suero salino fueron alimentadas *ad libitum*. Un tercer grupo de ratas también recibió tratamiento con suero salino, pero recibió la misma cantidad de alimento que el consumido por los animales tratados con leptina (*pair-fed*), con el objetivo de determinar aquellos efectos de la leptina que son independientes de sus propiedades anorexígenas. Se monitoreó diariamente tanto el peso corporal, como el consumo de alimento.

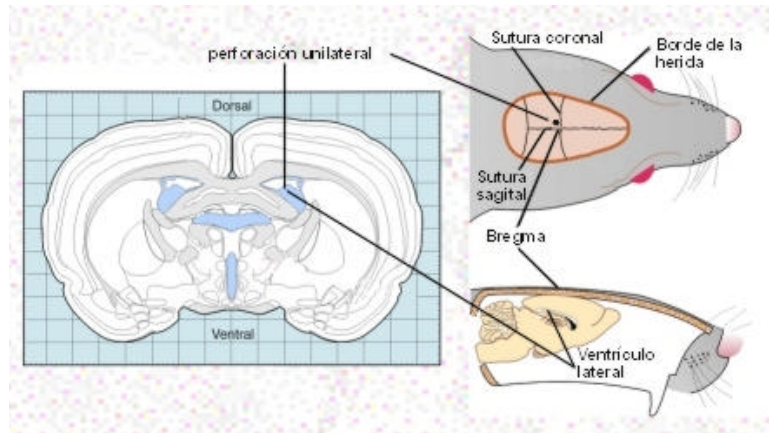


Figura 8. Representación esquemática de la implantación de las minibombas osmóticas.

La cánula conectada a una minibomba osmótica cargada con leptina se implanta a través de una perforación unilateral en el ventrículo lateral, de manera que la leptina se infunde en el líquido cefalorraquídeo (representado de color azul en el esquema del corte sagital del cerebro) que comunica todo el sistema de ventrículos cerebral.

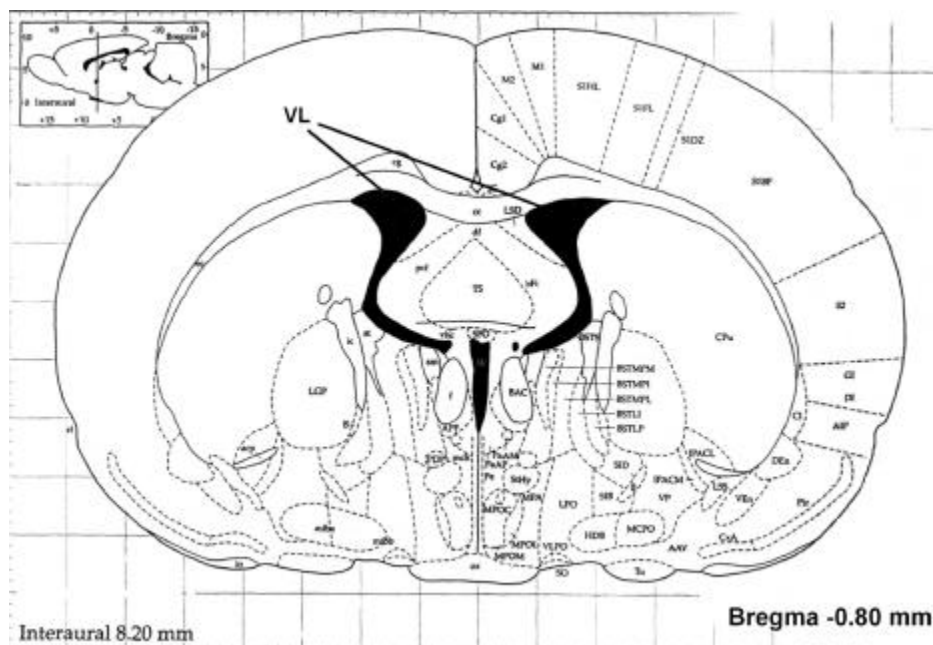


Figura 9. Coordenadas del ventrículo lateral en el estereotaxico.

VL – ventrículo lateral. (Tomado de Paxinos y Watson, 1997).

3.4 Tratamiento “in vivo” con insulina

Al cabo de 7 días de la implantación de las mini-bombas, las ratas fueron tratadas por vía intravenosa (*i.v.*) con insulina o suero salino (controles). Los animales fueron previamente ayunados 12 horas, anestesiados (apartado 3.3), y la insulina (Eli Lilly, Humulin) se inyectó por la vena safena a una dosis de 1UI/100 g de peso del animal. Al cabo de 30 minutos los animales aún anestesiados se decapitaron y se colectó su sangre, la cual se procesó según el apartado siguiente (3.5.). Se extrajo el tejido adiposo epididimal (TAE) para su fraccionamiento subcelular, así como muestras de hígado y TAE para la extracción de RNA o lípidos. Todas las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C hasta su uso.

3.5 Determinación de la concentración de glucosa sérica

Las muestras de sangre se dejaron coagular 30 min aproximadamente y se centrifugaron en minifuga a máxima velocidad 15 min a temperatura ambiente. En el suero (sobrenadante) se determinó la concentración de glucosa por el *kit Amplex[®] Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit* (Molecular Probes, A-22189), en un lector de placa Synergy HT[®] con el programa KC4 v3.1 (Bio-Tek[®] Instruments, Inc. USA). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se emplearon 3 réplicas por muestra (dilución 1:50). A partir de la velocidad de reacción se calculó la concentración de glucosa en las muestras, mediante el empleo de una curva patrón de velocidad de la reacción ($\text{DO}_{560 \text{ nm}}/\text{min}$) vs concentración de D-glucosa en un intervalo de 10 a 200 μM . La velocidad de reacción se calculó en la zona lineal inicial de la curva de $\text{DO}_{560 \text{ nm}}$ vs tiempo (minutos).

3.6 Determinación de la concentración de insulina y leptina séricas

La concentración de insulina o leptina en el suero se determinó empleando los *kits* SPI-Bio (France) inmunoenzimáticos específicos para insulina o leptina, respectivamente, en un lector de placa (apartado 3.5). Para la determinación de leptina los sueros se diluyeron 20 veces. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se emplearon 3 réplicas por muestra.

3.7 Determinación de la concentración de lípidos en el suero

La concentración de TAG en suero se analizó mediante el *kit Triglyceride LiquiColor[®]* (Stanbio, Cat. No. 2201), de colesterol total mediante el *kit Cholesterol Trinder[®]* (Stanbio, Cat. No. 1016), y de AG libres mediante el *kit NEFA C* (Wako), en un lector de placa (apartado 3.5). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se emplearon 3 réplicas por muestra.

3.8 Fraccionamiento subcelular del TAE

El tejido adiposo congelado se troceó y homogeneizó en tampón de homogeneización frío (0.1 M sacarosa, 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM Na-pirofosfato, 5 mM NaN_3 , 5 mM NaF, 1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina y 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatina). Se empleó un homogeneizador manual Dounce de vidrio – vidrio, realizando 30 pases con el pistilo A y 30 con el B, obteniendo el “homogenado total”. Dicho homogenado se centrifugó a 45000xg, 5 min, y se recogió el infranadante, del cual se recogió una alícuota, representando el extracto total del TAE. Para la obtención de las diferentes fracciones subcelulares del TAE, el infranadante se centrifugó a 12 000xg, 30 min (Fig. 10), obteniéndose en el precipitado la fracción de membrana plasmática “cruda” (Massague y Czech, 1982). Esta fracción está formada por la membrana celular, mitocondrias, núcleo y restos de células endoteliales. A partir del sobrenadante, por centrifugación a 33 000xg, 20 min, se obtuvo la fracción de membranas pesadas (*heavy membranes* o HM), y, luego, por centrifugación a 200 000xg, 1 h, la de membranas ligeras (*light membranes* o LM). El sobrenadante de esta última centrifugación corresponde al citoplasma celular (CYT) (Simpson y col., 1983). Las LM están compuestas fundamentalmente por el aparato de Golgi, fracciones del citoesqueleto de actina y pequeñas vesículas, y es donde se localiza el transportador GLUT4. Las HM están enriquecidas en las membranas del retículo endoplásmico (RE).

La membrana plasmática (MP) se purificó a partir de la membrana “cruda” (Fig. 10) mediante centrifugación en un colchón de sacarosa. Para ello, el sedimento de membrana “cruda” se resuspendió en 1 mL de tampón de homogeneización frío y se homogeneizó en un *potter Elvehjem* de vidrio con pistilo de teflón. El homogenado se depositó sobre 2 mL de colchón de sacarosa frío al 40% en 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA y se centrifugó en un rotor basculante TST60.4 (Kontron), a 108 000xg (29 000 rpm) 50 min. Se recogió la fracción de membrana plasmática presente en la interfase, se diluyó en un tampón de lavado frío (50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM Na-pirofosfato, 5 mM NaN_3 , 5 mM NaF, 1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 , 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina y 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatina) en relación 1:10 y se centrifugó a 27 000xg, 15 min. El sedimento se resuspendió en 1 mL de tampón de lavado y se centrifugó a máxima velocidad en una minifuga (Sigma) durante 15 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las membranas plasmáticas purificadas (MP), así como el resto de las fracciones subcelulares obtenidas (HM, LM y CYT) se guardaron a -70°C hasta su utilización. El fraccionamiento celular se llevó a cabo en baño de hielo, y las centrifugaciones a 4°C . La pureza de cada fracción se determinó por su enriquecimiento en Na^+/K^+ -ATPasa, GRP78 y TGN38, como marcadores de MP, RE y Golgi, respectivamente.

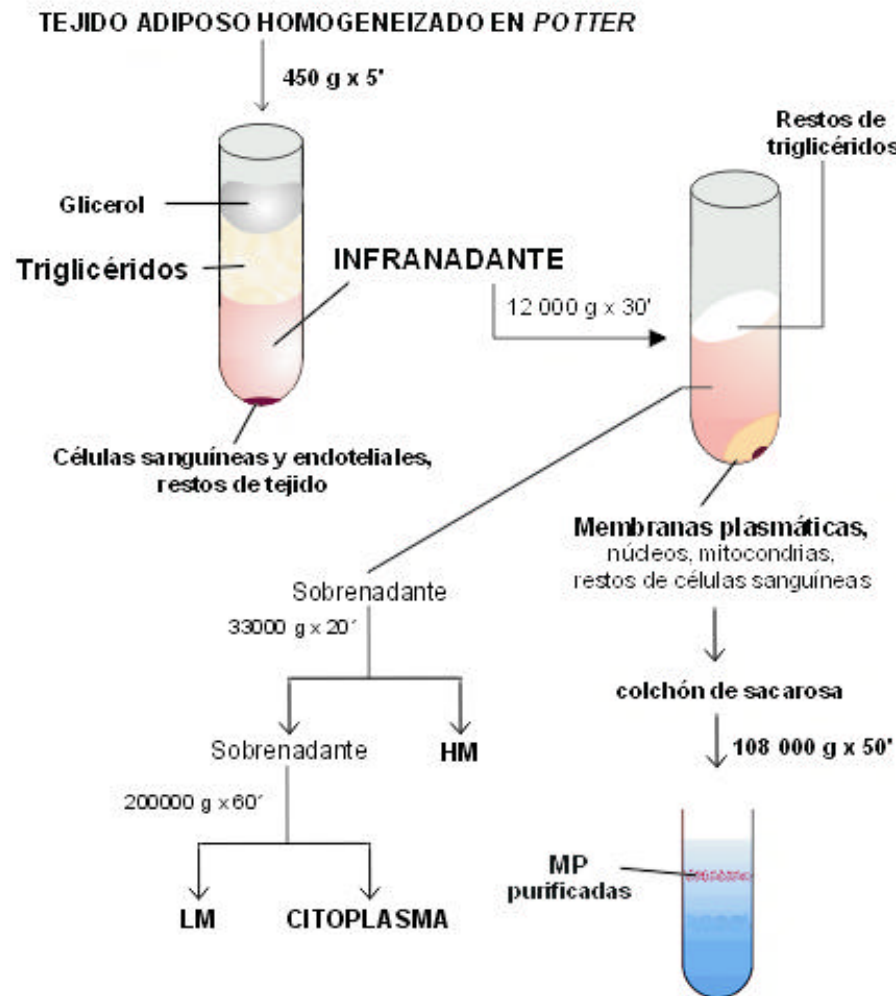


Figura 10. Representación esquemática del protocolo de centrifugación diferencial utilizado para aislar las distintas fracciones de membrana y el citoplasma celular a partir del TAE.

MP: membrana plasmática, LM: membranas ligeras (*Light membranes*) enriquecidas en Golgi, HM: membranas pesadas (*Heavy membranes*) enriquecidas en retículo endoplásmico.

3.9 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando el reactivo *BIO-RAD Protein Assay* (BIO-RAD) y BSA como proteína patrón.

3.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Las muestras se resuspendieron en tampón de carga de electroforesis o tampón de Laemmli (1970) (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2% SDS y 0.001% azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min, salvo cuando se quiso visualizar el GLUT4 y la Na^+/K^+ -ATPasa, en cuyo caso el tampón de Laemmli no contenía β -mercaptoetanol y no se calentaron las muestras. Las muestras así tratadas se sometieron a una electroforesis en minigeles (Bio-Rad) de

poliacrilamida/SDS de 1.5 mm de grosor, en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS). Como patrones de peso molecular se emplearon marcadores preteñidos *Rainbow* (10, 15, 25, 30, 35, 50, 75, 105, 160 y 250 kDa) (Amersham).

3.11 Transferencia a membranas e inmunodetección de proteínas (western blot)

Tras ser separadas por electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (NTC) con un tamaño de poro de 0.2 μ m (Bio-Rad), en tampón 25 mM Tris-HCL pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% metanol, a 300 mA durante 1 hora y refrigeración (Towbin y col., 1979). Posteriormente, las NTCs se incubaron durante toda la noche a 4°C, en PBS-TW20 (13.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄ pH 7.4 y 0.1% Tween 20), conteniendo 5% de leche desnatada. Seguidamente, las NTCs se lavaron 6x5 min en agitación orbital con 50 mL de PBS-TW20. Luego, se incubó con los anticuerpos primarios específicos diluidos en PBS-TW20, en agitación durante toda la noche a 4°C. Una vez retirado el anticuerpo, se lavó 6x5 min con PBS-TW20, para después incubar la NTC con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y diluido en tampón de bloqueo (PBS-TW20 + 5% leche desnatada), durante 30 – 45 min, con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavó 6x5 min con PBS-TW20 y, finalmente, el anticuerpo unido a las proteínas se detectó por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL de Amersham. Las bandas visualizadas en las autorradiografías se cuantificaron en un densitómetro GS-690 con el programa Multi-Analyst 1.1 (Bio-Rad). La naturaleza de los anticuerpos utilizados, así como las diluciones de uso se recogen en la Tabla 1.

3.12 Extracción de RNA

Todo el material empleado fue esterilizado en autoclave y horno a 180°C. El agua utilizada para la preparación de las disoluciones se trató con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% (v/v) y se esterilizó en autoclave. El aislamiento del RNA total se realizó mediante el método del Trizol (Invitrogen) a partir de 100-200 mg de tejido siguiendo las recomendaciones del fabricante. El precipitado final de RNA se resuspendió en 30 μ L agua DEPC y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm. Finalmente, el RNA se precipitó añadiendo 1/20 de su volumen de acetato de sodio 3M pH 7 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, guardándose a -70°C hasta su posterior uso.

Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Casa comercial	Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Casa comercial
?-IR-? (C-19) Policlonal de conejo.	1:200	Santa cruz Biotechnology	GAR-PO Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo unido a peroxidasa	1:5000	Bio-Rad
?-IR-PY1146 Policlonal de conejo.	1:1000	Cell Signalling Technology	GAR-PO	1:2000	Bio-Rad
?-IRS-1 Policlonal de conejo.	1:800	Cell Signalling Technology	GAR-PO	1:3000	Bio-Rad
?-IRS-1-P-Ser307 Policlonal de conejo.	1:1000	Cell Signalling Technology	GAR-PO	1:10 000	Bio-Rad
MAB-?-P-Tyr-1000	1:2000	Cell Signalling Technology	GAM-PO Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón unido a peroxidasa	1:10 000	Bio-Rad
?-P-Akt2 (Ser473) Policlonal de conejo.	1:1000	Cell Signalling Technology	GAR-PO	1:3000	Bio-Rad
?-P-Akt (Thr308) Policlonal de conejo.	1:1000	Santa cruz Biotechnology	GAR-PO	1:8000	Bio-Rad
?-GLUT4 (IF8) Monoclonal	1 ?g/ml	Biogénesis	GAM-PO	1:10 000	Bio-Rad
?-SREBP-1c (H-160) Policlonal de conejo.	1:200	Santa cruz Biotechnology	GAR-PO	1:8000	Bio-Rad
MAB-N ⁺ /K ⁺ -ATPase Monoclonal.	1:5000	ABCAM	GAM-PO	1:5 000	Bio-Rad
MAB-TGN38 Monoclonal.	1:500	ABCAM	GAM-PO	1:5 000	Bio-Rad
MAB-GRP78 Monoclonal.	1:500	ABCAM	GAM-PO	1:5 000	Bio-Rad
?-actina Policlonal de conejo.	1:300	ABCAM	GAR-PO	1:8000	Bio-Rad

3.13 Transcripción inversa de mRNA a cDNA

El RNA total (5 ?g de hígado y 3 ?g de adiposo) fue tratado con *DNase* libre de *RNasas* (2U/?g de RNA) (Roche) 30 min a 37°C, en presencia de *RNasin* (4U/?g) (Promega) y DTT 8 mM. Seguidamente se incubó 5 min a 95°C, y se copió el mRNA a cDNA, empleando 4U/?L de transcriptasa inversa (*RT*) del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Gibco BRL) en 20 ?L de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 1 mM de cada

dNTP, 50 nM de p(dN)₆ (Boheringer Mannheim) y el resto de los componentes del tratamiento previo con la DNaseI (Sambrook y col., 1989). Se incubó 1h a 37°C y se inactivó la RT a 95°C 5 min. El cDNA así generado se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

3.14 Real-time PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) empleando el sistema Taqman-MGB o SYBR Green, según el caso. La cuantificación de la expresión génica se hizo de forma relativa a la expresión del gen del 18SrRNA, utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde ΔCt es la diferencia entre los ciclos umbrales de la curva de PCR del gen de interés y la del control endógeno 18SrRNA, y $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre las ΔCt correspondientes a los distintos tratamientos (leptina, *pair-fed*) y la del grupo de ratas control (tratadas con suero salino tanto vía i.c.v., como vía i.v.) (Livak y Schmittgen, 2001). La naturaleza de los genes analizados con los sistemas Taqman-MGB o SYBR Green, se recogen en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Naturaleza de los genes analizados mediante PCR en tiempo real con el sistema Taqman-MGB.

Gen	Ensayo Taqman-MGB	Gen	Ensayo Taqman-MGB
ACC?	Rn00573474_m1	ATGL	GenBank XM_341960. Comprende la unión entre exones 2 y 3
Asah-1	Rn00584632_m1	Asah-2	Rn00671294_m1
CHREBP	Rn00591943_m1	CPT-1a	Rn00676501_g1
CPT-1b	Rn01407787_g1	DAGT-1	Rn00584870_m1
D6Dsa	Rn00580220_m1	FAS	Rn01463556_g1
FAT/CD36	Rn00580728_m1	GLUT-4	Rn01752378_g1
HSL	Rn00563444_m1	INSIG-1	Rn00673650_g1
IR-B	GenBank M29014. Comprende 18 nucleótidos del exón 11 (Fig. 11)	IRS-1	Rn02132493_s1
LASS2	GenBank XM-227443.	LASS4	GenBank XM-001065770
LASS6	GenBank XM-001058317	LPL	Rn00561482_m1
MCD	Rn00585056_m1	PEPCK-c	Rn01529009_g1
PGC -1?	Rn00580241_m1	PPAR?	Rn00566193_m1
PPAR?	Rn00440945_m1	SCD-1	Rn00594894_g1
SMPD-1	Rn01506464_g1	SMPD-2	Rn01440898_g1
SMS	Rn00710607_m1	SOCS-3	Rn00585674_s1
SPT-1	GenBank XM_225180	SREBP-1c	Rn01495757_g1
18S rRNA	Hs99999901_s1		

El IR se expresa en dos isoformas por splicing alternativo: IR-A e IR-B (Fig. 3). Para cuantificar la expresión diferencial de IR-A e IR-B, se emplearon oligos específicos en cada caso (Fig. 11, Tablas 2 y 3).

Tabla 3. Naturaleza de los genes analizados mediante PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green.

gen	oligos	Tamaño del fragmento
IR-A	5'-CCCACCTTTTGAGTCTGACGAT-3' 5'-GGGATGGCCTGGGAACA-3' (Fig. 11)	182 pb
18SrRNA	5'-CGGCTACCCACATCCAAGGAA-3' 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	187 pb

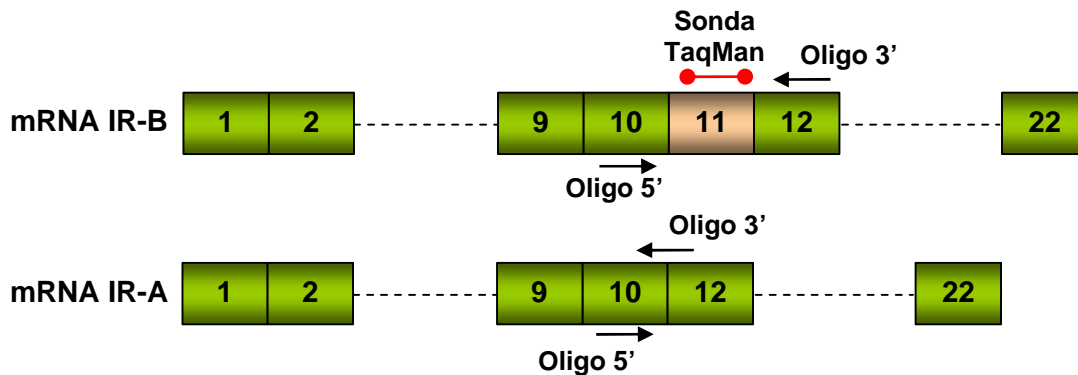


Figura 11. Esquema del diseño de los oligos para la amplificación selectiva de IR-A e IR-B por RT-PCR en tiempo real.

Para la amplificación de IR-B la sonda TaqMan-MGB se hibridizó al exón 11 y los oligos a los exones 10 y 12 respectivamente. Para la amplificación de IR-A el oligo 3' cubrió la unión entre los exones 10 y 12, el oligo 5' se hibridizó al exón 10, y como reportero se empleó el SYBR Green.

3.15 Determinación de TAG, AG y colesterol total en hígado y TAE

Los lípidos totales de los tejidos se aislaron mediante el método de Folch (1957). 50-100 mg de tejido se homogeneizaron en politrón con 1.5 mL de metanol 2x15 seg y luego con 3 mL de cloroformo 2x15 seg, en tubos de PP de 15 mL. El homogenado se centrifugó a 2000xg 10 min a temperatura ambiente, y la fase orgánica (? 2.5 mL) se pasó a un vial de cristal topacio con tapón de rosca y junta PTFE (Supelco), se le añadió 25 ?L del antioxidante BHT 10 mg/mL y se guardó a -70°C hasta su uso.

Para la determinación de TAG, colesterol total y AG (libres+acil-CoA) se siguió el protocolo descrito por Cohen y col., (2002). Brevemente, el extracto lipídico se llevó a temperatura ambiente, 1 mL de este extracto se pasó a un vial de PP y se le añadió 2 ?L de Triton X-100. De esta mezcla se dispensaron alícuotas de 100 ?L y 150 ?L (2 réplicas de cada una) en viales de PP, y se llevaron a sequedad bajo corriente de N_2 . Para la determinación de TAG o colesterol total, a los viales con los residuos lipídicos provenientes de 100 ?L de extracto se les añadió 0.3 mL del reactivo Stanbio correspondiente (apartado 3.7), y 200 ?L de la mezcla se dispensaron en una placa de 96 pocillos (Falcon). La placa se incubó a 37°C 5 min en un lector de placa

(apartado 3.5) y se leyó la absorbancia a 500 nm antes de 1h. El contenido de TAG o colesterol total se calculó según:

$$\frac{\text{mg TAG ó colesterol}}{\text{g tejido}} = \frac{\text{DO 500 nm}_{\text{muestra}} \cdot 3 \mu\text{L} \cdot 200 \frac{\text{mg}}{\text{dL}}}{\text{DO 500 nm}_{\text{patrón}}} \cdot \frac{3 \text{ mL}}{100 \mu\text{L}} \cdot \frac{1}{\text{g tejido}} ;$$

DO 500 nm_{muestra} : absorbancia a 500 nm de la muestra; DO 500 nm_{patrón}: absorbancia a 500 nm del patrón de TAG o colesterol; 200 mg/dL: concentración del patrón de TAG o colesterol; 3 μL: volumen de patrón de TAG o colesterol empleado; 3 mL: volumen total de la fase clorofórmica; 100 μL: volumen de la fase clorofórmica usado en la determinación de TAG o colesterol; g_{tejido}: gramos de tejido empleados en la extracción lipídica.

Para la determinación de AG (libres+acil-CoA) se empleo el kit NEFA C (apartado 3.7). Este kit contiene acil-CoA sintetasa, convirtiendo AG libres en derivados de aci-CoA. Por esta razón el resultado de esta determinación es la suma de los AG libres y de los acil-CoA. A los viales con los residuos lipídicos provenientes de 150 μL de extracto se les añadió 0.25 mL del reactivo R1, se mezcló por inversión y se incubó 15 min a 25°C. Luego, se añadieron 0.5 mL de reactivo R2, se mezcló por inversión y se incubó 15 min a 25°C. 200 μL de la mezcla se dispensaron en una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 550 nm antes de 1h en un lector de placa. El contenido de AG se calculó según:

$$\frac{\text{mg AG}}{\text{g tejido}} = \frac{\text{DO 550 nm}_{\text{muestra}} \cdot 20 \mu\text{L} \cdot 28.2 \frac{\text{mg}}{\text{dL}}}{\text{DO 550 nm}_{\text{patrón}}} \cdot \frac{3 \text{ mL}}{150 \mu\text{L}} \cdot \frac{1}{\text{g tejido}} ;$$

DO 550 nm_{muestra} : absorbancia a 550 nm de la muestra; DO 550 nm_{patrón} : absorbancia a 550 nm del patrón de AG; 28.2 mg/dL: concentración del patrón de AG; 20 μL: volumen de patrón de AG empleado; 3 mL: volumen total de la fase clorofórmica; 150 μL: volumen de la fase clorofórmica usado en la determinación de AG; g_{tejido} : gramos de tejido empleados en la extracción lipídica.

3.16 Análisis del perfil de AG componentes de TAG de hígado y TAE

3.16.1 Purificación de TAG

A partir de 100 mg de tejido y en presencia de ácido pentadecanoico (C15:0) (0.7 μg/mg tejido) se extrajeron los lípidos totales tal y como se describe en el apartado anterior (3.15). El extracto lipídico se llevó a sequedad bajo flujo de N₂. El residuo lipídico se resuspendió en 150 μL de cloroformo y la mezcla se aplicó a columnas Discovery-DSC-NH₂ de 500 mg (Supelco) pre-equilibrados con 5 mL de hexano, en un sistema de extracción en fase sólida a vacío de 12 puertos (Visiprep-DL vacuum manifold, Supelco). Los TAG se eluyeron con 2 mL hexano/ácido

acético (85/15, v/v). Las muestras se colectaron en tubos de cristal de 15 mL con tapón de rosca y junta PTFE (Supelco) y se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.16.2 Hidrólisis de TAG y metilación de AG

Las fracciones de TAG obtenidas en el apartado anterior (3.16.1) se llevaron a sequedad bajo corriente de N_2 , se les añadió 2.5 mL de metanol/HCl (5/1, v/v) y se incubó a 75°C . Al cabo de 5 h, se añadió 2 mL hexano, se agitó 30 seg en vortex y se centrifugó 200xg 5min a 25°C . La fase superior se pasó a tubo de cristal limpio y se secó bajo corriente de N_2 . El residuo lipídico que contiene los ésteres metílicos de AG se resuspendió en 0.3 mL de hexano, se pasó a viales de cristal con inserto con muelle (6*29 pk 100, Symta), se selló con cápsula con septum (12 mm pk500, Symta) y se guardó en la oscuridad a temperatura ambiente hasta ser inyectado en el cromatógrafo de gases en el día o al día siguiente.

3.16.3 Cromatografía de gases

Los ésteres metílicos de AG se separaron en un cromatógrafo de gases Agilent GC 6890 equipado con inyector automático (Agilent 7683) y detector de ionización en llama (FID). Se empleó una columna capilar (Sugelabor) recubierta interiormente con una película de 0.25 μm de espesor de la fase SGL-1000 (polietilenglicol acidificado), con una longitud de 50 m y un diámetro interno de 0.25 mm. Como gas portador se empleó He a 1 mL/min. El volumen de inyección de muestra fue de 1 μL y la relación de split de 50:1. La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C y la del horno 210°C . Los AG se identificaron de acuerdo a su tiempo de retención en la columna, para lo cual se inyectaron previamente patrones de ésteres metílicos de los siguientes AG: ácido palmítico ($\text{C}_{16:0}$), ácido palmitoléico ($\text{C}_{16:1}$, w7), ácido margárico ($\text{C}_{17:0}$), ácido esteárico ($\text{C}_{18:0}$), ácido oleico ($\text{C}_{18:1}$, w9), ácido linoléico ($\text{C}_{18:2}$, w6), ácido ω -linolénico ($\text{C}_{18:3}$, w3), ácido ω -linolénico ($\text{C}_{18:3}$, w6), ácido araquídico ($\text{C}_{20:0}$), ácido gadoléico ($\text{C}_{20:1}$, w9), ácido araquidónico ($\text{C}_{20:4}$, w6), ácido behénico ($\text{C}_{22:0}$), ácido docosahexanoico ($\text{C}_{22:6}$, w3), ácido eicosapentaenoico ($\text{C}_{22:5}$, w3) y ácido lignocérico ($\text{C}_{24:0}$) (Sigma). El área del pico correspondiente al éster metílico de cada AG se expresó como porcentaje del total.

3.17 Lipidómica del TAE y de sus fracciones subcelulares de membrana

En este apartado se describirán estudios cualitativos y cuantitativos por espectrometría de masas de las ceramidas en el TAE y sus distintas fracciones de membrana (PM, Golgi y ER), de las esfingomielinas y las fosfatidilcolinas en PM y del colesterol libre en PM y ER de este tejido.

3.17.1 Extracción de lípidos totales a partir de tejido

El aislamiento de lípidos totales se realizó mediante el método del Folch (1957). 20 mg de tejido, y, paralelamente, un blanco de extracción con 0.5 mL de agua, se homogeneizaron en

0.2 mL de metanol y luego en 0.4 mL de cloroformo mediante el uso de un homogeneizador tipo Dounce vidrio-teflón, realizando 10 pases con el pistilo A y 10 con el B, en presencia del patrón interno de ceramida Cer17:0 (80 pmol/mg tejido). La suspensión se pasó a tubos de cristal limpio y se sonicó en un baño de ultrasonido durante 15 min. Se añadió 0.15 mL de agua, se agitó en vortex 1 min y la mezcla se centrifugó 15 min a 3000xg a temperatura ambiente. La fase orgánica (inferior) se pasó a tubo de cristal limpio, se secó a vacío y se resuspendió en 1 mL de MSmix (7.5 mM acetato de amonio en cloroformo/metanol/propanol, 1/2/4, v/v) para su análisis por espectrometría de masas luego de ser purificada por TLC, según se describirá en el apartado siguiente (3.17.2).

3.17.2 Fraccionamiento de ceramidas por cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC preparativa se realizó en sílica 60 de alta resolución sobre placas de aluminio (Camag) (Hechtberger y col., 1994). 5 μ L (2 réplicas) del extracto lipídico proveniente del tejido total y disuelto en MSmix se aplicó en un carril de 1 cm de ancho. Como fase móvil se empleó hexano/acetato de etilo (5/1, v/v). Al finalizar la cromatografía, las placas fueron secadas, cortadas a la mitad y una de las mitades fue teñida con ácido sulfúrico. Posteriormente, ambas mitades se alinearon. En estas condiciones los acilglicéridos migran, mientras que las ceramidas se quedan en el punto de aplicación (ver esquema en Fig. 24A). De la mitad de la placa que no fue teñida se recortaron los puntos de aplicación, de los cuales se extrajeron los lípidos por el método de Folch (1957). Las ceramidas así obtenidas se redisolieron en 0.5 mL de MSmix para su análisis por espectrometría de masas.

3.17.3 Extracción de lípidos totales a partir de fracciones subcelulares de membrana

Los lípidos totales de 10 μ g de proteína de membrana (MP, Golgi y ER) se extrajeron en tubos de cristal con 0.6 mL agua, 0.8 mL metanol y 1.6 mL cloroformo, en presencia de patrones internos, que podían ser Cer17:0 (1.575 pmol/ μ g proteína), SM35:1;2 (17:0) (20 μ mol/ μ g proteína), D6-Col (60 μ mol/ μ g proteína) y PC36:6 (18:3/18:3) (20 μ mol/ μ g proteína), dependiendo del estudio que se fuera a realizar. La mezcla se sonicó 15 min y se centrifugó 15 min a 3000xg a temperatura ambiente. La fase orgánica se secó a vacío y se resuspendió en 1 mL de MSmix para su análisis por espectrometría de masas.

3.17.4 Acetilación de las muestras de fracciones subcelulares de membrana para la determinación de colesterol libre por espectrometría de masas

Los extractos lipídicos preparados según se ha descrito en el epígrafe anterior (3.17.3) se acetilaron de acuerdo al método de Liebisch y col., (2006). Para ello, en una placa de 96 pocillos (Eppendorff) se dispensaron 10 μ L/pocillo de extracto lipídico de RE o MP adipocitaria y se secó a

vacío. Posteriormente, se añadieron 50 μ L/pocillo de cloruro de acetilo/cloroformo (1/5, v/v) y la placa se dejó en la campana toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 20 μ L/pocillo de MSmix y el colesteril-acetato se determinó por espectrometría de masas.

3.17.5 Espectrometría de masas QqTOF

El análisis espectrométrico se realizó en modo positivo en un equipo híbrido QSTAR Pulsar *i* (MDS Sciex, Concord, Canada), equipado con una fuente iónica NanoMate HD System automática, controlada por Chipsoft 6.3.2 (Advion BioSciences, Ithaca, NJ). Se empleó un voltaje de ionización de 0.95 kV y una presión de gas de 1.25 psi. El instrumento se calibró en modo MS/MS usando un estándar del lípido sintético 1-palmitoil-2-docosaheptaenoil-sn-glicero-3-fosfolina, según se describe en Ekroos y col. (2002).

3.17.5.1 Análisis cualitativo y cuantitativo de esfingomielinas y fosfatidilcolinas

Las esfingomielinas y las fosfatidilcolinas en la MP de TAE se cuantificaron en modo positivo por barrido del ión precursor (*precursor ion scanning* ó PIS) del fragmento correspondiente a la cabeza de fosfatidilcolina (m/z 184.07, Figura 12) (Ekroos y col., 2002).

El cuadrupolo analítico Q1 se operó en la resolución de masa unitaria (*unit mass*), 20 ms de tiempo de permanencia (*dwell time*) y un paso (*step size*) de 0.2 Da. El atrapamiento en la celda de colisión de iones en un rango de m/z seleccionado (*peak enhancement*) se realizó según las instrucciones del fabricante y se controló por el programa informático Analyst QS 1.1. (Applied Biosystems). La identificación de los picos, la corrección isotópica de las intensidades de los mismos y la cuantificación se realizaron usando un prototipo del programa informático *Lipid Profiler* (MDS Sciex, Concord, Canada). Un PIS de m/z 184.07 representativo de un extracto lipídico de MP de TAE de un animal control se presenta en la Figura 13.

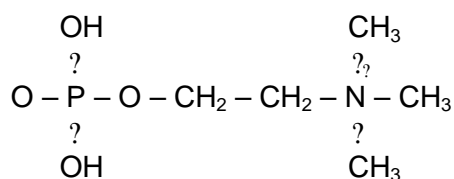


Figura 12. Estructura del fragmento iónico de la cabeza de fosforilcolina (m/z 184.07), empleado para la cuantificación de fosfatidilcolinas y esfingomielinas por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.

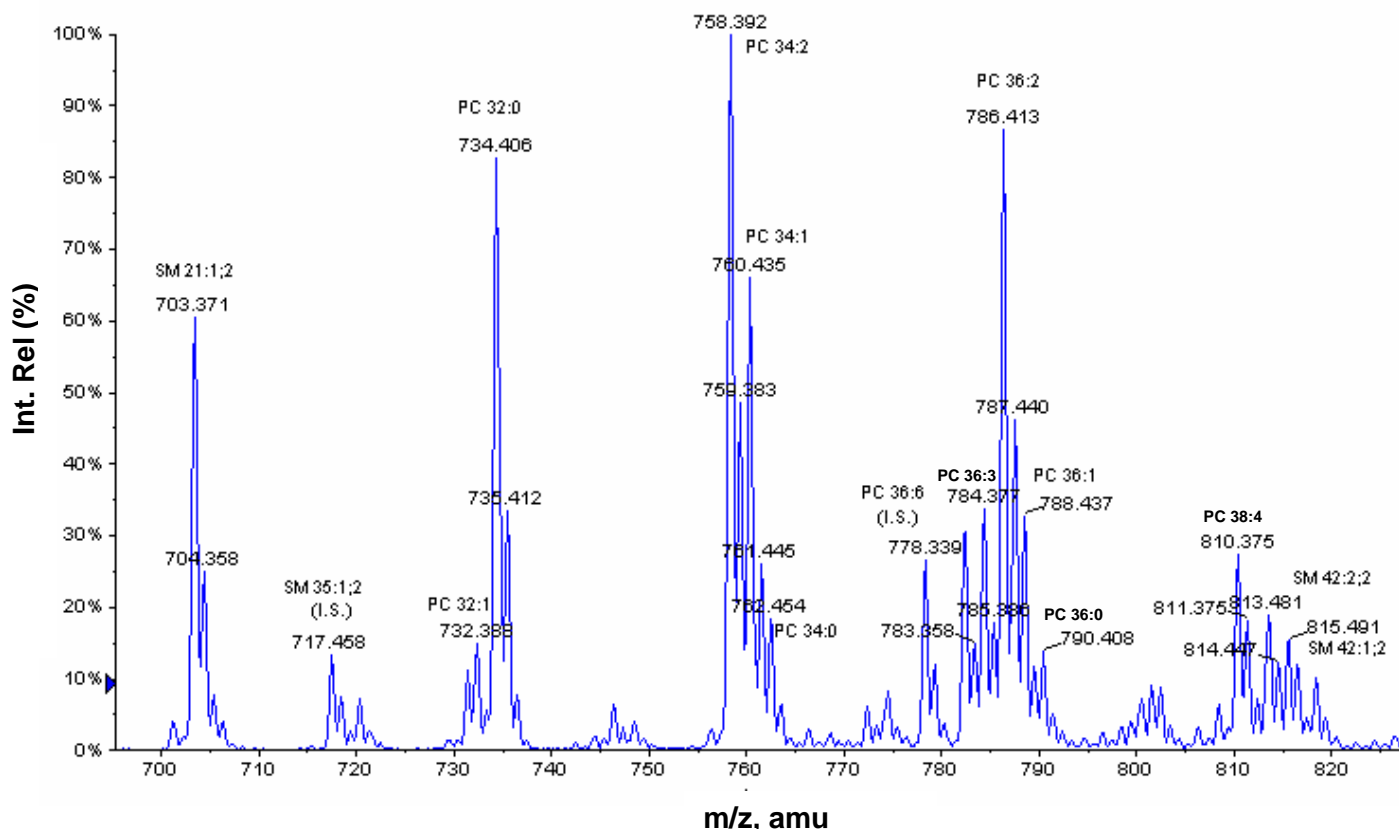


Figura 13. Precursor ion scan representativo del fragmento de la cabeza de fosforilcolina (m/z 187.07) específico para PC y SM, de un extracto lipídico de MP de TAE.

Se muestran las SM y PC más abundantes. Los picos de PC están designados por n átomos de carbono: m dobles enlaces en ambas cadenas de ácidos grasos. Los picos de SM están designados por n átomos de carbono: m dobles enlaces; p grupos hidroxilo. La identificación de los picos, la corrección isotópica de las intensidades de los mismos y la cuatificación se realizaron empleando el programa informático *Lipid Profiler*.

3.17.5.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de ceramida

La cuantificación de ceramida se realizó por espectrometría de masas en tándem en modo positivo usando la monitorización de reacciones múltiple (*multiple reaction monitoring* ó MRM). El cuadrupolo analítico Q1 se operó en la resolución de *unit mass*. El *peak enhancement* se situó en m/z 282.3 con el fin de incrementar la detección de los fragmentos de m/z 252.27, 264.27 y 282.27, característicos de una base esfingoide de 18 carbonos (Fig. 14).

Las especies moleculares de ceramida detectadas en el TAE (Tabla 4) fueron fragmentadas con una energía de colisión de 35 eV, la cual fue previamente optimizada con una mezcla de ceramidas patrones 2.2 μ M Cer17:0 y 0.4 μ M Cer24:1 (Fig. 15).

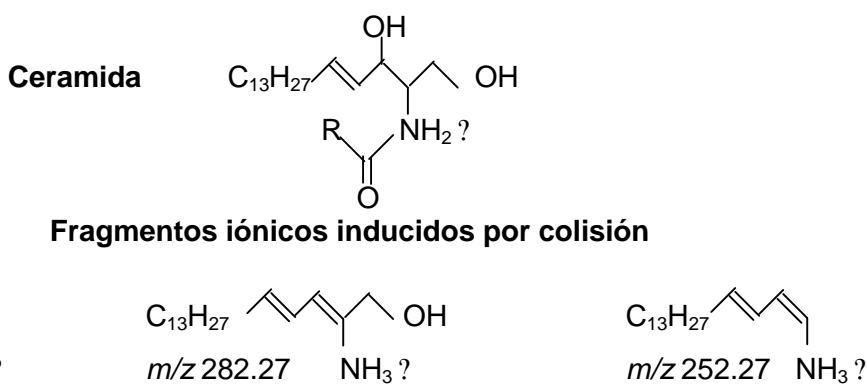


Figura 14. Estructuras de los fragmentos iónicos provenientes de la fragmentación inducida por colisión de una base esfingoide de 18 carbonos, empleados para la cuantificación de ceramida por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.

Tabla 4. Especies de ceramida detectadas en el TAE de rata por espectrometría de masas.

* m/z corresponde a iones moleculares cargados positivamente $[M+H]^+$

Especie de ceramida	m/z^*
Cer16:0	538.6
Cer17:0 (Patrón interno)	552.6
Cer18:0	566.6
Cer20:0	594.6
Cer22:0	622.6
Cer24:1	648.6
Cer24:0	650.6

Para la cuantificación de las ceramidas se sumaron las intensidades (áreas) de los mencionados iones reporteros para cada especie de ceramida, ya que la naturaleza de los grupos N-acil afecta la proporción relativa de estos fragmentos (Fig. 16). Se comprobó la respuesta lineal del instrumento en el rango de concentraciones de ceramida analizada, al añadir al extracto lipídico concentraciones crecientes del patrón interno de ceramida Cer17:0. La suma de las intensidades (áreas) de los fragmentos de todas las especies naturales de ceramida se normalizó con respecto a la suma de las intensidades (áreas) de los mismos fragmentos provenientes de un patrón interno de ceramida sintética (Cer17:0) y con respecto a la cantidad de tejido o de proteína de membrana de partida usadas para la extracción lipídica.

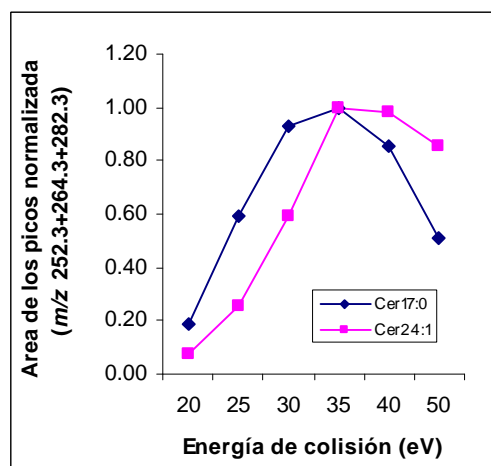


Figura 15. Optimización de la energía de colisión para la cuantificación de ceramida por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.

La suma del área de los fragmentos de m/z 252.27, 264.27, 282.27 correspondientes a los patrones Cer17:0 (2.2 μ M) y Cer24:1 (0.4 μ M), se normalizó con respecto a la suma de los mismos fragmentos provenientes de Cer17:0.

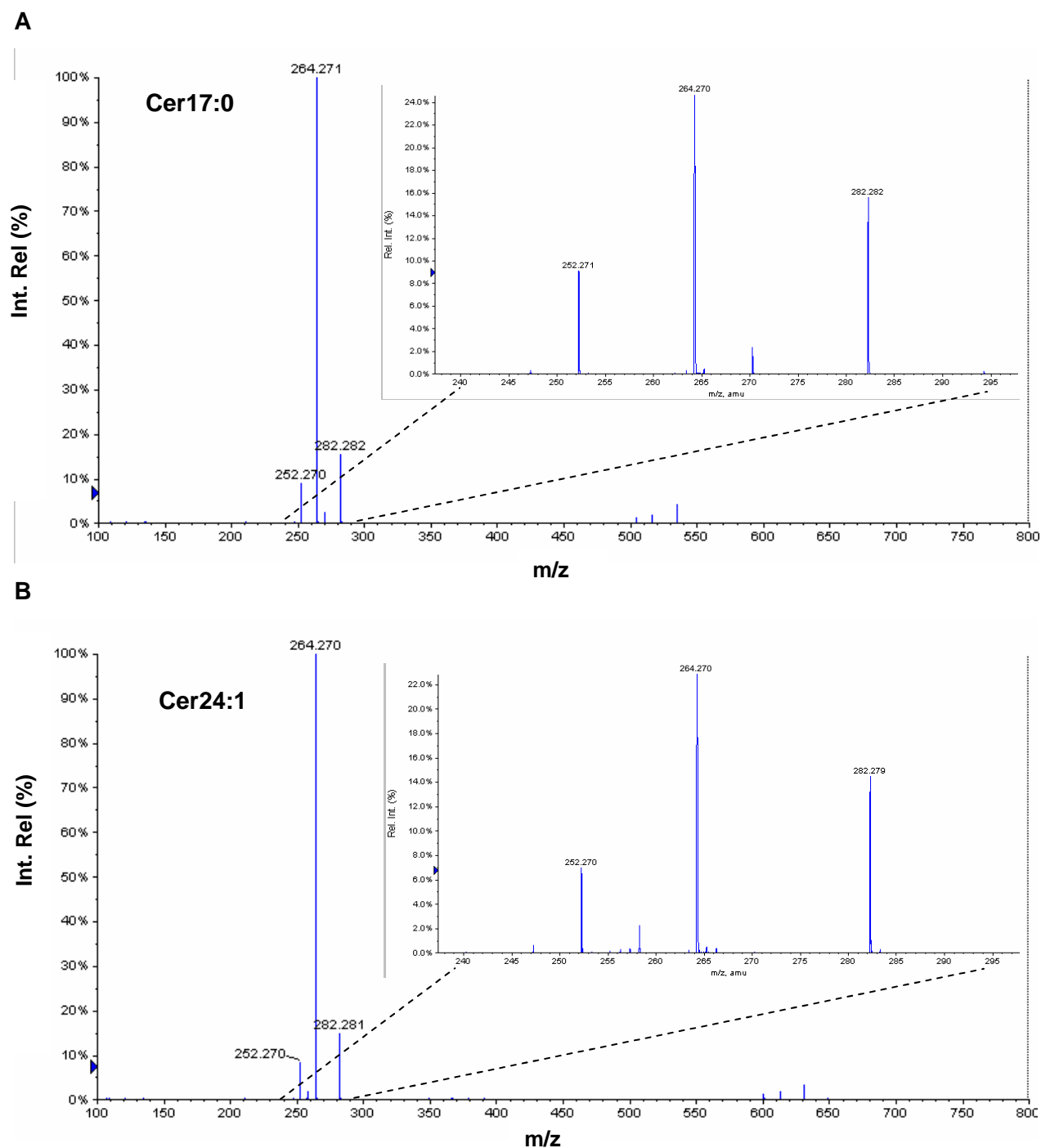


Figura 16. Efecto de la naturaleza del grupo N-acilo sobre la abundancia relativa de los fragmentos específicos de una base esfingoide de 18 carbonos obtenidos por espectrometría de masas en tándem en modo positivo.

Se presentan los espectros de masas en tándem de los patrones de ceramida (A) Cer17:0 y (B) Cer24:1. Ambos patrones fueron fragmentados en las mismas condiciones con una energía de colisión de 35 eV. La región de m/z correspondiente a los fragmentos específicos de ceramida de m/z 252.27, 264.27, 282.27 empleados para la cuantificación se encuentra ampliada en el inserto.

3.17.5.3 Análisis cuantitativo de colesterol libre

El colesteril-acetato obtenido en el epígrafe 3.17.4 se determinó por espectrometría de masas en tándem en modo positivo usando MRM. Los aductos de amonio de los iones moleculares de O-acetil colesterol (Fig. 17) de m/z 446.4 (CE 2:0) y m/z 452.4 (D6-CE 2:0) fueron fragmentados con una energía de colisión de 20 eV. Los fragmentos correspondientes de colestadieno m/z 369.3 (CE 2:0) y m/z 375.3 (D6-CE 2:0) se emplearon para la cuantificación, normalizando la abundancia del pico del fragmento de m/z 369.3 con respecto a la abundancia del pico de m/z 375.3 del patrón interno.

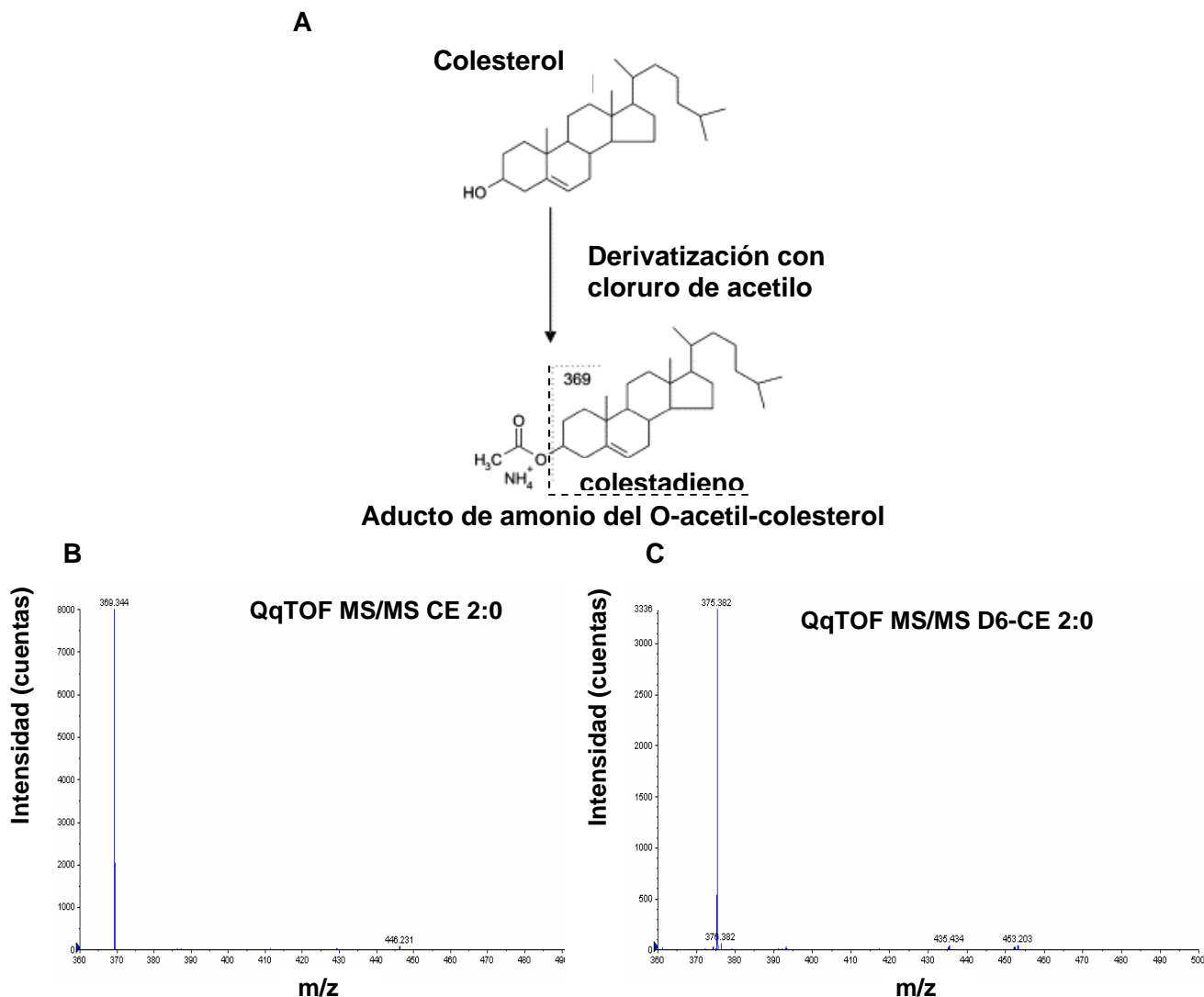


Figura 17. Esquema de la acetilación del colesterol con cloruro de acetilo y de la fragmentación del aducto de amonio del colesteril acetato.

Se muestran espectros de masas representativos en tándem en modo positivo de O-acetilcolesterol (B) de m/z 446.4 (CE2:0) y (C) m/z 452.4 (D6-CE2:0) de un extracto lipídico de RE de TAE, obteniéndose los correspondientes fragmentos de colestadieno de m/z 369.3 y m/z 375.3, empleados para la cuantificación de colesterol libre.

3.18 Análisis de los datos y procesamiento estadístico

Los datos cuantitativos se presentan como el valor medio \pm SEM (error estándar de la media). La significatividad de las diferencias entre dos medias se determinó mediante el test t de Student, y entre más de dos medias, mediante el test de one-way ANOVA, seguido del test de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad $p < 0.05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Efecto de la leptina central sobre las características biológicas de los animales

Entre los efectos más documentados de la leptina están la reducción de la ingesta y del peso corporal. Los animales control del experimento (tratados con suero salino vía *i.c.v.* y alimentados *ad libitum*) presentaron un incremento notable del peso corporal al finalizar el experimento (Fig. 18), ya que se encuentran en una etapa muy activa de crecimiento. El tratamiento con leptina por vía central redujo la ingesta alimentaria alrededor de un 30% (Fig. 18, Tabla 5), y no sólo impidió el incremento del peso corporal de los animales, sino que provocó su disminución (Fig. 18 y Tabla 5). Sin embargo, el índice de adiposidad no sufrió cambios (Tabla 5). Este tratamiento central con leptina no se traduce en un vertido de la hormona hacia la sangre (Tabla 5) e incluso reprime su expresión en el TAE (Fig. 19), confirmando lo publicado en ratón (Commings y col., 2000).

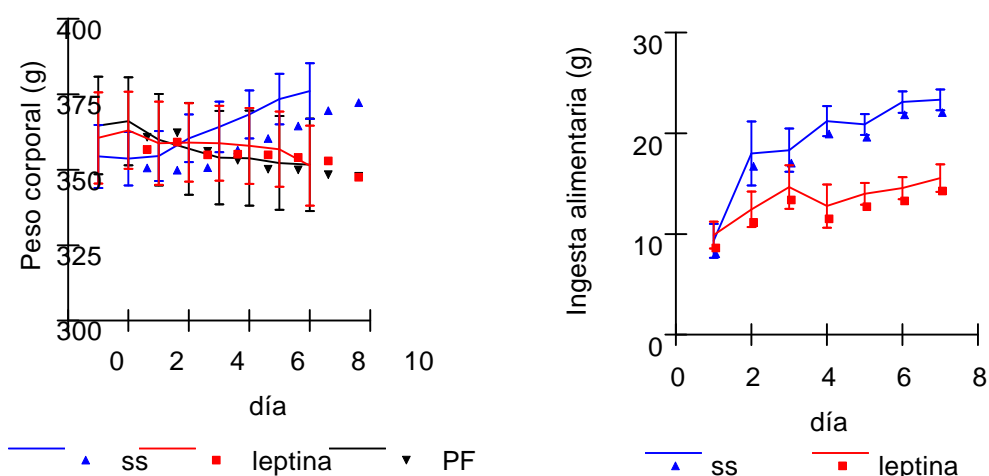


Figura 18. La leptina central reduce el peso corporal y la ingesta alimentaria.

SS – suero salino. Cada punto representa la media de 4 – 10 animales \pm SEM.

Tabla 5. Efecto de la leptina central sobre las características biológicas de los animales

SS: suero salino; PF: *pair-fed*; ? Peso corporal: diferencia entre el peso del animal registrado al final y al inicio del tratamiento *i.c.v.*; en todos los casos se presenta la media de 4 – 10 animales \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Trat-to <i>i.c.v.</i>	SS	Leptina	PF
? Peso corporal (g)	17 ? 5 ^a	-9 ? 4 ^b	-13 ? 2 ^b
Ingesta diaria media (g)	19 ? 1 ^a	13 ? 1 ^b	Idem leptina
Adiposidad %	2.4 ? 0.2 ^a	2.5 ? 0.2 ^a	3.1 ? 0.3 ^a
Glucosa sérica (mM)	6.5 ? 0.8 ^a	5.9 ? 0.6 ^a	5.9 ? 0.4 ^a
Insulina sérica (ng/mL)	1.6 \pm 0.9 ^a	0.7 \pm 0.1 ^b	1.6 \pm 0.5 ^a
Leptina sérica (ng/mL)	5.9 \pm 0.5 ^a	5.2 \pm 0.8 ^a	5.4 \pm 1.3 ^a

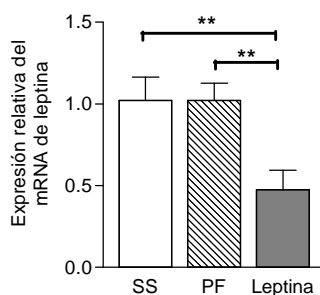


Figura 19. La leptina central reprime su propia expresión en el TAE.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA de leptina se determinó por Taqman-MGB Real-Time PCR relativo al gen 18SrRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (** $p < 0.01$).

4.2 Efecto de la leptina central sobre las acciones periféricas de la insulina *in vivo*

La administración de leptina a ratones *ob/ob* mejora de forma substancial el estado diabético y disminuye los niveles de insulina en plasma de estos animales (Pelleymounter y col., 1995; Schwartz y col., 1996). En concordancia con esto, según la Tabla 5, el tratamiento con leptina vía central a ratas de 3 meses disminuyó los niveles de insulina en suero en el estado basal en comparación con los animales controles, sugiriendo una mejoría en las acciones periféricas de la insulina.

Los efectos principales de la insulina *in vivo* son estimular la captura de glucosa y AG libres por los tejidos periféricos, y disminuir la secreción de glucosa y TAG por el hígado (Duerden y Gibbons, 1990). Empleando la técnica del clamp euglicémico-hiperinsulinémico se ha demostrado que la leptina suministrada tanto por vía periférica (Barzilai y col., 1997; Wang y col., 1999), como por vía central (Cusin y col., 1998; Minokoshi y col., 1999), aumenta la sensibilidad *in vivo* a la insulina en términos del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, en estos trabajos no se detectan efectos de la leptina sobre las acciones de la insulina sobre las grasas del suero.

En nuestras condiciones experimentales no se detectaron variaciones en los niveles de glucosa sérica en condiciones basales entre los animales de los diferentes tratamientos (Tabla 5). Además, en el hígado de las ratas tratadas con leptina se observó un incremento en los niveles del mRNA de la enzima gluconeogénica PEPCK con respecto a los animales controles alimentados *ad libitum* (Fig. 20). Sin embargo, contrastando con los resultados de (Barzilai y col., 1997), en nuestro trabajo sí se observó una mejoría en las acciones periféricas de un estímulo agudo con insulina sobre las grasas del suero, como se describirá a continuación.

En condiciones basales el *pair-feeding* no alteró el contenido de TAG en el suero (Fig. 21B), pero disminuyó los niveles de AG (Fig. 21A) en comparación con los animales controles alimentados *ad libitum*. En cambio la leptina bloqueó la disminución de los AG provocada por la reducción de la ingesta (Fig. 21A), y disminuyó los niveles de TAG (Fig. 21B) en comparación con el *pair-feeding*.

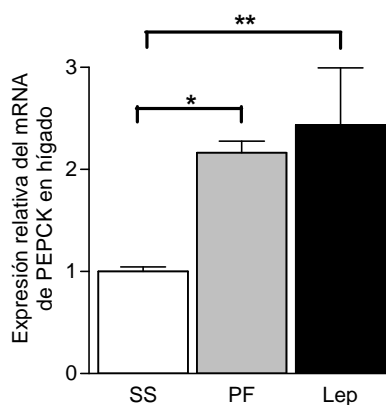


Figura 20. La leptina central aumenta la expresión de la enzima gluconeogénica PEPCK en el hígado.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA de PEPCK se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Luego de un estímulo intravenoso y agudo con insulina, como era de esperar, en todos los grupos de animales los niveles de glucosa sérica disminuyeron (resultados no mostrados). Además, en los animales controles alimentados *ad libitum* la insulina redujo los TAG séricos casi en un 40% (Fig. 21B,D) y los AG en un 25%, aunque éstos últimos de forma estadísticamente no significativa (Fig. 21A,C).

En los animales tratados por vía central con leptina no se observó una mayor supresión por la insulina de los ya bajos niveles de TAG séricos. Sin embargo, sí se observó un efecto sinérgico con la insulina, de forma independiente de las propiedades anorexigénicas, promoviendo la disminución de los AG libres del suero por los distintos tejidos (Fig. 21A,C). Estos datos concuerdan con el efecto sensibilizador de la leptina central frente a las acciones de la insulina en el organismo como un todo (Minokoshi y col., 1999). No se observaron diferencias en los niveles de colesterol total en el suero luego del tratamiento *in vivo* con insulina, y ni la leptina o el *pair-feeding* modificaron este resultado (datos no mostrados).

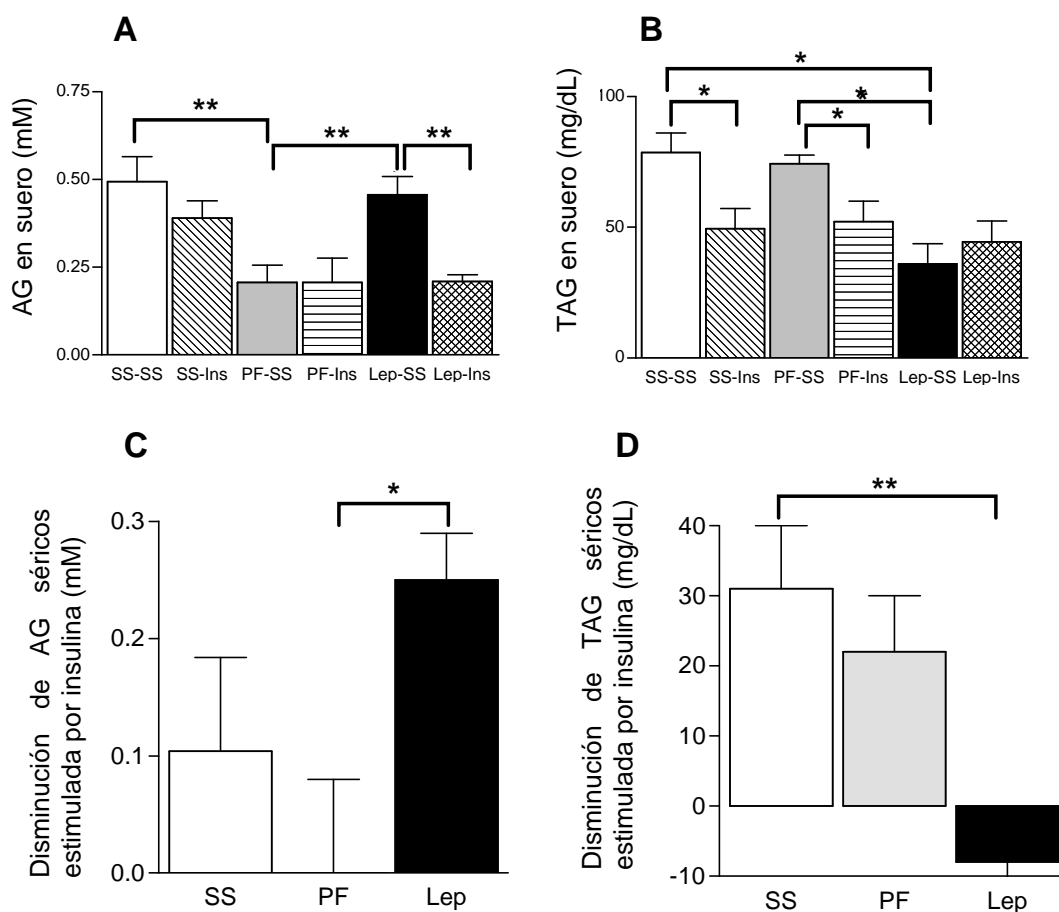


Figura 21. La leptina central potencia la capacidad de la insulina de promover la disminución de ácidos grasos (AG) libres en el suero.

Se muestran los niveles de AG (A) y TAG (B) en suero luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (Lep, 0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (Ins, 10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. (C) Disminución de AG séricos estimulada por insulina: diferencia entre los niveles de AG en suero (mM) registrados en el estado basal y el estimulado con insulina. (D) Disminución de TAG séricos estimulada por insulina: diferencia entre los niveles de TAG en suero (mg/dL) registrados en el estado basal y el estimulado con insulina. SS: suero salino; PF: *pair-fed*; Lep: leptina. Se presenta la media de 6 – 8 animales \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3 Efectos de la leptina central sobre el metabolismo lipídico en el hígado y el TAE

Estudios recientes han demostrado que la leptina evita la acumulación de grasas en tejidos no adiposos y limita la masa del tejido adiposo, previniendo de esta forma el desarrollo de obesidad y Diabetes tipo II (Unger, 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos de la leptina sobre el metabolismo lipídico en el hígado y el tejido adiposo, los dos tejidos lipogénicos más importantes del organismo, están aún por dilucidar.

4.3.1 Contenido de lípidos en el hígado y el TAE

En concordancia con sus propiedades lipostáticas, la leptina suministrada por vía central disminuyó los niveles de TAG (Fig. 22B) y AG (Fig. 22D) en el TAE, en comparación con el grupo

de ratas *pair-fed*. Asimismo, la leptina redujo el contenido hepático de TAG (Fig. 22A) y AG (Fig. 22C) en comparación con las ratas suministradas con suero salino y alimentadas *ad libitum*, pero no con respecto a las *pair-fed*. No se observaron diferencias en los niveles de colesterol total en los tejidos entre ratas de diferentes tratamientos (resultados no mostrados).

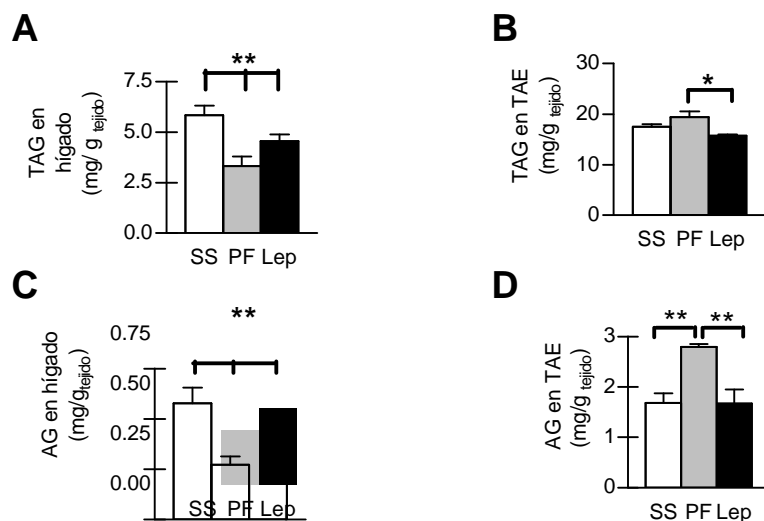


Figura 22. La leptina central ejerce efectos anti-esteatóticos sobre el hígado y el TAE.

SS: suero salino; PF: *pair-fed*; Lep: leptina. Se presenta la media de 10 – 16 animales \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.01).

4.3.2 Expresión génica de enzimas del metabolismo lipídico en el hígado y el TAE

Con el objetivo de determinar si los cambios en el contenido de grasas de ambos tejidos podrían correlacionarse con la expresión de genes, se determinaron los niveles de mRNA de enzimas involucradas en el control de los niveles intracelulares de AG en el hígado y el TAE. De esta forma, en ambos tejidos se estudió la expresión de factores de transcripción involucrados en la acumulación (SREBP-1c, CHREBP, PPAR α) y oxidación (PPAR α , PGC-1 α) de lípidos, así como de enzimas de la vía de la síntesis de novo y desaturación de ácidos grasos (ACC, FAS, SCD-1 y D6D), de la captura celular de AG (FAT/CD36) y de su oxidación mitocondrial (CPT-1, MCD). Además, en el TAE se analizó la expresión de la enzima implicada en la gliceroneogénesis (PEPCK), así como de las involucradas en los procesos de lipólisis/esterificación (ATGL, HSL y DAGT-1).

Tabla 6. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el hígado

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Gen	SS	PF	Leptina
A <u>Factor de transcripción lipogénico</u>			
SREBP-1c	1.0 \pm 0.4 ^a	6.4 \pm 0.7 ^b	1.1 \pm 0.3 ^a
B <u>Factores de transcripción de la oxidación de lípidos</u>			
PGC-1 α	1.00 \pm 0.05 ^a	0.5 \pm 0.4 ^b	2.0 \pm 0.7 ^c
PPAR α	1.0 \pm 0.2 ^a	3 \pm 1 ^b	7 \pm 1 ^c
C <u>Síntesis <i>de novo</i> y desaturación de ácidos grasos</u>			
ACC α	1.00 \pm 0.07 ^a	23.2 \pm 0.6 ^b	2.6 \pm 0.6 ^c
FAS	1.0 \pm 0.1 ^a	12 \pm 2 ^b	0.4 \pm 0.1 ^c
SCD-1	1.0 \pm 0.2 ^a	169 \pm 60 ^b	0.5 \pm 0.5 ^a
D6D	1.0 \pm 0.4 ^a	23 \pm 2 ^b	12.8 \pm 0.5 ^c
D <u>Captura y β-oxidación de ácidos grasos</u>			
FAT/CD36	1.0 \pm 0.2 ^a	0.6 \pm 0.2 ^a	2.3 \pm 0.2 ^b
CPT-1a	1.00 \pm 0.08 ^a	1.39 \pm 0.09 ^b	3.1 \pm 0.5 ^c
MCD	1.0 \pm 0.2 ^a	1.9 \pm 0.5 ^a	1.9 \pm 0.5 ^a

Tabla 7. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el TAE

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Gen	SS	PF	Leptina
A	<u>Factores de transcripción lipogénicos/adipogénicos</u>		
SREBP-1c	1.0 \pm 0.1 ^a	1.2 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.3 ^a
CHREBP	1.00 \pm 0.07 ^a	2.2 \pm 0.3 ^b	1.1 \pm 0.2 ^a
PPAR γ	1.0 \pm 0.1 ^a	1.7 \pm 0.1 ^b	2.6 \pm 0.3 ^c
B	<u>Factores de transcripción de la oxidación de lípidos</u>		
PGC-1 α	1.00 \pm 0.09 ^a	2.08 \pm 0.08 ^b	4.0 \pm 0.8 ^c
PPAR γ	1.00 \pm 0.05 ^a	1.9 \pm 0.3 ^b	1.18 \pm 0.05 ^a
C	<u>Síntesis <i>de novo</i> y desaturación de ácidos grasos</u>		
ACC	1.0 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.7 ^b	1.3 \pm 0.3 ^a
FAS	1.0 \pm 0.8 ^a	4 \pm 1 ^b	0.4 \pm 0.2 ^a
SCD-1	1.00 \pm 0.04 ^a	4.1 \pm 0.4 ^b	0.32 \pm 0.04 ^c
D6D	1.0 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.5 ^b	0.9 \pm 0.3 ^a
D	<u>Gliceroneogenesis</u>		
PEPCK-c	1.0 \pm 0.2 ^a	1.4 \pm 0.1 ^b	1.03 \pm 0.08 ^a
E	<u>Captura y β-oxidación de ácidos grasos</u>		
FAT/CD36	1.0 \pm 0.2 ^a	0.98 \pm 0.09 ^a	1.05 \pm 0.03 ^a
CPT-1b	1.00 \pm 0.06 ^a	2.8 \pm 0.3 ^b	5 \pm 1 ^c
MCD	1.00 \pm 0.05 ^a	1.6 \pm 0.1 ^b	2.9 \pm 0.2 ^c
F	<u>Lipolisis/ esterificación</u>		
ATGL	1.00 \pm 0.05 ^a	1.3 \pm 0.1 ^b	1.91 \pm 0.09 ^c
HSL	1.00 \pm 0.07 ^a	2.6 \pm 0.3 ^b	2.8 \pm 0.7 ^b
DAGT-1	1.00 \pm 0.08 ^a	1.5 \pm 0.2 ^b	2.5 \pm 0.2 ^c

4.3.2.1 Expresión de los factores de transcripción del metabolismo lipídico en el hígado y en el TAE

La expresión génica de los factores de transcripción pro- (SREBP-1c, CHREBP, PPAR γ) y anti-lipogénicos (PPAR γ y PGC-1 α) en el hígado y el TAE se presenta en las Tablas 6A y 7A, respectivamente. El PPAR γ se expresa fundamentalmente en el TAE, donde juega un papel central en la adipogénesis (Tontonoz y col., 1994). Este hecho, unido a los bajos niveles de

expresión del PPAR α en el hígado, condicionó que nuestros estudios sobre este factor de transcripción se centraran en el TAE.

Los niveles del mRNA de SREBP-1c aumentaron después del *pair-feeding* y fueron reprimidos por la leptina *i.c.v.* en el hígado. El mismo perfil se obtuvo para CHREBP en el TAE, sin observarse variaciones en SREBP-1c. Además, en el TAE el *pair-feeding* aumentó la expresión génica del PPAR α en comparación con animales controles alimentados *ad libitum*, y sorprendentemente, la leptina potenció aún más este efecto (Tabla 7A).

Por otro lado, el *pair-feeding* aumentó los niveles del mRNA de PGC-1 α en el TAE (Tabla 7B), pero no en el hígado (Tabla 6B), en comparación con los animales controles alimentados *ad libitum*. La leptina aumentó la expresión de este co-activador involucrado en la expresión de genes de la oxidación de los AG en ambos tejidos. Sin embargo, aunque la leptina potenció el efecto activador del *pair-feeding* sobre el PPAR α en el hígado (Tabla 6B), lo inhibió en el TAE (Tabla 7B), sugiriendo que en las ratas tratadas con leptina, el hígado juega un papel más importante que el TAE en la oxidación de las grasas.

4.3.2.2 Síntesis de novo de AG en el hígado y en el TAE, y gliceroneogénesis en el TAE

De acuerdo a los cambios en la expresión de SREBP-1c en el hígado (Tabla 6A), el *pair-feeding* potenció la expresión génica de ACC, FAS, SCD-1 y D6D en este tejido en comparación con el grupo de ratas alimentadas *ad libitum*, y la leptina bloqueó este efecto (Tabla 6C), sugiriendo una disminución de la síntesis *de novo* de AG en los animales tratados con leptina.

Sin embargo, en el TAE, la inducción de los genes de las enzimas lipogénicas por el *pair-feeding*, y su inhibición por la leptina (Tabla 7C), tiene lugar sin cambios en la expresión de SREBP-1c (Tabla 7A). Estos resultados sugieren que en el TAE, a diferencia del hígado, los efectos de la leptina reprimiendo la síntesis *de novo* de AG, parecen no estar mediados por SREBP-1c. Además, la inducción de los genes lipogénicos por el *pair-feeding* que se observó en el hígado (Tabla 6C) fue en casi todos los casos en uno o dos órdenes de magnitud superior a la del TAE (Tabla 7C), resaltando el ya conocido mayor poder lipogénico del hígado. Además, en el TAE con el *pair-feeding* también se incrementó la expresión de la enzima PEPCCK (Tabla 7D), involucrada fundamentalmente en la gliceroneogénesis en este tejido. Sin embargo, la leptina central bloqueó este efecto.

4.3.2.3 Lipolisis y esterificación en el TAE

La enzima DAGT-1 cataliza el paso final de la síntesis de TAG. Aunque los mecanismos que regulan la expresión de esta enzima se conocen muy poco (Meegalla y col., 2002), se ha observado que los procesos de re-esterificación en los adipocitos aumentan en situaciones de lipolisis incrementada, creándose un ciclo fútil que consume ATP (Brooks y col., 1982).

Por otro lado, la ATGL es una lipasa específica de TAG, y su expresión es regulada fundamentalmente por PPAR α (Kim y col., 2006). En concordancia con los efectos del *pair-feeding* y de la leptina sobre la expresión de este factor de transcripción adipogénico (Tabla 7A), el *pair-feeding* incrementó los niveles de mRNA de ATGL y DAGT-1, comparado con el grupo de animales alimentados *ad libitum*, y la leptina potenció este efecto (Tabla 7F). Esto, unido con una mayor expresión de la HSL en los animales tratados con leptina (Tabla 7F), sugieren una mayor lipólisis en estos animales.

4.3.2.4 Captura y oxidación mitocondrial de AG en el hígado y en el TAE

La leptina por vía *i.c.v.*, en comparación con las ratas tratadas con suero salino, incrementó la expresión del mRNA del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 en el hígado (Tabla 6D), pero no en el TAE (Tabla 7E), indicando una mayor captura de AG en el hígado luego del tratamiento con leptina.

Por otro lado, los efectos estimuladores del *pair-feeding* y la leptina sobre la expresión de los factores de transcripción PPAR α y PGC-1 α (Tablas 6B y 7B), se reflejan en el aumento de los niveles de mRNA de CPT-1 (Tablas 6D y 7E), la enzima encargada de transportar los AG hacia la matriz mitocondrial para su β -oxidación, y de la MCD (Tablas 6D y 7E), la cual degrada el malonil-CoA, desreprimiendo la actividad de CPT-1. Estos resultados constituyen evidencias de una mayor β -oxidación de AG, sobre todo en el hígado, en las ratas tratadas con leptina, en comparación con animales de ingesta similar.

4.3.3 Perfil de AG de los TAG en el hígado y el TAE

Como se observó en la Tabla 7C, el tratamiento con leptina disminuyó la expresión génica de SCD-1 y D6D en el hígado y el TAE. Con el objetivo de determinar si estos cambios en expresión de las desaturasas se reflejaban en el perfil de AG de los TAG en ambos tejidos, se extrajeron las grasas de ambos tejidos, y por cromatografía de gases se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de la composición de AG de la fracción de TAG.

En el hígado el tratamiento con leptina incrementó la proporción de palmítico y esteárico, y disminuyó la de oleico, reduciendo consecuentemente el índice de la SCD-1 (Tabla 8), en comparación con el *pair-feeding*. Adicionalmente, aunque en este tejido se incrementó la proporción de linoléico, el sustrato de la D6D, el índice de esta enzima no sufrió cambios, ya que también aumentó la proporción de ácido araquidónico (Tabla 8).

Por otro lado, 7 días de tratamiento *i.c.v.* con leptina no afectaron la abundancia relativa de AG en los TAG en el tejido adiposo (Tabla 8), en concordancia con el menor poder lipogénico de este tejido en comparación con el hígado.

Tabla 8. La leptina central altera la abundancia relativa de AG en los TAG del hígado, pero no del TAE

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. AG%: abundancia relativa de los distintos ácidos grasos. Se presenta la media de 6 – 8 animales \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

AG (%)	Hígado			TAE		
	SS	Leptina	PF	SS	Leptina	PF
14:0	0.60 \pm 0.03 ^a	0.60 \pm 0.03 ^a	1.0 \pm 0.1 ^b	1.40 \pm 0.05 ^a	1.40 \pm 0.04 ^a	1.50 \pm 0.05 ^a
16:0	38 \pm 1 ^a	40 \pm 2 ^a	27 \pm 2 ^b	24.7 \pm 0.3 ^a	25.2 \pm 0.5 ^a	25.9 \pm 0.6 ^a
16:1	3.3 \pm 0.3 ^a	2.4 \pm 0.1 ^a	4.2 \pm 0.8 ^a	6.7 \pm 0.2 ^a	5.8 \pm 0.5 ^a	7.4 \pm 0.5 ^a
18:0	5.6 \pm 0.7 ^a	8 \pm 1 ^b	3.7 \pm 0.2 ^a	2.70 \pm 0.07 ^a	2.8 \pm 0.1 ^a	2.60 \pm 0.09 ^a
18:1	20.6 \pm 0.7 ^a	16.9 \pm 0.3 ^a	39 \pm 2 ^b	30.2 \pm 0.4 ^a	29.7 \pm 0.2 ^a	30.0 \pm 0.3 ^a
18:2	28.6 \pm 0.8 ^a	31 \pm 2 ^a	19 \pm 2 ^b	31.7 \pm 0.6 ^a	33 \pm 1 ^a	29 \pm 1 ^a
18:3	1.2 \pm 0.1 ^a	1.1 \pm 0.1 ^a	0.7 \pm 0.1 ^a	1.40 \pm 0.05 ^a	1.40 \pm 0.04 ^a	1.50 \pm 0.04 ^a
20:1	0.26 \pm 0.03 ^a	0.28 \pm 0.02 ^a	0.5 \pm 0.2 ^b	0.20 \pm 0.01 ^a	0.20 \pm 0.02 ^a	0.19 \pm 0.01 ^a
20:4	7.3 \pm 0.9 ^a	7 \pm 1 ^a	4.6 \pm 0.8 ^b	1.00 \pm 0.07 ^a	0.90 \pm 0.01 ^a	0.9 \pm 0.1 ^a
(16:1/16:0)x100 Índice Scd-1	10 \pm 2 ^{a,b}	6.0 \pm 0.5 ^a	16 \pm 3 ^b	26 \pm 1 ^a	24 \pm 2 ^a	29 \pm 1 ^a
(20:4/18:2)x100 Índice D6D	26 \pm 6 ^a	22 \pm 2 ^a	26 \pm 6 ^a	3.3 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.2 ^a	3.2 \pm 0.4 ^a

4.4 Efectos de la leptina central sobre el metabolismo de los esfingolípidos en el TAE

Estudios recientes han demostrado que existe una relación entre la acumulación de ceramida, la lipotoxicidad y la resistencia a insulina en tejidos no-adiposos. La hiperleptinemia inducida por adenovirus inhibe la síntesis *de novo* de ceramida (Shimabukuro y col., 1998; Lee y col., 2004) e incrementa la sensibilidad a insulina en estos tejidos (Minokoshi y col., 1999). Sin embargo, los efectos de la leptina sobre el metabolismo de las ceramidas en el tejido adiposo no han sido estudiados. Con el objetivo de determinar si los niveles de ceramida total cambian en el TAE luego de una infusión *i.c.v.* con leptina, nos propusimos cuantificar las ceramidas endógenas en extractos clorofórmicos de dicho tejido.

4.4.1 Producción de ceramida por síntesis *de novo* o degradación de esfingomielina

Análisis iniciales por espectrometría de masas de extractos lipídicos totales crudos del TAE mostraron que los acilglicéridos, que constituyen más del 90% del contenido lipídico de este tejido, estaban interfiriendo con el análisis de la mezcla suprimiendo la señal (Fig. 23A). Sin embargo, por espectrometría de masas en tándem en el extracto lipídico crudo era posible identificar las ceramidas a través de la presencia de fragmentos procedentes de la base esfingoide de 18 átomos de carbono con m/z 252.27, 264.27 y 282.27 (Figs. 14 y 23B).

La cuantificación arrojó un contenido de ceramidas en el TAE de las ratas controles alimentadas *ad libitum* de 28 ± 6 pmol por mg de tejido, de las cuales las más abundantes fueron Cer24:0, 16:0 y 24:1, constituyendo el 31, 34 y 21 % del total, respectivamente (Tabla 9). Aunque en las ratas tratadas con leptina se observó una tendencia a disminuir el contenido total de ceramidas y a alterar la abundancia relativa de las mismas en el TAE, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos debido a la elevada desviación estándar de los datos. Para evitar la supresión de la señal y permitir un análisis cualitativo y cuantitativo fiable de las ceramidas en extractos lipídicos totales de TAE, los acilglicéridos fueron eliminados de dichos extractos por una purificación por TLC, cuyo esquema se muestra en el inserto de la Figura 24A.

Un espectro TOF de barrido total obtenido por infusión directa de los extractos lipídicos de TAE purificados por TLC se muestra en la Figura 24A, donde se observa que los acilglicéridos ya han sido eliminados. De todos modos, la presencia de una gran cantidad de señales de fondo debido al ruido químico y a la existencia de otras clases de lípidos en la región de m/z de las ceramidas, unido a la escasa abundancia de ceramidas en los tejidos de los mamíferos, imposibilita el reconocimiento de las distintas especies de ceramida en el barrido total. Sin embargo, los fragmentos específicos de ceramida con m/z 252.27, 264.27 y 282.27 (Fig. 14) se observan en los espectros MS/MS con una intensidad de señal 10 veces superior a la obtenida con el extracto lipídico crudo, como se muestra en la Figura 24B para una de las seis ceramidas naturales detectadas en el TAE de la rata Wistar (Tabla 4).

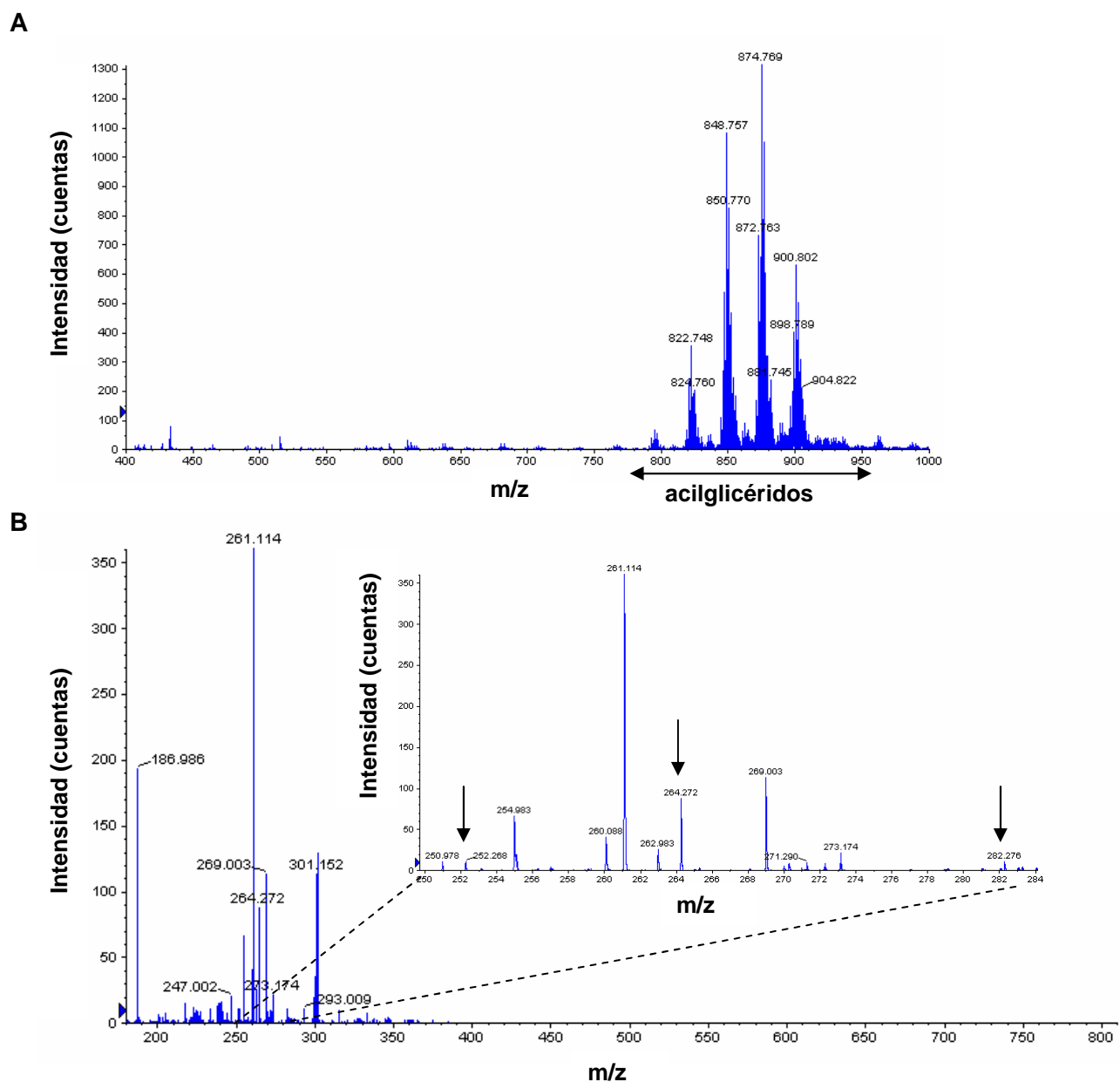


Figura 23. (A) Espectro de masas TOF representativo en modo positivo de un extracto lipídico crudo de TAE. (B) Espectro de masas en tándem representativo de Cer16:0 (m/z 538.6) de un extracto lipídico crudo de TAE.

(A) La región de m/z correspondiente a los acilglicéridos está indicada con una flecha. (B) Los fragmentos específicos de ceramida de m/z 252.27, 264.27, 282.27 empleados para la cuantificación se indican con flechas en el inserto.

Tabla 9. Cambios en los niveles de ceramidas en un extracto lipídico crudo de TAE luego de un tratamiento i.c.v con leptina.

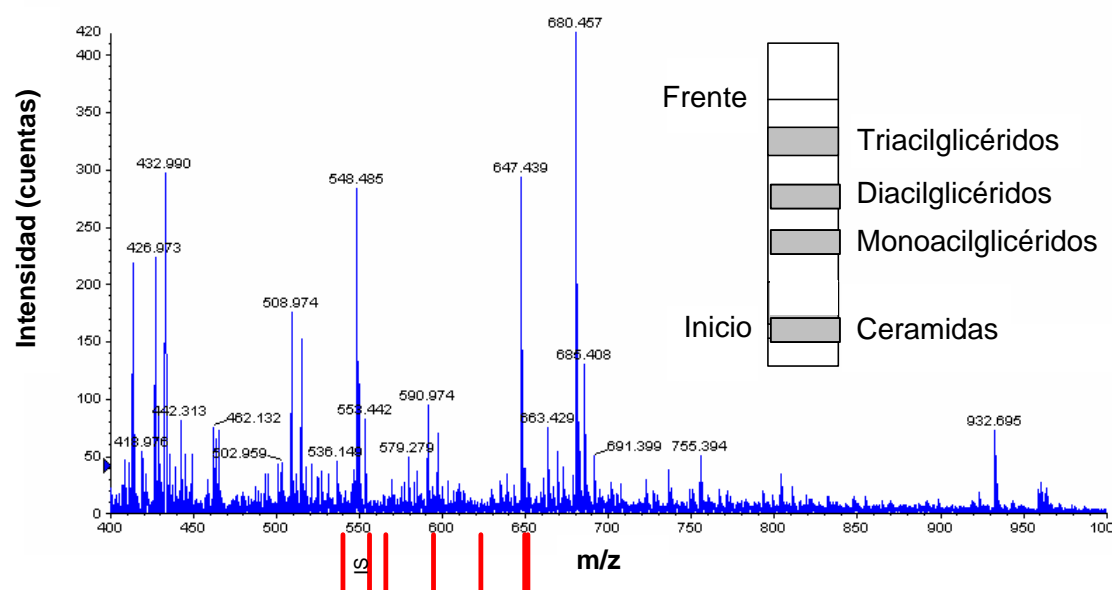
SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Las ceramidas se cuantificaron por espectrometría de masas en modo positivo usando Cer17:0 como patrón interno. Las especies de ceramida están designadas por # átomos de carbono: #dobles enlaces. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo # SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Especie de ceramida	SS		PF		Leptina	
	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)
16:0	34 ± 2 ^a	28 ± 6 ^a	36.7 ± 0.9 ^{a,b}	29 ± 4 ^a	39.1 ± 0.9 ^b	23 ± 2 ^a
18:0	3.0 ± 0.5 ^a		2.4 ± 0.2 ^a		2.8 ± 0.2 ^a	
20:0	3.4 ± 0.6 ^a		2.7 ± 0.6 ^a		2.8 ± 0.3 ^a	
22:0	7.0 ± 0.7 ^a		6.5 ± 0.6 ^a		6.3 ± 0.4 ^a	
24:1	21.5 ± 0.9 ^a		22.0 ± 0.7 ^a		22.0 ± 0.7 ^a	
24:0	31 ± 2 ^a		30 ± 1 ^a		27 ± 1 ^a	

La cuantificación del contenido de ceramida total en los extractos lipídicos purificados por TLC del TAE de las ratas controles tratadas con suero salino vía i.c.v. y alimentadas *ad libitum*, fue aproximadamente 36 pmol/mg de tejido, de las cuales las más abundantes fueron Cer24:0, Cer16:0 y Cer24:1, representando del total el 39, 28 y 21 %, respectivamente (Tabla 10). Luego de un tratamiento central con leptina, el contenido de ceramida total resultó ser de 26 pmol/mg de tejido, lo que supone una disminución del 34%, y la abundancia relativa de Cer24:0 disminuyó de 39 a 30%, en comparación con ratas controles (Tabla 10). Estos resultados coinciden con los obtenidos con extractos crudos (Tabla 9), indicando que la purificación por TLC no distorsiona los resultados y es un método adecuado para la purificación de extractos lipídicos en los que se quiera cuantificar ceramidas.

En los mamíferos las ceramidas se forman principalmente por síntesis *de novo*, por lo cual analizamos la expresión génica de la SPT, la enzima que cataliza el paso limitante de esta vía, así como de las tres isoformas de ceramida sintasa detectadas por nosotros por primera vez en el tejido adiposo (LASS2, 4 y 6) (Anexo I). En ratón LASS2 y 4 son específicas de AG de cadena larga, como 22:0 y 24:0, mientras que LASS6 es específica de AG de cadena corta (16:0 y 14:0) (Mizutani y col., 2005).

A



B

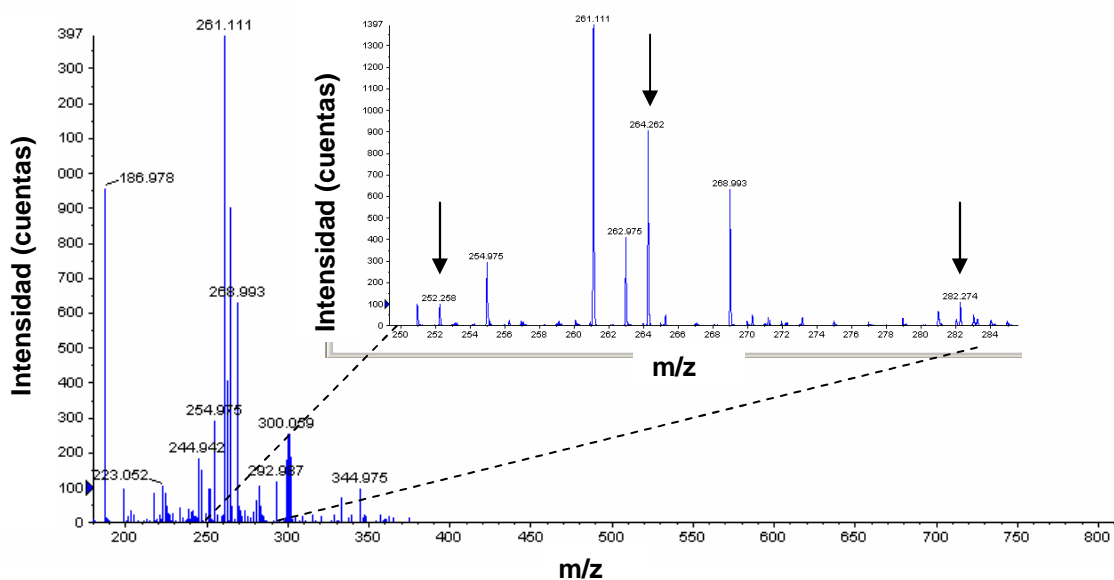


Figura 24. (A) Espectro de masas TOF representativo en modo positivo de un extracto lipídico de TAE purificado por TLC. (B) Espectro de masas en tándem representativo en modo positivo de Cer16:0 (m/z 538.6) de un extracto lipídico de TAE purificado por TLC.

(A) Se presenta un esquema del resultado de la TLC. La m/z correspondiente a las ceramidas detectadas en el TAE (Tabla 4) está indicada con líneas rojas. (B) Los fragmentos específicos de ceramida de m/z 252.27, 264.27, 282.27 empleados para la cuantificación se indican con flechas en el inserto.

Tabla 10. Cambios en los niveles de ceramidas en un extracto lipídico purificado por TLC de TAE luego de un tratamiento i.c.v con leptina.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Las ceramidas se cuantificaron por espectrometría de masas en modo positivo usando Cer17:0 como patrón interno a partir de un extracto lipídico de TAE purificado por TLC. Las especies de ceramida están designadas por ?átomos de carbono:?dobles enlaces. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo ? SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Especie de ceramida	SS		PF		Leptina	
	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg de tejido)
16:0	28 ± 1 ^a	36 ± 3 ^a	33.5 ± 0.7 ^b	36 ± 3 ^a	34.8 ± 0.4 ^b	26 ± 2 ^b
18:0	2.9 ± 0.5 ^a		2.7 ± 0.3 ^a		3.0 ± 0.3 ^a	
20:0	2.3 ± 0.2 ^a		2.7 ± 0.4 ^a		2.8 ± 0.2 ^a	
22:0	7.4 ± 0.4 ^a		6.5 ± 0.3 ^a		6.6 ± 0.3 ^a	
24:1	21.0 ± 0.7 ^a		20 ± 1 ^a		21.3 ± 0.6 ^a	
24:0	39 ± 2 ^a		36 ± 2 ^a		30 ± 1 ^b	

La infusión central de leptina, además de disminuir la disponibilidad de AG empleados para la síntesis *de novo* de ceramidas en el TAE (Figs. 21 y 22), reprimió la expresión génica de SPT en un 29% en comparación con el *pair-feeding* (Tabla 11A). También disminuyeron los niveles del mRNA de LASS2 y LASS4 en un 57 y 31%, respectivamente, comparados con los animales *pair-fed*, mientras que la expresión de LASS6 no sufrió cambios (Tabla 11A). Estos resultados están en concordancia con el cambio en el perfil de las ceramidas del TAE, en las cuales se produce un trasvase hacia las especies más cortas (Tabla 10).

Las ceramidas también se generan vía degradación de esfingomielina por las esfingomielinasas ácida (SMPD-1) y/o neutra (SMPD-2). El tratamiento con leptina central inhibió la expresión de SMPD-1 y SMPD-2 en un 57 y 44%, respectivamente, en comparación con el *pair-feeding* (Tabla 11B). Estos resultados sugieren una disminución en la producción de ceramida a partir de esfingomielina en el tejido adiposo epididimal luego del tratamiento central con leptina.

Tabla 11. Efecto de la leptina central sobre la expresión de genes del metabolismo de los esfingolípidos en el TAE

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Gen	SS	PF	Leptina
A <u>Síntesis <i>de novo</i> de ceramida</u>			
SPT1	1.0 \pm 0.1 ^a	1.7 \pm 0.2 ^b	1.2 \pm 0.1 ^a
Lass2	1.0 \pm 0.1 ^a	1.4 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^c
Lass4	1.00 \pm 0.08 ^a	1.6 \pm 0.1 ^b	1.13 \pm 0.09 ^a
Lass6	1.0 \pm 0.1 ^a	1.17 \pm 0.09 ^a	1.17 \pm 0.07 ^a
B <u>Degradación de SM</u>			
SMPD1	1.0 \pm 0.2 ^a	2.2 \pm 0.3 ^b	0.86 \pm 0.05 ^a
SMPD2	1.0 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.1 ^b	0.9 \pm 0.1 ^a
C <u>Síntesis de SM</u>			
SMS	1.00 \pm 0.07 ^a	2.6 \pm 0.1 ^b	1.6 \pm 0.1 ^c

4.4.2 Contenido de ceramida en Golgi

La enzima esfingomielina sintasa (SMS) cataliza la producción de esfingomielina (SM) a partir de ceramida en el aparato de Golgi. Según nuestros resultados, el contenido de ceramida total en Golgi es de 1.58 ± 0.08 pmol/ μ g de proteína, siendo la más abundante la Cer16:0, que representa el 33 % del total (Tabla 12). Además, a diferencia de lo observado en el extracto total de TAE (Tabla 10), en Golgi (Tabla 12) la especie de ceramida más abundante es la Cer16:0 (33%), seguida de las ceramidas de cadena larga Cer24:1 y Cer24:0, que representan aproximadamente un 27% cada una de ellas.

El tratamiento i.c.v. con leptina, en comparación con los animales *pair-fed*, redujo el contenido de ceramida total en Golgi a 1 pmol/ μ g de proteína, que representa una disminución de un 48%, y desplazó el perfil de las mismas hacia especies de cadena más corta. Estos resultados están en concordancia con los cambios provocados por la leptina sobre la expresión de la SCD-1 (Tabla 7C) y de las isoformas de LASS en el TAE (Tabla 11A).

Tabla 12. La leptina central reduce los niveles totales de ceramida y altera el perfil de los AG componentes de las ceramidas en el Golgi del TAE.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Las ceramidas se cuantificaron por espectrometría de masas en tándem en modo positivo usando Cer17:0 como patrón interno. Las especies de ceramida están designadas por #átomos de carbono:#dobles enlaces. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo ± SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Especie de ceramida	SS		PF		Leptina	
	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/# g proteína)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/# g proteína)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/# g proteína)
16:0	33.5 ± 0.8 ^a	1.58 ± 0.08 ^a	34.8 ± 0.8 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	37.8 ± 0.7 ^b	1.0 ± 0.1 ^b
18:0	3.93 ± 0.08 ^a		3.8 ± 0.1 ^a		3.8 ± 0.1 ^a	
20:0	4.1 ± 0.1 ^a		3.7 ± 0.2 ^a		3.4 ± 0.2 ^a	
22:0	6.7 ± 0.2 ^a		6.3 ± 0.2 ^a		6.8 ± 0.2 ^a	
24:1	27.6 ± 0.2 ^a		27.4 ± 0.4 ^a		25.7 ± 0.2 ^b	
24:0	26.6 ± 0.5 ^a		24.0 ± 0.7 ^a		23.6 ± 0.4 ^a	

4.4.3 Síntesis de esfingomielina y composición lipídica de la membrana plasmática

La disminución de los niveles de ceramida en Golgi, junto con una menor expresión del gen de SMS (Tabla 11C) en el TAE de ratas tratadas con leptina sugiere una menor síntesis de SM en este tejido. Para confirmar esta hipótesis se determinó el nivel de SM en la membrana plasmática, que es el compartimento subcelular con la mayor concentración de este lípido (Warnock y col., 1993).

La composición lipídica parcial de la MP del TAE de las ratas controles se muestra en la Tabla 13. En este compartimento subcelular, los niveles de SM total fueron de 374±16 pmol/#g de proteína, siendo la más abundante la SM16:0 (46 %). Este último resultado concuerda con la preferencia de sustrato de CERT, la proteína encargada de transportar las ceramidas del RE a Golgi para la síntesis de SM (Kumagai y col., 2005).

El contenido de colesterol libre en la MP fue similar al de SM, de acuerdo a lo descrito en la literatura, de que la SM y el colesterol libre en las membranas se encuentran en cantidades similares (Brown, 1998; Ridgway, 2000). Por otro lado, el contenido total de ceramida (9.5±0.6 pmol/#g de proteína) fue 40 veces inferior al de SM o colesterol libre, siendo la especie de ceramida más abundante la Cer16:0, representando el 32 % del total de ceramida. Finalmente, el contenido total de PC (741±21 pmol/#g de proteína), uno de los fosfolípidos más abundantes de la

MP, fue aproximadamente el doble que el de SM o colesterol libre, siendo la PC más abundante la PC34:2.

De acuerdo a nuestra hipótesis de una síntesis de SM reducida en las ratas tratadas con leptina, el contenido de SM en la MP disminuyó significativamente en comparación con los animales *pair-fed*. Además, se incrementó la abundancia relativa de la SM16:0, aunque este último cambio no fue estadísticamente significativo (Tabla 13). Aunque los niveles de ceramida total en la MP no variaron luego del tratamiento con leptina, de acuerdo con los cambios de expresión de las LASS (Tabla 11A), el perfil de las ceramidas se desplazó hacia especies de cadena corta, incrementándose la abundancia relativa de la Cer16:0 y disminuyendo la de la Cer24:0 (Tabla 13). Adicionalmente, la leptina redujo el contenido de colesterol libre en la MP. Aunque los niveles de fosfatidilcolina total (PC) no sufrieron cambios (Tabla 13), disminuyó la abundancia relativa de las especies de PC con una, tres o cinco insaturaciones, como PC32:1, PC34:1, PC36:1, PC34:3 y PC38:5, y aumentó la abundancia relativa de las PC con cero, dos o cuatro insaturaciones, como PC34:0, PC34:2, PC36:2 y PC38:4, reflejando la reducción de la expresión de SCD-1 y D6D provocada por la leptina (Tabla 7C).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la leptina, actuando solamente vía SNC, altera la composición lipídica de la MP del TAE, reduciendo los niveles de SM y colesterol libre, los dos componentes fundamentales de los *lipid rafts*.

Tabla 13. La leptina central altera la composición lipídica de la MP del TAE.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Las esfingomielinas, ceramidas, fosfatidilcolinas y el colesterol libre se cuantificaron por espectrometría de masas en tándem en modo positivo usando SM35:1;2, Cer17:0, PC36:6 y D6-Col como patrones internos. Las especies de SM están designadas por ? átomos de carbono en el grupo N-acil: ? dobles enlaces; ? grupos hidroxilo, excepto en SM41:2;2 y SM41:1;2, donde se representa ? átomos de carbono: ? dobles enlaces; ? grupos hidroxilo. Las especies de Cer están designadas por ? átomos de carbono: ? dobles enlaces. Las especies de PC están designadas por ? átomos de carbono: ? dobles enlaces en ambas cadenas de ácidos grasos. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo ? SEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (p?0.05).

	Especie	Ceramidas						Esfingomielinas								
		16:0	18:0	20:0	22:0	24:1	24:0	16:0	16:1	18:0	18:1	22:1	41:1;2	41:2;2	24:0	24:1
SS	Contenido total (pmol/? g prot)	9.5 ± 0.6 ^a						374 ± 16 ^a								
	Abundancia relativa (%)	31.8± 0.8 ^a	3.63± 0.08 ^a	3.62± 0.09 ^a	6.7± 0.1 ^a	29.5± 0.4 ^a	24.9 ±0.6 ^a	45.8± 0.9 ^a	3.82± 0.07 ^a	9.2± 0.3 ^a	1.78± 0.07 ^a	3.5± 0.4 ^a	5.0± 0.3 ^a	3.4± 0.1 ^a	10.3± 0.4 ^a	14.2± 0.6 ^a
PF	Contenido total (pmol/? g prot)	11.4 ± 0.8 ^a						421 ± 19 ^a								
	Abundancia relativa (%)	33± 1 ^a	3.51± 0.06 ^a	3.6± 0.2 ^a	6.4± 0.2 ^a	29.8± 0.4 ^a	24.1 ±0.5 ^a	46±1 a,b	3.5± 0.1 ^{a,b}	9.9± 0.4 ^a	1.6± 0.2 ^a	2.5± 0.1 ^b	4.4± 0.1 ^a	2.4± 0.1 ^b	10.5± 0.3 ^a	14.0± 0.6 ^a
Lep	Contenido total (pmol/? g prot)	10.7 ± 0.6 ^a						321 ± 11 ^b								
	Abundancia relativa (%)	35.3± 0.4 ^b	3.48± 0.06 ^a	3.0± 0.1 ^a	6.6± 0.1 ^a	29.0± 0.2 ^a	22.3 ±0.3 ^b	49±1 b	3.37± 0.08 ^b	9.3± 0.3 ^a	1.4± 0.1 ^a	2.37± 0.09 ^b	4.6± 0.2 ^a	2.3± 0.2 ^b	10.2± 0.4 ^a	13.8± 0.3 ^a
		Fosfatidilcolinas														
	Especie	30:0	32:1	32:0	34:3	34:2	34:1	34:0	36:4	36:3	36:2	36:1	36:0	38:6	38:5	38:4
SS	Contenido total (pmol/? g prot)	741 ± 21 ^a														
	Abundancia relativa (%)	0.6± 0.2 ^a	2.7± 0.2 ^a	10.6± 0.2 ^a	0.99± 0.04 ^a	18.4± 0.3 ^a	10.9 ±0.2 ^a	1.65± 0.08 ^a	12.6± 0.3 ^a	4.7± 0.2 ^a	14.8± 0.4 ^a	5.0± 0.3 ^a	0.55± 0.05 ^a	1.07± 0.05 ^a	2.45± 0.09 ^a	12.5± 0.4 ^a
PF	Contenido total (pmol/? g prot)	741 ± 29 ^a														
	Abundancia relativa (%)	0.50± 0.02 ^a	3.1± 0.1 ^b	12.3± 0.5 ^b	1.17± 0.04 ^b	17.1± 0.5 ^b	12.0 ±0.1 ^b	1.6± 0.2 ^a	12.7± 0.6 ^a	4.9± 0.1 ^a	13.0± 0.6 ^b	5.2± 0.2 ^a	0.5± 0.1 ^a	1.2± 0.1 ^a	2.9± 0.3 ^b	10.6± 0.4 ^b
Lep	Contenido total (pmol/? g prot)	706 ± 30 ^a														
	Abundancia relativa (%)	0.47± 0.02 ^a	2.3± 0.1 ^a	12.1± 0.5 ^b	0.86± 0.04 ^a	18.4± 0.5 ^a	11.0 ±0.2 ^a	2.3± 0.2 ^b	12.7± 0.6 ^a	4.6± 0.2 ^a	15.2± 0.6 ^a	4.6± 0.2 ^b	0.6± 0.1 ^a	1.04± 0.07 ^a	2.4± 0.2 ^a	12.3± 0.6 ^a
		SS			PF			Lep								
	Colesterol libre (pmol/? g prot)	374 ± 19 ^a			435 ± 10 ^b			358 ± 4 ^a								

4.5 Efecto de la leptina central sobre la maduración de SREBP-1c en el TAE

Las enzimas lipogénicas ACC, FAS, SCD-1 y D6D son dianas conocidas de la acción de SREBP-1c. Sin embargo, la leptina central reprimió la expresión de estos genes lipogénicos en el TAE (Tabla 7C) sin afectar los niveles de mRNA de SREBP-1c en este tejido (Tabla 7A), sugiriendo que la represión de la lipogénesis en el TAE por la leptina central podría ser independiente de SREBP-1c. No obstante, teniendo en cuenta que la maduración proteolítica de SREBP-1c es un punto importante en la regulación de su actividad como factor de transcripción lipogénico, hemos examinado los cambios en la distribución subcelular de SREBP-1c en este tejido luego de una infusión central con leptina.

Como se muestra en la Figura 25, en los animales tratados con leptina los niveles del precursor inactivo de SREBP-1c (125 kDa) en RE están incrementados, mientras que los de la forma transcripcionalmente madura de SREBP-1c (65 kDa) están disminuidos, en comparación con los animales controles.

INSIG-1 es una proteína integral de membrana de RE que enlaza SCAP, bloqueando de esta forma la translocación de SREBP a Golgi, y por tanto su activación proteolítica y su acción sobre la transcripción génica (Yang y col., 2002). Además, la interacción entre INSIG-1 y SCAP depende de la disponibilidad de colesterol libre en el RE (Brown y col., 2002).

Aunque no se observaron cambios en el contenido de colesterol libre en el RE del TAE luego de un tratamiento con leptina por vía central (Fig. 26), sí se incrementaron los niveles de mRNA de INSIG-1 en este tejido en comparación con las ratas tratadas con suero salino (Fig. 27). Por tanto, parece ser que la leptina actuando vía central reduce la síntesis *de novo* de AG en el TAE, por lo menos en parte, a través de la inhibición de la maduración proteolítica de SREBP-1c en este tejido, gracias a la inducción de INSIG-1.

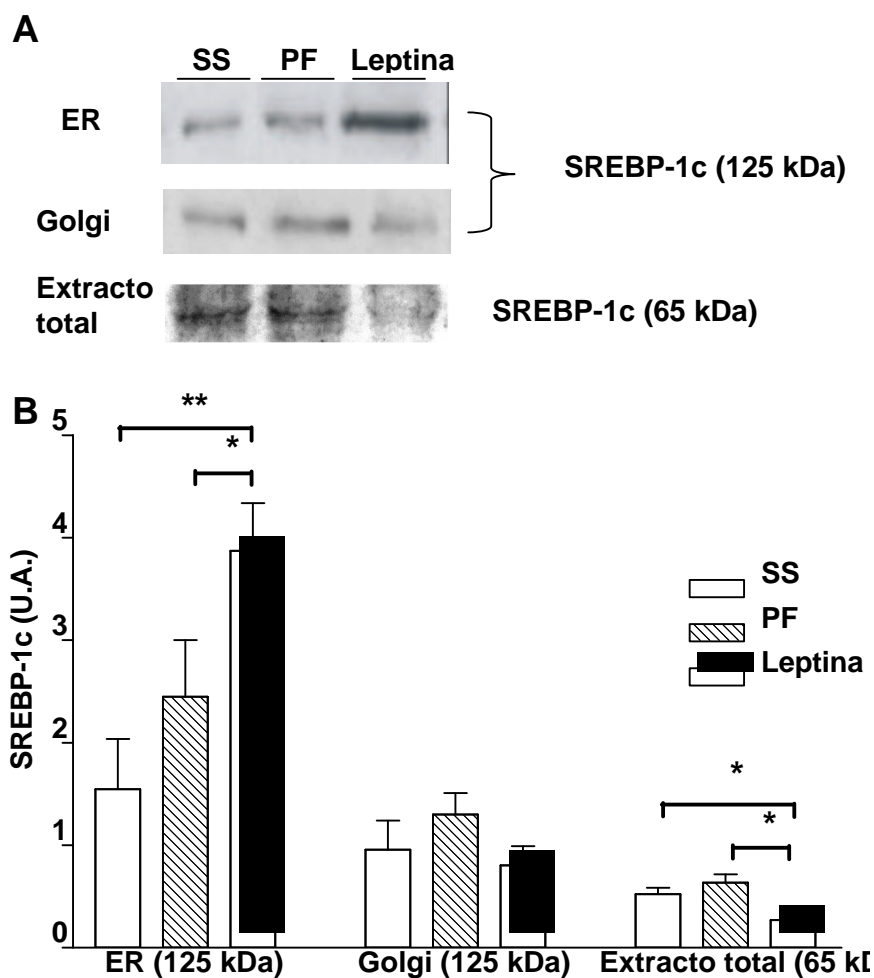


Figura 25. La leptina central inhibe la maduración de SREBP-1c en el TAE.

(A) *Western blot* representativo del precursor inactivo de SREBP-1c (125 kDa) en 40 μ g de RE o Golgi, así como de la forma transcricionalmente madura de SREBP-1c (65 kDa) en 70 μ g de extracto total de TAE, luego de un tratamiento *i.c.v.* de leptina o suero salino (SS) durante 7 días. SS: suero salino, PF: *pair-fed*. (B) Se presenta la media del análisis densitométrico de 4 animales por grupo \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01).

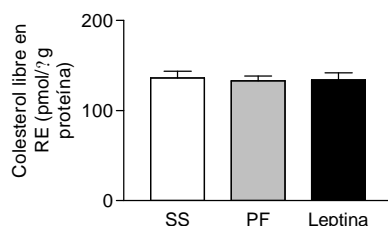


Figura 26. La leptina central no afecta el contenido de colesterol libre en el RE del TAE.

SS: suero salino, PF: *pair-fed*. El colesterol libre se cuantificó por espectrometría de masas en modo positivo usando D6-Col como patrón interno. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo \pm SEM (p >0.05).

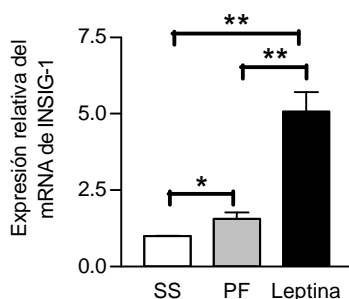


Figura 27. La leptina central induce la expresión de INSIG-1 en el TAE.

La expresión del mRNA de INSIG-1 se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.6 Efectos de la leptina central sobre la capacidad de respuesta a un estímulo agudo de insulina *in vivo* en el TAE

Como hemos visto en epígrafes anteriores, la leptina inhibe la lipogénesis en el TAE actuando a distintos niveles, como son la inhibición de la maduración del factor de transcripción lipogénico SREBP-1c, así como la disminución de la expresión de enzimas y factores de transcripción del metabolismo lipídico. Sin embargo, es ampliamente conocido que el factor fundamental que estimula la lipogénesis en este tejido es la señal de la insulina.

Se ha descrito que la leptina, actuando tanto por vía central como periférica, incrementa la sensibilidad a la insulina del organismo como un todo, pero la disminuye en el tejido adiposo blanco (Cusin y col., 1998; Wang y col., 1999). Con el objetivo de profundizar en los mecanismos moleculares involucrados, luego del tratamiento *i.c.v.* con leptina durante 7 días, se analizaron los niveles de mRNA y proteína total del IR-A/B, IRS-1, del GLUT4 y del SOCS-3 en el TAE. Paralelamente, y antes de ser sacrificados, los animales se sometieron a un tratamiento *in vivo* con insulina durante 30 min, analizando en diferentes fracciones subcelulares del TAE por *western blot* los efectos de la leptina central sobre la activación de los intermediarios de la etapa temprana de la vía de señalización de insulina (IR, IRS-1), así como sobre intermediarios de etapas más tardías involucrados en el metabolismo de la glucosa (Akt2, GLUT4).

4.6.1 Niveles de mRNA y de proteína total de IR-A/B, IRS-1 y GLUT4

Para continuar el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos de la leptina central sobre la señalización de la insulina en el TAE, analizamos la expresión génica y los niveles de proteína total del IR, IRS-1 y GLUT4.

En el TAE el IR se expresa en dos isoformas por splicing alternativo: IR-A e IR-B. En las ratas tratadas con leptina no se observaron cambios significativos en la expresión génica de ninguna de las dos isoformas del IR (Fig. 28B, D), como tampoco variaron los niveles de proteína total del IR (Fig. 28A,C). Sin embargo, los niveles de mRNA y proteína total de IRS-1 (Fig. 29A,B,C) y GLUT4

(Fig. 29D,E,F) disminuyeron, en comparación con las ratas *pair-fed*, tras el tratamiento central con leptina.

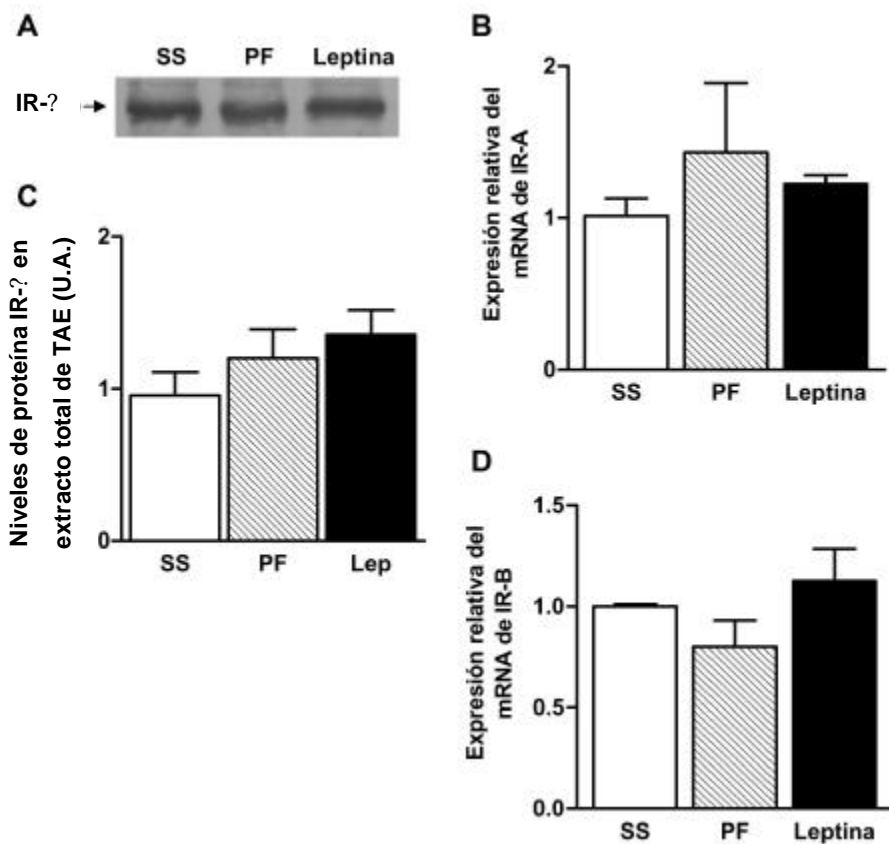


Figura 28. La leptina central no altera la expresión de las isoformas del IR, ni el nivel de proteína total de IR en el TAE.

(A) *Western blots* representativos de IR-? en 70 μ g de extracto total de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días. (C) Se presenta la media del análisis densitométrico normalizado con respecto a β -actina de 3-4 animales por grupo \pm SEM. La expresión del mRNA de (D) IR-B se determinó por Taqman-MGB, y la de (B) IR-A por SYBR Green Real-Time PCR relativo al gen 18SrRNA. SS: suero salino, PF: *pair-fed*. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM ($p < 0.05$).

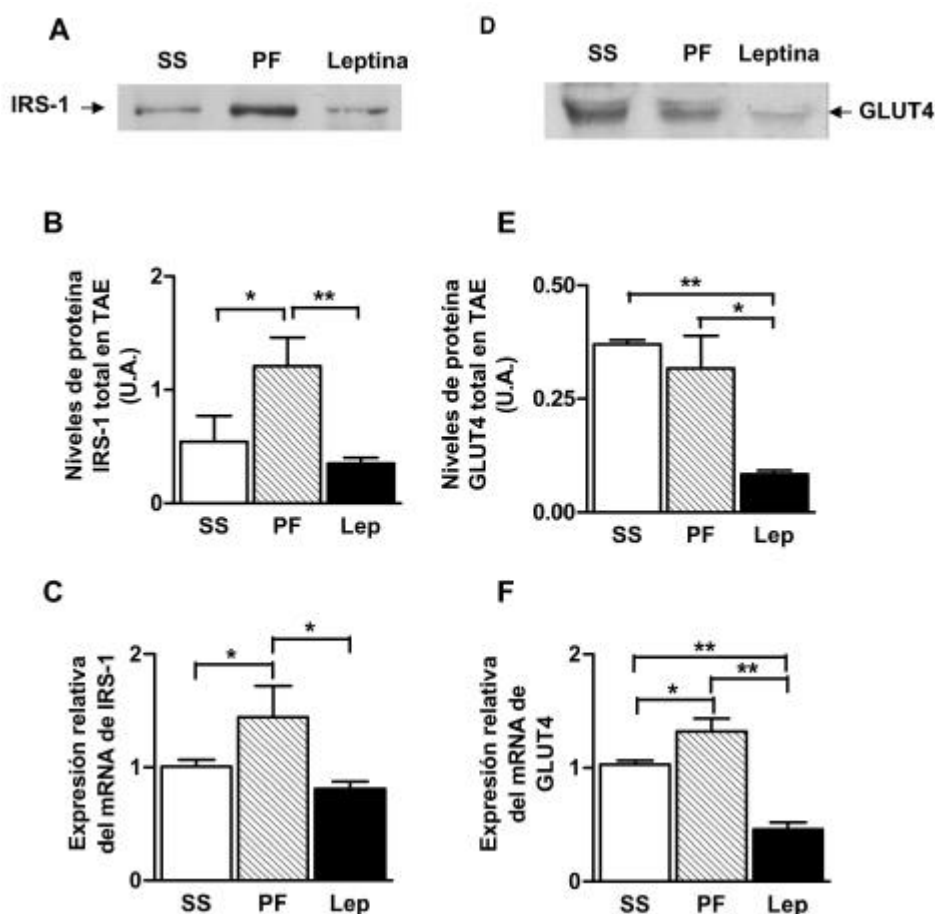


Figura 29. La leptina central reprime la expresión de IRS-1 y GLUT4 en el TAE.

Western blots representativos de (A) IRS-1 y (D) GLUT4 en 70 μ g de extracto total de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días. (B y E) Se presenta la media del análisis densitométrico normalizado con respecto a β -actina de 3-4 animales por grupo \pm SEM. La expresión del mRNA de (C) IRS-1 o (F) GLUT4 se determinó por Taqman-MGB Real-Time PCR relativo al gen 18SrRNA. SS: suero salino, PF: *pair-fed*, Lep: leptina. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01).

4.6.2 Expresión y niveles proteicos de SOCS3

Varios estudios han demostrado que el SOCS3 actúa como modulador negativo de la señal de la insulina (Shi y col., 2006; Senn y col., 2003; Rui y col., 2002). Según (Emanuelli y col., 2001), la insulina induce la traslocación del SOCS3 del CYT a la MP, colocalizando con el IR e inhibiendo su autofosforilación, como parte de un mecanismo de retroalimentación negativa (Senn y col., 2003). En línea con estos resultados en la Fig. 30A,B se observa una disminución de la proteína SOCS3 citosólica ante un estímulo *in vivo* con insulina en ratas controles, aunque la aparición de SOCS3 en la MP no pudo ser detectada (datos no mostrados). El comportamiento de las ratas *pair-fed* en este sentido fue similar a las alimentadas *ad libitum* (resultados no mostrados).

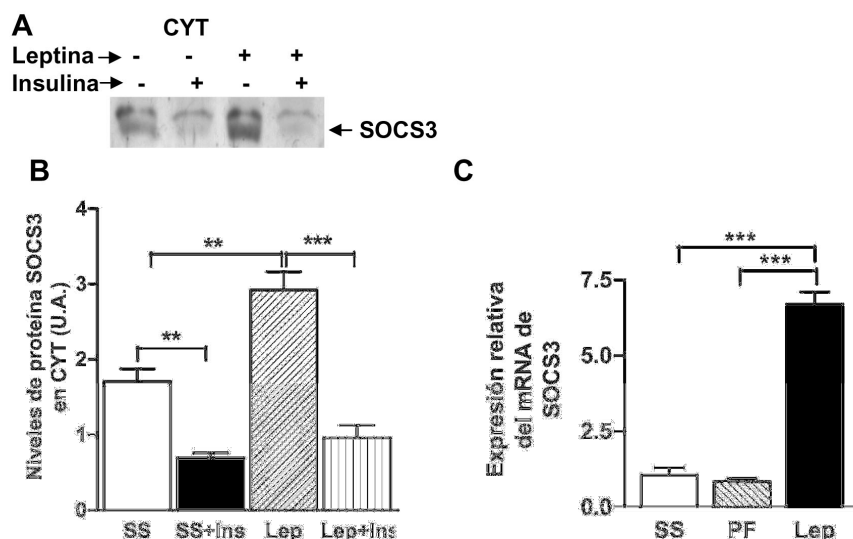


Figura 30. La leptina central aumenta los niveles de mRNA y de proteína de SOCS3 en el TAE.

(A) *Western blots* representativos de SOCS3 en 50 μ g de CYT de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. (B) Se presenta la media del análisis densitométrico normalizado con respecto a β -actina de 3-4 animales por grupo \pm SEM. (C) SS: suero salino, PF: *pair-fed*. La expresión del mRNA de SOCS3 se determinó por Taqman-MGB Real-Time PCR relativo al gen 18SrRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (** p <0.01, *** p <0.001).

La leptina en adipocitos aislados actuando de forma directa sobre su receptor es conocida por inducir la expresión de SOCS3 (Pérez y col., 2004). Sin embargo, aún no se ha analizado si la leptina, actuando solamente vía central, es capaz de modular la expresión génica de SOCS3 en el TAE. El tratamiento central con leptina incrementó 8 veces los niveles de mRNA (Fig. 30C) y 3 veces los de proteína citosólica de SOCS3 (Fig. 30A,B) en el TAE, en comparación con las ratas *pair-fed*, sin afectar la traslocación del SOCS3 citosólico ante un estímulo con insulina (Fig. 30A,B).

4.6.3 Etapas tempranas de la vía de señalización de insulina

En el TAE de ratas controles el IR está distribuido entre la membrana plasmática y las membranas internas (Fig. 31). Al tratar estos animales vía *i.v.* con insulina, de acuerdo con los ya conocidos efectos de la hormona, se observó una estimulación de la autofosforilación en Tyr del IR de 2 a 3 veces en MP (Fig. 31E) y LM (Fig. 31F). Sin embargo, el tratamiento con leptina inhibió en un 90% la autofosforilación del IR estimulada por insulina en MP (Fig. 31E), pero no en LM, donde se observó un incremento de 3 veces, similar a la ratas controles estimuladas con insulina (Fig. 31F).

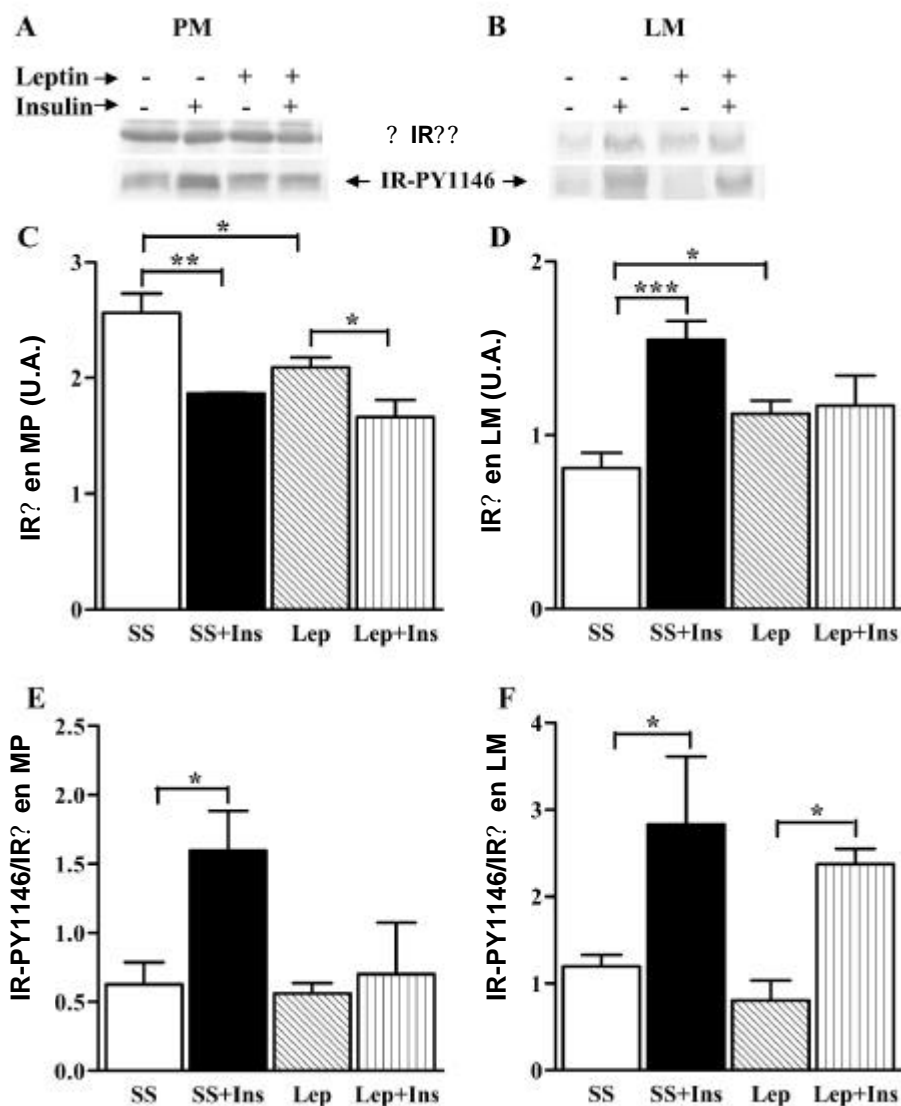


Figura 31. La leptina central inhibe la respuesta a insulina del IR en el TAE.

Western blots representativos de IR e IR-PY1146 en 75 ?g de MP (A) o LM (B) de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 ?g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. Se presenta la media del análisis densitométrico de 3-4 animales por grupo ? SEM (* p ?0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

El IRS-1 es un componente central de las etapas tempranas de la vía de señalización de insulina. De acuerdo a resultados previos de nuestro grupo (Villar y col., 2006), el IRS-1 se encuentra distribuido entre las fracciones de membrana y el CYT, y la insulina induce su translocación de MP y LM al CYT (Figs. 32D-F). Además, como era de esperar, la insulina incrementó la fosforilación en Tyr del IRS-1 en todas las fracciones subcelulares de 1.5 a 2 veces (Figs. 32G-I). Sin embargo, en ratas tratadas con leptina, en el estado basal, la masa proteica del IRS-1 disminuyó 3 veces en el CYT (Fig. 32F), y se alteró su distribución en las membranas, reduciéndose el contenido de IRS-1 en un 29% en la MP (Fig. 32D) y aumentando en un 44% en LM (Fig. 32E). Adicionalmente, la leptina incrementó 9 veces la fosforilación en Tyr basal del IRS-1

citoplásico (Fig. 32I), pero inhibió la estimulada por insulina en todas las fracciones subcelulares (Fig. 32G-I).

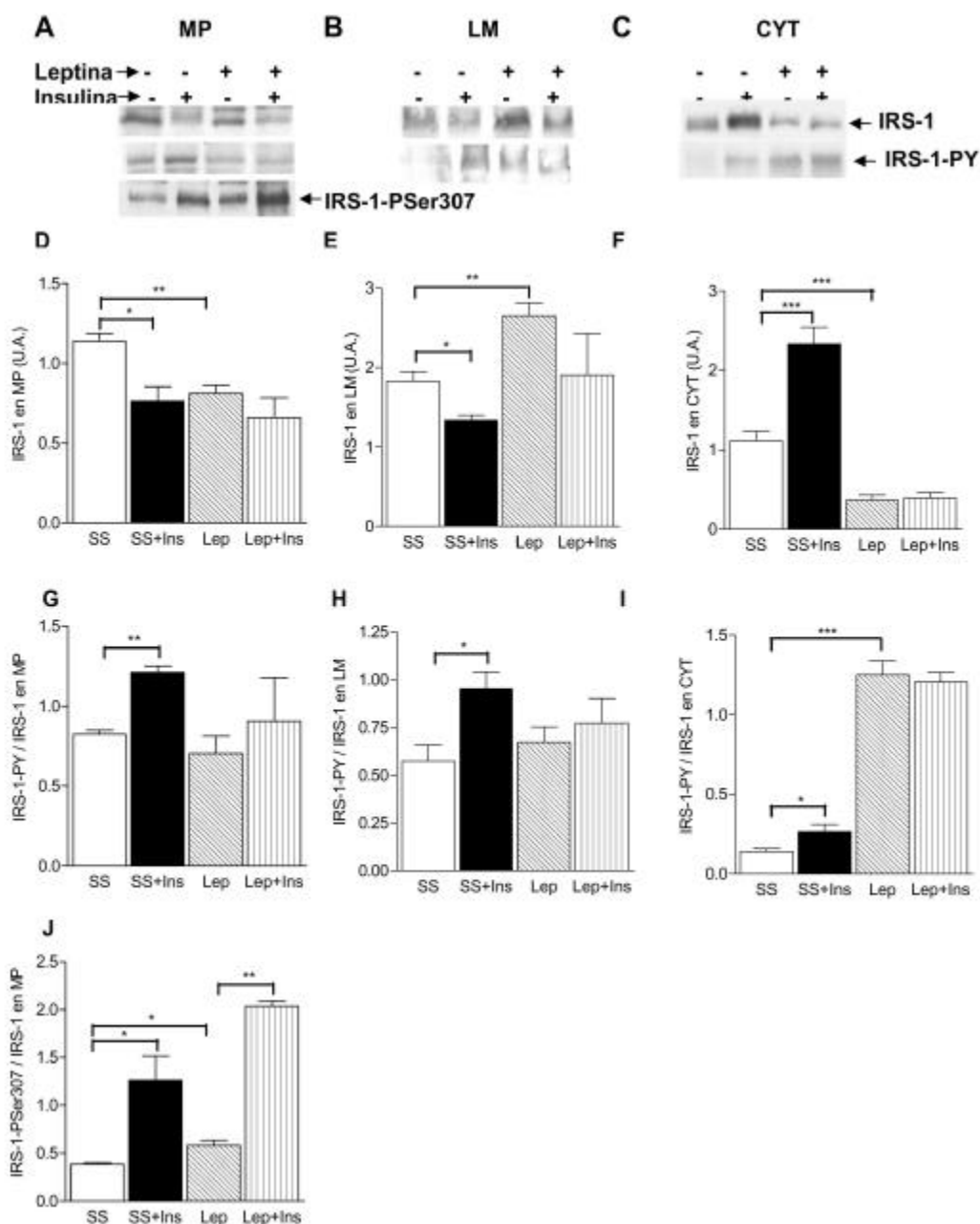


Figura 32. La leptina central inhibe la respuesta a insulina del IRS-1 en el TAE.

Western blots representativos de IRS-1, IRS-1-PY e IRS-1-PSer307 en 75 μ g de MP (A), LM (B) o CYT (C) de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. Se presenta la media del análisis densitométrico de 3-4 animales por grupo \pm SEM (* p ?0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

Finalmente, aunque no se detectaron efectos de insulina sobre la fosforilación en Ser307 del IRS-1 en LM o CYT (datos no mostrados), este parámetro se incrementó 3.4 veces en la MP (Fig. 32J), constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativa de la señal de insulina. Al tratar

las ratas con leptina, la fosforilación del IRS-1 en Ser307 en la MP aumentó en un 53% tanto en condiciones basales, como en las estimuladas con insulina (Fig. 32J).

4.6.4 Activación de la Akt2 y translocación del GLUT4 a la membrana plasmática

Una alteración en la distribución subcelular y/o en la fosforilación de IR e IRS-1 luego del tratamiento con leptina podría muy probablemente tener consecuencias en las etapas tardías de la vía de señalización de insulina, por ejemplo, en aquellas involucradas en el metabolismo de la glucosa.

La fosforilación (activación) de la Akt2 es un paso esencial de la vía dependiente de PI3-K para la translocación del GLUT4 de las membranas internas a la MP luego de un estímulo con insulina. Consecuentemente, en todas las fracciones subcelulares la insulina aumentó la fosforilación de la Akt2 en Ser473 y Thr308 (Figs. 33G-L), los dos residuos necesarios para la activación de esta quinasa (Stokoe y col., 1997), estimulando 3 veces la translocación del GLUT4 hacia la membrana plasmática (Fig. 34D). Sin embargo, en ratas tratadas con leptina, la fosforilación basal de Akt2 en Ser473 aumentó en todas las fracciones subcelulares hasta los niveles observados en las ratas controles estimuladas con insulina (Figs. 33D-F), sin observarse cambios en la fosforilación en Thr308. En estas condiciones no se observó variación en los niveles de GLUT4 en la MP (Fig. 34D).

Sorprendentemente, la estimulación con insulina de ratas tratadas con leptina provocó desfosforilación de la Ser473 de la Akt2 en MP y LM (Figs. 33D-F) hasta niveles observados en condiciones basales de ratas controles, mientras que la fosforilación en Thr308 en estas fracciones de membrana siguió siendo normal. Como resultado, se bloqueó la translocación del GLUT4 a la MP estimulada por insulina (Fig. 34D), aunque el reclutamiento del transportador por insulina a partir de LM siguió siendo normal (Fig. 34E).

El pair-feeding no causó efectos en ningún intermediario analizado de la cascada de señalización de insulina.

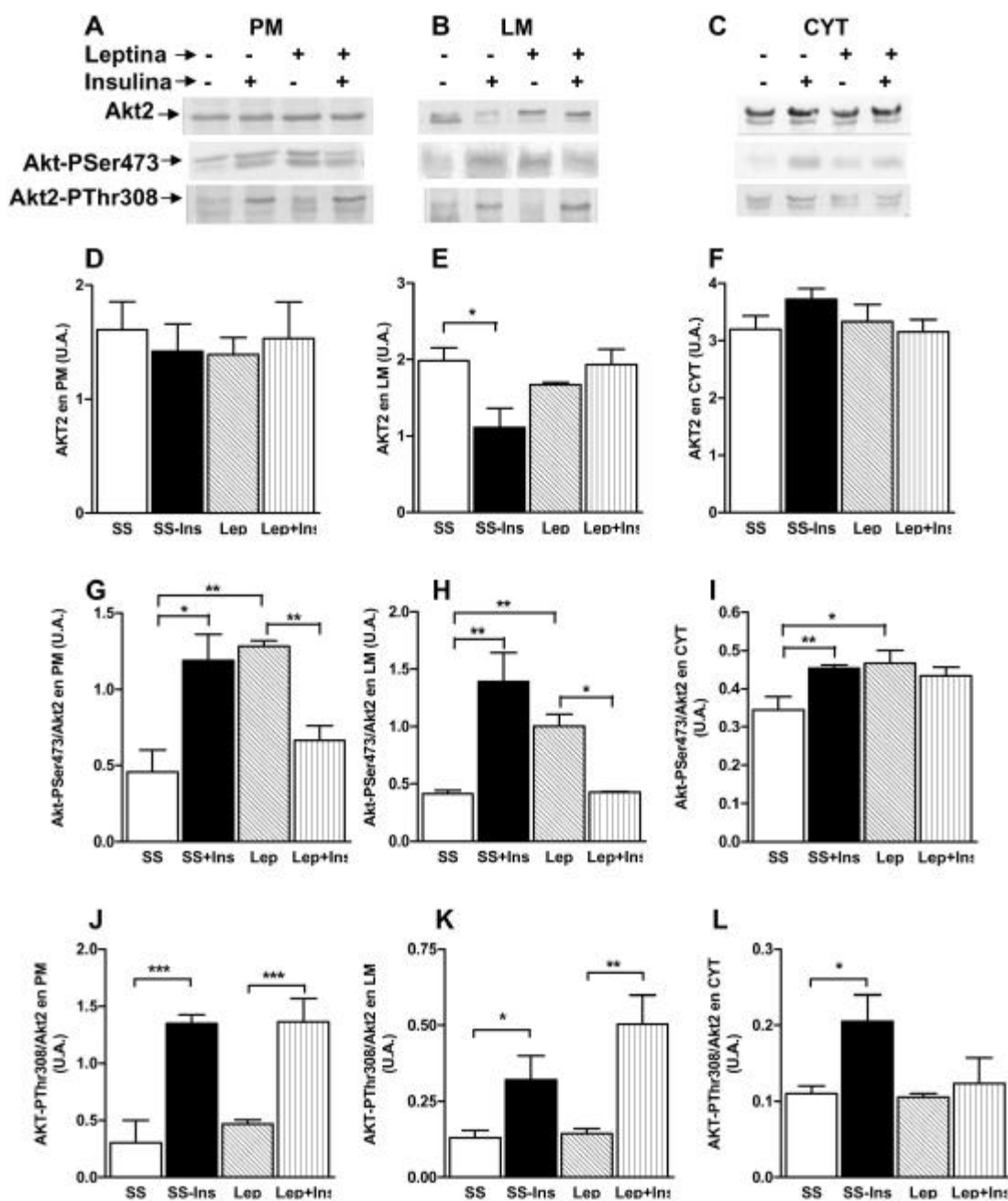


Figura 33. La leptina central altera la activación de la Akt2 estimulada por insulina en el TAE.

Western blots representativos de Akt2, Akt2-PSer473 y Akt2-PThr308 en 75 ?g de (A) MP, (B) LM o (C) 50 ?g de CYT de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 ?g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. (D-L) Se presenta la media del análisis densitométrico de 3-4 animales por grupo ? SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

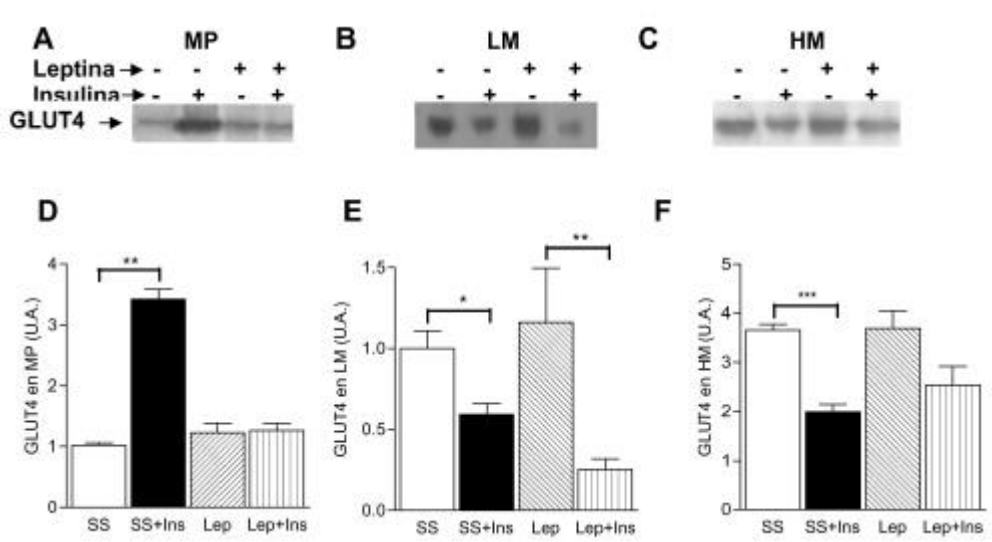


Figura 34. La leptina central impide la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática estimulada por insulina en el TAE.

Western blots representativos de GLUT4 en 100 μ g de (A) MP o 50 μ g de (B) LM o (C) HM de TAE luego de un tratamiento *i.c.v.* con leptina (0.2 μ g/día) o suero salino (SS) durante 7 días, seguido de un tratamiento *in vivo* con insulina (10 I.U./kg peso corporal) o suero salino vía *i.v.* durante 30 min. (D-F) Se presenta la media del análisis densitométrico de 3-4 animales por grupo \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

4.7 Alteraciones de los efectos lipostáticos de la leptina en un modelo de resistencia central a la hormona

4.7.1 Características biológicas de los animales con resistencia central a la leptina

Está suficientemente documentado, que la diabetes tipo II está asociada a alteraciones en la homeostasis de los lípidos, y se caracteriza por resistencia a la leptina. Sin embargo, aún no se ha demostrado, si estas alteraciones metabólicas son un resultado del estado diabético, o si constituyen una de las causas para el desarrollo del mismo.

Para abordar este tema, en el presente trabajo se ha estudiado la homeostasis lipídica en un modelo experimental con resistencia central a la leptina, previamente caracterizado por nuestro grupo de investigación. Este modelo experimental lo constituyen ratas Wistar macho envejecidas (24 meses), cuyos niveles de leptina en suero están incrementados con respecto a las ratas de 3 meses (Fernández-Galaz y col., 2002). Además, en el hipotálamo de estas ratas la expresión del receptor Ob-Rb está disminuida (Fernández-Galaz y col., 2001) y la de SOCS3 incrementada (Peralta y col., 2002). Asimismo, el tratamiento central con leptina 0.2 μ g/día no afecta la ingesta o el peso corporal de estos animales (Fernández-Galaz y col., 2002).

El proceso de envejecimiento de dichas ratas se caracteriza por un aumento del peso corporal, así como del porcentaje de grasa corporal (Tabla 14). Aunque las ratas de 24 meses son

resistentes a la insulina, siguen siendo normoglucemicas (Tabla 14) y normoinsulinemicas en ayunas (Escrivá y col., 1997).

Tabla 14. La resistencia central a la leptina resulta en una adiposidad incrementada.

Se presenta la media de 10 – 15 animales por grupo \pm SEM (**p \leq 0.001).

	3 meses	24 meses
Glucosa sérica (mg/dL)	100 \pm 8	94 \pm 7
Peso corporal (g)	364 \pm 8	672 \pm 18***
Adiposidad %	2.4 \pm 0.2	7.0 \pm 0.5***

4.7.2 Contenido de lípidos en el hígado, el TAE y el suero

En un estado de resistencia central a la leptina se produce un incremento significativo del contenido de grasas en el hígado y el TAE (Fig. 35). Consecuentemente, y similar a lo observado en pacientes diabéticos no-insulino-dependientes (Reaven, 1995), también aumenta el contenido de TAG y colesterol total en suero (Fig. 35). Sin embargo, en las ratas Wistar viejas no se producen alteraciones en los niveles de AG séricos (Fig. 35).

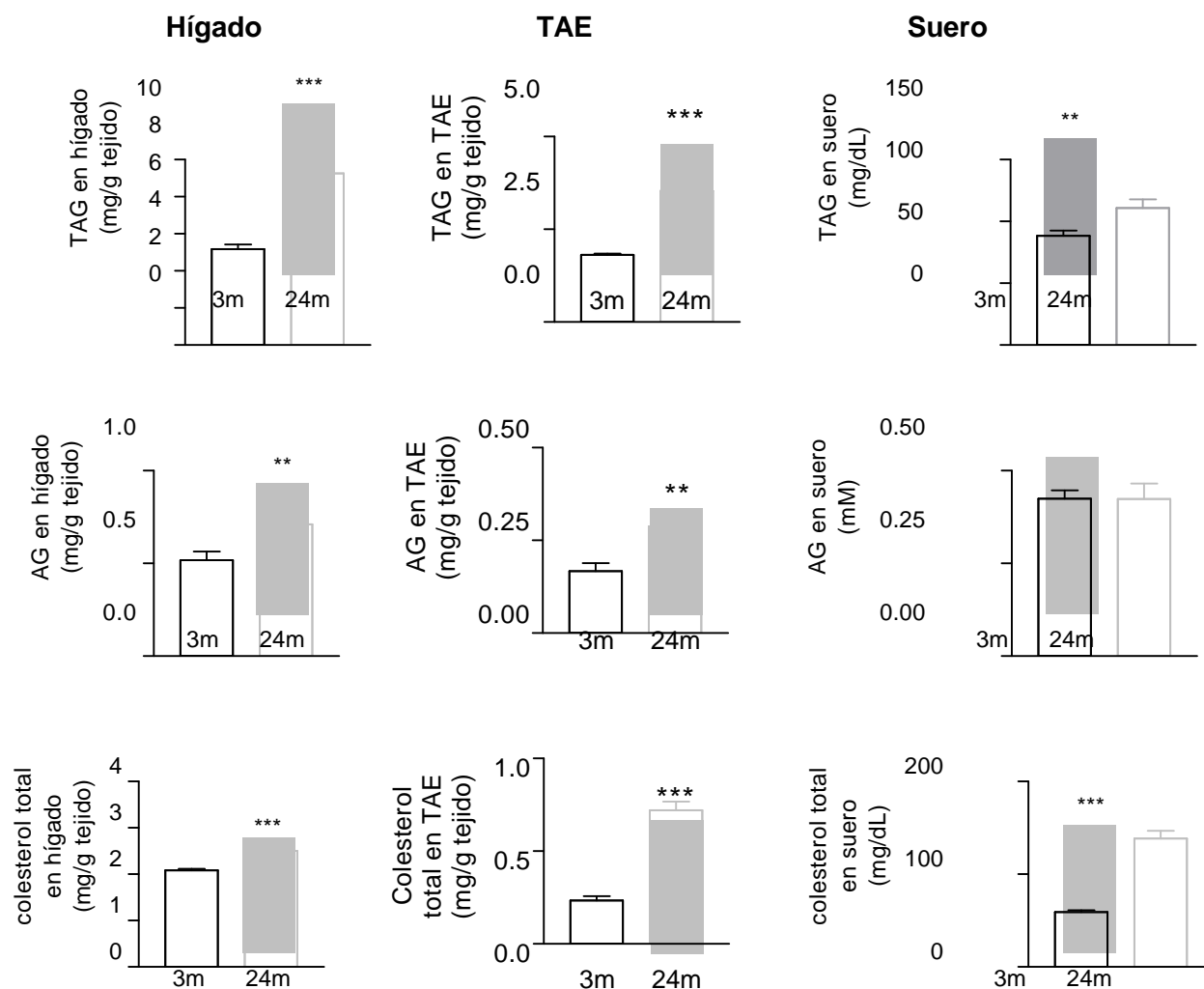


Figura 35. La resistencia central a la leptina se caracteriza por acumulación de grasas en el hígado y el TAE, unido a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, manteniendo niveles normales de AG en suero.

3m: ratas de 3 meses; 24m: ratas de 24 meses. Se presenta la media de 10 – 16 animales por grupo \pm SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.7.3 Expresión génica de enzimas del metabolismo lipídico en el hígado y el TAE

4.7.3.1 Factores de transcripción del metabolismo lipídico en el hígado y en el TAE

La resistencia central a la leptina aumentó en ambos tejidos la expresión génica de SREBP-1c, mientras que en el TAE el PPAR γ no sufrió cambios (Tablas 15A y 16A). Sin embargo, los niveles de mRNA de factores de transcripción lipooxidativos como el PPAR γ y el PGC-1 α aumentaron en el hígado (Tabla 15B), pero no en el TAE (Tabla 16B).

Tabla 15. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el hígado

La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Gen	3 meses	24 meses
A <u>Factor de transcripción lipogénico</u>		
SREBP-1c	1.0 \pm 0.3	4.3 \pm 0.7**
B <u>Factores de transcripción de la oxidación de lípidos</u>		
PGC-1 β	1.00 \pm 0.03	2.3 \pm 0.3*
PPAR α	1.0 \pm 0.1	7 \pm 1**
C <u>Síntesis <i>de novo</i> y desaturación de ácidos grasos</u>		
ACC	1.00 \pm 0.04	15 \pm 2***
FAS	1.0 \pm 0.1	7 \pm 1***
SCD-1	1.0 \pm 0.1	3.7 \pm 0.8*
D6D	1.0 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3*
D <u>Captura y β-oxidación de ácidos grasos</u>		
FAT/CD36	1.0 \pm 0.2	6.3 \pm 0.4***
CPT-1a	1.00 \pm 0.08	2.6 \pm 0.7**
MCD	1.0 \pm 0.2	4 \pm 1**

4.7.3.2 Síntesis *de novo* de AG en el hígado y en el TAE, y gliceroneogénesis en el TAE

De acuerdo a lo descrito en humanos resistentes a insulina y obesos (Faix y col., 1993; Diraison y col., 2002), las ratas con resistencia central a la leptina presentaron un mayor nivel de mRNA de las enzimas lipogénicas en el hígado (Tabla 15C), y un menor nivel en el TAE (Tabla 16C), a pesar de estar incrementada la expresión de SREBP-1c en ambos tejidos (Tablas 15A y 16A). Sorprendentemente en ambos tejidos aumentó la expresión de D6D (Tablas 15C y 16C). Finalmente, la expresión de PEPCCK en el TAE no varió (Tabla 16D).

4.7.3.3 Lipólisis y esterificación en el TAE

En el TAE de las ratas resistentes a leptina disminuyó la expresión de ATGL y HSL, pero aumentó la de DAGT-1 (Tabla 16F), indicando una disminución en la lipólisis y un incremento en la esterificación con la edad.

Tabla 16. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en el TAE

La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Gen	3 meses	24 meses
A	<u>Factores de transcripción lipoénicos/adipogénicos</u>	
SREBP-1c	1.0 \pm 0.1	2.3 \pm 0.2***
PPAR γ	1.0 \pm 0.1	0.93 \pm 0.05
B	<u>Factores de transcripción de la oxidación de lípidos</u>	
PGC-1 α	1.0 \pm 0.1	0.43 \pm 0.09***
PPAR γ	1.00 \pm 0.07	1.3 \pm 0.3
C	<u>Síntesis <i>de novo</i> y desaturación de ácidos grasos</u>	
ACC	1.0 \pm 0.2	0.64 \pm 0.03*
FAS	1.0 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1**
SCD-1	1.0 \pm 0.1	0.19 \pm 0.07***
D6D	1.00 \pm 0.06	1.8 \pm 0.6*
D	<u>Gliceroneogenesis</u>	
PEPCK-c	1.00 \pm 0.08	1.09 \pm 0.08
E	<u>Captura y β-oxidación de ácidos grasos</u>	
LPL	1.00 \pm 0.06	2.1 \pm 0.2**
FAT/CD36	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
CPT-1b	1.00 \pm 0.06	1.0 \pm 0.3
MCD	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1
F	<u>Lipolisis/ esterificación</u>	
ATGL	1.00 \pm 0.05	0.62 \pm 0.05**
HSL	1.01 \pm 0.09	0.66 \pm 0.05**
DAGT-1	1.0 \pm 0.1	1.42 \pm 0.04**

4.7.3.4 Captura y oxidación mitocondrial de AG en el hígado y en el TAE

En las ratas viejas, en consecuencia con el perfil de expresión de los factores de transcripción PPAR γ y PGC-1 α (Tablas 15B y 16B), se incrementó la expresión del mRNA de FAT/CD36, CPT-1 y MCD (Tabla 15D) en el hígado, pero no en el TAE (Tabla 16E). Estos resultados sugieren que en el hígado, a diferencia del TAE, se incrementa la captura y oxidación de los AG séricos en un estado de resistencia central a la leptina. Sin embargo, en el TAE con la edad aumentó la

expresión de la LPL (Tabla 16E), indicando un aumento en la hidrólisis de TAG y ésteres de colesterol de las lipoproteínas plasmáticas por los adipocitos de las ratas viejas.

4.7.4 Producción de ceramida por síntesis *de novo* o degradación de esfingomielina en el TAE

Aunque la resistencia central a la leptina puede favorecer la vía de la síntesis *de novo* de ceramida, aumentando la disponibilidad de AG (Fig. 36), e incrementando la expresión génica de SPT y LASS6 (Tabla 17A), el contenido de ceramida total en el TAE no aumentó (Tabla 18). A este último resultado pueden contribuir en parte la disminución de la expresión de SMPD-2 (Tabla 17B) y el aumento de la expresión de la ceramidasa Asah1 (Tabla 17D), enzimas involucradas en la producción de ceramida a partir de esfingomielina y en la degradación de ceramida, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con los cambios en la expresión de LASS6 (Tabla 17A), el perfil de las ceramidas se desplazó hacia especies de cadena más corta, disminuyendo la abundancia relativa de Cer24:1 y aumentando la de Cer16:0, en comparación con las ratas jóvenes (Tabla 18).

Tabla 17. Efecto de la resistencia central a la leptina sobre la expresión de genes del metabolismo de los esfingolípidos en el TAE

La expresión del mRNA se determinó por TaqMan Real-Time PCR relativo al gen 18S rRNA. Se presenta la media de 6 animales por grupo \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Gen	3 meses	24 meses
A <u>Síntesis <i>de novo</i> de ceramida</u>		
SPT1	1.00 \pm 0.01	1.21 \pm 0.09**
Lass2	1.00 \pm 0.02	1.1 \pm 0.2
Lass4	1.0 \pm 0.1	0.83 \pm 0.09
Lass6	1.0 \pm 0.2	1.49 \pm 0.09**
B <u>Degradación de SM</u>		
SMPD1 (ac)	1.00 \pm 0.02	1.14 \pm 0.07
SMPD2 (n)	1.00 \pm 0.02	0.76 \pm 0.05*
C <u>Síntesis de SM</u>		
SMS	1.00 \pm 0.09	1.1 \pm 0.2
D <u>Degradación de ceramida</u>		
Asah1 (ac.)	1.00 \pm 0.08	1.75 \pm 0.07**
Asah2 (n)	1.00 \pm 0.04	1.1 \pm 0.2

Tabla 18. La resistencia central a la leptina no aumenta los niveles totales de ceramida, pero cambia el perfil de las mismas en el TAE.

3m: ratas de 3 meses; 24m: ratas de 24 meses. Las ceramidas se cuantificaron por espectrometría de masas en modo positivo usando Cer17:0 como patrón interno, a partir de un extracto lipídico del TAE purificado por TLC. Las especies de ceramida están designadas por ? átomos de carbono: ? dobles enlaces. Se presenta la media de 3-4 animales por grupo ? SEM (**p<0.01).

Especie de ceramida	3m		24m	
	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg tejido)	Abundancia relativa (%)	Contenido total (pmol/mg tejido)
16:0	23 ± 1	30 ± 1	31 ± 2**	30 ± 2
18:0	1.9 ± 0.3		2.5 ± 0.2	
20:0	2.4 ± 0.5		4.0 ± 0.3**	
22:0	7.9 ± 0.2		8.2 ± 0.8	
24:1	18.9 ± 0.7		12.8 ± 0.8**	
24:0	44 ± 1		44.8 ± 0.9	

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

La obesidad es un fenómeno cada vez más frecuente en los países industrializados, y se encuentra entre los principales problemas de salud de la sociedad moderna. Existen numerosos desórdenes metabólicos que se desarrollan asociados a éste fenómeno, como por ejemplo, la resistencia a insulina, que puede conllevar Diabetes tipo II. Aunque han sido numerosos los estudios dedicados a dilucidar la relación existente entre la obesidad y la resistencia a insulina, los mecanismos moleculares que originan la patología aún no han sido completamente esclarecidos. En este sentido, cada vez son más los autores que postulan que el desarrollo de resistencia a leptina es un fenómeno previo a la aparición de resistencia a insulina, y por tanto, a la Diabetes tipo II. Sin embargo, el desarrollo de manera consciente de fármacos que eviten la aparición de resistencia a leptina, o que minimicen los efectos de este estado patológico una vez instaurado, requiere del conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de la leptina en condiciones fisiológicas. Por esta razón, en el presente trabajo hemos abordado el estudio de algunos de estos mecanismos moleculares, responsables del incremento de la sensibilidad sistémica a insulina provocado por la leptina.

Desde el descubrimiento de la leptina en 1994 cada vez se describen más efectos de esta hormona sobre distintas facetas de la homeostasis del organismo. Se conoce que la leptina forma parte de un grupo importante de señales adipocitarias que ejercen sus efectos a largo plazo tanto por vía periférica como por vía del SNC. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación, así como otros resultados de la literatura, indican que muchos efectos de la leptina sobre el peso corporal y el metabolismo energético tienen lugar a través de su acción en el SNC.

La administración de leptina vía *i.c.v.* directamente en el SNC, permite que la hormona estimule los núcleos hipotalámicos sin llegar a alcanzar concentraciones periféricas que pudieran afectar directamente los distintos órganos diana. De esta manera, se pueden distinguir los efectos de la leptina que son mediados por el hipotálamo de los efectos periféricos.

5.1 Acciones lipostáticas de la leptina central en el TAE y el hígado

Ya es un hecho conocido que la leptina actuando vía central o periférica reduce la adiposidad y ejerce efectos anti-esteatóticos sobre los tejidos magros (Wang y col., 1999b; Lee y col., 2001), aumentando consecuentemente la sensibilidad a insulina del organismo como un todo (Minokoshi y col., 1999). Entre los tejidos diana de la leptina se encuentra el hígado, que juega un papel central en la biosíntesis y utilización global de lípidos, y el tejido adiposo blanco, el sitio principal de almacenamiento de grasa en forma de TAG y un importante órgano endocrino. Nuestros datos demuestran que la leptina *i.c.v.* ejerce efectos específicos de tejido sobre el metabolismo lipídico del hígado y el TAE.

Por una parte, en ambos tejidos, la leptina vía central bloquea la síntesis *de novo* de AG, lo cual concuerda con los resultados de otros autores que han sobreexpresado leptina mediante el sistema de adenovirus (Cohen y col., 2002), o que han infundido leptina vía i.c.v., pero a dosis muy superiores a la nuestra (10 µg/día, Lin y col., 2003). De esta forma, la leptina disminuye la expresión de ACC, FAS, SCD-1 y D6D en el hígado y el TAE, en comparación con ratas *pair-fed*.

La enzima SCD-1 sintetiza AG insaturados en la posición 9 (oleil- y palmitoleil-CoA). Al formarse palmitoleil-CoA, se pierde la inhibición sobre la ACC por parte del palmitoil-CoA, promoviéndose la biosíntesis de AG. Por tanto, al disminuir la expresión de la SCD-1, disminuye la síntesis de AG monoinsaturados, y concomitantemente, la de TAG (Ntambi, 1995). Asimismo, la inhibición de la ACC, junto con su menor expresión génica, hace que disminuyan los niveles de malonil-CoA, que es el inhibidor más importante de la CPT-1, enzima clave que da inicio a la β -oxidación mitocondrial. En conjunto, estas son algunas de las razones, por las cuales en las ratas tratadas con leptina disminuyen los niveles de TAG tanto hepáticos como séricos.

Consecuentemente con los cambios en la expresión de SCD-1, en los TAG hepáticos disminuye la proporción de ácido oléico, el producto de la actividad de la SCD-1. Sorprendentemente, a diferencia del hígado la actividad de las desaturasas no se refleja en el perfil de los AG de los TAG en el TAE. La razón podría residir en que en el hígado la lipogénesis, en términos de expresión de las enzimas lipogénicas, es cuantitativamente superior en dos órdenes de magnitud a la del TAE, unido a que menos del 20% de la lipogénesis *de novo* contribuye a los AG de los TAG en ambos tejidos (Strawford y col., 2004). Sin embargo, los cambios en la actividad de las desaturasas en el TAE debido al tratamiento con leptina se reflejan sobre todo en la composición de las PC de membrana y no en los TAG. Así, en las PC de la MP del TAE aumenta la abundancia relativa de especies con AG saturados como PC32:0 (16:0/16:0) y PC34:0 (16:0/18:0), y disminuye la de AG monoinsaturados, como PC32:1 (16:0/16:1), PC34:1 (16:0/18:1) y PC36:1 (18:0/18:1). La explicación puede estar en que los TAG del TAE actúan como tampones de los AG de la sangre, mientras que los FL se nutren predominantemente de la síntesis endógena. En línea con esta hipótesis están los resultados obtenidos por (Blank y col., 1993; Cook y Spence, 1985; Igal y Coleman, 1996) en diferentes tipos celulares, que observan que el ácido araquidónico exógeno se incorpora primero a los TAG, y luego a los FL.

El perfil de expresión de los genes lipogénicos fue paralelo al del factor de transcripción SREBP-1c en el hígado, sin observarse cambios en la expresión de este factor de transcripción en el TAE. En el hígado de las ratas tratadas con leptina, la disminución de los niveles de mRNA de SREBP-1c podrían estar mediados por la inducción de PPAR γ , el cual es conocido por bloquear la actividad de LXR en el promotor de SREBP-1c, inhibiendo así su transcripción (Yoshikawa y col., 2003). Sin embargo, en el TAE, como se discutirá más adelante, la leptina central bloqueó el

proceso de activación proteolítica de SREBP-1c, sugiriendo que la hormona actuando vía central inhibe la lipogénesis en ambos tejidos, en parte, a través de la represión de la actividad de SREBP-1c, pero por mecanismos diferentes.

Por otro lado, nuestros resultados constituyen la primera evidencia que relaciona la leptina con la D6D. Esta enzima cataliza el paso lento de la vía de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Anexo II), los cuales son componentes importantes de los fosfolípidos de membrana, son potentes reguladores de la expresión génica (Sessler y Ntambi. 1998; Clarke, 2001), y son precursores de prostaglandinas involucradas en importantes funciones biológicas (Brenner, 2003). Además, los estudios sobre la D6D han sido desarrollados fundamentalmente en el hígado (Nakamura y col., 2000; Brenner, 2003), el cerebro (Cho y col., 1999), las glándulas adrenales (Igal y col., 1991), el corazón (López y col., 1993) y los testis (De Catalfo y de Gómez, 1998), mientras que en el tejido adiposo los datos son muy escasos (Matsuzaka y col., 2002; Boeuf y col., 2001). En este trabajo aportamos evidencias de la represión de D6D en el hígado y el TAE por la leptina actuando vía central. Consecuentemente, el tratamiento con leptina incrementa la proporción de ácido linoleico en los TAG de ambos tejidos.

La expresión de la D6D hepática puede ser activada por SREBP-1c o PPAR γ , dependiendo del contexto metabólico (Matsuzaka y col., 2002; Nara y col., 2002). El grupo de las *pair-fed* con una expresión de D6D significativamente incrementada, y que representa solo aquellos efectos de la leptina i.c.v. que son mediados por la disminución de la ingesta que provoca la hormona, presenta un incremento en los niveles del mRNA tanto de SREBP-1c como de PPAR γ hepáticos. Sin embargo, en las ratas tratadas con leptina, aunque la expresión de PPAR γ está incrementada con respecto a las ratas *pair-fed*, la de SREBP-1c está disminuida, lo cual podría resultar en una disminución en la expresión de la D6D en el hígado de las ratas tratadas con leptina en comparación con las *pair-fed*. Estos datos sugieren que la D6D hepática es regulada por la leptina central fundamentalmente a través de SREBP-1c. En cambio en el TAE, ni el *pair-feeding* ni la leptina central alteran la expresión de SREBP-1c, mientras que el patrón de expresión de PPAR γ es el que va en paralelo con el de la D6D, sugiriendo que en este tejido la leptina central regula la D6D fundamentalmente a través de PPAR γ .

En conjunto, nuestros datos sugieren que la leptina central puede reducir la síntesis *de novo* de AG y TAG en el TAE actuando a diferentes niveles: 1) a través de la represión de la expresión de enzimas de la vía lipogénica, como ACC, FAS, SCD-1 y D6D; 2) por la inhibición de la expresión de la PEPCCK, la enzima responsable de suministrar el glicerol-fosfato derivado de la vía glicolítica para la síntesis de TAG y 3) bloqueando el transporte de glucosa estimulado por insulina en el TAE, lo cual también contribuye a reducir la gliceroneogénesis, y por tanto, la síntesis *de novo* de TAG en este tejido.

Por otro lado, se ha descrito que la hiperleptinemia inducida por adenovirus promueve la conversión de los adipocitos “almacenadores” de grasa en adipocitos “quemadores” de grasa (Orci y col., 2004; Barzilai y col., 1997). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que aunque la administración de leptina central aumenta la expresión del PGC-1 α , así como de las enzimas de la β -oxidación de los AG, como la CPT-1 y la MCD, los niveles de AG en suero, con respecto a las ratas *pair-fed*, se incrementan hasta los valores observados en las ratas controles alimentadas *ad libitum*. Por tanto, nuestros resultados indican que además de incrementar la oxidación de los AG en los adipocitos, la infusión de leptina central estimula los procesos de lipólisis/esterificación con la liberación concomitante de los AG al suero. En estas condiciones, el hígado parece ser el responsable de la captura y oxidación del flujo extra de AG proveniente del TAE, ya que en el hígado de los animales tratados con leptina en comparación con los *pair-fed*, los niveles de mRNA de FAT/CD36, CPT-1 y MCD están incrementados, posiblemente a través del incremento en PPAR α y PGC-1 α . Además, este aumento en la captura de AG séricos por el hígado podría contrarrestar la inhibición que ejerce el malonil-CoA sobre la CPT-1, lo cual, unido a una menor expresión de la ACC, la enzima generadora de malonil-CoA, y a una mayor expresión génica de CPT-1 y MCD en el hígado de las ratas tratadas con leptina, favorecería la β -oxidación en este tejido y limitaría la esterificación de los AG a TAG, lo cual está en concordancia con la disminución en el contenido de TAG hepáticos en los animales tratados con leptina.

Además, el incremento de la β -oxidación en el hígado promovería la vía gluconeogénica en este tejido, en parte por mantener a la piruvato carboxilasa en su forma activa (Randle y col., 1988). En este sentido, se ha observado un aumento en la expresión de la PEPCK hepática en ratas Sprague-Dawley tratadas con leptina central (1.5 μ g en 6 horas) (Liu y col., 1998). Adicionalmente, mediante un clamp euglicémico-hiperinsulinémico, estos autores detectan una redistribución de los flujos de glucosa intrahepáticos en las ratas tratadas con leptina y no en las *pair-fed* o en las tratadas con suero salino, concluyendo que la leptina estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucogenolisis hepática a través del CNS. En nuestro estudio también hemos detectado un incremento en la expresión génica de la PEPCK en el hígado luego del tratamiento con leptina. Sin embargo, este efecto parece deberse a la disminución de la ingesta que provoca la hormona, y no viene acompañado de un incremento de la glicemia en ayunas, sugiriendo que la glucosa neoformada podría estarse desviando hacia otros destinos en el interior del hepatocito, como por ejemplo, la síntesis de glucógeno, al igual que lo sugerido por Liu y col. (1998). Además, una mayor gluconeogénesis en el hígado podría disminuir la disponibilidad de piruvato para ser oxidado, y favorecería la β -oxidación de los AG e impediría su acumulación en forma de TAG en este tejido.

De acuerdo a nuestros datos, la lipólisis en el TAE de las ratas tratadas con leptina parece estar mediada por la ATGL y la HSL, mientras que la esterificación por la DAGT-1. La ATGL, también denominada “desnutrina” (Villena y col., 2004) o fosfolipasa A2 independiente de calcio [iPLA2? (TTS-2.2)] (Jenkins y col., 2004), es una lipasa específica de TAG que ha sido identificada hace 2 años y ha sido estudiada solamente en ratón y humano (Maizal y col., 2006; Zimmermann y col., 2004). Las diferentes preferencias de sustrato de la ATGL y la HSL sugieren una acción en serie y coordinada entre estas dos enzimas involucradas en la movilización de las reservas de grasa, siendo la ATGL la proveedora del sustrato de diglicéridos para la HSL. Aunque los mecanismos involucrados en la regulación de la ATGL permanecen sin dilucidar, varios estudios han demostrado que la expresión de esta enzima se induce por PPAR γ (Kim y col., 2006) y que es sensible al estado nutricional del organismo. De esta forma, la expresión de la ATGL se induce en respuesta al ayuno (Villena y col., 2004), lo cual concuerda con el incremento de la expresión de la ATGL en el TAE de las ratas *pair-fed*. Además, la inducción de la ATGL en los adipocitos por la leptina central, posiblemente mediada por PPAR γ , junto con la inhibición por la leptina de la señal de insulina en este tejido, van de la mano con los datos de otros grupos que mostraron que la resistencia a insulina en el TAE aumenta la expresión de ATGL (Kershaw y col., 2006).

Por otro lado, nuestros datos podrían sugerir que además de aumentar la lipólisis, la leptina evita la desaparición del tejido adiposo estimulando PPAR γ , ya que una de las principales funciones de este factor de transcripción es promover la adipogénesis. Aunque el PPAR γ también promueve la síntesis *de novo* de AG, este proceso en el TAE es cuantitativamente insignificante (Lewis y col., 2002). De hecho, según nuestros datos, el aumento de la expresión de las enzimas de la síntesis *de novo* de AG en el TAE luego del *pair-feeding* es de 1 orden de magnitud inferior al hígado. Además, se ha sugerido que el PPAR γ promueve en los adipocitos un ciclo fútil entre la lipólisis y la esterificación disipando la energía en forma de calor (Guan y col., 2002), y disminuye la expresión de leptina (DeVos y col., 1996), lo cual está en concordancia con nuestros datos. De esta forma se garantiza que el tejido adiposo siga efectuando la función para la cual está específicamente adaptado, que es “secuestrar” el exceso de AG provenientes de la circulación, protegiendo de esta forma los tejidos magros de la lipotoxicidad. Además, una mayor adipogénesis vía PPAR γ podría explicar que los fosfolípidos del TAE sean un mejor reflejo de la actividad de las SCD-1 y D6D, ya que en esas condiciones la síntesis de fosfolípidos está favorecida con respecto a la síntesis de TAG (Taylor y Parks, 1979). Para confirmar esta hipótesis sería interesante cuantificar el contenido de FL en el tejido como un todo.

Los efectos lipostáticos de la leptina central sobre el hígado y el TAE repercuten sobre el contenido lipídico del suero. Por un lado, la administración central de leptina reduce el contenido de TAG en el suero en comparación con el grupo de ratas *pair-fed*. Este efecto podría deberse a

la disminución de la síntesis *de novo* de AG, a la repression de la SCD-1, la cual genera los AG monoinsaturados para la síntesis de TAG y la secreción de lipoproteínas (Miyazaki y col., 2001), y al incremento de la oxidación de los AG por el hígado. Sin embargo, el contenido de TAG y AG en el hígado de las ratas tratadas con leptina no se reduce por debajo de los niveles observados en las ratas *pair-fed*. Nosotros proponemos que en las condiciones de ingesta reducida, la potente inducción en el hígado de las enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de AG, y el mantenimiento de los de TAG séricos a niveles similares a los observados en los animales controles alimentados *ad libitum*, indican que el hígado actúa como el suministrador principal de grasa en forma de lipoproteínas para cubrir las necesidades de todo el organismo. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que en las ratas *pair-fed*, donde los AG están siendo utilizados como la fuente principal de energía por los órganos periféricos, lo cual se refleja en la reducción de los niveles de AG séricos, el TAE aumenta la lipólisis de los TAG para contribuir a la generación de los AG necesarios para todo el organismo. Sin embargo, el tratamiento con leptina impide la lipogénesis *de novo* en los adipocitos, potencia la lipólisis y reduce la reutilización de AG para la síntesis de TAG, ya que, a diferencia del *pair-feeding*, la leptina inhibe la captura de glucosa estimulada por insulina en los adipocitos, y por tanto reduce sus niveles de glicerol-3-fosfato. Como resultado, luego del tratamiento con leptina, se reduce el contenido intracelular de TAG y AG en el TAE, y aumentan los niveles séricos de AG en comparación con el grupo de animales *pair-fed*.

En general, estos datos sugieren que una señalización crónica de la leptina a nivel de CNS, no sólo controla la saciedad, sino que también genera adaptaciones metabólicas específicas de tejido en el hígado y el TAE. En el TAE la leptina inhibe la lipogénesis *de novo* y promueve la lipólisis/esterificación de los TAG, estableciendo un nuevo punto de equilibrio en el ciclo AG-TAG, en el cual la exportación de los AG al suero está incrementada. Este flujo de AG es capturado y oxidado por el hígado. En este último tejido la leptina inhibe la lipogénesis *de novo* y promueve la oxidación de los AG, conllevando una reducción en los niveles séricos de TAG. Estos mecanismos de acción de la leptina central podrían en parte explicar el papel fisiológico de la hormona de impedir el desarrollo de la obesidad.

5.2 Alteraciones en la vía de señalización de la insulina en el TAE luego de un tratamiento central con leptina

Uno de los efectos fundamentales de la insulina en el TAE es promover la lipogénesis. A su vez, una adiposidad incrementada está relacionada con resistencia a la insulina (Abel y col., 2001; Tozzo y col., 1997), aunque los mecanismos involucrados aún no han sido esclarecidos. Por tanto, debido a sus acciones lipostáticas y sensibilizantes frente a la insulina, se ha descrito que la leptina, actuando tanto por vía central como periférica, incrementa la sensibilidad a la insulina del

organismo como un todo, pero la disminuye en el tejido adiposo blanco (Cusin y col., 1998; Wang y col., 1999). Sin embargo, los estudios acerca del efecto de la leptina central o periférica sobre la cascada de insulina en el tejido adiposo son escasos y controvertidos (Ceddia y col., 2002).

Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que tras una estimulación *in vitro* con insulina, los adipocitos tratados *in vitro* con leptina, así como los obtenidos de ratas tratadas por vía i.c.v. con leptina, presentan inhibición en las dos ramas principales de la cascada de señalización de insulina: la MAPK y la GSK3 (Pérez y col., 2004). Según Wang y col. (1999a), un tratamiento durante 5 días con leptina subcutánea incrementa la captura de glucosa en tejido adiposo marrón y músculo esquelético, pero la disminuye en tejido adiposo blanco. Estos efectos de la leptina periférica se asociaron con cambios específicos de tejido en la expresión y niveles proteicos del GLUT4, los cuales estaban incrementados en adiposo marrón y músculo, pero disminuyeron en adiposo blanco luego del tratamiento con leptina. Sin embargo, aún permanece sin esclarecer si dichos efectos de la leptina son mediados por su acción directa sobre su receptor en los tejidos, o por su acción indirecta, a través de una vía eferente del SNC.

Debido a que se ha sugerido que los efectos de la leptina sobre la utilización de glucosa son mediados principalmente por el SNC (Kamohara y col., 1997), uno de los objetivos de nuestro trabajo consistió en determinar si existían cambios en la capacidad de respuesta a insulina del TAE, en ratas sometidas a una infusión central de leptina. Nuestros datos muestran que la leptina, actuando solo vía SNC, es capaz de modular negativamente la cascada de señalización de insulina en etapas tan tempranas como el IR, el IRS-1 y la Akt2.

5.2.1 Receptor de insulina

Resultados previos del grupo han demostrado que IR-B es la isoforma predominante del receptor de insulina en el TAE de ratas jóvenes, mientras que en ratas viejas hiperleptinémicas y resistentes a insulina, la expresión de esta isoforma está disminuida, sin observarse cambios en IR-A (Serrano y col., 2005). Por tanto, decidimos analizar si la leptina vía central alteraba la expresión de las isoformas del IR. Nuestros datos demuestran que el tratamiento con leptina no afecta la expresión de ninguna de las isoformas del IR, y no altera la cantidad de proteína de IR total en la célula. Sin embargo, la leptina inhibió la autofosforilación en Tyr estimulada por insulina del IR en MP, pero no en LM. Asimismo, luego del tratamiento con leptina se observó un incremento substancial de la expresión y masa proteica del SOCS3 en el TAE, así como una mayor traslocación del SOCS3 del citosol ante un estímulo con insulina. En este sentido se ha demostrado que la insulina induce la translocación del SOCS3 del CYT a la MP, donde colocaliza con el IR (Emanuelli y col., 2001). Aunque en el presente trabajo no se logró observar una interacción directa entre el IR y el SOCS3 en la MP, y tampoco se logró detectar SOCS3 en la MP, es posible que a elevados niveles de expresión, el SOCS3 afecte la autofosforilación en Tyr del IR

en la MP. De hecho se ha demostrado que la autofosforilación en Tyr del IR está disminuida en cultivos primarios de adipocitos provenientes de ratones que sobreexpresan SOCS3 (Shi y col., 2006), así como en el hígado de ratones, en los que se ha inducido la expresión de SOCS3 mediante un tratamiento con IL-6 o lipopolisacáridos (Senn y col., 2003; Ueki y col., 2004). Sin embargo, otros datos demuestran que SOCS3 no tiene ningún efecto sobre la autofosforilación del IR (Shi y col., 2006; Emanuelli y col., 2001; Ueki y col., 2004). Por tanto, se necesitarán estudios futuros para aclarar estas discrepancias. En cualquier caso, estas alteraciones en la autofosforilación del IR contribuyen muy probablemente a la resistencia a insulina observada en el TAE de ratas tratadas con leptina (Wang y col., 1999a; Minokoshi y col., 1999), como ocurre en otros modelos de resistencia a insulina (Virkamaeki y col., 1999).

5.2.2 IRS-1

El IRS-1 es uno de los sustratos del receptor de insulina más importantes del tejido adiposo. Nuestros datos demuestran que la leptina actuando vía central modula negativamente al IRS-1 y que el SOCS3 podría estar involucrado en este proceso. En este sentido, es conocido que el SOCS3 actúa como modulador negativo de la señal de la insulina, inhibiendo la fosforilación en Tyr estimulada por insulina del IRS-1 (Shi y col., 2006; Emanuelli y col., 2001; Senn y col., 2003; Ueki y col., 2004), y promoviendo la degradación proteolítica del IRS-1 (Rui y col., 2002). Asimismo, adipocitos deficientes de SOCS3 presentan una respuesta incrementada a la insulina en términos de fosforilación en Tyr de IRS-1 y -2, actividad de PI3-K y transporte de glucosa (Shi y col., 2004).

Nuestros datos indican que la leptina central inhibe la fosforilación en Tyr estimulada por insulina del IRS-1, lo cual, en concordancia con (Shi y col., 2006), viene acompañado por una reducción en los niveles proteicos de IRS-1 en el CYT. Además, la leptina incrementa la fosforilación en Ser307 del IRS-1 en la MP tanto en condiciones basales, como estimuladas con insulina, lo cual es conocido por promover la degradación proteolítica de IRS-1 (Greene y col., 2003; Gao y col., 2004). También la inducción de la ATGL observada en el TAE de ratas tratadas con leptina podría incrementar la cantidad de DAG, el cual a su vez activaría a la PKC y fomentaría la fosforilación en Ser307 del IRS-1. Todos estos efectos, junto con una menor expresión de IRS-1 y una mayor expresión de SOCS3, podrían muy probablemente explicar los disminuidos niveles proteicos de IRS-1 en el CYT del TAE en las ratas tratadas con leptina.

Entonces, de acuerdo con lo descrito por otros grupos (Shi y col., 2006; Emanuelli y col., 2001; Senn y col., 2003; Ueki y col., 2004; Rui y col., 2002; Greene y col., 2003; Gao y col., 2004), nuestros resultados sugieren que la leptina actuando vía central controla el IRS-1 en el TAE a través de los siguientes mecanismos: 1) regulando su expresión génica; 2) inhibiendo su

fosforilación en Tyr estimulada por insulina; 3) promoviendo su degradación proteolítica a través de la fosforilación en Ser307 y/o a través de un proceso mediado por SOCS3.

5.2.3 Akt2 y GLUT4

Para su completa activación la Akt2 debe fosforilarse tanto en Ser473, como en Thr308 (Stokoe y col., 1997). Nuestros datos demuestran que la leptina actuando vía central aumenta la fosforilación en Ser473 de la Akt2 en el TAE sin alterar la fosforilación de la quinasa en Thr308 o el contenido de GLUT4 en las distintas fracciones subcelulares de este tejido. Adicionalmente, aunque la leptina i.c.v. permite la fosforilación en Thr308 de la Akt2 en las fracciones de membrana ante un estímulo con insulina, a su vez la leptina promueve la desfosforilación de la Ser473, posiblemente vía SOCS3, ya que se ha demostrado que altos niveles de expresión de SOCS3 inhiben la fosforilación en Ser473 de la Akt2 estimulada por insulina (Senn y col., 2003). Consecuentemente, en las ratas tratadas con leptina se inhibe la translocación del GLUT4 a la MP, aunque la insulina sigue siendo capaz de reclutar al GLUT4 de los compartimentos subcelulares, sugiriendo que la leptina podría estar afectando una etapa tardía en el proceso de translocación del GLUT4 a la MP estimulada por insulina.

Además, se ha demostrado que la PLD, la enzima que cataliza la generación de ácido fosfatídico a partir de fosfatidilcolinas, forma parte de las vesículas de GLUT4, y que una menor actividad de PLD no evita el reclutamiento de estas vesículas a la membrana plasmática ante un estímulo con insulina, sino que impide su anclaje y fusión a la MP (Huang y col., 2006b). Según nuestros resultados, la leptina disminuye en la MP del TAE la proporción relativa de las PC saturadas/monoinsaturadas, como PC32:1 (16:0/16:1), PC34:1 (16:0/18:1) y PC36:1 (18:0/18:1), los sustratos fundamentales de la PLD (Pettitt y col., 1997), lo cual muy probablemente disminuiría la actividad de esta enzima. Este efecto, junto con la desfosforilación de la Ser473 de la Akt2 ante un estímulo de insulina en presencia de leptina, contribuiría a la inhibición del transporte de glucosa estimulado por insulina en las ratas tratadas con leptina. Finalmente, la leptina central reduce la expresión de GLUT4 en el TAE, lo cual concuerda con datos obtenidos infundiendo leptina por vía subcutánea (Wang y col., 1999a).

Por otro lado, la inhibición por la leptina de la fosforilación en Ser473 de la Akt2 estimulada por insulina está en concordancia con las acciones anti-lipogénicas de la leptina, ya que la Akt favorece la transcripción de enzimas involucradas en la síntesis de colesterol y AG a través de la activación de SREBP (Porstmann y col., 2005). Además, recientemente se ha demostrado que en *Drosophyla melanogaster*, la activación de la Akt en el citosol promueve la acumulación de grandes gotas lipídicas y la expresión de LSD2, la proteína de la mosca homóloga a la perilipina de los vertebrados, involucrada en la formación de las gotas lipídicas (Vereschagina y Wilson, 2006). Por tanto, según nuestros datos, el bloqueo por la leptina central de la fosforilación de la

Akt2 citosólica en Thr308, impediría la activación completa de esta quinasa, y por tanto, estaría en concordancia con la función lipostática de la leptina de reducir los depósitos grasos del organismo.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la leptina actuando vía central modula negativamente la vía de señalización de insulina en el TAE en etapas tan tempranas como IR, IRS-1 y Akt2, inhibiendo la translocación del GLUT4 a la MP estimulada por insulina en este tejido. Además, nuestros resultados sugieren que los efectos inhibitorios de la leptina central sobre la cascada de la insulina en el TAE podrían estar mediados por SOCS3. Finalmente, dichos efectos son consistentes con la función de la leptina de limitar la adiposidad, ya que la captura de glucosa a partir de fuentes extracelulares es un paso clave para la síntesis de TAG en los adipocitos, al carecer estas células de la glicerol-quinasa, la enzima encargada de reciclar el glicerol proveniente de la hidrólisis de los TAG. De esta forma, la leptina actuando vía central previene el incremento de la adiposidad, un factor muy conocido por jugar un papel central en el desarrollo de la resistencia a leptina e insulina.

5.3 Implicación del metabolismo de los esfingolípidos en las acciones lipostáticas de la leptina en el TAE

Nuestros resultados demuestran que la leptina actuando vía central disminuye el contenido total de ceramida en el TAE a través de la inhibición de las dos vías principales de producción de ceramida en los mamíferos: la síntesis *de novo* y la degradación de SM (Hannun col., 2001). Aunque la disminución de los niveles de ceramida es modesta (alrededor de un 34 %), estudios *in vitro* han demostrado que induciendo cambios comparables en el contenido endógeno de ceramida es suficiente para provocar efectos en la señalización de insulina (Chavez y col., 2003; Chavez y Summers, 2003). Además, el incremento del contenido de ceramida en los tejidos no-adiposos resistentes a insulina en roedores también es modesto: un 26% en hígado y un 52% en músculo esquelético (Turinsky y col., 1990). Estas observaciones sugieren que la disminución de los niveles de ceramida en el TAE luego del tratamiento con leptina vía central es suficiente para jugar un papel importante en los efectos de la hormona sobre este tejido.

La reducción de la síntesis *de novo* de ceramida se evidencia a través de una menor expresión de SPT, la enzima que cataliza el paso lento de esta vía, así como de dos (LASS2 y 4) de las tres isoformas de ceramida sintasa expresadas en este tejido (Anexo I). LASS2 y LASS4 tienen preferencia por AG de cadena larga, especialmente C22:0 y C24:0 (Mizutani y col., 2005). Consecuentemente, en el TAE de las ratas tratadas con leptina disminuye la abundancia relativa de Cer24:0, desplazando el perfil de ceramidas hacia especies de cadenas más cortas. La importancia fisiológica de estos cambios cualitativos en las ceramidas del TAE inducidos por la leptina central, necesita estudios futuros.

Los mecanismos que regulan la expresión génica de SPT o LASS no han sido establecidos. Los niveles de mRNA de SPT responden a estímulos inflamatorios (Hanada, 2003), señalización del receptor de leptina (Shimabukuro y col., 1998) y actividad de AMPK (Blázquez y col., 2001). Asimismo, de acuerdo con (Dobrzyn y col., 2005), la deficiencia de SCD-1 en ratón, reduce la síntesis de ceramida a través del incremento de la oxidación de los AG y de la represión de SPT en el músculo esquelético. En nuestras condiciones experimentales la leptina central también disminuye la expresión de SCD-1 en el TAE. Sin embargo, la reducción de los niveles de AG libres y TAG en este tejido de las ratas tratadas con leptina no parece deberse solo a una β -oxidación incrementada en el TAE, sino a una mayor lipólisis en este tejido con la concomitante liberación de AG al suero, unido a una menor disponibilidad de AG a partir de los TAG plasmáticos, debido a los efectos lipostáticos de la leptina sobre el hígado. En cualquier caso, los mecanismos mediante los cuales la leptina central inhibe la expresión de SPT en el TAE necesitan ser investigados.

Además, la leptina central reduce la disponibilidad de AG libres en el TAE, ya que disminuye los niveles de TAG en el suero, y el contenido de TAG y AG intracelular. Esta disminución en la disponibilidad de AG en el TAE muy probablemente resulta en una menor actividad de SPT y, por tanto, en una menor síntesis de ceramida, ya que la actividad de esta enzima *in vitro* se ve estimulada en gran medida por los niveles de ácido palmítico (Hanada y col., 2000).

Las ceramidas se encuentran entre los principales sospechosos de causar lipoapoptosis en los tejidos magros (Unger, 2003). Siguiendo esta línea de pensamiento, los efectos reductores de ceramida en el TAE provocados por la leptina central, protegería a los adipocitos de la apoptosis inducida por grasas, mejorando de esta forma la capacidad del TAE de actuar como tampón de las grasas en el organismo, lo cual estaría en concordancia con la función de la leptina de evitar la acumulación de grasa en tejidos magros (Unger, 2003). Además, la obesidad se caracteriza por una incrementada secreción de citoquinas pro-inflamatorias por los adipocitos, así como por los macrófagos que se infiltran en el tejido adiposo (Rajala y Scherer, 2003), y se ha demostrado que las ceramidas median las respuestas inflamatorias de algunas citoquinas (Chatterjee, 1998). Por tanto, la disminución en los contenidos de ceramida en el TAE luego del tratamiento con leptina, impediría el desarrollo de la inflamación crónica que acompaña el estado obeso.

Sin embargo, la acumulación de ceramida en los tejidos magros está asociada con resistencia a insulina (Turinsky y col., 1990; Adams y col., 2004), y nuestros datos, así como los de otros grupos (Minokoshi y col., 1999; Cusin y col., 1998) han demostrado que la leptina aumenta la sensibilidad a insulina del organismo como un todo, pero la disminuye en el TAE. Por tanto, ¿cómo podría explicarse esta aparente paradoja entre los efectos reductores de ceramida en el

TAE con una menor sensibilidad a insulina en este tejido luego de un tratamiento con leptina vía central?

La ceramida es uno de los sustratos fundamentales para la síntesis de SM. Por tanto, niveles reducidos de ceramida, junto con una menor expresión de SMS en el TAE de las ratas tratadas con leptina resultaría en una disminución de los niveles de SM. De acuerdo a esta hipótesis, la MP, el organelo subcelular con el mayor contenido de SM (Warnock y col., 1993), presenta una disminución en los niveles de SM luego del tratamiento con leptina, mientras que el contenido de PC, la especie lipídica que dona la cabeza de colina para la síntesis de SM, no se altera. Además, los niveles de ceramida en el aparato de Golgi, el sitio principal para la síntesis de SM, están disminuidos luego de la infusión de leptina. Todas estas observaciones, junto con una menor expresión de SMPD en el TAE de las ratas tratadas con leptina apoyan la idea de que los menores niveles de SM en la MP se deben a una reducida disponibilidad de ceramida para la síntesis de SM y no a una mayor hidrólisis de SM.

Según (Smart y col., 1999), hasta un 70% del contenido total de SM celular se encuentra en los *lipid rafts*. En estos microdominios de membrana la SM está íntimamente asociada al colesterol libre (Pierini y Maxfield, 2001). Los niveles de colesterol libre también disminuyen en la MP del TAE luego del tratamiento con leptina, sin cambios significativos en los niveles de ceramida total. En este sentido se ha demostrado que la disminución progresiva de los niveles de colesterol libre en células 3T3-L1 debido a un tratamiento con β -ciclodextrina, conduce a la destrucción gradual de las caveolas y a la inhibición de la captura de glucosa estimulada por insulina (Parpal y col., 2001). Aunque la reducción de los niveles de SM y colesterol libre en la MP del TAE es relativamente modesta (alrededor de un 20%), se ha demostrado que la cantidad de estos lípidos se encuentra regulada en un rango muy estrecho (Ridgway, 2000) y que cambios comparables en los niveles de SM y colesterol libre en la MP son suficientes para alterar tanto la endocitosis del GLUT4 (Liu y col., 2004), como la captura de AG por FAT/CD36 (Pohl y col., 2005). Por tanto, nuestros datos podrían explicar la alteración de la señalización de insulina en las etapas tempranas de la vía, así como en la translocación del GLUT4 a la MP adipocitaria luego del tratamiento con leptina, ya que la señalización del receptor de insulina (Smart y col., 1999), así como la inserción correcta del GLUT4 en la MP (Inoue y col., 2006), dependen en gran medida de la composición lipídica de la MP.

Por otro lado, uno de los papeles fundamentales de la insulina es promover lipogénesis mediante la activación de SREBP-1c (Hegarty y col., 2005). En este sentido se ha demostrado que una disminución en la síntesis *de novo* de ceramida (Worgall y col., 2004) o de SM (Worgall y col., 2002) inhibe la maduración de SREBP-1c en células CHO. El mecanismo propuesto consiste en que la disminución de los niveles del ligando natural del colesterol libre, la SM, en la MP

resultaría en un mayor flujo de colesterol libre hacia membranas intracelulares como el RE, impidiendo de esta forma la traslocación del complejo SCAP-SREBP del RE a Golgi (Yang y col., 2002). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que a pesar de la reducción en la síntesis *de novo* de las ceramidas y del contenido de SM y colesterol libre en la MP del TAE, los niveles de colesterol libre en el RE no cambian luego del tratamiento con leptina, sugiriendo que la inhibición de la translocación de SREBP-1c de RE a Golgi es independiente de los cambios provocados por la leptina en la vía de las ceramidas.

Por otro lado, la leptina aumenta casi en un 300% la expresión de INSIG-1, la proteína encargada de retener el complejo SCAP-SREBP en el RE (Yang y col., 2002). Este efecto se evidencia a través de la disminución de los niveles proteicos de la forma madura de SREBP-1c (65 kDa), así como de la reducción de la expresión de los genes diana de SREBP-1c (SCD-1, FAS y ACC) en el TAE de las ratas tratadas con leptina. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por (Yang y col., 2002), donde sobre-expresando INSIG-1, se logra retener el complejo SREBP-SCAP en el RE de manera independiente de los niveles intracelulares de colesterol libre. Por tanto, según nuestros resultados, la leptina central disminuye la sensibilidad del TAE a las acciones lipogénicas de la insulina por un mecanismo dependiente de INSIG-1 e independiente de ceramida. El mecanismo molecular mediante el cual la leptina actuando vía central incrementa la expresión de INSIG-1 en el TAE, necesita ser investigado.

Finalmente, aunque SREBP-1c es conocido por jugar un papel central en la regulación de la expresión de los genes de enzimas lipogénicas, el control de su maduración proteolítica por la leptina central no parece ser el único factor responsable de la represión de los genes lipogénicos, ya que se ha demostrado que ratones *knock-out* de SREBP-1c reducen su lipogénesis solamente en un 50 % (Liang y col., 2002). En este sentido nuestros datos indican que otros factores de transcripción lipogénicos como CHREBP, que estimula la transformación de glucosa en lípidos (Yamashita y col., 2001), también participan en las acciones anti-lipogénicas de la leptina central en el TAE.

5.4 Efecto de la leptina central sobre las acciones *in vivo* de la insulina

Como resultado de todos los efectos de la leptina central sobre el hígado y el TAE, discutidos anteriormente, y en concordancia con lo descrito en la literatura, se observó una disminución de los niveles de insulina en sangre y una mejora en las acciones periféricas de la insulina *in vivo* sobre los AG del suero, sugiriendo un incremento de la sensibilidad a la insulina del organismo como un todo luego del tratamiento central con leptina.

Al someter a los animales a un estímulo agudo con insulina *in vivo*, los niveles de glucosa sérica disminuyeron hasta valores por debajo del límite de detección del método empleado, con lo cual nos fue imposible detectar mejoras en la sensibilidad a insulina en este aspecto. Por tanto, en

estudios futuros sería importante emplear la técnica del clamp euglicémico-hiperinsulinémico con vistas a detectar efectos de la leptina central sobre la sensibilidad a insulina en términos de captura de glucosa plasmática por los distintos tejidos, como han hecho ya otros autores (Minokoshi y col., 1999; Haque y col., 1999; Wang y col., 1999a). También sería interesante analizar la expresión génica y actividad de enzimas claves del metabolismo de los carbohidratos en el hígado, como la glucosa-6-fosfatasa, glucógeno sintasa quinasa-3, entre otras, tanto en el estado basal, como luego de un estímulo con insulina, con el objetivo de investigar el efecto de la leptina central sobre la capacidad de la insulina de reprimir la producción hepática de glucosa.

En el caso de las grasas, el tratamiento crónico con leptina central, de forma independiente de sus propiedades anorexígenas, actúa de forma sinérgica con un estímulo *in vivo* y agudo (30 min) de insulina en la disminución de los AG libres del suero, evidenciando el ya conocido efecto sensibilizante que ejerce la leptina central sobre las acciones periféricas de la insulina *in vivo*. Este efecto parece deberse fundamentalmente a un mayor gradiente de concentración de AG entre el suero y el citosol celular de los distintos tejidos magros, sobre todo del hígado, gracias a los efectos lipostáticos de la leptina, y no a una potenciación de la capacidad anti-lipolítica de la insulina en el TAE, ya que en este tejido la leptina central inhibe la vía de señalización de la insulina desde etapas tempranas.

5.5 Alteraciones en las acciones lipostáticas de la leptina en un modelo de resistencia central a la hormona

En la actualidad cada vez son más los grupos que apoyan la hipótesis de que la aparición de resistencia a la leptina precede el desarrollo de resistencia a la insulina, lo cual a su vez puede conllevar Diabetes tipo II. A pesar de ser muchos los estudios dedicados a dilucidar las causas del desarrollo de la resistencia a leptina, debido a la complejidad de las vías de señalización en las que interviene la hormona, los mecanismos moleculares que la originan aun no han sido completamente esclarecidos. Además, debido a la naturaleza integrada de los sistemas de homeostasis energética, el fallo en un punto del sistema se traduce en muchas ocasiones en respuestas compensatorias en otros sitios. Por tanto, como ocurre en otras patologías crónicas, una prevención o tratamiento efectivo de la resistencia a insulina podría requerir una combinación de fármacos dirigidos a esos puntos de respuesta compensada. Sin embargo, para abordar el diseño de esos fármacos de una manera consciente, es necesario dilucidar dónde se origina el fallo primario tanto en la señal de la leptina, como en el de la insulina, y esclarecer los posibles mecanismos compensatorios.

En este sentido, aunque todavía existen discrepancias en cuanto a la contribución específica de cada tejido, resultados anteriores del grupo han demostrado que la resistencia a insulina que se observa en nuestro modelo de resistencia central a la leptina se desarrolla primero en el tejido

adiposo y algunos tipos de músculo (soleus y diafragma), mientras que otros tejidos conservan la sensibilidad a la hormona (Escrivá y col., 1997). En línea con esta hipótesis están los resultados anteriores de nuestro grupo (Villar y col., 2006; Serrano, 2006), que demuestran que en las ratas de 24 meses la señalización de insulina en el tejido adiposo se encuentra en mucho peores condiciones que en el hígado o en el músculo esquelético (cuádriceps), concluyendo que la resistencia a la insulina aparece antes en el TAE que en el resto de los tejidos analizados.

Es casi un consenso general que para el desarrollo de hiperglucemia luego de la aparición de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo y/o músculo esquelético, debe producirse un aumento en los AG circulantes, los cuales disminuyen la capacidad de la insulina de inhibir la producción hepática de glucosa, y estimulan la secreción de insulina por el páncreas, generándose hiperinsulinemia. Al mantenerse la carga de AG plasmáticos sobre el páncreas, las células beta-pancreáticas entran en apoptosis, los niveles de insulina en sangre se desploman y sobreviene la hiperglucemia.

En este sentido, al presentar las ratas de 24 meses resistencia a la leptina a nivel central (Fernández-Galaz y col., 2002), la hormona no es capaz de ejercer sus efectos lipostáticos, observados en ratas jóvenes sensibles a la hormona. Así, las ratas viejas son hiperleptinémicas, presentan una elevada adiposidad, un mayor contenido de TAG, colesterol total y AG en el TAE y en el hígado, y, consecuentemente, elevados niveles de TAG y colesterol total en el suero. Sin embargo, en estas condiciones las ratas viejas siguen manteniendo los valores de AG, glucosa e insulina plasmáticos en el rango de la normalidad en ayunas, y mueren sin desarrollar diabetes. Por tanto, las ratas de 24 meses constituyen un modelo interesante para el desarrollo de estrategias de prevención de la enfermedad.

Nosotros proponemos que las ratas Wistar envejecidas desarrollan mecanismos compensatorios en el hígado y el TAE para evitar la diabetes. Por un lado, en el TAE, disminuye la lipólisis y se impide el incremento de los niveles de ceramida, protegiendo los adipocitos de la apoptosis y contribuyendo a su hiperplasia. Por otro lado, en el hígado, se producen adaptaciones metabólicas, que mantienen la glucosa y los AG plasmáticos en valores normales, protegiendo de esta forma al páncreas, el cual a su vez garantiza la normoinsulinemia.

Nuestros resultados indican que a pesar de estar hipertrofiado, el TAE de las ratas resistentes a leptina sufre adaptaciones metabólicas para disminuir en lo posible la carga de AG sobre los tejidos magros. Así, a pesar de haber una gran disponibilidad de AG para la síntesis *de novo* de ceramidas en el TAE de los animales viejos, los niveles totales de este lípido no aumentan. Además, a juzgar por la expresión de ATGL, la HSL y DAGT-1, en los adipocitos de las ratas viejas disminuyen los procesos de lipólisis y aumentan los de esterificación, al igual que sucede en el tejido adiposo de humanos y roedores con resistencia a la insulina (Langin y col., 2005; Villena y col., 2004). Asimismo, la mayor expresión de la LPL en este tejido sugiere un aumento en la

captura de AG a partir de lipoproteínas plasmáticas, lo cual podría explicar los altos niveles de AG libres en el TAE. Asimismo, resultados anteriores de nuestro grupo (Pérez y col., 2004) han demostrado que la hiperleptinemia, muy probablemente vía SOCS3, induce resistencia a la insulina en los adipocitos, lo cual podría contribuir a la disminución de la lipogénesis en el TAE de las ratas viejas. En conjunto, estos resultados sugieren que en nuestro modelo experimental, la leptina, probablemente gracias a la hiperleptinemia, sigue siendo capaz de reducir la lipogénesis en el TAE y de evitar el incremento en los niveles de ceramida en este tejido, protegiéndolo de esta forma de la apoptosis e incrementando su capacidad de acumular grasas provenientes de tejidos periféricos. Por tanto, se podría especular que estos resultados plantean un posible mecanismo de supervivencia, gracias al cual las ratas Wistar envejecidas no llegan a desarrollar diabetes tipo II.

Por otro lado, nuestros datos sugieren que, a través de la inducción de FAT/CD36, posiblemente vía PPAR α y/o PGC-1 β , el hígado de las ratas resistentes a leptina ejerce su conocida función de neutralizar compuestos potencialmente tóxicos, como pueden ser los AG libres, derivados de un tejido adiposo hipertrofiado, transformándolos en derivados biológicamente inertes como son los TAG. Evidencia de esto es el mayor contenido de grasas en el hígado de las ratas viejas. En este sentido, la inducción de la SCD-1, así como de la ACC, que se observa en el hígado de las ratas resistentes a leptina incrementaría los niveles de malonil-CoA, el inhibidor de la CPT-1b, favoreciendo la incorporación de los AG provenientes del TAE a los TAG hepáticos. La insulina podría ser la responsable de la inducción de las enzimas lipogénicas en el hígado de las ratas viejas (Girard y col., 1994), ya que, aunque estos animales son normoinsulinémicos, sus picos de insulina son más elevados y más largos en el tiempo tras la ingesta de alimentos, en comparación con animales controles (Fermin, 2002). Además, según Serrano (2006), la señalización de insulina en el hígado de las ratas viejas sigue siendo comparable a la de las jóvenes. Los efectos de la insulina están mediados por el factor de transcripción SREBP-1c, ya que este juega un papel central en el control de la expresión de enzimas lipogénicas en el hígado, y sus niveles de mRNA están incrementados en el hígado de las ratas viejas, así como en otros modelos de roedores con esteatosis hepática (Shimomura y col., 1999).

Aunque en términos de expresión génica, nuestros resultados sugieren que en el hígado de las ratas viejas también estaría incrementada la oxidación de AG, lo cual también se ha descrito en humanos con esteatosis hepática (Sanyal y col., 2001), este incremento no parece ser suficiente para contrarrestar los elevados niveles de síntesis de TAG en el hígado, y podría constituir un estrés oxidativo, causando daño hepático, similar a lo que sucede en la esteato-hepatitis (Sanyal y col., 2001).

Finalmente, al haber una menor captura de glucosa ante un estímulo de insulina en el músculo y en el TAE en los animales viejos (Escrivá y col., 1997), y al estar en relativamente buenas condiciones la vía de señalización de la insulina en el hígado (Serrano, 2006), para mantener la normoglucemia, el hígado podría estar usando la glucosa para la síntesis *de novo* de AG. En línea con esta idea están los datos obtenidos por Clandinin y col., (1996), que observan una mayor expresión de la ATP citrato liasa en el hígado de ratones *ob/ob*, que en cuanto a la ausencia de los efectos de la leptina constituyen un caso extremo en comparación con nuestro modelo de rata. Para confirmar en nuestro modelo que el hígado está usando la glucosa para la síntesis *de novo* de AG, sería interesante analizar el grado de fosforilación de la isocitrato deshidrogenasa o los niveles de expresión de su quinasa en el hígado de los animales viejos, ya que se conoce que la fosforilación de esta enzima del ciclo de los ácidos tricarbónicos favorece la exportación del citrato desde la mitocondria al citosol, y por tanto, el uso de la acetil-CoA proveniente de la glicolisis para la síntesis *de novo* de AG.

Por tanto, sugerimos que el mayor contenido de grasas en el hígado, así como la consecuente hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, es el precio que pagan las ratas con resistencia central a la leptina por mantener la glucosa y los AG libres plasmáticos en niveles normales. Gracias a estas adaptaciones metabólicas que sufren el hígado y el TAE, el páncreas aún sigue siendo capaz de mantener la normoinsulinemia en ayunas.

Por otro lado, la disminución en la capacidad lipogénica del TAE con la edad, contrasta con el incremento de la capacidad lipogénica del hígado, a pesar del incremento de los niveles de expresión de SREBP-1c en ambos tejidos. Aunque existen diferencias entre adipocitos y hepatocitos, por ejemplo, en el mecanismo mediante el cual los PUFA reprimen la expresión de genes lipogénicos (Mater y col., 1998, 1999), los mecanismos básicos responsables de la regulación de la vía lipogénica son similares en ambos tejidos (Girard y col., 1994). La hiperleptinemia asociada al estado avejentado podría en parte explicar esta diferencia entre la capacidad lipogénica del hígado y el TAE en estos animales. Como ya hemos visto en ratas jóvenes, y también de acuerdo a lo descrito en la literatura (Bryson y col., 1999), la leptina inhibe la lipogénesis *in vivo* tanto en el hígado como en el TAE. Sin embargo, un efecto paracrino directo de altas concentraciones de leptina sobre el TAE podría justificar una acción más marcada de la hormona sobre los adipocitos *in vivo*. Además, la resistencia a insulina provocada por la hiperleptinemia en el TAE de las ratas viejas a través de SOCS3 (Pérez y col, 2004), podría inhibir el efecto estimulador de la insulina sobre la maduración proteolítica de SREBP-1c, bloqueando la expresión de sus genes diana.

Por otro lado, aunque es conocido que el SREBP-1c juega un papel central en la regulación de la expresión de genes lipogénicos, es necesario tener en cuenta que este factor de transcripción por sí solo es un activador débil de la transcripción, necesitando de otros factores de transcripción,

como el factor nuclear- γ y la proteína de especificidad-1 (Xiong y col., 2000), para desarrollar su actividad máxima. Por tanto, estudios futuros que aborden la expresión relativa de estos cofactores y su interacción con SREBP-1c en el hígado y el TAE, podrían ayudar a explicar la diferencia en la capacidad lipogénica del hígado y el TAE en las ratas con resistencia central a la leptina.

En cualquier caso, nuestros resultados están en concordancia con lo observado en el hígado y el tejido adiposo blanco de obesos humanos (Diraison y col., 2002) y roedores (Soukas y col., 2000; Nadler y col., 2000) y sugieren que la lipogénesis *de novo* en el TAE no es la causa primaria del incremento de la adiposidad en las ratas resistentes a leptina, sino que es el hígado el órgano lipogénico fundamental responsable de desarrollar y/o mantener una elevada adiposidad en un estado de resistencia central a la leptina.

Teniendo en cuenta que 1) una adiposidad incrementada está asociada a resistencia a la insulina, 2) en nuestro modelo de rata de 24 meses, el hígado es el responsable de la elevada adiposidad, 3) la hiperleptinemia sigue siendo capaz de reducir la lipogénesis en el TAE, pero no en el hígado, estamos tentados a especular que de los tejidos periféricos, el sitio primario donde se desarrolla la resistencia a la leptina es el hígado, lo cual es la antesala para la aparición de resistencia a insulina en músculo esquelético y tejido adiposo. Un fallo en la capacidad anti-lipogénica de la leptina en este órgano, aumentaría la lipogénesis hepática, lo cual provoca hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, incrementando el flujo de grasas al resto de los tejidos periféricos, conllevando resistencia a insulina. En concordancia con esta hipótesis están las observaciones de Lee y col., (1998) que detectan resistencia a insulina en individuos delgados normoglucémicos, pero con hígado graso. El mayor flujo de grasas hacia los adipocitos aumenta la masa del tejido, produciendo una mayor secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , así como hiperleptinemia. A su vez, los elevados niveles de leptina en sangre, vía SOCS3, inducen resistencia a la insulina en los adipocitos (Pérez y col., 2004), evitando el desarrollo de la obesidad mórbida característica de los ratones *ob/ob*. Paralelamente, la resistencia a la insulina en el TAE iría mermando cada vez más las acciones anti-lipolíticas de la hormona. Esto, sumado a la cada vez mayor masa del tejido adiposo, podría sobrepasar la capacidad de captura de AG por el hígado, resultando en el característico incremento de AG plasmáticos que precede la aparición de la hiperinsulinemia y la hiperglucemia del estado diabético.

Esta hipótesis no descarta que antes que en el hígado, la resistencia a la leptina podría desarrollarse en el sistema nervioso central. Además, podría justificar las discrepancias que existen en cuanto a si es el músculo esquelético o el tejido adiposo el primer órgano en desarrollar resistencia a la insulina, ya que el flujo de grasas desde el hígado estaría afectando a los dos tejidos a la vez.

Llegados a este punto podríamos decir que nuestros resultados coinciden con lo descrito en la literatura en cuanto al papel clave de la leptina como reguladora del peso y la composición corporal en los mamíferos. Se observó que la hormona actúa a nivel del SNC disminuyendo por un lado la ingesta, y por otro impidiendo la acumulación de energía en forma de grasa, de manera independiente de sus propiedades anorexígenas. Para lograr esto último, la leptina actuando solamente a través del sistema nervioso central ejerce efectos de manera específica de tejido en el hígado y en el tejido adiposo blanco, favoreciendo la lipólisis en el tejido adiposo, y la captura y oxidación por el hígado de los AG liberados por los adipocitos. Además, la hormona disminuye los niveles de ceramida en el tejido adiposo, protegiéndolo de esta forma de la lipotoxicidad y permitiendo un mejor funcionamiento de este tejido especializado en acumular grasas. Este efecto resulta en un menor vertido de grasas hacia tejidos magros como el hígado, con el consecuente incremento de la sensibilidad a insulina de los mismos, lo cual se evidencia de forma indirecta a través de la disminución de los niveles plasmáticos de insulina y a la mejoría en la capacidad de la insulina de promover la captura de AG plasmáticos.

Por otro lado, la leptina inhibe la síntesis *de novo* de AG en el hígado y en el tejido adiposo blanco. En el hígado, este efecto se consigue a través de la inhibición de la expresión génica de enzimas lipogénicas vía represión de la expresión de SREBP-1c, y resulta en una menor exportación de TAG al suero. En este sentido, la represión de SCD-1 por la leptina juega un papel clave en las propiedades anti-esteatóticas de la hormona.

En el TAE la leptina reduce la lipogénesis *de novo* a través de tres vías analizadas en este trabajo: 1) inhibición de la maduración proteolítica del factor de transcripción lipogénico SREBP-1c; 2) inhibición de la expresión génica de enzimas lipogénicas; 3) inhibición de la señalización de insulina en el adipocito desde etapas tempranas de la cascada como el IR y el IRS-1, hasta etapas tardías como la Akt2 y el GLUT4, posiblemente vía SOCS3.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es evidente que la señalización de leptina a nivel de SNC es vital para prevenir el aumento de peso corporal expresado en forma de adiposidad, y que el desarrollo de un estado de resistencia central a la hormona causa obesidad, lo cual podría derivar en Diabetes tipo II. Sin embargo, una vez instaurada la resistencia central a la leptina, podrían surgir adaptaciones metabólicas compensatorias en el hígado y el TAE, que prevengan el desarrollo de la enfermedad. De esta forma, el mantenimiento de la normoinsulinemia y la normoglucemia en ayunas se puede pagar con hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, factores que a su vez son conocidos por causar otras patologías, como infartos cerebrales y cardiovasculares, esteato-hepatitis, etcétera.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

La leptina actuando **solamente sobre el sistema nervioso central**:

- I. reduce la ingesta y el peso corporal
- II. de forma independiente de sus propiedades anorexígenas, la leptina ejerce los siguientes efectos a través del sistema nervioso central:
 1. provoca adaptaciones metabólicas específicas de tejido en el hígado y el TAE, que limitan la acumulación de TAG y AG libres en ambos tejidos y reducen el contenido de TAG en el suero. Algunos de los mecanismos moleculares que subyacen a estas acciones son los siguientes:
 - ? Los AG liberados por el aumento de la lipólisis mediada por ATGL y HSL en el TAE, son capturados y oxidados fundamentalmente por el hígado, donde vía PPAR? y PGC-1?, se incrementa la expresión de enzimas involucradas en la captura y ?-oxidación de AG.
 - ? En el hígado la leptina disminuye la lipogénesis a través de la inhibición de la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis *de novo* de AG, sobre todo de la SCD-1, vía reducción de la expresión génica de SREBP-1c.
 - ? En el TAE la leptina reduce la lipogénesis a través de los siguientes mecanismos moleculares:
 - ✍ promoviendo resistencia a la insulina desde etapas tempranas de la cascada de señalización de insulina, probablemente a través de SOCS3. Las alteraciones en la composición lipídica de la membrana plasmática del TAE, también podrían jugar un papel importante en este efecto de la leptina.
 - ✍ Inhibiendo la expresión de las enzimas involucradas de la síntesis *de novo* de AG y en la gliceroneogénesis, sin alterar la expresión de SREBP-1c, pero bloqueando la maduración proteolítica de este factor de transcripción lipogénico, mediante la inducción de INSIG-1
 2. en el TAE disminuye el contenido total de ceramidas, así como el perfil de AG de las mismas, a través de la inhibición de la síntesis *de novo* de ceramida y de su producción a partir de SM. Este efecto podría mejorar la función fisiológica del TAE de actuar como tampón de las grasas en el organismo, protegiéndolo de la lipoapoptosis.
 3. Potencia la acción de un estímulo agudo e *in vivo* de insulina sobre la captura periférica de AG. Este efecto se debe a la capacidad de la leptina central de inhibir la lipogénesis y de promover la ?-oxidación de los AG en los tejidos periféricos y no a una potenciación de las acciones anti-lipolíticas de la insulina en el TAE.

En un estado de **resistencia central a la leptina**:

- III. aumenta la adiposidad y el contenido de grasas en el hígado y el suero
- IV. la incrementada lipogénesis en el hígado, y no en el TAE, es la responsable de la elevada adiposidad, explica en parte la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia de estos animales, y podría ser el sitio periférico primario del fallo de la señalización de leptina que precede al desarrollo de la resistencia a insulina en el tejido adiposo y el músculo esquelético.
- V. La disminución de la lipólisis y de la lipogénesis, el aumento de la esterificación y el mantenimiento de los niveles de ceramida en valores normales en el TAE, posiblemente gracias a la hiperleptinemia, permiten la hiperplasia de este tejido, constituyendo una adaptación metabólica de supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB 2001 Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-33
- Adams JM, Pratipanawat T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ 2004 Ceramide Content Is Increased in Skeletal Muscle From Obese Insulin-Resistant Humans. *Diabetes* 53:25-31
- Aiston S y Agius L. 1999 Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes*. 48:15-20.
- Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD 2002 Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis *J Biol Chem* 277:29424-30
- Backer JM, Myers MG Jr, Sun XJ, Chin DJ, Shoelson SE, Miralpeix M, White MF. 1993 Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells. *J Biol Chem*. 268:8204-12.
- Bado A., Levasseur A., Attoub S. 1998 The stomach is a source of leptin. *Nature*. 394:790-3.
- Banks W, DiPalma C, Farrell C. 1999 Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*. 20:1341-5.
- Barr V, Malide D, Zarnowski M, Taylor S, Cushman S. 1997 Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 138:4463-72.
- Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. 1997 Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest*. 100:3105-10.
- Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, Lok S, Weigle DS, Erickson JC, Palmiter RD, Schwartz MW. 1998 Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes*. 47:538-43.
- Bates SH, Myers MG Jr. 2003 The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab*. 14:447-52.
- Berti L, Gammeltoft S. 1999 Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2. *Mol Cell Endocrinol*. 157:121-30.
- Bjorbaek C, Kahn BB. 2004 Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*. 59:305-31.
- Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. 1997 Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 272:32686-95.

- Blank ML, Smith ZL, Snyder F. 1993 Arachidonate-containing triacylglycerols: biosynthesis and a lipolytic mechanism for the release and transfer of arachidonate to phospholipids in HL-60 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1170:275-82.
- Blazquez C, Geelen MJ, Velasco G, Guzman M 2001 The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBBS Lett* 489:149-53
- Boden G. 2003 Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 111:121-4.
- Boeuf S, Klingenspor M, Van Hal NL, Schneider T, Keijer J, Klaus S. 2001 Differential gene expression in white and brown preadipocytes. *Physiol Genom*. 7:15-25.
- Bradford M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-54.
- Bradley R y Cheatham B. 1999 Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes*. 48:272-79.
- Bradley R, Cleveland K, Cheatham B. 2001 The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. *Recent Prog. Horm. Res*. 53:329-58.
- Brenner RR. 2003 Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 68:151-62.
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls Jr. HR, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. 2003 The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 278:11303-11
- Brooks B, Arch JRS, Newsholme EA. 1982 Effects of hormones on the rate of the triacylglycerol/fatty acid substrate cycle in adipocytes and epididymal fat pads. *FEBS Lett*. 146:327-30
- Brown A, Sun L, Feramisco J, Brown M, Goldstein J 2002 Cholesterol Addition to ER Membranes Alters Conformation of SCAP, the SREBP Escort Protein that Regulates Cholesterol Metabolism. *Molecular Cell* 10:237-245
- Brown RE, 1998 *J Cell Sci* 111: 1-9
- Bryson JM, Phuyal JL, Swan V, Caterson ID. 1999 Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice. *Am J Physiol*. 277:E417-22
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. 1996 Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology*. 137:151-9.
- Casanueva F y Dieguez C. 1999 Neuroendocrine regulations and actions of leptin. *Front. Neuroendocrinol*. 20:317-63.

- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. 2002 Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 16:1163-1176
- Ceddia y col., 1999 *Int.J.Obes* 23:1207-1212
- Chatterjee S 1998 Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1523-33.
- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA 2003 A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids. *J Biol Chem* 278:10297-10303
- Chavez JA, Summers SA 2003 Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419:101-9
- Chen CS, Rosenwald AG, Pagano RE. 1995 Ceramide as a modulator of endocytosis. *J Biol Chem.* 270:13291-7
- Chinookoswong N, Wang JL, Shi ZQ. 1999 Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes.* 48:1487-92.
- Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. 1999 Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem.* 274:37335-9.
- Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Lee R, Leibel RL. 1996 Genomic structure of the human OB receptor and identification of two novel intronic microsatellites. *Genome Res.* 6:1192-9.
- Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR. 1996 Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med.* 2:585-9.
- Clandinin MT, Cheema S, Pehowich D, Field CJ. 1996 Effect of polyunsaturated fatty acids in obese mice. *Lipids.* 31 Suppl:S13-22
- Clarke SD. 2001 Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 131:1129-32.
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. 2002 Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 297:240-243
- Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM. 2000 Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr.* 20:77-103.
- Commins SP, Watson PM, Levin N, Beiler RJ, Gettys TW. 2000 Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different β -adrenoceptor subtypes. *J Biol Chem* 275:33059-33067

- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 334:292-5.
- Cook HW, Spence MW. 1985 Triacylglycerol as a precursor in phospholipid biosynthesis in cultured neuroblastoma cells: studies with labeled glucose, fatty acid, and triacylglycerol. *Can J Biochem Cell Biol.* 63:919-26.
- Cusin I, Zakrzewska KE, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F. 1998 Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes.* 47:1014-9.
- De Catalfo GEH, de Gomez Dumm 1998 Lipid dismetabolism in Leydig and Sertoli cells isolated from streptozotocin-diabetic rats. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:1001-1010
- Del Rio G. 2000 Adrenomedullary function and its regulation in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Jun;24 Suppl 2:S89-91.
- Della-Fera MA, Qian H, Baile CA 2001 Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin, *Diabetes Obes Metab* 3:299–310
- DeVos P, Lefebvre A, Miller S. 1996 Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Clin. Invest.* 98:1004-9.
- Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M, Beylot M. 2002 Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E46-51
- Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM 2005 Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency reduces ceramide synthesis by downregulating serine palmitoyltransferase and increasing β -oxidation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E599-E607
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. 1999 Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity *Clin Invest.* 103: 253–259.
- Duerden JM, Gibbons GF. 1990 Storage, mobilization and secretion of cytosolic triacylglycerol in hepatocyte cultures. The role of insulin. *Biochem J.* 272:583-7
- Ekroos K, Chernushevich IV, Simons K, Shevchenko A 2002 Quantitative profiling of phospholipids by multiple precursor ion scanning on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 74:941
- Elimam A, Kamel A, Marcus C 2002 In vitro effects of leptin on human adipocyte metabolism. *Horm Res.* 58:88-93

- Elmquist J, Bjorbaek C, Ahima R, Flier J, Saper C. 1998 Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395:535-47.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, Van Obberghen E. 2001 SOCS3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276:47944-47949
- Escrivá F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascual-Leone AM, Andres A, Satrustegui J, Carrascosa JM. 1997 In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology.* 138:49-54
- Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. 1999 Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala – ventral striatal subsystems. *Ann. NY Acad. Sci.* 877:412-38.
- Fabris R, Nisoli E, Lombardi AM, Tonello C, Serra R, Granzotto M, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Federspil G, Carruba MO, Vettor R. 2001 Preferential channeling of energy fuels toward fat rather than muscle during high free fatty acid availability in rats. *Diabetes.* 50:601-8.
- Faix D, Neese R, Kletke C, Wolden S, Cesar D, Coutlangus M, Shackleton CHL, Hellersteinl MK. 1993 Quantification of menstrual and diurnal periodicities in rates of cholesterol and fat synthesis in humans. *J Lipid Res.* 34:2063-75
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM 1997 Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7001-5
- Feller SM. 2001 Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene.* 20:6348-71.
- Fermin Y. 2002 Cambios en la sensibilidad a la insulina durante el envejecimiento de la rata wistar. Alteraciones en las vías lipogénicas y lipolíticas en el tejido adiposo perirrenal. Tesis Doctoral, UAM.
- Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Peralta S, Arribas C, Andrés A, Carrascosa JM, Ros M. 2002. Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in Wistar rats. *Diabetologia* 45:997-1003
- Folch J, Lee M, Stanley GH 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:479-509
- Forouhi NG, Jenkinson G, Thomas EL, Mullick S, Mierisova S, Bhonsle U, McKeigue PM, Bell JD. 1999 Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and South Asian men. *Diabetologia.* 42:932-5.
- Frayn KN. 2002 Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* 45:1201-10.
- Friedman JM. 2002 The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev.* 60(10Pt2): S1-14; discussion S68-84, 85-7.

- Fruhbeck G y Salvador J. 2000 Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*. 43:3-12.
- Frühbeck G, Aguado M, Gómez-Ambrosi J, Martínez JA. 1998 Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 250:99-102
- Frühbeck G, Aguado M, Martínez JA. 1997 In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 240:590-4.
- Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. 2004 Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2024-2034.
- Ghilardi N y Skoda RC. 1997 The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*. 11:393-9.
- Girard J, Perdureau D, Foufelle F, Prip-buus C, Ferre P. 1994 Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J*. 8:36-42. Review
- Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm JL. 1995 Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*. 95:2195-204.
- Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. 2003 Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 278:8199-8211
- Grillo S, Gremeaux T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J. 1999 Potential role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *FEBS Lett*. 461:277-9.
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Stepan CM, Lazar MA. 2002 A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*. 8:1122-8.
- Guerre-Millo M. 1997 Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Biomed Pharmacother*. 51:318-23.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM. 1997 Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8878-8883
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-6.

- Hanada K 2003 Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1632:16-30
- Hanada K, Hara T, Nishijima M 2000 D-Serine inhibits serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the initial step of sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett* 474:63-5
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM 2001 Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling. *Biochemistry* 40:4893-4903
- Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T 1999 Role of the sympathetic nervous system and insulin enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48:1706-1712
- Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. 1996 Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:4406-13.
- Hechtberger P, Zinser E, Saf R, Hummel K, Paltauf F, Daum G 1994 Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 225:641-9.
- Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P, Foufelle F 2005 Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:791-796
- Hileman S, Pierroz D, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks W, Flier J. 2002 Characterization of short isoforms of the leptin receptor in the rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology.* 143:775-83.
- Hoggart N, Haggarty P, Thomas L, Lea R. 2001 Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem. Soc. Trans.* 29:57-63.
- Hotamisligil GS. 2003 Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27:S53-5.
- Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA. 2006b Insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol. Biol. Cell* 16:2614-2623
- Huang W, Dedousis N, Bandi A, Lopaschuk GD, O'Doherty RM 2006 Liver triglyceride secretion and lipid oxidative metabolism are rapidly altered by leptin in vivo. *Endocrinol* 147:1480-1487.
- Igal RA, Coleman RA. 1996 Acylglycerol recycling from triacylglycerol to phospholipid, not lipase activity, is defective in neutral lipid storage disease fibroblasts. *J Biol Chem.* 271:16644-51
- Igal RA, Mandon EC, de Gomez Dumm INT 1991 Abnormal metabolism of polyunsaturated fatty acids in adrenal glands of diabetic rats. *Mol. Cell Endocr.* 77:217-227

- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O. 1994 Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci.* 19:222-7.
- Inoue M, Chiang SH, Chang L, Chen XW, Saltiel AR 2006 Compartmentalization of the Exocyst Complex in Lipid Rafts Controls Glut4 Vesicle Tethering. *Mol Biol Cell* 17:2303-2311
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW 2004 Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities, *J. Biol. Chem.* 279:48968–48975
- Jéquer E y Tappy L. 1999 Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79:451-80.
- Kahn BB. 1998 Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell.* 92:593-6.
- Kahn CR. 1978 Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism.* 27:1893-902.
- Kakuma T, Lee Young, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger R 2000 Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *PNAS* 97:8536-8541
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ 1997 Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389:374-377
- Kastin A y Pan W. 2000 Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul. Pept.* 92:37-43.
- Kellerer M, Lammers R, Ermel B, Tippmer S, Vogt B, Obermaier-Kusser B, Ullrich A, Haring HU 1992 Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry* 31:4588-96
- Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LAW, Peroni O, Katic M, Flier JS 2006 Adipose Triglyceride Lipase: Function, Regulation by Insulin, and Comparison With Adiponutrin. *Diabetes* 55: 148-157
- Kieffer TJ, Habener JF. 2000 The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278:E1-E14.
- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. 1998 Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest.* 101:1-9.
- Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, Smas CM. 2006 The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E115-E127.

- Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB 2000 In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 141:2328-2339
- Kimura A, Baumann CA, Chiang SH, Saltiel AR. 2001 The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:9098-103.
- King GL y Johnson S. 1985 Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science.* 227:1583-6.
- Kraus D, Fasshauer M, Ott V, Meier B, Jost M, Klein HH, Klein J 2002 Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes. *J Endocrinol* 175:185-191
- Krebs DL, Hilton DJ. 2001 SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* 19:378-87.
- Krebs DL, Hilton DJ. 2003 A new role for SOCS in insulin action. *Suppressor of cytokine signaling.* *Sci STKE.* 169:PE6.
- Kumagai K, Yasuda S, Okemoto K., Nishijima M, Kobayashi S, Hanada K. 2005 *J Biol Chem* 280:64488-64495
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. 2000 Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res.* 871(1):50-6.
- Laemmli UK. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lange Y, Swaisgood MH, Ramos BV, Steck TL. 1989 Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 264:3786-93
- Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P. 2005 Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes.* 54:3190-7.
- Lee G, Proenca R, Montez J. 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 379:632-5.
- Lee JH, Rhee PL, Lee JK, Lee KT, Kim JJ, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. 1998 Role of hyperinsulinemia and glucose intolerance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver in patients with normal body weight. *Korean J Intern Med.* 13:12-4.
- Lee Y, Naseem RH, Duplomb L, Park BH, Garry DJ, Richardson JA, Schaffer JE, Unger RH 2004 Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 101: 13624–13629
- Lee Y, Wang MY, Kakuma T, Wang ZW, Babcock E, McCorkle K, Higa M, Zhou YT, Unger RH. 2001 Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hiperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 276:5629-5635

- Leibowitz SF y Hoebel BG. 1998 Behavioral neuroscience of obesity. En: Bray, Bouchard y James, ed. Handbook of obesity. Marcel Dekker, Inc pp:314-58.
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. 2002 Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23:201-29.
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS 2002 *J. Biol. Chem.* 277:9520–9528
- Liebisch G, Binder M, Schifferer R, Langmann T, Schultz B, Schmidt G 2006 High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta.* 1761:121-8
- Lin J, Choi YH, Hartzell DL, Li C, Della-Fera MA, Baile CA. 2003 CNS melanocortin and leptin effects on stearoyl-CoA desaturase-1 and resistin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 311:324-8.
- Liu J, Kimura A, Baumann CA, Saltiel AR. 2002 APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 22:3599-609.
- Liu L, Karkanas GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J, Rossetti L. 1998 Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem.* 273:31160-7.
- Liu P, Leffler BJ, Weeks LK, Chen G, Bouchard M, Strawbridge AB, Elmendorf S. 2004 *Am. J. Physiol.* 286:C317-C329
- Livak K, Schmittgen T. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
- Long SD y Pekala PH. 1996 Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J.* 319:179-84.
- Lopez Jimenez JA, Bordoni A, Hrelia S, Rossi CA, Turchetto E, Zamora S, Piagi PL. 1993 Evidence for a detectable delta-6-desaturase activity in rat heart microsomes: aging influence on enzyme activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:1037-1041
- Magaña MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF. 2000 Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem.* 275:4726-33
- Mairal A, Langin D, Arner P, Hoffstedt J 2006 Human adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* 49:1629-36
- Maresh G, Maness L, Zadina J, Kastin A. 2001 In vitro demonstration of a saturable transport system for leptin across the blood-brain barrier. *Life Sci.* 69:67-73.
- Marignani PA, Epand RM, Sebaldt RJ. 1996 Acyl Chain Dependence of Diacylglycerol Activation of Protein Kinase C Activity in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 225:469-73

- Massague J y Czech MP. 1982 Role of disulfides in the subunit structure of the insulin receptor. Reduction of class I disulfides does not impair transmembrane signalling. *J Biol Chem* 257:6729-38.
- Mater MK, Pan D, Bergen WG, Jump DB. 1998 Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *J Lipid Res.* 39:1327-34
- Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB 1999 Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem.* 274:32725-32
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hastly A, Tamura Y, Osuga J, Okasaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. 2002. Dual regulation of mouse Δ -5 and Δ -6 desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR α . *Lipid Res.* 43:107-114
- McGarry JD. 2002 Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51:7-18.
- Meegalla RL, Billheimer JT, Cheng D. 2002 Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 298:317-23
- Milagro F y Marques-López I. 2002 Nervous system and obesity. *ANALES Sis San Navarra.* 25:41-52.
- Minokoshi Y, Haque MS, Shimazu T 1999 Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48:287-91
- Minokoshi Y, Kahn BB. 2003 Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem Soc Trans.* 31:196-201.
- Minokoshi Y, Kim Y, Peroni O. 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 415:339-43.
- Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. 2001 A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.*42:1018-1024
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y 2005 Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J* 390:263–271
- Mohamed-Ali V, Pinkney J, Coppack S. 1998 Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Relat. Metab. Disord.* 22:1145-58.
- Müller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G. 1997 Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272:10585-10593.

- Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek Jr FT, Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL 1997 Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46:1360-3
- Muzumdar R, Ma X, Yang X, Atzmon G, Bernstein J, Karkanas G, Barzilai N. 2003 Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *FASEB J.* 17:1130-2.
- Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. 2000 The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11371-6
- Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. 2000 Regulation of hepatic Δ -6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene. *J. Nutr.* 130:1561-1565
- Nara T, He W, Tang C, Clarke S, Nakamura M. 2002 The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human Δ -6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 296: 11-117
- Ntambi JM. 1995 The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res.* 34:139-50.
- Opekarova M, Tunner W. 2003 Specific lipid requirements of membrane proteins--a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta.* 1610:11-22.
- Orci L, Cook WS, Ravazzola M, Wang M, Park BH, Montesano R, Unger RH 2004 Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *PNAS* 101:2058-2063
- Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P. 2001 *J Biol Chem.* 276: 9670-9678
- Paxinos G y Watson C. 1997 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Compact 3rd Edition, Academic Press, San Diego.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269:540-3.
- Pérez C, Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Arribas C, Andres A, Ros M, Carrascosa JM. 2004 Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53:347-53
- Pessin JE, Saltiel AR. 2000 Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.*106:165-9.
- Pierini LM, Maxfield FR 2001 Flotillas of lipid rafts fore and aft. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9471-3
- Pohl J, Ring A, Korkmaz U, Eehalt R, Stremmel W. 2005 *Mol. Biol. Cell* 16:24-31
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. 2006 Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 136:873-6. Review

- Porstmann T, Griffiths B, Chung JL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A. 2005 PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene*. 24:6465-81
- Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW. 1998 Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*. 41:863-81.
- Rajala MW, Scherer PE 2003 Minireview: The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 144:3765-73
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. 1963 The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of Diabetes mellitus. *Lancet*. i:785-9.
- Randle PJ, Kerbey AL, Espinal J. 1988 Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. *Diabetes Metab Rev*. 4:623-38.
- Ranganathan S, Ciaraldi TP, Henry RR, Mudaliar S, Kern PA. 1998 Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology* 139:2509-2513
- Reaven GM. 1995 The fourth musketeer--from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*. 38:3-13.
- Ridgway ND. 2000 *Biochim Biophys Acta* 1484: 129-141
- Robbins TW y Everitt BJ. 1996 Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*. 6:228-36.
- Roden M, Perseghin G, Petersen KF, Hwang JH, Cline GW, Gerow K, Rothman DL, Shulman GI. 1996 The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J Clin Invest*. 97:642-8.
- Roh C., Roduit R., Thorens B., Fried S., Kandror K. 2001 Lipoprotein lipase and leptin are accumulated in different secretory compartments in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 276:35990-4.
- Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. 1996 Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3424-7.
- Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, Wu J, Wang J. 1997 Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem*. 272:27758-63.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF 2002 SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*. 277:42394-8
- Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. 2000 Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 49:749-58.

- Saladin R, DeVos P, Guerre-Millo M. 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377:527-9.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Saltiel AR. 2001 New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104:517-29.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989 *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Margalet V. 1999 Modulation of insulin receptor signalling by pancreastatin in HTC hepatoma cells. *Diabetologia*. 42:317-25.
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. 2001 Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 120:1183-92.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. 2002 The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*. 36:199-211.
- Sarmiento U, Benson B, Kaufman S, Ross L, Qi M, Scully S, DiPalma C. 1997 Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of C57BL/6 mice. *Lab Invest*. 77:243-56.
- Schaffer JE. 2002 Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E239-46.
- Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. 1999 Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am. J. Clin. Nutr*. 69:584-96.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 98:1101-6.
- Seino S, Bell GI. 1989 Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 159:312-6.
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA 2003 Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 278:13740-6
- Serrano R, Villar M, Martinez C, Carrascosa JM, Gallardo N, Andrés A. 2005 Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. *J Mol Endocrinol* 34:153-161
- Serrano R. 2006 Regulación de la expresión del receptor de insulina y sus sustratos. Efecto del tratamiento in vivo con insulina sobre la señalización de la hormona en hígado y músculo esquelético de rata con el envejecimiento. Tesis Doctoral, UCLM.

- Sessler AM y Ntambi JM. 1998 Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Nutr.* 128:923-6.
- Shi H, Cave B, Inouye K, Bjørbæk C, Flier JS 2006 Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes* 55:699-707
- Shi H, Tzamei I, Bjørbæk C, Flier JS: Suppressor of Cytokine Signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signalling. *J Biol Chem* 279:34733-34740, 2004
- Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH 1998 Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem*, 273:32487-32490
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. 1997 Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4637-41
- Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. 1999 Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274:30028-30032
- Simpson IA, Yver DR, Hissin PJ, Wardzala LJ, Karnieli E, Salans LB, Cushman SW 1983 Insulin-stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 763:393-407
- Sindelar DK, Chu CA, Rohlie M, Neal DW, Swift LL, Cherrington AD. 1997 The role of fatty acids in mediating the effects of peripheral insulin on hepatic glucose production in the conscious dog. *Diabetes.* 46:187-96
- Sivitz WI, Fink BD, Morgan DA, Fox JM, Donohoue PA, Haynes WG. 1999 Sympathetic inhibition, leptin, and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats. *Am J Physiol.* 277:E668-77.
- Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* 271:5301-4.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP 1999 Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304
- Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C. 2000 Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut.* 47:178-83.
- Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. 2000 Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 14:963-80.
- Spiegelman BM, Flier JS. 2001 Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104:531-43.

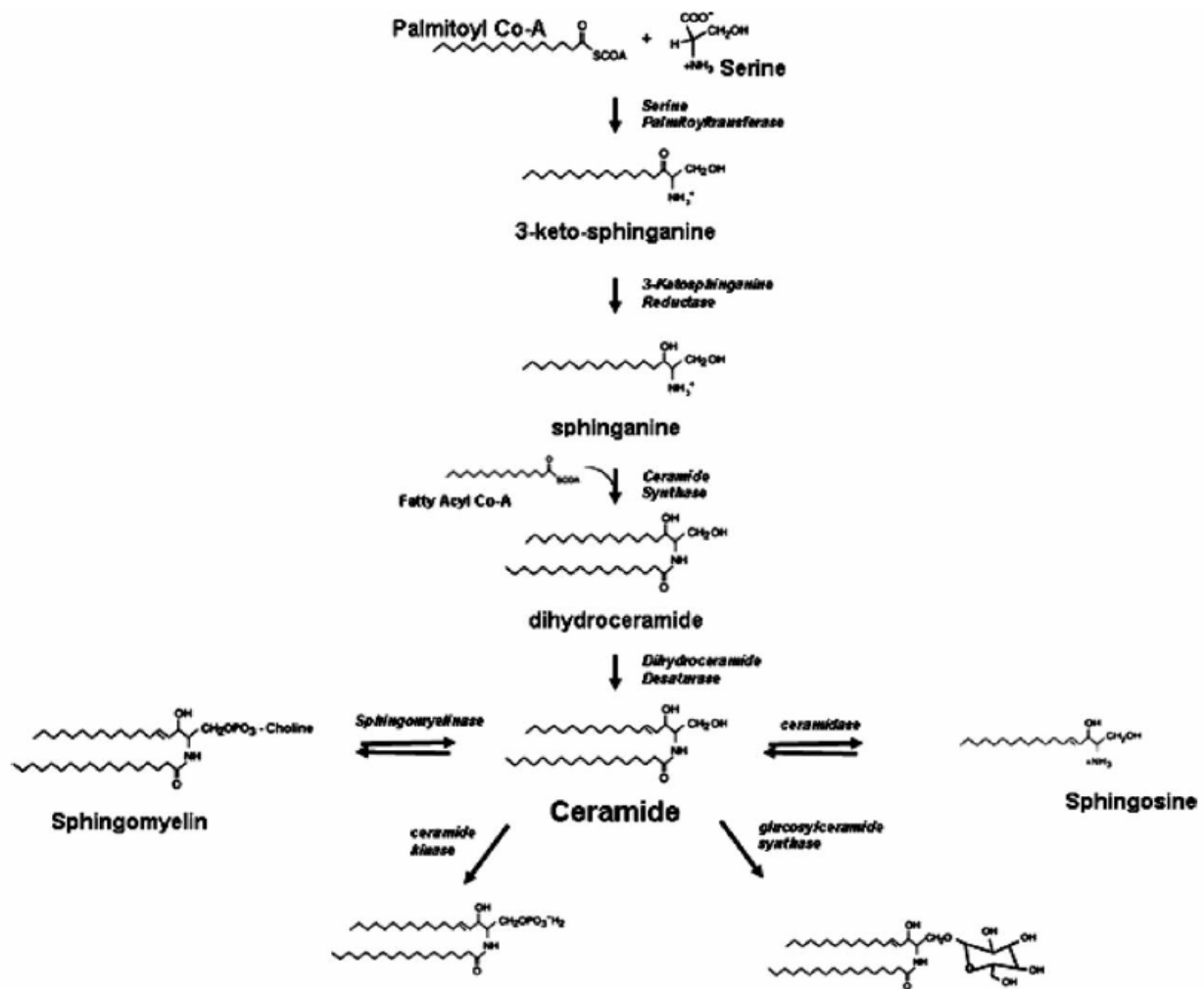
- Standaert ML, Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, Farese RV. 2001 Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry*. 40:249-55.
- Stein DT, Dobbins R, Szczepaniak L, Malloy C, McGarry JD. 1997 Skeletal muscle triglyceride stores are increased in insulin resistance (Abstract). *Diabetes* 46:23A.
- Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD 1996 Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest*. 97:2728-35.
- Steinberg GR, Bonen A, Dyck DJ. 2002 Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E593-600.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.
- Stokoe D, Stephens L, Copeland T, et al: Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (Wash. DC)* 277:567-70, 1997
- Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczkowska S, Kinalska I, Baranowski M, Zendzian-Piotrowska M, Brzezinska Z, Gorski J.. 2004 Relationship Between Insulin Sensitivity and Sphingomyelin Signaling Pathway in Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 53:1215-1221
- Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK. 2004 Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286:E577-88.
- Summers SA. 2006 Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res*. 45:42-72.
- Sweeney G, Keen J, Somwar R, Konrad D, Garg R, Klip A. 2001 High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in I6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 142:4806-12.
- Szanto I, Kahn CR. 2000 Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2355-60.
- Tartaglia L., Dembski M., Weng X. Identification and expression cloning of a leptin receptor, Ob-R. *Cell*. 1995; 83:1263-71.
- Taylor RF, Parks LW. 1979 Triacylglycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relation to phospholipid synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 575:204-14.
- Taylor SI, Arioglu E. 1998 Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 9:419-39.
- Tontonoz P, Graves R, Budavari A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Temps P, Spiegelman B. 1994 Adipocyte-specific transcription factor ARF 6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, and RXR. *Nucleic Acids Res*. 22:5628-34.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4.
- Tozzo E, Gnudi L, Kahn BB 1997 Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. *Endocrinology* 138:1604-11
- Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1990 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 265:16880-5
- Ueki K, Kondo T, Kahn R. 2004 Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol.* 24:5434-46
- Unger RH, Orci L 2001 Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 15:312-21
- Unger, RH 2003 Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 144:5159–5165
- Van Obberghen E, Baron V, Delahaye L, Emanuelli B, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Lebrun P, Mothe-Satney I, Peraldi P, Rocchi S, Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, Giudicelli J. 2001 Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest.* 31:966-77.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. 2000 The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 346:561-76.
- Vanpatten S, Karkanas GB, Rossetti L, Cohen DE. 2004 Intracerebroventricular leptin regulates hepatic cholesterol metabolism. *Biochem J.* 379:229-33
- Vereschagina N, Wilson C. 2006 Cytoplasmic activated protein kinase Akt regulates lipid-droplet accumulation in *Drosophila* nurse cells. *Development.* 133:4731-5
- Villar M, Serrano R, Gallardo N, Carrascosa JM, Martínez C, Andrés A. 2006 Altered subcellular distribution of IRS-1 and IRS-3 is associated with defective Akt activation and GLUT4 translocation in insulin-resistant old rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1763:197-206
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul, HS. 2004 Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. 279:47066-75.
- Virkamaeki A, Ueki K, Kahn CR. 1999 Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931-943
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998 A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 393:684-8.
- Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ. 1999a Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology* 140:2117-2124

- Wang ZW, Zhou YT, Kakuma T, Lee Y, Higa M, Kalra SP, Dube MG, Kalra PS, Unger RH 1999b Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10373-8
- Warnock DE, Roberts C, Lutz MS, Blackburn WA, Young Jr WW, Baenziger U 1993 Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. *J Biol Chem.* 268:10145-53
- William WN, Ceddia RB, Curi R 2002 Leptin controls the fate of fatty acids in isolated rat white adipocytes. *J Endocrinol* 175:735-744
- Wong ML, Licinio J, Yildiz BO, Mantzoros CS, Prolo P, Kling M, Gold PW. 2004 Simultaneous and continuous 24-hour plasma and cerebrospinal fluid leptin measurements: dissociation of concentrations in central and peripheral compartments. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:258-65.
- Worgall TS, Johnson RA, Seo T, Gierens H, Deckelbaum RJ 2002 Unsaturated Fatty Acid-mediated Decreases in Sterol Regulatory Element-mediated Gene Transcription Are Linked to Cellular Sphingolipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 277: 3878-3885
- Worgall TS, Juliano RA, Seo T, Deckelbaum RJ 2004 Ceramide Synthesis Correlates with the Posttranscriptional Regulation of the Sterol-Regulatory Element-Binding Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 24:943-948
- Xiong S, Chirala SS, Wakil SJ. 2000 Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3948-53
- Xiong Y, Miyamoto N, Shibata K, Valasek MA, Motoike T, Kedzierski RM, Yanagisawa M. 2004 Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1045-50.
- Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D, Uyeda K. 2001 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9116–9121
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS 2002 Crucial Step in Cholesterol Homeostasis. Sterols Promote Binding of SCAP to INSIG-1, a Membrane Protein that Facilitates Retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500
- Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N. 2003 Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol.* 17:1240-54.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. 2002 Mechanism by Which Fatty Acids

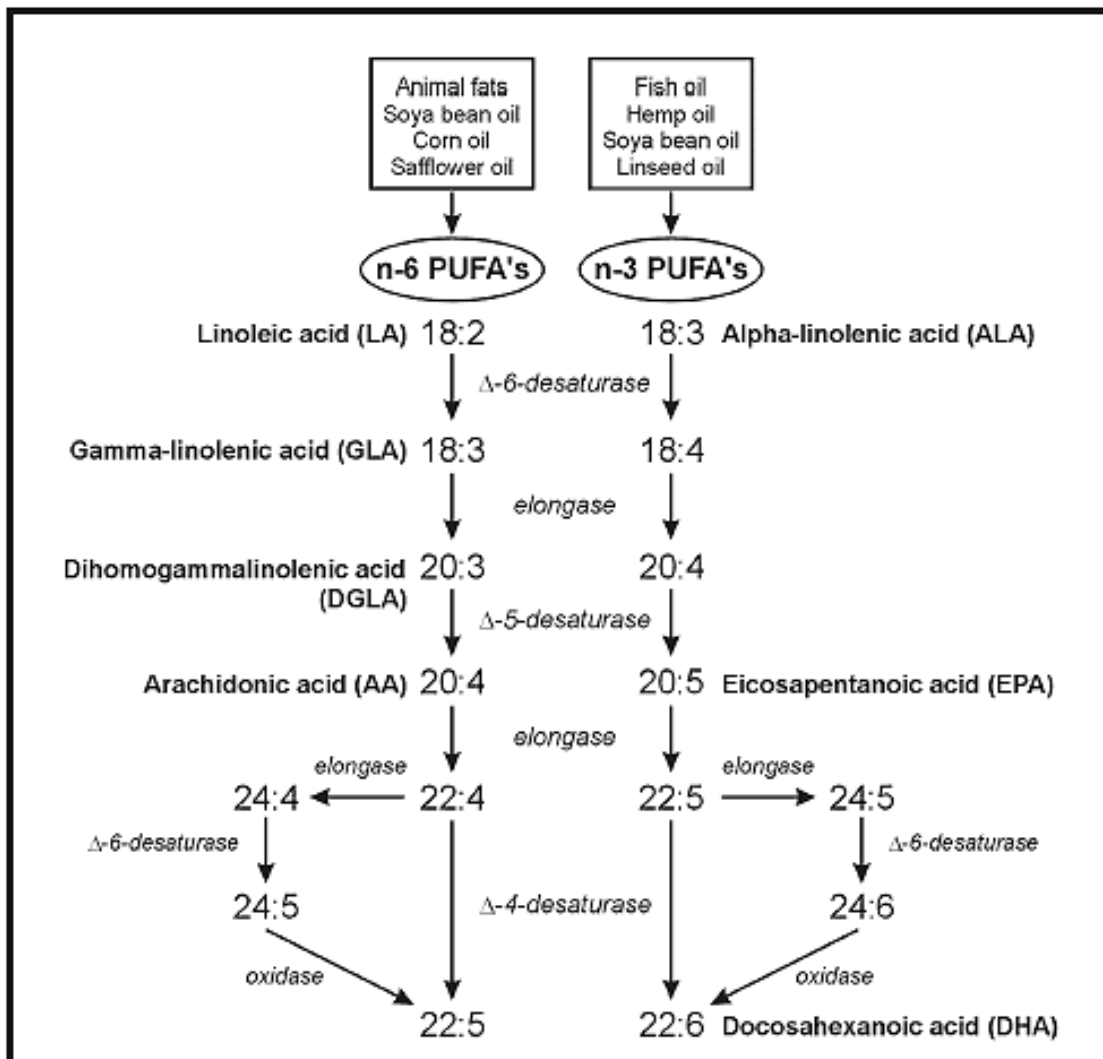
- Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. *J Biol Chem.* 277:50230-50236.
- Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. 2003 The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett.* 546:45-50.
- Zastrow O, Seidel B, Kiess W, Thiery J, Keller E, Bottner A, Kratzsch J. 2003 The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27:1472-8.
- Zhang H, Kumar S, Barnett A, Eggo M. 2000 Tumor necrosis factor alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol. Cell Endocrinol.* 159:79-88.
- Zhang Y, Proenca R, Maffie M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-32.
- Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A. 2002 A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci.* 5:727-8.
- Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH 2000 Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 97:1784-9
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R 2004 Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306:1383 – 1386
- Zobolotny J, Bence-Hanulee K, Stricker-Krongrad A. 2002 PTP 1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell.* 2:385-7.

8 ANEXO I



Esquema representando las reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis y degradación de ceramida. (Tomado de Summers, 2006)

9 ANEXO II



Esquema representando las reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis de los PUFA (Tomado de <http://www.medpharm.co.za/safp/2002/may/images/fatty01.gif>).