



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH,
LA INGESTA Y EL METABOLISMO LIPÍDICO
POR PÉPTIDOS DERIVADOS DEL GEN DE
GHRELIN

María Jesús VÁZQUEZ VILLAR

2009



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Dr. Carlos Diéguez González, Catedrático del Departamento de Fisiología

Certifica que:

la presente Tesis Doctoral titulada **“Regulación de la Secreción de GH, ingesta y el metabolismo de lípidos por péptidos derivados del gen de ghrelin”**, elaborada por María Jesús Vázquez Villar, ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que conste firmo la presente autorización en Santiago de Compostela, 2009

Fdo: Carlos Diéguez González

Fdo: María Jesús Vázquez



**CIBER FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD
Y LA NUTRICIÓN**

“En esta vida la paciencia ha de ser el pan de cada día; pero la necesitamos en particular para nosotros, porque nadie se nos hace tan pesado como nosotros mismos”

San Francisco de Sales

A mi familia

INTRODUCCIÓN.....	1
I. Regulación de la Ingesta.....	1
1. Señales periféricas.....	4
♦ <u>Páncreas</u>	4
- Insulina.....	4
♦ <u>Tejido Adiposo</u>	5
- Leptina (OB).....	6
1. Características generales.....	6
2. Receptor.....	6
3. Mecanismo de acción	7
4. Vías de señalización.....	9
5. Otras Funciones.....	11
. Reproducción.....	11
. GH.....	13
. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	15
. Eje corticoadrenal.....	15
. Prolactina.....	16
- Resistina (RSTN).....	17
1. Características generales.....	17
2. Funciones.....	17
. Inhibición de la ingesta.....	17
. Resistina y Obesidad.....	18
. Resistina, Resistencia a insulina y DMII.....	18
. Resistina e inflamación.....	20
- Adiponectina (ADPN).....	21
1. Características generales.....	21
2. Receptor.....	21
3. Mecanismo de acción.....	22
4. Otras funciones.....	23
- IL6.....	24
- TNF- α	25
- Visfatina.....	25
- TGF- β	26
- Otras adipoquinas.....	27
♦ <u>Tracto Gastrointestinal</u>	28
- Colecistoquinina (CCK).....	28
- Ghrelin.....	29
- Oxintomodulina.....	30
- GLP-1.....	30
- Polipéptido pancreático (PP).....	31
- PYY.....	31

2. CNS	33
♦ Hipotálamo.....	33
- Arcuato (ARC).....	34
. NPY.....	35
. AgRP.....	36
. POMC-Sistema Melanocortinas.....	37
. CART.....	39
- Ventromedial (VMN).....	40
- Lateral (LHA).....	42
. Orexinas.....	43
. MCH.....	44
- Pariventricular (PVN).....	46
- Dorsomedial (DMN).....	47
- Otros factores hipotalámicos.....	47
. Núcleo Supraquiasmático (SCN).....	47
. Intracelulares.....	48
a. AMPK y Metabolismo de lípidos.....	48
b. mTOR.....	50
. Sistema endocanabinoides.....	51
♦ Tronco cerebral.....	53
♦ Otros mecanismos reguladores a nivel central.....	53
- Sistema Dopaminérgico.....	53
- Cerebelo.....	54
- Hipocampo.....	54
II. GHRELIN	55
1. Antecedentes y descubrimiento	55
2. Un gen, distintos péptido	57
2.1. Estructura y procesamiento.....	57
2.2. Distribución.....	61
2.3. Péptidos circulantes.....	62
2.4. Variabilidad genética.....	63
3. Ghrelin acetilado (ghrelin)	64
3.1. GOAT.....	64
3.2. Regulación de la expresión.....	67
a) Ayuno-Ingesta.....	67
b) Nervio Vago.....	67
c) Peso Corporal.....	68
d) Hormonas y otros péptidos.....	68
e) <i>Bypass</i> gástrico.....	69
3.3. Receptor: GHS-R.....	70
a) Características generales.....	70
b) Localización.....	70
c) Mecanismo de acción.....	70
d) GHS-R1a: único receptor de ghrelin?.....	73

3.4. Funciones.....	75
➤ Secreción de GH.....	75
➤ Ingesta y Peso corporal.....	76
➤ Metabolismo: glucosa y lípidos.....	82
➤ Gastrointestinales.....	86
➤ Reproducción.....	87
➤ Cardiovasculares.....	90
➤ Sistema Inmune.....	91
➤ Proliferación celular.....	91
➤ Fisiología del hueso.....	92
➤ Otros efectos.....	92
4. Ghrelin desacetilado (UAG).....	92
4.1. Funciones.....	93
➤ Secreción de GH.....	93
➤ Regulación de la ingesta y el peso corporal.....	93
➤ Regulación del metabolismo de glucosa y lípidos.....	94
➤ Gastrointestinales.....	97
➤ Reproducción.....	97
➤ Cardiovasculares.....	97
➤ Proliferación celular.....	97
➤ Otros efectos.....	98
5. Obestatina.....	98
5.1. Expresión.....	100
5.2. Receptor.....	100
5.3. Funciones.....	100
OBJETIVOS.....	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
I. Animales de experimentación.....	105
II. Técnicas experimentales.....	106
a) Canulación intravenosa.....	106
b) Canulación intracerebroventricular.....	107
c) Colocación bombas osmóticas.....	108
III. Metodología experimental.....	108
○ Tratamiento intracerebroventricular.....	108
➤ Estudio del efecto de la administración icv de los distintos péptidos derivados del gen <i>ghrelin</i> sobre la <u>ingesta</u>	108
1.1.1 Administración de ghrelin y ghrelin delecionado en el exón 4.....	108
1.1.2 Administración de ghrelin y ghrelin desacetilado.....	109
1.1.3 Administración de obestatina.....	109
➤ Estudio del efecto de la administración crónica de ghrelin a nivel central sobre el <u>metabolismo lipídico</u>	110

○ Tratamiento intravenoso	110
➤ Estudio del efecto de la administración iv de los distintos péptidos derivados del gen <i>ghrelin</i> sobre la <u>respuesta y/o secreción pulsátil de GH</u>	110
1.2.1 Administración de GHR-d4.....	110
1.2.2 Administración de GHR-d3.....	111
1.2.3 Administración de UAG.....	111
1.2.4 Administración de Obestatina.....	112
a) Respuesta a ghrelin.....	112
b) Respuesta a GHRH.....	112
c) Secreción pulsátil.....	112
➤ Estudio del papel de mTOR sobre la regulación de la <u>secreción de GH</u>	112
2.1. Secreción pulsátil.....	113
2.2. Respuesta a ghrelin.....	113
2.3. Respuesta a GHRH.....	113
➤ Estudio del papel de AMPK y metabolismo de lípidos a nivel central sobre la <u>secreción de GH</u>	114
3.1.1. Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la secreción espontánea de GH.....	114
3.1.2. Efecto de la administración de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH inducida por ghrelin.....	115
3.1.3. Efecto de la administración de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH inducida por GHRH.....	116
3.2.1. Efecto de la administración icv de TOFA sobre la secreción pulsátil de GH.....	116
3.2.2. y 3.2.3. Efecto de la administración icv de TOFA y ETOMOXIR sobre la respuesta de GH inducida por ghrelin.....	117
3.2.4 y 3.2.5. Efecto de la administración icv de TOFA y ETOMOXIR sobre la respuesta de GH inducida por GHRH.....	117
IV. Protocolo experimental	118
➤ Efecto sobre la ingesta de la administración icv de distintos péptidos derivados del gen ghrelin.....	118
➤ Efecto sobre el metabolismo de la administración crónica a nivel central de ghrelin.....	119
➤ Secreción de GH.....	120
a) Secreción pulsátil.....	120
b) Respuesta de GH a estímulos.....	122
V. Métodos analíticos	124
1. Radioinmunoensayo.....	124
1.1. Ría GH.....	124
1.2. Ría de ghrelin.....	127
2. Western Blot.....	128
3. RT-PCR.....	132
4. Actividad enzimática.....	137
5. Determinación de Malonyl-CoA.....	140
6. Análisis estadístico.....	140

RESULTADOS.....	141
♦ Efecto de distintos péptidos derivados del gen <i>ghrelin</i> sobre ingesta y la secreción de GH.....	141
a) <u>Efecto sobre la ingesta.....</u>	141
1.1.1. Ghrelin y GHR-d4.....	141
1.1.2. UAG.....	143
1.1.3. Obestatina.....	145
b) <u>Efecto sobre la secreción de GH: respuesta de GH.....</u>	148
1.2.1. GHR-d4.....	148
1.2.2. GHR-d3.....	150
1.2.3. UAG.....	152
1.2.4. Obestatina.....	153
♦ Estudio del papel de mTOR en la regulación de la secreción de GH.....	159
2.1 Secreción espontánea de GH.....	159
2.2 Respuesta a ghrelin.....	161
2.3 Respuesta a GHRH.....	163
♦ Estudio del papel de la vía AMPK y metabolismo lipídico en la regulación de la secreción de GH.....	165
<u>AMPK</u>	
3.1.1. Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la secreción pulsátil de GH.....	165
3.1.2. Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH a ghrelin.....	169
3.1.3. Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH a GHRH.....	173
<u>METABOLISMO DE LÍPIDOS</u>	
3.2.1. Efecto de la administración icv de TOFA sobre la secreción pulsátil de GH.....	177
3.2.2. Efecto de la administración icv de TOFA sobre la respuesta de GH a ghrelin.....	179
3.2.3. Efecto de la administración icv de ETOMOXIR sobre la respuesta de GH a ghrelin.....	181
3.2.4. Efecto de la administración icv de TOFA sobre la respuesta de GH a GHRH.....	183
3.2.5. Efecto de la administración icv de ETOMOXIR sobre la respuesta de GH a GHRH.....	185
♦ Efecto de la administración crónica de ghrelin a nivel central sobre el metabolismo lipídico.....	187
<u>Lewis</u>	187
- Efecto sobre la ingesta y el peso corporal.....	187
- Efecto sobre parámetros plasmáticos.....	189
- Efecto sobre el metabolismo lipídico en WAT.....	190

<u>Dwarf</u>	192
- Efecto sobre la ingesta y el peso corporal.....	192
- Efecto sobre parámetros plasmáticos.....	194
- Efecto sobre el metabolismo lipídico en WAT.....	194
DISCUSIÓN	197
CONCLUSIONES	217
REFERENCIAS	219
AGRADECIMIENTOS	255

Abreviaturas:

- **α -MSH**: hormona estimuladora de melanocitos
- **ACC**: acetil-CoA carboxilasa
- **ACTH**: hormona adrenocorticotropina
- **Adipo R**: receptor de adiponectina (dos isoformas 1 y 2)
- **AgRp**: proteína relacionada con aguti
- **AMPK**: adenosin monofosfato activado por kinasa
- **ARC**: núcleo arcuato hipotalámico
- **BAT**: tejido adiposo marrón
- **BBB**: barrera hematoencefálica
- **BDNF**: factor neurotrófico derivado del cerebro
- **BMI**: índice de masa corporal
- **cAMP**: adenosina monofosfato cíclica
- **CART**: transcrito regulado por anfetamina y cocaína
- **CB**: receptor de cannabinoides (CB-1 y CB-2)
- **CCK**: colecistoquinina
- **CCK1R**: receptor de colecistoquinina
- **CNS**: sistema nervioso central
- **CPT-1**: carnitina-palmitoil transferasa
- **CRH**: hormona liberadora de corticotropina.
- **D1R**: receptor de dopamina
- **DAG**: diacilglicerol
- **DMH**: núcleo dorsomedial hipotalámico
- **DMII**: diabetes Mellitus tipo II
- **DMX**: núcleo dorsal motor del vago
- **DPP-IV**: dipeptidil peptidasa IV
- **FAS**: ácido graso sintasa
- **FFA**: ácidos grasos libres
- **FSH**: hormona estimulante de folículo
- **G6P**: glucosa 6 fosfatasa
- **GABA**: ácido gamma-aminobutírico
- **GAL**: galanina
- **GALP**: péptido similar a galanina
- **GH**: hormona de crecimiento
- **GHR-d3**: ghrelin deleciónado en el exón 3
- **GHR-d4**: ghrelin deleciónado en el exón 4
- **GHRH**: hormona liberadora de hormona de crecimiento
- **GHRP**: péptidos sintéticos secretadores de GH (GHR-P2; GHR-P6)
- **GHS**: secretagogos de GH
- **GHS-R**: receptor de secretagogos de GH (GHS-R1a y GHS-R1b)
- **GLP-1**: péptido tipo glucagon
- **GLP1R**: receptor de GLP-1
- **GLUT**: transportador de glucosa
- **GnRH**: hormona liberadora de gonadotropinas
- **GOAT**: ghrelin o-aciltransferasa
- **GTT**: test de tolerancia a glucosa
- **HFD**: dieta alta en grasa
- **HHA**: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
- **HMW**: alto peso molecular
- **icv**: intracerebroventricular
- **IGF-I**: factor tipo insulina I
- **IL-6**: interleuquina 6
- **IP3**: inositol trifosfato
- **IR**: receptor de insulina
- **IRS2**: sustrato 2 de receptor de insulina
- **ITT**: test de tolerancia a insulina
- **iv**: intravenoso
- **LCFA-CoA**: ácido grasos de cadena larga
- **LH**: hormona luteinizante
- **LHA**: hipotálamo lateral
- **LMW**: bajo peso molecular
- **LPL**: lipoprotein lipasa

- **MBOAT**: acyltransferasas unidas a membrana
- **MCD**: malonyl-CoA decarboxilasa
- **MCH**: hormona concentradora de melanina
- **MCR**: receptor de melanocortinas (MC-R3, MCR -4)
- **MMC**: complejo mayor de migración
- **mTOR**: "mammalian target of rapamycin"
- **NAC**: núcleo acumbens
- **NF- κ B**: factor nuclear kappa-beta
- **NPY**: neuropéptido y
- **NTS**: núcleo tracto solitario
- **OB**: leptina
- **ObR**: receptor de leptina
- **OX**: orexinas (hipocretinas)
- **OXM**: oxintomodulina
- **PEPCK**: fosfoenolpiruvato carboxikinasa
- **PKC**: proteína kinasa c
- **PLC**: fosfolipasa c
- **POMC**: proopiomelanocortina
- **PP**: polipéptido pancreático
- **PPAR**: receptor activado por el proliferador de peroxisomas
- **PRL**: prolactina
- **PTP1B**: proteína tirosina fosfatasa 1 B
- **PVN**: núcleo periventricular hipotalámico
- **RE**: retículo endoplasmático
- **RSTN**: resistina
- **SCD-1**: estearil-CoA desaturasa
- **SCN**: núcleo supraquiasmático
- **SNS**: sistema nervioso simpático
- **SOCS 3**: supresor de la señalización de citokinas
- **SREBP**: proteína de unión a elementos regulados por esteroles
- **SST**: somatostatina
- **TG**: triglicéridos
- **TGF- β** : factor de crecimiento tumoral β
- **TNF α** : factor de necrosis tumoral α
- **TRH**: hormona secretora de tirotropina
- **TRKB**: receptor de BDNF
- **TSH**: hormona estimuladora del tiroides
- **UAG**: ghrelin desacetilado
- **UCP**: proteína desacoplante
- **VMH**: núcleo ventromedial hipotalámico
- **VTA**: área tegmental ventral
- **WAT**: tejido adiposo blanco
- **Y-R**: receptor de NPY (Y1R, Y2R, Y3R, Y4R, Y5R, Y6R))

INTRODUCCIÓN

I. REGULACIÓN DE LA INGESTA

La ingesta de alimentos y la capacidad de los organismos para almacenar reservas propias, han sido entendidas a lo largo de la historia como una ventaja evolutiva y una garantía de supervivencia: todo indica que, desde un punto de vista evolutivo, nuestro organismo está preparado para aprovechar al máximo los recursos en tiempos de escasez. Sin embargo esta cualidad, en tiempos en los que hay mayores recursos energéticos y con un menor esfuerzo para conseguirlos, se ha convertido en algo perjudicial. Así, en los países desarrollados, uno de los principales problemas de salud, llegando incluso a catalogarse de epidemia, es la **Obesidad**.

La obesidad, que es en sentido estricto un acúmulo excesivo de grasa corporal, está definida por un BMI >30 (BMI, Índice de Masa Corporal = peso [kg] / altura [m]²).

Aunque son muchos los factores que intervienen en el desarrollo de la obesidad, entre ellos genéticos, parece que el cambio sufrido por la sociedad en los últimos años en cuanto al estilo de vida, incluyendo distintos hábitos de comida y un mayor sedentarismo, tiene un gran impacto sobre el desarrollo y la extensión de esta enfermedad (1).

La relación entre obesidad y el riesgo de padecer otras enfermedades parece clara, ya que las personas obesas presentan una mayor mortalidad y morbilidad, asociadas a un aumento en la predisposición a sufrir daños vasculares (cardíacos y cerebrales), diabetes tipo II, hipertensión, problemas respiratorios, osteoartritis e incluso algunos tipos de cáncer.

A pesar de su incidencia y los graves problemas asociados, el número de personas que padece esta enfermedad aumenta año tras año, siendo especialmente preocupante en el caso de los niños; de hecho se calcula que en el 2015 el 40% de los niños europeos serán obesos (2).

Independientemente de cual sea el origen, la obesidad puede considerarse un desorden crónico del balance energético en donde la cantidad ingerida (ingesta) es mayor al gasto (metabolismo, los efectos del ejercicio y termogénesis), y el exceso energético es almacenado en forma de grasa en el tejido adiposo. (Figura 1)

Pero tan importante como la cantidad de tejido adiposo acumulado, es el lugar en el que se sitúan estos depósitos, siendo especialmente peligroso el visceral/abdominal. Además, existe un patrón dimórfico predominando el tejido adiposo subcutáneo en el caso de las mujeres y el visceral en el caso de los hombres. Se cree, que en esta distribución juegan un papel importante los estrógenos, y teniendo en cuenta que el propio tejido adiposo presenta enzimas que le permiten sintetizar estrógenos, esto puede tener una gran importancia en la regulación del peso corporal en mujeres postmenopáusicas y en hombres.

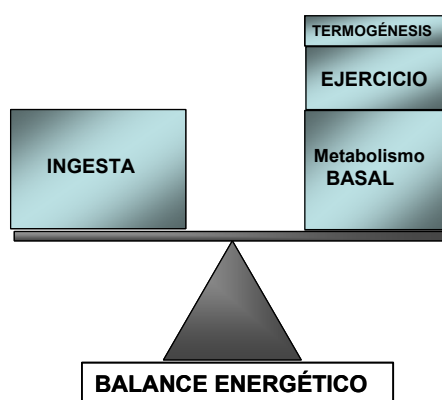


Figura 1: Esquema del balance energético

Paradójicamente a la alta incidencia de sobrepeso y obesidad, el sistema fisiológico encargado de regular el peso corporal es amplio y muy preciso e integra una gran cantidad de señales tanto fisiológicas como de comportamiento, incluyendo no solo la cantidad y la frecuencia de las comidas, sino también el tipo de alimentos elegidos (cantidad de calorías, variedad, sabor, etc) (1). (Figura 2)

Inicialmente el objetivo del sistema encargado de regular el peso corporal es mantenerlo constante. Y esto es posible porque al detectar alguna desviación del peso defendido, se disparan a distintos niveles señales que se integran y dan lugar a una respuesta conjunta para lograr que el peso corporal se mantenga lo más estable posible. Por otro lado, esta tendencia a mantener estable el peso corporal hace que la suma de pequeñas desviaciones entre ingesta/gasto energético, que se produzcan de forma crónica, pueda derivar en un considerable aumento del peso corporal a lo largo del tiempo.

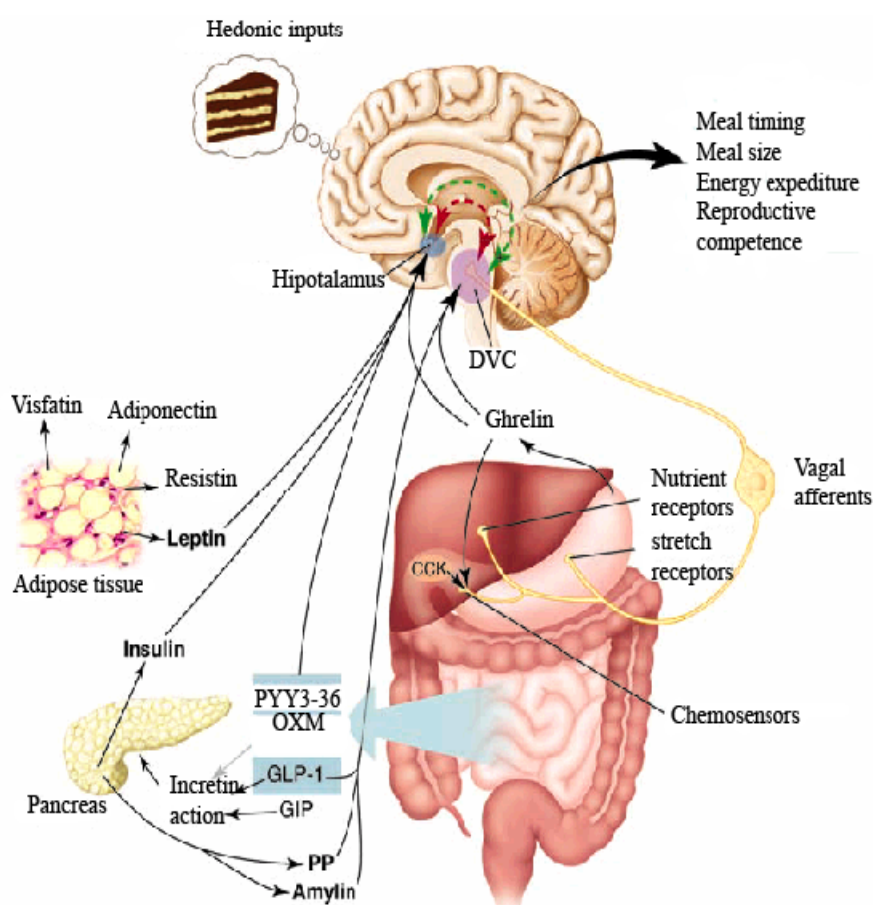


Figura 2. Regulación de la ingesta. Las señales a largo plazo que informan del almacenamiento energético son producidas por el tejido adiposo (leptina) y el páncreas (insulina). El *feedback* relativo al estado nutricional viene en forma de: nutrientes absorbidos, señales neuronales y péptidos del tracto gastrointestinal. Las rutas neuronales, de forma primaria la del nervio vago, dan información acerca de la distensión gástrica y el entorno químico y hormonal de la parte superior del intestino delgado al NTS dentro del complejo vagal dorsal. Las hormonas secretadas por el tracto gastrointestinal estimulan acciones de hambre o de saciedad.

En definitiva la regulación de la ingesta incluye integración de señales procedentes de 2 niveles distintos:

1. **Señales periféricas:** incluyendo las señales producidas por páncreas, tejido adiposo y tracto gastrointestinal.
2. **CNS (sistema nervioso central):** especialmente el hipotálamo.

1. SEÑALES PERIFÉRICAS

➔ PÁNCREAS

○ INSULINA

La insulina es secretada por las células β del páncreas en respuesta a los niveles de glucosa y en proporción al tejido adiposo, circula por la sangre y cruza la BBB mediante un mecanismo dependiente de receptor, pasando así al cerebro. Fue la primera hormona propuesta como factor circulante implicado en la regulación del peso corporal a través de distintos neuropéptidos del hipotálamo (3).

Se ha demostrado que la administración icv de insulina, tanto en monos como en roedores, causa un descenso de la ingesta y del peso corporal, y que esta acción está mediada por neuronas en el Núcleo Arcuato (ARC) hipotalámico, donde se encuentran receptores de insulina (IR) (4-6).

Su mecanismo de acción es a través de IRs, de los cuales se han descrito dos en neuronas, IR-1 e IR-2. Teniendo en cuenta que el ratón *ir-1*^{-/-} no presenta ninguna alteración sobre ingesta o peso corporal, que el ratón *ir-2*^{-/-} muestra un incremento de ingesta, aumento de grasa corporal e infertilidad, y que el IR-2 está ampliamente expresado en neuronas del ARC, todo apunta a que la insulina ejerce su acción a nivel central a través de IR-2 (7).

La unión insulina-receptor hace que este último adquiera actividad catalítica y puede fosforilar proteínas diana, que en última instancia modifican la expresión, entre otros, de distintos neuropéptidos hipotalámicos tales como NPY y POMC, ejerciendo así el efecto de la insulina sobre la ingesta y el peso corporal (8-10).

Esto ha hecho que se haya propuesto que, junto a la leptina, sería la hormona encargada de la regulación de la ingesta y el peso corporal a largo plazo.

➤ TEJIDO ADIPOSO

Inicialmente se pensaba que el tejido adiposo era un mero reservorio donde se acumulaba en forma de grasa, el exceso de energía consumido. Sin embargo, desde el descubrimiento en 1994 de la leptina (11), se estableció con certeza que el tejido adiposo era un órgano endocrino. Se caracteriza por sintetizar y secretar muchos péptidos denominados adipocinas que pueden actuar a nivel local (autocrina/paracrina) o sistémico (endocrina), así como por expresar numerosos receptores que le permiten recibir señales procedentes de otros órganos entre ellos el CNS. (Figura 3)

Esta capacidad para recibir información desde distintos órganos y poder responder a ella mediante la liberación de adipocinas, hace que se considere al tejido adiposo como elemento clave en la regulación de distintos procesos biológicos tales como metabolismo energético, funciones neuroendocrinas e inmunológicas (12).

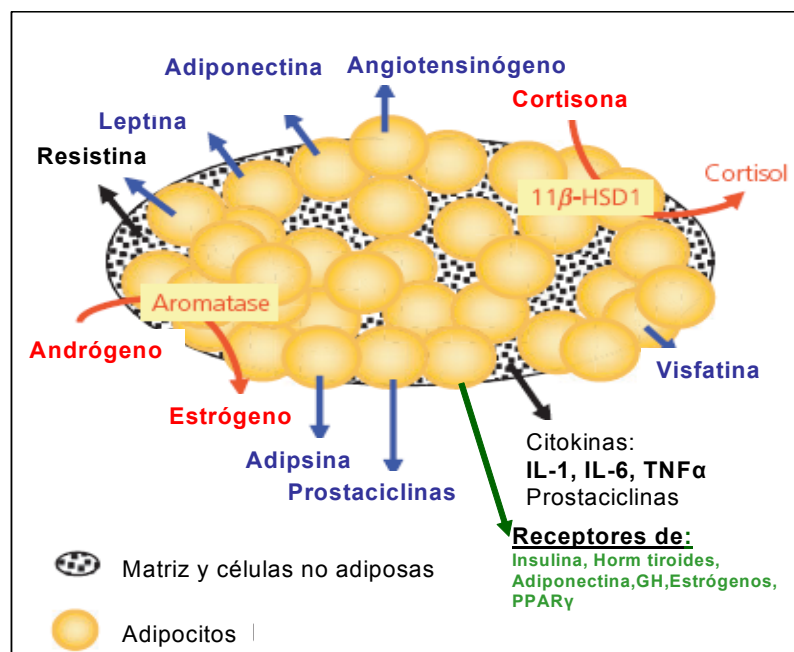


Figura 3: Esquema del tejido adiposo: adipocinas y receptores.

♦ LEPTINA

1. Características generales

Previo al descubrimiento de la leptina, experimentos de parabiosis con ratones genéticamente obesos (ob) y diabéticos (db) realizados por Coleman *et al*, predecían la existencia de un factor circulante capaz de transmitir información desde la periferia al cerebro indicando la existencia de alta cantidad de reserva energética (13;14).

Esto se confirmaría en 1994 cuando Friedman *et al* identificaron el gen *ob*, que codificaba una hormona que se expresaba especialmente en el tejido adiposo, y la denominaron leptina (del griego *leptos*, que significa delgado), y en los años posteriores con la identificación de su receptor (Lep^{db} , Lep^{fa}) (15;16).

La leptina es un péptido de 16 KDa y consta de 167 aa. Es una hormona secretada por el tejido adiposo en proporción a la cantidad total de masa grasa, el tamaño de los adipocitos y su contenido en triglicéridos; así aumenta en sujetos obesos y cae con la pérdida de peso. Se expresa también, aunque a niveles mucho menores en: BAT (tejido adiposo marrón), estómago, intestino, epitelio de glándula mamaria, placenta, músculo esquelético y puede que en cerebro (17).

Circula en sangre y cruza la BBB mediante un mecanismo saturable dependiente de receptor.

2. Receptor

Han sido identificadas numerosas isoformas distintas del receptor de leptina obtenidas por procesamiento alternativo del gen *obR*; por ejemplo en ratón se han encontrado al menos 5 (ObRa-ObRe) (13;14).

Las distintas isoformas se pueden agrupar en tres tipos: secretadas, cortas y larga.

- Las isoformas secretadas: son producto de *splicing* alternativo en las distintas especies o los productos de escisión de las formas unidas a la

membrana del ObR. Son solo dominios extracelulares que se unen a la leptina circulante, quizás regulando la concentración de leptina libre.

- Las isoformas cortas (ObRa, ObRc, ObRd y ObRf en ratón), presentan los 17 exones pero con los aa 3-11 truncados. La isoforma ObRa es altamente conservada, y se expresa en el endotelio de los capilares del cerebro y de órganos periféricos, por lo que se ha propuesto que esta es la isoforma que media el transporte de la leptina a través de la BBB.

- La única isoforma larga es la ObRb: consta de 17 exones y se diferencia en la porción intracelular (18).

De todas las isoformas la clave para la acción de la leptina es la **ObRb** (19). Este receptor se expresa especialmente en núcleos del hipotálamo, incluyendo el arcuato (ARC), dorsomedial (DMH) o el ventromedial (VMH), y en otras regiones cerebrales tales como núcleo tracto solitario (NTS), núcleo dorsal motor del vago (DMX) y el hipocampo, implicadas también en el control de la ingesta, metabolismo y sistemas neuroendocrinos (17;20).

3. Mecanismo de Acción

La leptina se une a la forma larga del receptor ObRb que es la esencial para mediar el efecto de esta hormona sobre la regulación del balance energético y del peso corporal a largo plazo; de hecho es la isoforma ausente en el ratón *db/db*.

Este receptor se expresa en dos poblaciones neuronales del ARC, claves en la regulación de la ingesta: los orexigénicos NPY/AgRP y los anorexigénicos POMC/CART. Así, la leptina estimula la producción de neuropéptidos anorexigénicos y suprime los niveles de los orexigénicos, como se demuestra en casos de déficit de actividad de leptina tales como el ayuno, en los que se estimula la ingesta mediante la supresión de la síntesis de POMC y el aumento de los niveles de expresión de NPY/AgRP (21;22).

Además, la leptina puede ejercer su acción sobre las neuronas POMC, mediante la disminución del ácido γ -aminobutírico, y sobre las neuronas

NPY/AgRP, disminuyendo la secreción de AgRP y mediante la activación de canales K-ATP (23).

Datos más recientes sugieren que la leptina puede influir en la ingesta mediante la modificación de la plasticidad de las sinapsis entre distintas poblaciones neuronales del ARC. Pinto *et al* (24) demostraron que ratones *ob/ob* tenían incrementadas las señales excitadoras sobre las neuronas NPY/AgRP y disminuidas sobre POMC/CART, mientras que se conseguía revertir este efecto con la administración de leptina. Bouret *et al* (25) demostraron que la densidad de inervación del PVN, DMN y LHA desde el ARC es inferior en ratones *ob/ob* comparado con los wt. En este caso, la administración de leptina conseguía revertir el efecto si era administrada en período perinatal pero no en estado adulto (26).

Tanto en roedores como en humanos la obesidad inducida por dieta parece ir asociada a resistencia a la leptina.

La leptina también actúa sobre otras neuronas: desciende la expresión génica de MCH, galanina (GAL) y orexinas (27;28) e incrementa la de GALP (*galanin-like peptide*) en el ratón *ob/ob*. El hecho de que las neuronas GALP expresaran el receptor de leptina (29), indicaba un papel de GALP en las acciones mediadas por leptina.

Ghrelin y leptina interactúan funcionalmente de manera que ghrelin bloquea los efectos de la leptina en la ingesta, mientras que la administración previa de leptina atenúa los efectos de ghrelin en la ingesta (30) a través de las neuronas de NPY (22). Así, la regulación de los efectos de ghrelin en las neuronas del hipotálamo, particularmente en las neuronas de NPY/AgRP, puede ser uno de los mecanismos importantes de la señalización de la leptina a nivel del hipotálamo.

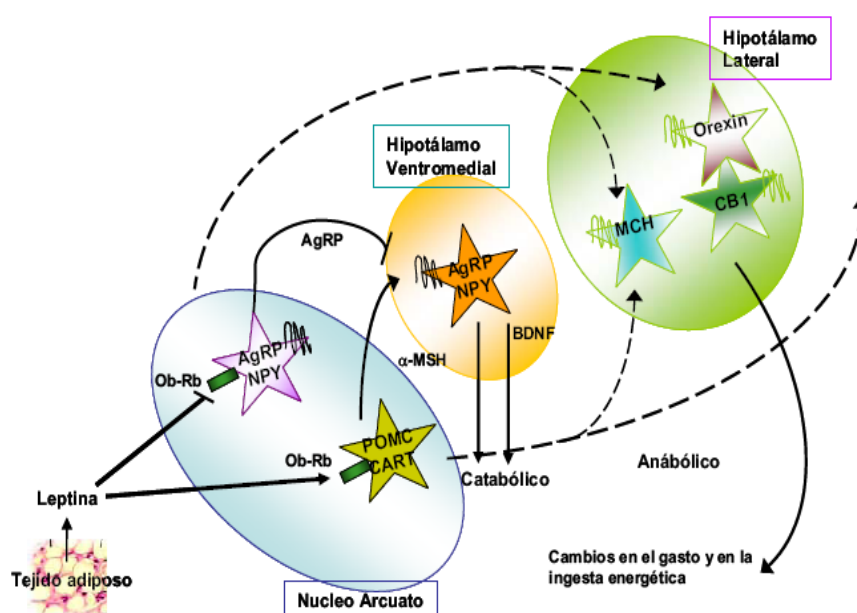


Figura 4: Mecanismos de acción de la leptina.

4. Vías de señalización

La leptina, mediante su unión a la isoforma larga del receptor ObRb, activa la vía JAK-STAT. La activación de JAK2, mediante autofosforilación, lleva a la fosforilación de STAT 3, dando lugar a la translocación de STAT3 al núcleo y la transcripción de distintos neuropéptidos (31).

También se ha descrito la activación de STAT5 mediante JAK2, aunque esta parece de menor importancia a nivel hipotalámico.

En las neuronas hipotalámicas también activa una vía común con la insulina: IRS-PI3K. Ambas hormonas inhiben la ingesta activando IRS2 (sustrato 2 de receptor de insulina), MAPK, ERK, AKT y fosfatidilinositol 3 Kinasa (32;33).

Datos más recientes sugieren que los sensores celulares de energía, AMPK y mTOR, son también importantes mediadores de la acción de la leptina a nivel hipotalámico, de modo que se puede inhibir el efecto de la adipokina evitando la caída de la actividad hipotalámica de AMPK y mediante la prevención del aumento de la actividad de mTOR (34).

La señalización de la leptina a través de la vía JAK2-STAT3 puede estar regulada mediante un *feedback* negativo ejercido por la proteína supresora de citocinas SOCS3 y por la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) (35). Ratones con delección neuronal del gen *socs3* y también ratones con deficiencia heterocigota de SOCS3, presentaban una mayor sensibilidad a la leptina que los wt y estaban protegidos contra el desarrollo de obesidad inducida por dieta (36). Mientras que ratones sin SOCS3, especialmente en neuronas POMC, presentaban un fenotipo similar sugiriendo que las neuronas POMC en el ARC pueden ser el lugar hipotalámico donde se produce la resistencia a leptina, que caracteriza a la obesidad.

Ptb1b^{-/-} son resistentes a la obesidad inducida por dieta alta en grasas y no sufren resistencia a leptina; pudiendo ser también un factor importante en el desarrollo de resistencia a leptina (37).

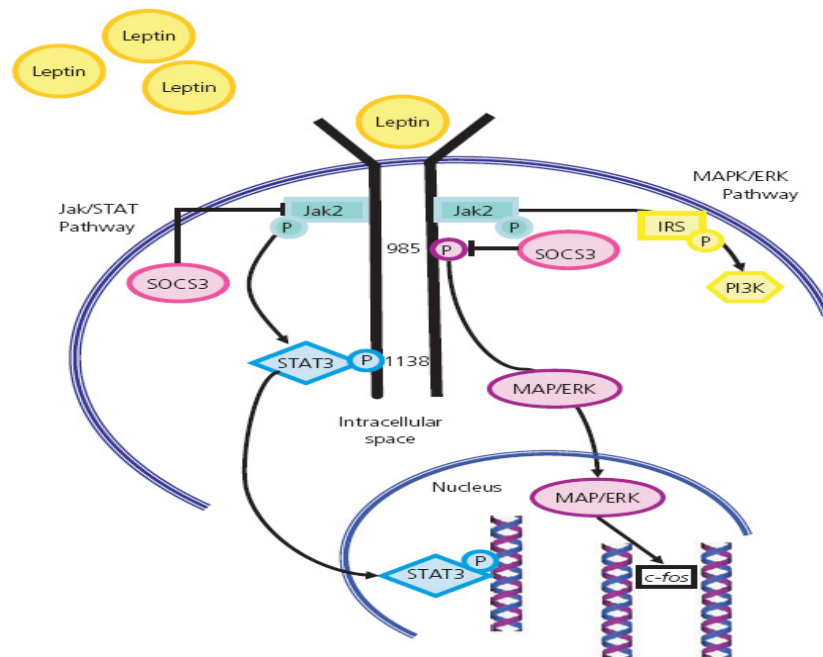


Figura 5: Vías de señalización de la leptina.

5. Otras Funciones:

Además de su importante papel en la regulación de la ingesta y el peso corporal a largo plazo, la leptina realiza otras funciones:

✦ Reproducción

La reproducción está controlada por el llamado eje reproductor HHG (Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas). Su correcto funcionamiento, y por tanto el desarrollo de capacidad reproductiva, está muy relacionado con señales nutricionales y metabólicas. Es conocido desde hace tiempo que un déficit energético impide el correcto desarrollo del eje reproductor, llegando a inhibir o retrasar el inicio de la pubertad; con lo que se ha establecido la necesidad de una cantidad mínima de masa o peso corporal para desencadenar el inicio de la pubertad con la suficiente garantía de poder mantener esa capacidad reproductora en la edad adulta (38).

Uno de los candidatos a ejercer esa conexión entre estado nutricional y actividad reproductora es la leptina, ya que existen receptores de Ob en distintas zonas del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta y de la función gonadal, tales como el ARC y VMN.

En general, la leptina ejerce un papel permisivo/estimulador sobre la liberación pulsátil del neuropéptido GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) a nivel hipotalámico, aunque también se han descrito acciones adicionales sobre hipófisis y gónadas, que explicarían el efecto regulador de la leptina sobre este sistema; en concreto el hecho de que la leptina inhiba la secreción de testosterona por parte del testículo, explicaría los efectos inhibitorios sobre la actividad reproductora que se encuentran en situaciones de hiperleptinemia, como por ejemplo en la obesidad (38).

Muchos son los indicios que señalan a la leptina como un indicador de la cantidad de energía acumulada, siendo ésta clave en el correcto desarrollo de la capacidad reproductora:

- Dimorfismo sexual: las hembras presentan mayores niveles plasmáticos de leptina que los machos, ya que poseen mayor cantidad de tejido adiposo. Esto, junto con el hecho de que para la aparición de la menarquia se requiere una determinada cantidad de grasa, y que situaciones de severo déficit energético, tales como ayuno prolongado o exceso de ejercicio, causan retraso o interrupción de la capacidad reproductiva, llevan a pensar en una fuerte relación entre la fisiología de la leptina y la función gonadal, especialmente en el caso de las hembras.

- La administración de leptina a ratones *ob/ob* consigue reestablecer los niveles normales de gonadotropinas circulantes, el peso de las gónadas y la función reproductora, de modo que revierte el fenotipo infértil que caracteriza a estos ratones (39).

- En ratón normal sometido a restricción de calorías, también se consigue revertir los problemas encontrados en la reproducción mediante la administración de leptina. Por otro lado, se logra adelantar el inicio de la pubertad unos 11 días, respecto de los ratones control, mediante la administración de leptina (40).

- La administración de leptina causa un descenso de la expresión de NPY, dejando este de inhibir la secreción de GnRH (41).

El NPY, además de un potente estimulador de la ingesta, inhibe la secreción de gonadotropinas, tal y como se ha comprobado en experimentos realizados con hembras de primate: la administración de NPY causa la inhibición de GnRH y por tanto no alcanzan la madurez sexual (42).

- La acción de la leptina sobre el eje reproductor puede llevarse a cabo a los tres niveles del eje (43-45):

- Hipotálamo: las neuronas productoras de GnRH presentan receptores de leptina, de modo que ésta regula (estimula) la liberación de GnRH.
- Hipófisis: estimula directamente la secreción de LH y FSH.
- Gónadas: tanto en ovario (células foliculares) como en testículo (células de Leydig) existen receptores de leptina. A este nivel la leptina antagoniza los efectos estimuladores de la síntesis de estrógenos y testosterona ejercidos por determinados factores y hormonas, tales como IGF-I, insulina o glucocorticoides. Mientras que el déficit de leptina lleva a la disminución de la actividad del eje HHG, que resulta en la disminución de los niveles circulantes de esteroides sexuales.

✘ GH (Hormona de crecimiento)

Teniendo en cuenta la distribución de los receptores de leptina en el hipotálamo y que los niveles de tejido adiposo pueden modificar la secreción de GH en humanos, se pensó que la relación tejido adiposo-secreción de GH podía estar mediada por la leptina (38).

Con la administración icv de suero antileptina a ratas *ad libitum*, se observó que estos animales presentaban niveles plasmáticos de hormona de crecimiento disminuidos, indicando que para obtener una secreción espontánea normal de GH son necesarios unos niveles mínimos de leptina. Así, los niveles fisiológicos normales de leptina circulante ejercen un efecto máximo en la secreción de GH, y solo la administración crónica de leptina para sostener un estado de hiperleptinemia es capaz de incrementar la secreción de GH.

Posteriormente se observaron bajos niveles de GH plasmática en roedores y humanos que sufrían mutaciones en el gen de la leptina o en su receptor (46).

Con la administración icv de leptina se conseguía revertir el efecto inhibitor del ayuno sobre la secreción espontánea de GH, al igual que también se conseguía aumentar la respuesta de GH a GHRH, administrada exógenamente, en ratas sometidas a ayuno (47).

La presencia de receptores de leptina en diferentes núcleos hipotalámicos, incluyendo el paraventricular y el arcuato, en los que se también se encuentran neuronas de GHRH sugiere una acción de la leptina a nivel hipotalámico sobre la expresión del gen, tanto de GH como de SST. De hecho, se han encontrado pequeñas poblaciones de neuronas GHRH en el núcleo arcuato que expresan receptor de leptina (48).

La disminución de la secreción de mRNA de GHRH en el núcleo arcuato por el ayuno, se restaura por completo tras la administración de leptina; estos resultados indican un papel de GHRH como mediador de la acción de la leptina sobre la secreción de GH.

Por otro lado también se sabe que la administración de anticuerpos antiSST restaura la secreción de GH que estaba inhibida en ratas en ayuno, de lo cual se podría deducir que la secreción de GH inducida por la leptina podría estar mediada por una disminución en la liberación de SST desde el hipotálamo. La confirmación de esta teoría llegó al ver que los niveles de mRNA de SST en el núcleo paraventricular de ratas hipofisectomizadas en ayuno se ven significativamente reducidas por la leptina (49).

Teniendo en cuenta todos estos datos se puede decir que el efecto de la leptina sobre la secreción de GH puede ser ejercida directamente sobre las neuronas hipotalámicas que regulan su secreción, GHRH/SST, así como indirectamente a través de su papel sobre la regulación de la ingesta, modificando la expresión de distintos neuropéptidos que también pueden modificar la secreción de GH tales como NPY, GnRH o TRH (48).

✘ Eje Hipotálamo-Hipofisis-Tiroideas

Durante el ayuno, asociado a bajos niveles de leptina, se observa también un descenso en los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas, y de TSH y TRH en hipófisis y hipotálamo respectivamente (13;14).

La cuantificación de los niveles de leptina en ratas de diferente estado tiroideo indicaba que las hormonas tiroideas inhiben los niveles de leptina plasmáticos, aunque hay datos discrepantes a este respecto (50).

La reducción del mRNA de proTRH en las neuronas del PVN puede ser prevenida mediante administración de leptina. Por tanto, la disminución de los niveles circulantes de leptina durante el ayuno puede actuar como señal clave para las neuronas TRH, para reanudar el punto de partida en la regulación *feedback* de la expresión génica de TRH mediante hormonas tiroideas. Este mecanismo podría inhibir la síntesis de TRH durante el ayuno, cuando los niveles de hormonas tiroideas son bajos, llevando a una disminución de la secreción de TSH y consecuentemente de la estimulación de la tiroides por TSH, y también a la reducción de la termogénesis por las hormonas tiroideas, que actúa de forma coordinada con otros mecanismos homeostáticos.

Durante el ayuno, el ARC es esencial para la respuesta normal implicada en la adaptación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas al déficit energético, y el hipotálamo, en general, sirve como un lugar crítico de la regulación de la leptina en este eje. Puede que ese efecto sea mediado por NPY ya que las neuronas NPY poseen numerosos receptores de leptina y emiten numerosas proyecciones hacia el PVN donde se encuentran las neuronas TRH.

Datos obtenidos en pacientes con mutaciones en el gen de la leptina o su receptor sugieren que la leptina ejerce un papel permisivo en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas, ya que algunos de los miembros afectados presentaban hipotiroidismo hipotalámico (38).

✘ Eje Corticoadrenal

Otra de las características de los ratones y las ratas obesas es la hipercorticosteronemia. El hecho de que la administración de leptina corrija esa alteración en los ratones *ob/ob*, y también el aumento de ACTH y/o los niveles de corticosterona producidos por el estrés o el ayuno, hizo pensar que la leptina podía estar regulando el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), al menos en animales de experimentación. Además, altos niveles de glucocorticoides inhibían la acción de la leptina sobre la ingesta (38).

Sin embargo, en humanos no está claro. Mientras en sujetos con mutaciones en el gen de leptina o su receptor se observa una correcta función adrenal y que las alteraciones en los niveles pulsátiles de cortisol no son revertidos con la administración de leptina exógena, en sujetos normales se ha encontrado una relación significativa inversa entre las fluctuaciones de leptina, ACTH y cortisol (51;52).

El probable mecanismo de acción: mientras los glucocorticoides estimulan la síntesis y secreción de leptina por parte de los adipocitos, la leptina inhibe el eje HHA a dos niveles: en hipotálamo sobre las neuronas CRH y en la glándula adrenal inhibiendo la síntesis de cortisol.

✘ Prolactina (PRL)

En humanos se ha encontrado que la hiperprolactinemia puede estar asociada a obesidad, mientras que con la pérdida de peso se regulan los niveles plasmáticos de prolactina.

En el ratón *ob/ob* la administración de leptina restaura la lactancia. El bloqueo de leptina con anticuerpos retrasa el pico preovulatorio de la leptina, mientras que con la administración icv de leptina se revierte el efecto inhibitorio causado por el ayuno.

Mientras estos datos en roedores sugieren un efecto estimulador de PRL por parte de la leptina, en humanos faltan datos que nos señalen esa relación directa (38).

♦ RESISTINAa) Características generales

La resistina (RSTN) fue descubierta simultáneamente por tres grupos independientes. Es una hormona de 114 aa que pertenece a la familia de proteínas ricas en cisteína (RELMs) que han sido implicadas en procesos de inflamación. En el caso de roedores se secreta mayoritariamente por adipocitos, y en humanos por macrófagos y monocitos. Además de en adipocitos se expresa también en otros tejidos: hipófisis, glándula adrenal, hipotálamo, placenta, etc (53).

Circula en sangre bajo dos formas distintas de ensamblaje: HMW (de alto peso molecular) y LMW (bajo peso molecular). De las cuales la biológicamente activa es la LMW, siendo el sistema de ensamblaje una forma de regular el inicio de la actividad biológica de la RSTN.

Estudios iniciales sugerían que la RSTN causaba efectos sobre la acción de la insulina, siendo el nexo de unión entre la obesidad y la resistencia a insulina. Así, la administración de resistina recombinante causaba resistencia a insulina, mientras que la inmunoneutralización de la misma revertía ese efecto.

Mientras que en roedores parece clara la función de la resistina, en humanos no tanto, de modo que no es tan evidente la conexión entre secreción por tejido adiposo o niveles circulantes con obesidad y resistencia a insulina.

b) Funciones:

- Inhibición de Ingesta: se ha descrito en ratas que la administración de RSTN a nivel central causa inhibición de la ingesta a corto plazo (90 minutos), y que este efecto está mediado por algún mecanismo hipotalámico (54).

Posteriormente se observó, mediante la administración crónica de RSTN a nivel central, que la acción anorexigénica observada estaba asociada a cambios en los niveles de expresión de distintos neuropéptidos, así como de

actividad de uno de los sensores energéticos AMPK a nivel hipotalámico, y de forma dependiente del estado nutricional. Así, en ratas sometidas a ayuno previo (48 horas) la administración de resistina revertía el efecto del ayuno sobre los niveles de expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos, causando un descenso en la expresión de los orexigénicos (NPY y AgRP) y un aumento en el anorexigénico CART. Mientras, en ratas *fed*, la disminución de la ingesta observada parecía ser debida a la caída en la expresión de FAS (ácido graso sintasa) a nivel del VMN causado por la activación de AMPK (55). Esta acción anorexigénica de la RSTN puede actuar como una señal informativa a nivel central de la cantidad de reserva energética, al igual que la leptina.

- RSTN y Obesidad. Son numerosos los trabajos que consideran a la RSTN como una hormona directamente relacionada con la obesidad (56): modelos de roedores obesos, tanto genéticos como inducidos por dieta, presentan altos niveles de RSTN circulantes; la administración de anticuerpos anti-resistina mejora los niveles de glucosa y la sensibilidad a insulina en ratones con obesidad inducida por dieta; el ratón transgénico que sobreexpresa resistina es obeso debido al aumento del número y del tamaño de los adipocitos, etc.

Publicaciones recientes indican que la RSTN a nivel central puede causar resistencia a insulina hepática, mediante la modificación de la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos.

Sin embargo, en humanos esto no parece tan claro: mientras hay trabajos que siguen la misma línea observada en roedores, otros no encuentran relación directa entre aumento de adiposidad y los niveles de resistina (57).

- RSTN, Resistencia a Insulina (RI) y Diabetes mellitus II (DMII): la mayoría de estudios en roedores indican que la administración RSTN *in vivo*, así como su sobreexpresión transgénica, causa resistencia a insulina mediante el incremento de la producción de glucosa hepática (58).

Ratones sometidos a dieta alta en grasa (HFD) presentaban RI hepática y hiperresistinemia, efecto que se conseguía revertir mediante un oligonucleótido antisentido de RSTN (59).

En algunos casos se ha encontrado también una posible conexión entre leptina y resistina, indicando que la leptina puede mejorar la sensibilidad a la insulina mediante una vía que interaccione y suprima los efectos de la resistina: ratones *ob/ob* presentaban altos niveles de resistina, que estaban positivamente relacionados con los altos niveles de glucosa, insulina y lípidos; tras la administración de leptina mejoraba la sensibilidad a insulina en estos ratones, posiblemente debido al descenso de los niveles de mRNA de resistina (60). Sin embargo también hay trabajos que discrepan, llegando a no encontrar variación en la expresión de resistina en modelos de ratones con RI (61).

La RSTN también interacciona con la insulina, y se cree que esta conexión es a nivel del IR. El ratón transgénico que sobreexpresa resistina presenta dificultades en el transporte de glucosa mediado por insulina (62).

Publicaciones recientes indican que la RSTN a nivel central puede causar resistencia a insulina hepática, mediante acciones a nivel hipotalámico. Singhal *et al* (63) observaron que la resistencia a insulina hepática se produce mediante variaciones en los niveles de expresión de neuropéptidos en distintos núcleos hipotalámicos, especialmente con un aumento de NPY en el ARC y el VMN. La RSTN causaba un aumento de IL-6, TNF α y SOCS3, y la disminución de fosforilación de STAT3, que causaban en definitiva un acusado descenso en la sensibilidad a insulina y un incremento en la salida de glucosa. Un trabajo posterior de este mismo grupo demostró, mediante el uso de ratones *db/db* KO para RSTN, que la ausencia de RSTN causaba un descenso de triglicéridos y de esteatosis hepática, y que este efecto era más evidente en los ratones deficientes de leptina (64).

Datos de nuestro grupo indican que la RSTN administrada a nivel central durante 7 días provoca resistencia a insulina hepática. Encontramos que la RSTN provocaba la inhibición de AMPK en el hígado, lo que causaba un aumento de adipogénesis indicado por el aumento de numerosas enzimas implicadas en este proceso (LPL, ACC, SCD-1, SREBP), así como un aumento de moléculas proinflamatorias, como TNF α e IL-6, que podía ser debido al exceso de acumulación de ácidos grasos y triglicéridos (55).

- RSTN e Inflamación: se considera a la RSTN una molécula proinflamatoria, ya que provoca el aumento de factores inflamatorios tales como TNF α , IL-6 y la proteína C reactiva. Algunos trabajos sugieren que la RSTN puede llevar a cabo este aumento a través de la ruta dependiente de factor nuclear, NF- κ B (65). También se encontró relación entre los niveles de RSTN y la inflamación en artritis reumatoide, donde se considera además que la RSTN puede actuar, mediante la ruta de señalización NF- κ B, disparando la secreción de otras moléculas proinflamatorias tales como TNF α , IL-1 β e IL-6. Recientes estudios indican que la RSTN a nivel central causa un aumento en los niveles de TNF α y IL-6 en el hígado, lo que sugiere que la RSTN induce resistencia a insulina hepática incrementando los niveles de moléculas proinflamatorias, mediante mecanismos no conocidos, pero que podrían ser debidos al exceso de acumulación de lípidos tras el tratamiento.

La RSTN en humanos se expresa mayoritariamente en macrófagos en respuesta a señales proinflamatorias, tales como TNF α e IL-6; mientras que la RSTN induce el aumento de secreción, por el macrófago, de éstas y otras moléculas proinflamatorias. Estos datos, junto con el hecho de que tanto la RSTN como las moléculas proinflamatorias se encuentran elevadas en obesidad y diabetes, enfermedades en la que tienen lugar procesos inflamatorios, sugieren inevitablemente que la RSTN está implicada en procesos inflamatorios (66).

♦ ADIPONECTINAa) Características generales:

La adiponectina es una proteína de 247 aa y 30 KDa. Fue descubierta, al mismo tiempo, por cuatro grupos distintos usando distintas técnicas.

En su forma básica es un homodímero de tres subunidades que se va asociando mediante puentes disulfuro hasta formar hexámeros (LMW) o estructuras mayores (HMW).

En plasma se encuentra mayoritariamente la adiponectina en su forma entera (*full-length*). El efecto farmacológico de la forma globular parece ser la estimulación de la β -oxidación en el músculo esquelético, mientras que la forma entera produce un descenso en la salida de glucosa hepática (61;67;68). Se expresa específicamente en adipocitos, y sus niveles plasmáticos están negativamente correlacionados con la adiposidad, resistencia a la insulina, daños coronarios y dislipemia, tanto en ratón como en humanos (12;69), sugiriendo que la hipoadiponectinemia contribuye a la patogénesis de esas condiciones (70).

b) Receptor

Existen dos isoformas de receptor denominadas: Adipo R1 y Adipo-R2, que se expresan de forma mayoritaria en músculo esquelético y hígado respectivamente. Además, ambos receptores se expresan en las células β pancreáticas, tanto en humano como en ratón.

Adipo R1 se une a la adiponectina globular, mientras que Adipo-R2 se une a la *full-length*.

Estos receptores median el incremento de AMPK y la actividad de PPAR- γ , lo que lleva a un incremento de la oxidación de los ácidos grasos y captación de glucosa, con lo que participa en el incremento de la sensibilidad a la insulina (68;71).

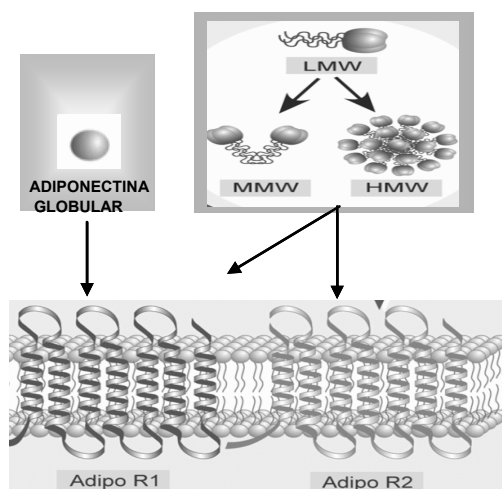


Figura 6: Configuración estructural de la adiponectina y sus receptores: Adipo R1 y Adipo R2.

c) Mecanismo de acción

La adiponectina causa un descenso en el contenido de triglicéridos en el músculo esquelético: incrementa la expresión de moléculas implicadas en el transporte de ácidos grasos (CD36), en su combustión (AcilCoA oxidasa) y disipación (UCP2, proteína desacoplante). Observando que esto mismo sucedía en ratones *ob/ob*, el grupo de Kadowaki propuso que la adiponectina puede activar PPAR α (72).

Esto supondría que la adiponectina aumenta los niveles de combustión de ácidos grasos y el consumo de energía, presumiblemente mediante la activación de PPAR α , causando un descenso en el contenido total de TG, tanto en hígado como en músculo esquelético, y así aumenta la sensibilidad a la insulina *in vivo* (73). Experimentos *in vitro* con miocitos refuerzan esta teoría (74).

Mediante experimentos en los que se inhibe la actividad de AMPK, usando un dominante negativo, se pudo observar que la estimulación en el uso de la glucosa y la combustión de ácidos grasos por adiponectina podía ocurrir por la activación de AMPK (68).

La adiponectina, tanto la forma globular como la *full-length*, estimula la fosforilación y la activación de AMPK en el músculo esquelético, aunque solo la forma *full-length* es la que funciona en el hígado (68). Mediante la activación de AMPK se consiguen efectos en paralelo en los dos tejidos periféricos (75;76):

- En músculo: la adiponectina activa AMPK, que lleva a la fosforilación e inhibición de ACC (acetyl-CoA-carboxilasa), lo que supone la inhibición de síntesis y activación de la oxidación de ácidos grasos.
- En hígado: mediante la activación de AMPK e inhibición de ACC consigue aumentar la combustión de ácidos grasos, y también reducir la expresión de moléculas implicadas en la gluconeogénesis, consiguiendo así disminuir los niveles de glucosa (68).

En esta misma vía apuntan también los trabajos de Scherer *et al*, en los que observan que el ratón transgénico para adiponectina reduce la expresión de enzimas gluconeogénicos como fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G6P), los cuales están asociados con un incremento en la fosforilación de AMPK en el hígado (77).

Como también se ha demostrado que la leptina estimula AMPK en el músculo esquelético (78), la activación de la AMPK puede ser un mecanismo común por el cual las adipokinas sensibilizadoras a insulina, como adiponectina y leptina, incrementan la sensibilidad a la insulina.

d) Otras funciones:

A la adiponectina se le han atribuido también otras propiedades: aterogénicas, vasodilatadoras, intervención en procesos inflamatorios, altos niveles de adiponectina disminuyen la probabilidad de sufrir determinados tipos de cáncer asociados a obesidad y DMII, etc.

Además, se ha relacionado a la adiponectina con el desarrollo de diabetes gestacional. Diversos estudios en los que cuantifican los niveles de adiponectina a determinados tiempos de embarazo proponen una clara conexión entre los bajos niveles de adiponectina en los primeros meses de gestación con el aumento de la resistencia a la insulina y el posterior desarrollo de la diabetes gestacional.

♦ IL-6

Es una citokina asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina (79). Circula en múltiples formas glicosiladas, en un rango de 22 a 27 kDa, que se expresa en tejido adiposo (adipocitos y matriz) y en neuronas, lo que sugiere una doble acción a nivel periférico y central. Su receptor es homólogo al receptor de la leptina.

Un alto BMI se corresponde con niveles plasmáticos altos de IL-6 y con fallos en la tolerancia a la glucosa y resistencia a insulina, que se revierte con la pérdida de peso. Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de IL-6 predicen el desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

A nivel central IL-6, además de disminuir la ingesta, activa lipólisis, inhibe adipogénesis, aumenta el gasto energético, y controla la secreción de hormonas como la adiponectina, ejerciendo en conjunto un efecto regulador del peso corporal. Así, el ratón *il-6^{-/-}* se caracteriza por un significativo aumento en la ingesta y en el peso a partir de los seis meses de edad, llegando a ser obeso a los nueve meses. Sin embargo, con la administración de IL-6 se conseguía revertir ese fenotipo (80).

En humanos con sobrepeso tiene una relación negativa con la masa grasa, sugiriendo la deficiencia central de IL-6 en la obesidad (81). Los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-6 tienen un fallo generalizado en el crecimiento, el cual incluye reducción del peso corporal y descenso de la masa grasa.

Mediante la administración de IL-6 icv e ip en rata, se pudo comprobar como solo la administración central de la citokina causaba aumento del gasto energético. Esto indicaba que la IL-6 a nivel central ejerce efectos antiobesidad en roedores.

♦ TNF α

Inicialmente descrita como Factor de Necrosis Tumoral, esta citokina es una proteína transmembrana de 26-kDa que se divide en una proteína de 17-kDa, biológicamente activa, que ejerce sus efectos vía receptor TNF α tipo I y tipo II. Dentro del tejido adiposo se expresa en adipocitos y en células estomovasculares (82), al igual que los dos tipos de receptores, pudiendo encontrarse unidos a membrana o en sus formas solubles (83).

La habilidad del TNF α de inducir caquexia *in vivo*, llevó a una exhaustiva evaluación de su papel en la homeostasis energética. Actualmente se ha visto que puede estar implicada en la patogénesis de la obesidad y de la resistencia a la insulina (83): está altamente expresado en tejido adiposo de humanos y roedores obesos, y disminuye con la pérdida de peso pudiendo observarse una mejoría en la sensibilidad a la insulina. La exposición crónica a TNF α induce resistencia a la insulina, tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que el tratamiento con neutralizantes solubles de TNF α mejora la sensibilidad a la insulina en roedores pero no en humanos (83).

El ratón sin TNF α está protegido frente a la resistencia a insulina causada por obesidad inducida por dieta alta en grasa.

♦ VISFATINA

Es una proteína de 52 kDa que inicialmente había sido descubierta en relación con procesos inflamatorios, entre ellos afección pulmonar.

El interés por esta proteína se debe al hecho de que la visfatina adiposa es específica de los depósitos de grasa viscerales y disminuye la resistencia a insulina. Además, los niveles séricos de la misma están positivamente

correlacionados con la adiposidad visceral, aumentando durante el desarrollo de obesidad ($\times 3$ en ratones obesos mediante HFD). Por último, se ha descrito que tiene efectos similares a la insulina y puede unirse y activar el receptor de insulina en sitios distintos de la hormona pancreática, desencadenando la activación de la misma vía y ejerciendo así efectos hipoglicémicos directos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la cantidad de insulina en sangre es superior a la visfatina, tanto en condiciones de ayuno como de ingesta *ad libitum*, parece que la visfatina no contribuye mucho al mantenimiento de la normoglucemia en condiciones normales; pero el aumento de secreción de visfatina puede resultar un mecanismo compensatorio para intentar estabilizar los niveles de glucosa ante la resistencia a insulina característica de la obesidad (84).

Además, estimula la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros, induce que los TG se acumulen, acelera la síntesis de TG a partir de glucosa, e induce la expresión de PPAR- γ , FAS, diacilglicerol aciltransferasa y adiponectina.

La expresión de visfatina está regulada por la inflamación y sepsis, y puede inhibir la apoptosis en neutrófilos, implicando otras funciones además de efectos miméticos a los de la insulina (85).

Sin embargo, es de mencionar que posteriormente se abrió una investigación por las autoridades académicas del laboratorio en el que se habían generado dichos resultados, al haber dudas razonables de la fiabilidad de los datos publicados.

♦ TGF- β

Es una citokina producida por una variedad de células capaz de regular el crecimiento y diferenciación de numerosos tipos celulares.

La elevada expresión génica de TGF- β en el tejido adiposo puede tener amplias implicaciones en la fisiopatología de la obesidad y está asociado a

varias complicaciones de ésta, ya que este factor de crecimiento tumoral incrementa la proliferación celular de los preadipocitos, y su elevación contribuye a incrementar el número de células en los depósitos de grasa relacionados con el fenotipo obeso.

♦ OTRAS ADIPOKINAS

En el tejido adiposo se expresan además muchas otras adipokinas implicadas en procesos inflamatorios, factores de coagulación y vasodilatadores, enzimas implicadas en la secreción de hormonas sexuales y cortisona, así como numerosos receptores que permiten regular la secreción de muchas de estas adipokinas. Todo esto justifica que el tejido adiposo no sea considerado como un mero reservorio energético, sino como un órgano endocrino que participa activamente en la regulación de la homeostasis energética.

PROTEÍNAS SECRETADAS	RECEPTORES	ENZIMAS
Leptina	Insulina	• Metabolismo lípidos
Adiponectina	Glucagon	LPL
Resistina	Hormonas tiroideas	Apo-E
Angiotensinógeno	GH	• Metabolismo glucosa
TNF- α	Angiotensinógeno II	PI3K
IL-6	Gastrina/CCK	PKB
Adipsina	Adiponectina	GLUT-4
PAI-1	IL-6	• Síntesis esteroides
TGF- β	TNF- α	Aromatasa
Vaspina	Hormonas tiroideas	11 β -HSD1
Visfatina	Vitamina D	17 β -HSD
Omentina	NF- κ B	
Desnutrina	PPAR- γ	

Figura 7: Resumen de adipokinas expresadas en el tejido adiposo.

➔ **TRACTO GASTROINTESTINAL**

■ **COLECISTOQUININA (CCK)**

Es una proteína secretada por las células I de la mucosa del intestino delgado, en respuesta a la comida; pero también se expresa de forma significativa en el CNS. A partir de un precursor de 115 aa, y mediante procesamiento proteolítico, se obtienen distintos péptidos (caracterizados por presentar un octapéptido carboxiterminal), de los cuales CCK-8, CCK-22 y CCK-33 son las formas bioactivas que se encuentran en niveles más elevados en sangre.

Se han descrito dos receptores para CCK: CCK1R, también denominado CCK-A recordando su implicación en procesos de "alimentación", que se expresa mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, y CCK2R, o CCK-B (brain) que se encuentra en cerebro.

Se sabe que la CCK inhibe la ingesta tanto en humanos como en roedores (86;87): al administrar CCK periféricamente justo antes de la comida, disminuye la cantidad ingerida de una forma dosis dependiente y sin afectar a la ingesta de agua o causar aversión; y desencadena, además, una secuencia de comportamientos en las ratas que normalmente se asocia a saciedad.

El efecto anorexigénico de CCK es de corta duración e indetectable si el péptido se administra más de 30 minutos antes de la comida. Está mediado por el receptor CCK1R, y se transmite al cerebro mediante el nervio vago ya que se ha comprobado que la vagotomía disminuye el efecto anorético de la CCK periférica (88;89). Teniendo en cuenta que este receptor se encuentra también en distintas zonas del cerebro, entre ellas el hipotálamo, y que la microinyección de CCK en varios núcleos hipotalámicos inhibe la ingesta, sugiere que la CCK aporta al cerebro señales de saciedad, tanto directa como indirectamente.

Aunque no de forma exclusiva, la saciedad inducida por la CCK se consigue mediante la inhibición del vaciado gástrico a través de información recogida por mecanorreceptores y transmitida por el nervio vago al cerebro. Tanto en monos

como en humanos la distensión gástrica aumenta el efecto anorético de la CCK8 (87).

Sin embargo, ratas con daño funcional en el CCK1R son diabéticas, hiperfágicas y obesas, mientras que en ratón la deficiencia del receptor no causa ninguna variación en el fenotipo. Posiblemente, el papel más importante de la CCK sobre la regulación del peso corporal podría venir por la interacción sinérgica con señales de adiposidad a largo plazo, como por ejemplo la leptina.

■ GHRELIN

Aunque se produce principalmente en las células X/A de la mucosa estomacal (90), también se expresa en otros tejidos: intestino, testículo, hipotálamo...

Es un péptido de 28 aa, caracterizado por estar octanoilado en la Ser 3, siendo esta característica clave para desempeñar sus funciones, tanto en la secreción de GH (91) y en la regulación de la ingesta (92), como la motilidad y el vaciado gástrico (93).

Se sabe que el ghrelin es una hormona muy importante en la regulación de la homeostasis energética, caracterizada por un fuerte efecto orexigénico, cuyas acciones incluyen desde el inicio de la ingesta (aumento significativo en los niveles plasmáticos de ghrelin unas 2 horas previas) y el aumento de la ingesta a corto plazo cuando es administrado icv o periféricamente, hasta el efecto a largo plazo sobre la ingesta y el balance energético, ya que se observa aumento de la adiposidad y del peso corporal cuando es administrado de forma crónica.

Se une al receptor GHS-R1a, y realiza su efecto orexigénico mediante la modulación de distintas neuronas hipotalámicas a nivel de ARC (NPY/AgRP). Datos recientes (94) indican que el ghrelin ejerce su efecto a nivel hipotalámico modificando el metabolismo de ácidos grasos mediante la activación de AMPK, que a través de mecanismos hasta ahora desconocidos, modula la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta (95).

■ OXINTOMODULINA (OXM)

El gen *preproglucagon* se expresa ampliamente en el estómago, páncreas y NTS. Mediante procesamiento proteolítico tejido específico, realizado por convertasas, se obtienen distintos péptidos: glucagón en el páncreas y GLP-1, GLP-2 y OXM en el intestino.

OXM es secretada por la células L del intestino, y se ha encontrado tanto en roedores como en humanos que reduce la ingesta (96).

Aunque el mecanismo de acción no está del todo claro, parece probable que esté implicado el receptor GLP-1R, ya que la OXM en ratones *glp-1r^{-/-}* no modifica la ingesta, al igual que mediante el bloqueo del receptor con un antagonista (Exendina 9-39). Aunque la OXM actúa en distintas zonas del cerebro, parece que el efecto anorexigénico es a través del hipotálamo.

Además de regular el apetito, parece que su papel en la regulación de la homeostasis energética implica también efectos sobre el gasto energético (95).

■ GLP-1

Otro de los péptidos derivados de *preproglucagon* es GLP-1 ("glucagon like peptide"). Es secretado por las células L, en respuesta a ingestión de nutrientes (grasa y hidratos de carbono, principalmente) de forma directa o indirecta. Cuenta con dos formas bioactivas, GLP-1₇₋₃₆ y GLP-1₇₋₃₇, que pueden ser inactivadas en circulación mediante la enzima DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV).

GLP-1 disminuye la ingesta en distintas especies incluyendo humanos: la administración periférica aumenta la saciedad en personas con peso normal, obesas, y diabéticas.

Se une al receptor GLP-1R y, aunque el mecanismo a través del cual ejerce su efecto anorexigénico no es del todo conocido, parece que la información se transmite por el nervio vago a distintas zonas cerebrales. Aunque GLP-1 puede cruzar la BBB, parece improbable que llegue en cantidad suficiente fisiológicamente teniendo en cuenta la rapidez con la que es degradado en

circulación por la DPP-IV. Sin embargo, puede que presente efecto a nivel central ya que se expresa en distintas neuronas del cerebro que emiten proyecciones sobre el hipotálamo y otras áreas implicadas en la regulación de la homeostasis energética.

En los últimos años, el interés sobre GLP-1 está centrado en la sobreexpresión del receptor, ya que reduce el peso corporal mientras mejora la diabetes (95;96).

■ Polipéptido Pancreático (PP)

El PP es producido por células PP en los islotes de Langerhans sometidas a control vagal, y en proporción al total de las calorías ingeridas.

Tanto en su acción central como periférica se une a los receptores Y4R y Y5R, ejerciendo influencia sobre el páncreas exocrino, secreción de ácido gástrico y motilidad del tracto gastrointestinal.

Su papel en la regulación de la homeostasis energética no está del todo claro, en parte porque la administración periférica disminuye la ingesta, mientras que la administración central la aumenta; esto podría ser explicado por unión diferencial a los receptores. Sin embargo, la administración periférica de PP reduce la ingesta y la ganancia de peso tanto en los ratones *ob/ob* como en los *wt*, y en humanos disminuye el apetito y la ingesta independientemente del vaciado gástrico (95;96).

■ PYY

Es un péptido de 36 aa secretado por las células L de la mucosa del intestino delgado y grueso, postprandialmente y en proporción a la ingesta calórica (mayor respuesta a los lípidos que a los hidratos de carbono). Pertenece a la familia de polipéptidos pancreáticos junto con el NPY y el PP, que se caracterizan por el número de aa, un motivo estructural común, y por presentar una amidación en el extremo carboxiterminal en su forma bioactiva.

Se unen a una familia de receptores asociados a proteína G: Y1R, Y2R, Y4R, Y5R, y Y6R.

Circula en sangre de dos formas: PYY₁₋₃₆, sobre el que rápidamente actúa la enzima DPP-IV dando lugar a la forma predominante y bioactiva PYY₃₋₃₆.

La administración periférica de PYY₃₋₃₆ lleva a una marcada inhibición de la ingesta, tal y como se comprobó en humanos, en los que se alcanzaba una reducción del 36% en la ingesta tras la administración del péptido a concentraciones similares a las producidas postprandialmente. Esta reducción se conseguía sin causar náuseas, alteración del gusto por la comida o la cantidad de líquidos ingeridos, y tampoco era seguido de un proceso de compensación hiperfágica. Datos similares se obtuvieron también en roedores (97).

Sin embargo, la administración a nivel central tanto de PYY como de PYY₃₋₃₆ provoca el aumento de la ingesta. Una posible explicación a esto es la existencia de distintos receptores y la distinta accesibilidad a estos. PYY se une a todos los receptores Y, siendo el efecto orexigénico mediado por Y1 e Y5, que se encuentran en el núcleo paraventricular, sobre los que actúa también NPY.

Mientras que PYY₃₋₃₆ activa selectivamente Y2R y Y5R, se cree que el PYY₃₋₃₆ circulante tiene mayor acceso a Y2R, ya que este se encuentra en el ARC, caracterizado por la ausencia de BBB (98).

En el hipotálamo Y2R es un receptor autoinhibidor presináptico sobre neuronas orexigénicas que expresan NPY y AgRP. Por tanto, la unión PYY₃₋₃₆ al Y2R reduce la ingesta mediante la inhibición de las neuronas NPY/AgRP, dejando estas de inhibir a POMC, con lo que aumentaría la producción de α -MSH conocido por su efecto anorético.

A pesar de los datos que indican que la administración periférica de PYY₃₋₃₆ reduce la ingesta mediante un mecanismo a nivel hipotalámico, otros estudios sugieren la intervención del nervio vago, basándose en que el Y2R se expresa también en las proyecciones vagales aferentes y que mediante la vagotomía se impide este efecto (99).

Aunque algunos grupos no han conseguido replicar el efecto anorético de PYY₃₋₃₆ administrado periféricamente, otros lo han descrito tanto en roedores como en primates no humanos. Quizás estas discrepancias puedan ser explicadas por

diferencias metodológicas en los tratamientos tales como dosis, vías e inicio de la administración (95;96).

2. CNS

El interés por entender el papel del cerebro en la regulación del balance energético corporal se inició en la década de los 50, cuando Mohr y Frohlich observaron que pacientes con adenomas hipofisarios presentaban un rápido y significativo aumento de peso.

Años después, y a través de distintos experimentos con ratas en los que se lesionaban y/o se bloqueaban mediante fármacos distintas zonas del cerebro, se estableció la teoría del "modelo de doble centro" en la que consideraban la existencia de dos centros hipotalámicos implicados: centro de saciedad (VMN) y centro del hambre (LHA).

Actualmente se sabe que uno de los principales puntos de regulación de la ingesta es el hipotálamo, donde se establecen distintos circuitos neuronales mediados por neuropéptidos. Sin embargo, existen otras áreas cerebrales que también intervienen en la integración de señales periféricas y centrales, colaborando en definitiva en la regulación de la homeostasis energética.

➔ HIPOTÁLAMO

Dentro del cerebro, el hipotálamo es una región crítica en la regulación de la ingesta ya que recibe e integra señales periféricas.

Dentro del hipotálamo se diferencian distintos núcleos neuronales. De ellos el ARC contiene el primer orden de neuronas (NPY/AgRP y POMC) sobre las que actúan directamente señales periféricas como la leptina, y que emiten proyecciones a otras regiones, tanto del hipotálamo (VMN, PVN, LHA, y DMN) como del cerebro, implicadas en la regulación de la ingesta.

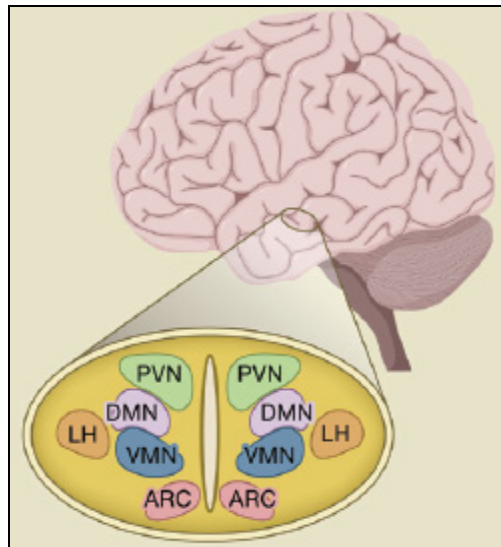


Figura 8: Disposición de los distintos núcleos en el Hipotálamo. ARC (núcleo Arcuato), VMN (Ventromedial), DMN (Dorsomedial), LHA (Lateral) y PVN (Paraventricular).

➤ **Núcleo ARC**

Está considerado el principal núcleo regulador de la ingesta por las siguientes razones:

- Situación: está situado en la parte más basal del hipotálamo, justo encima de la eminencia media. Como en esta zona casi no existe BBB permite el paso de numerosas sustancias circulantes en sangre hacia el cerebro, pudiendo así responder rápidamente a fluctuaciones en nutrientes y hormonas.
- Control: los grupos neuronales que lo componen están muy inervados por axones desde distintas zonas del cerebro y presentan receptores para muchas hormonas, reflejando así la existencia de una alta regulación.
- Especialización: en él se diferencian dos grupos de neuronas (NPY/AgRP y POMC/CART) que están próximos e interconectados (100), que reciben señales del estado nutricional y secretan neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos respectivamente. Constituyen el primer orden de neuronas implicadas en la regulación de la ingesta.

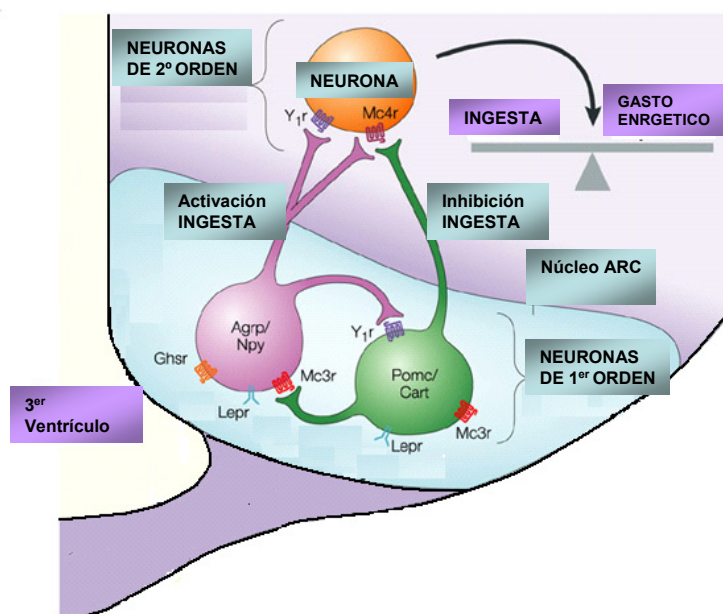


Figura 9: El ARC desempeña un papel clave en la regulación de la ingesta. Consta de dos grupos neuronales NPY/AgRP y POMC/CART que son las que primero reciben información periférica (hormonas, neurotransmisores) sobre las reservas del organismo, y mediante proyecciones sobre otras neuronas regulan el balance energético.

✘ NPY

Es una molécula de señalización anabólica secretada por las neuronas NPY, que emiten proyecciones hacia otros núcleos neuronales como el PVN (la proyección más importante), DMN, y LHA.

La administración de NPY en ratas, tanto intraventricular como hipotalámica, estimula la ingesta y disminuye el gasto de energía gracias a la disminución de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (101) e inhibición del eje tiroideo (102). Además, activa enzimas lipogénicas en el hígado y tejido adiposo blanco. Esto nos indica que no es simplemente un neuropéptido orexigénico, sino que es un importante regulador del metabolismo causando el desarrollo de un fenotipo obeso.

De acuerdo con su papel fisiológico en el control de la ingesta, los niveles de mRNA de NPY, así como el péptido NPY, aumentan de forma significativa durante el ayuno y disminuyen después de este (103).

A pesar de que NPY es una señal orexigénica, el ratón *NPY-null*, presenta un fenotipo normal, con una pequeña disminución en la ingesta provocada por ayuno. Esto puede ser debido a un mecanismo compensatorio generado por otros neuropéptidos como por ejemplo AgRP (104;105).

NPY, al igual que PP y PYY, se une a los receptores YR. Se han descrito 6, de los cuales Y1R-Y5R se encuentran en rata, mientras que Y6R se ha descrito en ratón y permanece inactivo en primates (106).

NPY puede unirse a distintos receptores (Y1R, Y2R, Y4R y Y5R). Esto hace pensar que el efecto orexigénico del neuropéptido pueda ser debido a una acción conjunta de los distintos receptores. Aunque existen trabajos que señalan a los receptores Y1R e Y5R como responsables de mediar el efecto de NPY, existen otros en los que también se destaca la función de Y2R e Y4R sobre la ingesta: el bloqueo de Y5R inhibe la ingesta (107); el ratón deficiente en Y5R tiene atenuada la respuesta a NPY (108); el ratón deficiente Y1R es obeso (109); el ratón KO Y2R presenta un incremento en la ingesta, peso corporal y adiposidad (110).

Se ha descrito una relación inversa entre los niveles de NPY en el hipotálamo y los niveles de insulina y leptina circulantes: un descenso en los niveles de leptina e insulina debidos a una reducción de la grasa corporal provocan un aumento en los niveles de NPY.

✘ AgRP (Péptido relacionado con Agouti)

Es un neuropéptido de 132 aa que pertenece a la familia de péptidos agouti.

La expresión de agouti da lugar a distintos efectos: pelaje amarillo, obesidad, resistencia a insulina, hiperglicemia, y un incremento de la longitud corporal.

En humanos también se expresa el gen *agouti* en el tejido adiposo (111).

AgRP se expresa solo en el ARC del hipotálamo en el cerebro. Coexpresa con NPY y proyecta a varios núcleos hipotalámicos, tales como PVN y DMN, y lugares extrahipotalámicos (112).

La leptina inhibe la liberación de AgRP. Al igual que NPY, la expresión de AgRP está regulada por la deficiencia de leptina causada por ayuno o mutación (113).

AgRP es un potente y selectivo antagonista de MC3R y MC4R (114), que son receptores de melanocortinas implicados en el control del balance energético. La inhibición de estos receptores lleva a un fenotipo obeso que está asociado con hiperfagia, disminución de la termogénesis y de la eficiencia calórica.

A diferencia de NPY, la administración de AgRP a lo largo de una semana en roedores lleva a un incremento en la ingesta (115). Algunos estudios más recientes sugieren que al menos parte de las acciones a largo plazo pueden ser independientes del antagonismo con los receptores MC3/4, y podría implicar mecanismos adicionales tales como cambios iniciados por el antagonismo sobre los receptores de melanocortinas, agonismo inverso sobre MC3/4, o interacción con receptores desconocidos (116).

La administración crónica de AgRP en roedores causa una sostenida hiperfagia que lleva a obesidad (117). Alteraciones en la expresión de AgRP han sido observadas en condiciones crónicas de balance energético positivo o negativo. Huang *et al* (118) observaron que 22 semanas de HFD reducen significativamente la expresión hipotalámica de AgRP e incrementa la expresión de MCR4.

✘ POMC- Sistema Melanocortinas

El gen *pomc*, que en mamíferos se expresa exclusivamente en las neuronas del ARC, da lugar por procesamiento proteolítico a una serie de

péptidos entre ellos la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) y la adrenocorticotropina (ACTH).

Los niveles de expresión de POMC reflejan el estado energético del organismo ya que disminuyen con el ayuno y aumentan tras la administración de leptina o después de 6h de realimentación (119). Tanto mutaciones en el gen *pomc* como anomalías en su procesamiento dan lugar a obesidad temprana, insuficiencia renal y pelo con pigmentación roja en humanos (120). POMC se coexpresa en el ARC con CART, y estas neuronas están directamente reguladas por leptina (23).

Dentro de las melanocortinas, la más implicada en la regulación de la ingesta y el peso corporal es α -MSH (hormona estimulante de melanocitos), que ejerce su efecto mediante la unión con los receptores de melanocortinas, MCR3 y MCR4, expresados mayoritariamente en zonas sobre las que proyectan las neuronas del ARC tales como el PVN. Además de disminuir la ingesta, activa el eje tiroideo y aumenta el gasto energético (calculado en función del O_2 consumido) aumentando también la termogénesis (121;122).

Los agonistas de estos receptores causan anorexia, mientras que los antagonistas inducen hiperfagia y obesidad; además alteraciones en estos receptores son las responsables del 1-6 % de la obesidad temprana severa en humanos (123;124).

En ratones, la deficiencia genética del receptor MC4 origina hiperfagia y obesidad. Sin embargo, en cuanto a MCR3 no está todo tan claro: mediante la administración de un agonista selectivo no hay diferencias en ingesta (125), mientras que la administración de un antagonista de MCR3/MCR4 como AgRP en un ratón sin MCR4 aumentaba la ingesta; el ratón con MCR3 *null* presenta hiperfagia y obesidad tanto con dietas normales como altas en grasa; mutaciones de MCR3 en humanos dan lugar a obesidad.

La administración central de α -MSH inhibe la ingesta y reduce el peso corporal. El efecto estimulador de AgRP es inhibido mediante α -MSH (115). Así, se establece un sistema dinámico entre α -MSH y AgRP *in vivo*.

Estudios más recientes apuntan a la necesidad de que el sistema de melanocortinas esté intacto para que se lleve a cabo la regulación a corto plazo de la ingesta (126).

Recientemente, datos obtenidos por Nogueiras *et al*/comprobaron, mediante el uso de una combinación de pruebas genéticas y farmacológicas, que el sistema de las melanocortinas promueve el almacenamiento de grasa mediante la acción directa sobre el hígado, músculo y tejido adiposo. Este control del CNS sobre el metabolismo de lípidos y de glucosa parece ser llevado a cabo principalmente por el SNS y es independiente de cambios paralelos en la ingesta y la adiposidad. En concreto, cuando la actividad del sistema de melanocortinas está reducida, se desencadena una respuesta coordinada que promueve la deposición de grasa mediante: incremento de la síntesis de TG en el hígado, disminución del uso de glucosa por parte del músculo y BAT, aumento de la sensibilidad a insulina así como la entrada de glucosa y lípidos en WAT, promoviendo así la síntesis de TG en WAT. Estos cambios metabólicos en distintos órganos parecen ser relevantes en roedores y humanos; representa un circuito sinérgicamente regulado que puede potenciar el cambio en el sustrato utilizado y reparto de nutrientes que, en definitiva, puede alterar la reserva energética (127).

✘ CART

CART (tránsito regulado por anfetamina y cocaína) se expresa en las mismas neuronas que POMC en el ARC. El hecho de que esté altamente conservado en los mamíferos indica que tiene un papel fisiológico importante. Aunque la homología de CART entre humanos y ratas es del 92%, en ratas se

obtienen dos isoformas mientras que en humanos solo la forma corta CART (1-89) (128).

El péptido CART se expresa en distintas zonas del cerebro incluyendo el PVN (donde colocaliza con vasopresina y CRH (129), DMN, región perifornical, LHA y sobretodo en el ARC.

Las neuronas que secretan CART también están asociadas con recompensa y refuerzo, procesamiento sensorial, estrés, regulación endocrina e ingesta (caracterizada por la inhibición de la ingesta sin modificar gasto energético) (130).

La administración icv de CART, especialmente en el 4° Ventrículo, provoca activación neuronal en el PVN, rico en CRH y TRH, causando así la reducción de la ingesta normal y la inducida por ayuno (131). Colocaliza con receptores de leptina en las neuronas del hipotálamo: en ambos, ratas *fa/fa* y ratones *ob/o*, reduce los niveles de expresión de CART en el ARC, mientras que la administración de leptina a ratones *ob/ob* incrementa mRNA de CART (128).

Los niveles de expresión de CART caen durante el ayuno o diabetes, indicando que la expresión de CART está regulada por la cantidad de reserva energética y el estado hormonal periférico (129).

➤ Núcleo VMN

Desde que fue denominado "centro de saciedad" al comprobar que lesiones bilaterales cuasaban hiperfagia y obesidad, la participación del núcleo VMN en la regulación de la ingesta parece clara.

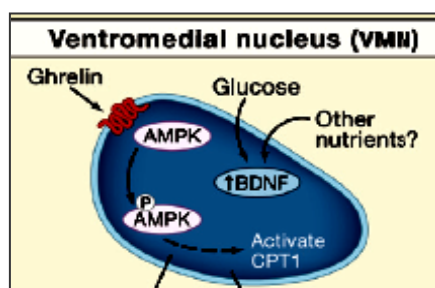


Figura 10: Factores implicados en la regulación de la ingesta a nivel del VMN.

El VMN puede aumentar directamente la actividad de las neuronas POMC mediante microcircuitos, estimulando su actividad excepto en estado de ayuno en el que disminuye, además de proyectar hacia otros núcleos hipotalámicos y al tronco cerebral. Por su parte el ARC también regula la actividad del VMN donde se encuentran receptores MCR4, Y1R, Y2R e Y5R, sugiriendo que tanto POMC como NPY emiten proyecciones al VMH. La administración de NPY en el VMN aumenta la ingesta, el ayuno está asociado con unos niveles elevados de NPY en esta región, mientras que la respuesta electrofisiológica de las neuronas en el VMH a α -MSH está disminuida en animales en ayuno y/o tratados con AgRP.

La importancia del VMN en la regulación de la homeostasis energética ha sido soportada por estudios en los que se demuestra la existencia de ObRb y activación neuronal inducida por leptina: inyecciones selectivas de Ob en el VMN reducen la ingesta y el peso corporal en ratas delgadas. También, estados metabólicos alterados tales como ayuno o preñez alteran de forma selectiva la expresión de ObRb en el VMN. Mientras, la delección de ObRb, de forma selectiva en este núcleo, disminuye la ganancia de peso corporal con un aumento de los niveles plasmáticos de leptina y de la expresión de UCP1 en BAT (132).

Otro ejemplo de regulación núcleo específica de la ingesta a nivel del VMN, es la modificación de la actividad de AMPK y consecuentemente de la vía de metabolismo de lípidos (ACC-FAS-CPT-1) (133). En concreto, se ha propuesto que la inhibición de FAS a nivel del VMN (genética, farmacológica o por hormonas periféricas) provoca el descenso de la ingesta, sugiriendo que FAS en este núcleo puede actuar como un sensor nutricional integrando señales periféricas con los mecanismos centrales que regulan la ingesta.

Además, en el VMN se expresa el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), implicado en la regulación del desarrollo neuronal y su plasticidad, y cuya expresión se reduce en situaciones de ayuno (134). Se ha comprobado en humanos que la alteración de BDNF o su receptor TRKB, causan hiperfagia y obesidad, además de retraso en el desarrollo mental, disminución de la memoria a corto plazo y hiperactividad (135;136).

Este factor, que interviene en las funciones metabólicas reguladas por el VMH, está regulado a su vez por distintos factores nutricionales. Este efecto no es mediado por el sistema de melanocortinas, a diferencia de lo que se pensaba inicialmente, ya que BDNF reduce la ingesta y el peso corporal en ratones deficientes de MCR4 (137).

➤ **Hipotálamo Lateral (LHA)**

Este núcleo forma parte del segundo orden de integración de señales implicadas en la regulación energética, especialmente del ARC. En él se sintetizan dos tipos de péptidos: hipocretinas (orexinas) y hormona concentradora de melanina (MCH).

Se caracterizan por emitir proyecciones a un amplio número de zonas del CNS (córtex, tálamo o sistema límbico) participando en numerosas funciones tales como aprendizaje, memoria, emoción, y respuestas motoras en función del estado energético ya que están reguladas por numerosas hormonas, entre ellas, ghrelin y leptina.

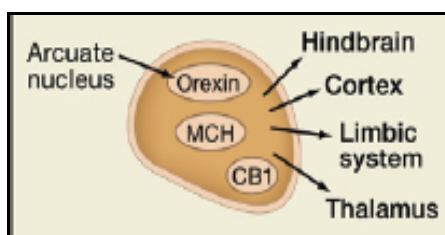


Figura 11: Factores implicados en la regulación de la ingesta a nivel del LHA.

✘ OREXINAS (OXs):

Las orexinas A y B, se obtienen a partir del procesamiento proteolítico de la pre-pro-orexina. Son secretadas por neuronas distintas (138), y ejercen su efecto a través de proyecciones a distintas zonas del cerebro, por ejemplo PVN, ARC, tálamo, córtex cerebral, NTS y núcleo dorsal motor del vago. Estas importantes conexiones sugieren que las orexinas intervienen en diferentes facetas relacionadas con la alimentación. Se unen a dos receptores específicos, ampliamente distribuidos en el CNS, pertenecientes ambos al grupo de los acoplados a proteínas G (139).

Se las ha relacionado también con la ingesta de líquidos y con el sueño pues la delección del gen de orexinas en ratones induce narcolepsia (140;141).

La administración central de orexina A ejerce un potente efecto orexigénico, mientras que la orexina B no tiene efecto (142). La expresión del mRNA de pre-pro-orexina aumenta en situaciones de ayuno, y este efecto se revierte cuando se trata a las ratas con leptina en el ventrículo lateral (27). Se sabe que el 50% de las neuronas productoras de orexinas expresan receptores tanto de orexina como de leptina, y que se activa la expresión de orexina ante hipoglucemia causada por insulina. El estado tiroideo no afecta a los niveles de mRNA de pre-pro-orexina en el hipotálamo (143).

Todas las neuronas hipotalámicas que se activan durante el estado de ayuno reciben proyecciones desde las neuronas productoras de orexina, entre ellas el NPY con el que establece, a bajas concentraciones, un efecto sinérgico sobre la ingesta, pudiendo ser el sistema de las orexinas un regulador de NPY y de su efecto sobre ingesta y metabolismo.

Los niveles de mRNA de pre-pro-orexina disminuyen tanto en la gestación como en la lactancia. En experimentos en los que se inducía hiperprolactinemia también se vió que había una disminución significativa de los niveles del mRNA de pre-pro-orexina cuando se comparaban con las ratas "sham" (144).

El ratón *oxs^{-/-}* es hipofágico pero con un índice de crecimiento normal, gracias a una disminución en la tasa metabólica. Es además un buen modelo de estudio de narcolepsia humana (145) ya que las neuronas productoras de orexinas proyectan también a áreas asociadas con el despertar y la atención. En circunstancias de inanición, las orexinas pueden mediar tanto en respuesta a la atención, para mantenerse despiertos, como en la ingesta dando la orden del inicio de la comida. Esto hace que las orexinas sean buenas candidatas para la conexión entre insomnio y obesidad.

La orexina puede jugar un importante papel como hormona periférica implicada en la regulación de la ingesta energética: las neuronas secretoras de orexinas tienen receptores tanto de orexinas como de leptina

La orexina también se expresa en células endocrinas de la mucosa gástrica, intestino y páncreas (146), y la administración periférica aumenta los niveles de glucosa en sangre.

Las terminaciones de NPY, AgRP y α -MSH son abundantes en el LHA y están en contacto con células que expresan MCH y orexinas (147;148).

El mecanismo por el cuál las neuronas que expresan MCH y orexinas ejercen su acción sobre la homeostasis energética todavía no ha sido completamente elucidado, aunque está claro que la mayoría de las dianas están en el sistema endocrino y sistema nervioso autónomo, el núcleo nervioso craneal motor y estructuras corticales (149).

✘ MCH:

Es un péptido orexigénico que ejerce su efecto sobre la ingesta de forma independiente de NPY y orexina, ya que no se observa ningún efecto sinérgico cuando se administran juntos en el 3^{er} ventrículo de ratas (150).

Además de participar en la regulación de la ingesta, se le han atribuido otras funciones: sueño-vigilia, reproducción, integración de señales sensoriales y su respuesta motora, así como regulación de la sed.

Los niveles de mRNA de MCH están elevados en animales obesos y durante el ayuno, y la administración icv repetida de MCH incrementa la ingesta y produce obesidad moderada en ratas (151;152). Además, la delección del gen en ratón resultó en un fenotipo hipofágico y muy delgado, con una tasa metabólica muy alta, mientras que el ratón transgénico que sobreexpresa el precursor de MCH es hiperfágico y desarrolla obesidad central. Esto hace pensar que MCH es el tercer neuropéptido que modifica el balance energético mediante el aumento de la ingesta y el descenso del gasto simultáneamente. De acuerdo con esto, se ha comprobado que MCH suprime la liberación de TSH.

El efecto estimulador de ingesta de MCH parece competir con α -MSH puesto que, tras la administración conjunta de ambos péptidos, uno antagoniza el efecto del otro (137).

El LHA puede ser también un lugar de acción para el sistema de endocannabinoides ya que las neuronas orexigénicas de esta zona (orexina y MCH) expresan CB1, receptor de endocannabinoides (153):

- Se ha demostrado recientemente que la estimulación de CB1 activa la misma ruta intracelular que la orexina-A, sugiriendo un papel orexigénico de los endocannabinoides a través de esta población neuronal. Además, teniendo en cuenta que estas neuronas proyectan hacia zonas del VTA, es posible que el LHA actúe como punto integrador de señales orexigénicas, hipotalámicas y extrahipotalámicas, mediadas por el sistema de endocannabinoides.

-También las neuronas MCH pueden participar en la señal orexigénica de los endocannabinoides, ya que se ha comprobado que los endocannabinoides pueden estimular las neuronas MCH, disminuyendo la señal inhibidora GABA, causando un aumento de la ingesta. Efecto que puede ser bloqueado mediante la administración de leptina.

➤ **Núcleo PVN**

Está situado en la parte anterior del hipotálamo, próximo a la parte superior del 3^{er} ventrículo. Es el principal núcleo productor de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona liberadora de tirotrópina (TRH).

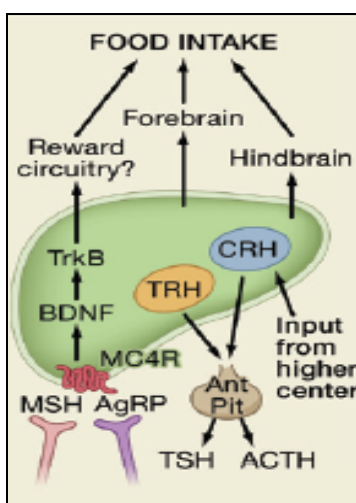


Figura 12: Regulación de la ingesta a nivel del PVN.

Es una de las áreas de neuronas secundarias que procesan la información para la regulación de la homeostasis energética, ya que recibe proyecciones desde las neuronas NPY/AgRP (atenúan la señal inhibitoria GABA-érgica) del ARC, melanocortinas (aumenta la señal GABA-érgica), orexinas y otras zonas como el NTS.

El PVN es muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta como CCK, NPY, ghrelin. Estos péptidos pueden actuar mediante AMPK ya que la administración de péptidos anorexigénicos activan la subunidad $\alpha 2$ -AMPK mientras que los péptidos orexigénicos la estimulan.

Estas proyecciones desde otros núcleos, así como los péptidos periféricos, pueden regular la actividad de las neuronas TRH y las que expresan CRH, y

éstas a su vez actúan sobre las células hipofisarias productoras de TSH, indicando así que el PVN integra señales nutricionales con el eje hipofisario y tiroideo (99).

El PVN puede, además, ser un lugar de interacción entre el sistema de endocannabinoides y neuronas orexigénicas y anorexigénicas: se ha encontrado que el receptor de endocannabinoides CB1 se coexpresa con CRH y CRH-R1, de modo que el aumento de endocannabinoides lleva a un descenso en la secreción de CRH, pudiendo éste ser el mecanismo a través del cual se ejerce, en última instancia, el efecto de los glucocorticoides sobre la ingesta (153).

➤ **Núcleo DMH**

El núcleo DMH, recibe conexiones de otras zonas como el hipotálamo medio y lateral, así como del ARC de donde recibe proyecciones de NPY/AgRP integrando y procesando esta información (154).

Está relacionado con: modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño-vigilia, ritmo circadiano y actividad locomotora (155).

➤ **Otros factores hipotalámicos**

▪ El **Núcleo Supraquiasmático (SCN)** ha sido relacionado con la regulación de la ingesta teniendo en cuenta la importancia que tiene esta región cerebral sobre el ritmo circadiano y su influencia sobre las funciones biológicas.

El CNS proyecta hacia distintas zonas hipotalámicas, como el PVN y DMN, y recibe inervación desde el VMN y el ARC (en concreto el sistema de melanocortinas) regulando así la actividad de CNS, aunque está especialmente relacionado con el sistema de las orexinas (156).

Mutaciones en determinados genes de esta región conducen a obesidad, como por ejemplo el *clock*; un gen crítico para la generación del ritmo circadiano y cuya delección (*clock*^{-/-}) da lugar a un ratón hiperfágico y obeso (157).

▪ **Intracelulares:**

✘ **AMPK y metabolismo de lípidos:**

- **AMPK**: el enzima AMPK se activa en respuesta a un incremento en el ratio intracelular de AMP/ATP, actuando como un sensor del estado energético en la célula. La activación de AMPK (fosforilación) dispara las rutas productoras de ATP, mientras que inhibe las que consumen ATP, intentando mantener el balance energético. La activación de AMPK en músculo esquelético, hígado y tejido adiposo mejora la sensibilidad a insulina; además, se ha demostrado recientemente que regula la ingesta a nivel hipotalámico (activación de AMPK incrementa la ingesta mientras la inhibición la disminuye). Esto sugiere que el AMPK hipotalámico, además de sensor energético, puede estar mediando el efecto de ciertos péptidos: es activado por péptidos orexigénicos como ghrelin, canabinoides o AgRP, e inhibido por factores anorexigénicos (leptina, insulina) (158).

El efecto de distintas hormonas sobre AMPK puede ser específico del tejido, causando activación/inhibición de esta kinasa a nivel central e inhibición/activación a nivel periférico, respectivamente (159).

En general, la activación de AMPK causa el paso de condiciones anabólicas (promoviendo la síntesis y almacenaje de glucosa, glucógeno, ácidos grasos, colesterol y triglicéridos junto con un incremento del tamaño y del número de las células) a un estado catabólico (oxidación de glucosa, ácidos grasos y triglicéridos, e inhibición del crecimiento y la proliferación celular) para generar ATP.

- **Metabolismo de lípidos (160)**: una de las dianas mejor caracterizadas para mediar el efecto de AMPK sobre ingesta es la ruta de metabolismo de ácidos grasos. Así, la activación de AMPK hipotalámico mediante fosforilación, lleva a la fosforilación e inhibición de ACC (acetyl-CoA carboxilasa), y esto causa un descenso en los niveles de malonyl-CoA, y un aumento de la actividad de CPT-1 (carnitina-palmitoyl transferasa 1), resultando finalmente en la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y la activación de la β -oxidación. Al mismo tiempo, el descenso en los niveles de malonyl-CoA es interpretado como una señal de déficit energético y, por mecanismos aún desconocidos, desencadena la expresión de neuropéptidos orexigénicos causando un aumento de la ingesta. En definitiva ambas vías, activación de β -oxidación y la expresión de neuropéptidos orexigénicos, causan el aumento de los niveles de ATP.

Por el contrario, la inhibición de AMPK a nivel hipotalámico permite la síntesis de ácidos grasos, con el aumento en los niveles de malonyl-CoA y por tanto la inhibición de CPT-1. Esto supone el acúmulo de LCFA-CoA a nivel citosólico, interpretado como señal de exceso energético, causando la inhibición de la ingesta mediante la modificación de la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos.

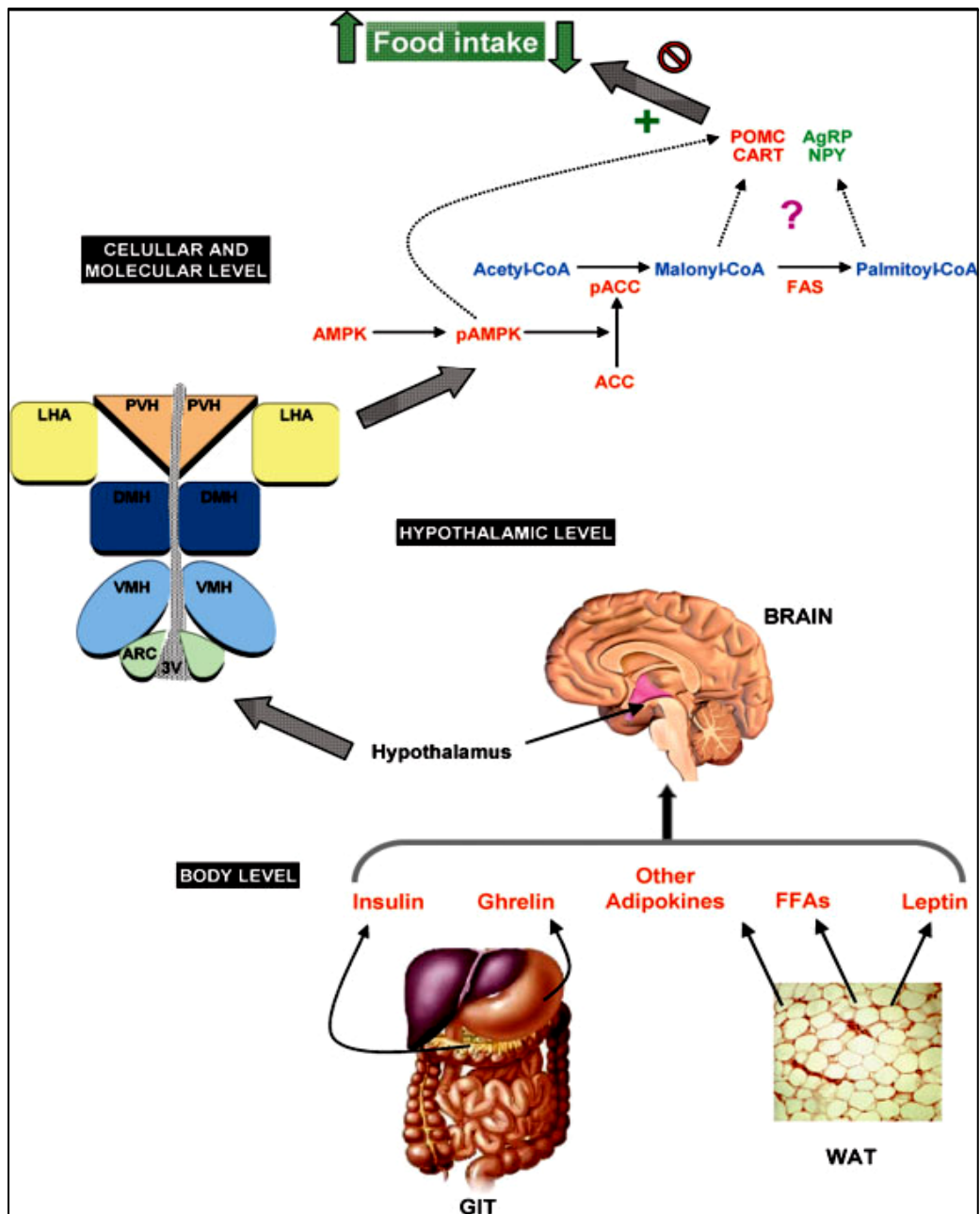


Figura 13: Mecanismo de acción de AMPK. Cambios en la actividad de AMPK en el hipotálamo pueden actuar a través de ACC/Malonyl-CoA/CPT-1/ β -oxidación de ácidos grasos para regular la ingesta.

✘ **mTOR:** mTOR ("mammalian target of rapamycin) es una kinasa altamente conservada que al igual que AMPK actúa como sensor del estado energético. En rata, la señal mTOR está controlada por regiones específicas

del hipotálamo y colocaliza con NPY y AgRP en el ARC. Como la administración icv de leucina aumenta la señal hipotalámica de mTOR causando la disminución de la ingesta y del peso corporal, se ha propuesto que mTOR está implicado en la regulación de la ingesta (34;161).

La administración de leptina y el *refeeding* activan la señal de mTOR, mientras que el ayuno la disminuye; la inhibición de mTOR mediante la administración de rapamicina consigue bloquear el efecto de leucina y leptina sobre la ingesta y el peso corporal.

AMPK también disminuye la actividad de mTOR en hipotálamo, mediando así la inhibición de síntesis de proteínas (162).

- **Sistema Endocannabinoides:** son cannabinoides endógenos (anandamida y 2-AG (2-Araquidonilglicerol)), que median sus efectos principalmente a través de dos receptores, CB1 y CB2.

Está implicado en distintas funciones: procesamiento memoria, ansiedad, actividad motora, nocicepción, control del apetito, sistema inmune (153).

Mediante la activación del receptor CB1, que se expresa fundamentalmente en el CNS, intervienen en la regulación de la ingesta: se ha encontrado altos niveles de endocannabinoides en hipotálamo de personas obesas; y la administración central y periférica de anandamida incrementa la ingesta, efecto que puede ser atenuado mediante la coadministración de antagonistas de CB1.

Aunque se sabe que el receptor CB1 se expresa en neuronas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta como CART, MCH y CRH, el mecanismo a través del cual media su efecto orexigénico sigue siendo materia de debate. Resultados recientes sugieren que la activación de CB1 desencadena la activación de neuronas orexigénicas e inhibición de las anorexigénicas, así como la activación de AMPK a nivel hipotalámico (163).

Además de su efecto sobre la ingesta actúa directamente sobre tejidos periféricos tales como tejido adiposo y hígado, en los que promueve la adipogénesis y disminuye el gasto energético (164).

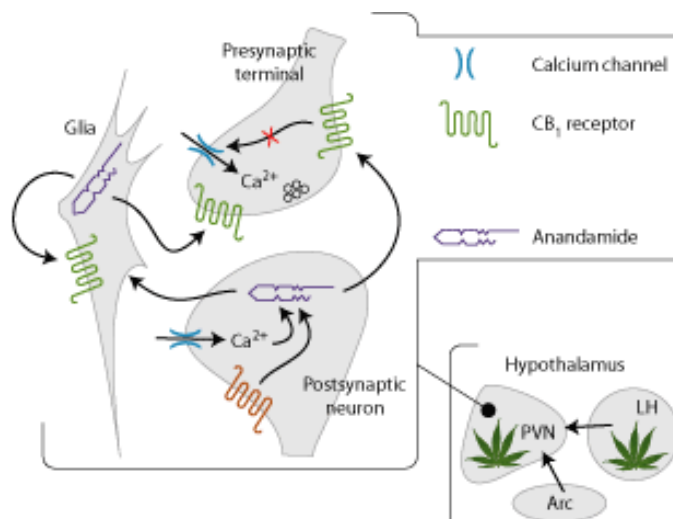


Figura 14: Mecanismo de acción de los endocannabinoides. Mediante señal presináptica inhibitoria impide la liberación de neurotransmisores por otras neuronas.

El receptor CB₂, aunque también está presente en el cerebro, se expresa de forma mayoritaria en tejidos periféricos tales como bazo o amígdalas, y está implicado en reacciones inflamatorias y procesos generales del sistema inmune (153).

Mediante trabajos realizados en ratones doble KO para los receptores CB₁ y CB₂, se ha sugerido la existencia de otros receptores de endocannabinoides. Uno de ellos es el GPR55, que se expresa en cerebro, componentes del sistema inmune, epitelio vascular, etc. A juzgar por el fenotipo del ratón *gpr55*^{-/-}, parece que media acciones del sistema de endocannabinoides en procesos de inflamación, y percepción y respuesta al dolor (165).

➔ **TRONCO CEREBRAL**

Existen conexiones recíprocas entre hipotálamo y el tronco cerebral. Se cree que el tronco cerebral está implicado en el control autonómico de la ingesta, la digestión y la absorción de comida, mediante la inervación parasimpática (nervio vago) y respuesta simpática.

En concreto el **núcleo tracto solitario (NTS)** regula el tamaño de las comidas en función de las señales postprandiales recibidas desde la boca y el tracto gastrointestinal, según las propiedades químicas y mecánicas de los alimentos, y transmitidas a través del nervio vago y otros nervios craneales (137).

Se han encontrado en esta zona numerosos receptores de hormonas periféricas que regulan la ingesta: Y1R, Y5R y ObRb.

Mediante estudios realizados en ratas descerebradas, se ha comprobado que el NTS puede aumentar el tamaño de las comidas si se disminuye la frecuencia de estas (166).

➔ **OTROS MECANISMOS REGULADORES A NIVEL CENTRAL:**

▪ **Sistema Dopaminérgico:** está relacionado con la regulación de la actividad locomotora, estado anímico y recompensa. En concreto, las que neuronas del área tegmental ventral (VTA) que liberan dopamina y que proyectan sobre el NAc (núcleo acumbes) están implicadas en sistemas de recompensa asociadas a ingesta. Aunque inicialmente se creía que las señales metabólicas modificaban el sistema de dopamina a través del ARC, ahora se cree que las propias neuronas dopaminérgicas son sensibles a distintos péptidos hipotalámicos tales como NPY, AgRP y orexinas, y también a ghrelin, insulina o leptina (137).

▪ **Cerebelo:** mediante estudios electrofisiológicos se han encontrado conexiones bidirecciones entre neuronas hipotalámicas y el cerebelo. Está relacionado con la motivación de comer, y se ha encontrado que la saciedad disminuye la actividad del cerebelo mientras que la administración oral de glucosa la aumenta. Desde el cerebelo salen proyecciones hacia otras zonas implicadas en la regulación de la ingesta tales como NTS (167).

▪ **Hipocampo:** está relacionado con memoria espacial, así como de eventos y hechos. Además, está implicado en la regulación de la ingesta ya que presenta receptores de señales metabólicas tales como insulina y leptina, necesitando para ello que presente integridad estructural. Exposición a dieta alta en grasa está asociada a aumento de ingesta, ganancia de peso y disminución de la memoria (168).

II. GHRELIN

1. Antecedentes y descubrimiento.

En el 1999, el grupo de Kojima *et al* (92) descubrió, a partir de extractos gástricos, un péptido que era ligando endógeno para el receptor de secretagogos de GH (GHS-R). Al péptido purificado lo denominaron ghrelin ("ghre" la raíz protoindoeuropea de la palabra "growth" (crecimiento)).

El descubrimiento de ghrelin surgió como resultado de la conocida como farmacología reversa que se inició con la síntesis de secretagogos artificiales, siguió con la clonación del receptor y finalmente la identificación de la hormona endógena.

Desde finales de los 70 se sintetizaban pequeñas moléculas denominadas GHRP (péptidos sintéticos liberadores de hormona de crecimiento) con capacidad para estimular y amplificar la secreción pulsátil de GH (169). Posteriormente, se sintetizaron compuestos, tanto de naturaleza peptídica como no peptídica, que se denominaron en conjunto GHS (secretagogos de GH). Estos compuestos, tales como hexarelina o GHRP-6, causaban el aumento en los niveles de secreción de GH, *in vitro* e *in vivo*.

Posteriormente, en 1996 (170) descubren el receptor de secretagogos en hipófisis y en distintos núcleos hipotalámicos, lo que sugiere la existencia de algún otro componente implicado en la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento además de los conocidos hasta ese momento (GHRH y SST). Al año siguiente se aislaron dos isoformas de este receptor: GHS-R1a y GHS-R1b.

Sin embargo, el descubrimiento del ligando endógeno vino posteriormente a partir de la expresión del receptor en una línea celular, y mediante la cuantificación del incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular que se producía tras la activación del GHS-R. Chequearon distintos extractos de tejidos de rata tales como cerebro, pulmón, corazón, riñón y estómago, siendo en este último en el que detectaron, de forma inesperada, mayor actividad del receptor.

El péptido purificado constaba de 28 aa y estaba caracterizado por presentar un grupo *O*-*n*-octanoico en el residuo 3 (Ser). Esta modificación, no conocida hasta ese momento, parecía clave para poder desempeñar su función como activador de la secreción de *GH* tanto *in vivo* como *in vitro*. La homología entre el ghrelin humano y de roedores superaba el 80% (solo se diferencia en dos aminoácidos) (92), indicando que estaba altamente conservado entre especies, especialmente en mamíferos (171) mientras que no existía homología estructural con *GHRP-6* o hexarelina.

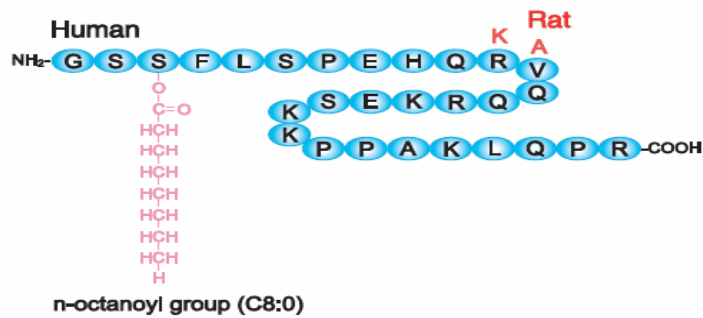


Figura 15: Secuencia de aa de ghrelin acilado.

Su función como secretagogo de *GH* suponía la existencia de un nuevo péptido implicado en la regulación de esta hormona, modificando lo conocido hasta el momento. Además de *GHRH* (estimulador) y *SST* (inhibidor) existía un tercer péptido que, liberado mayoritariamente desde el estómago, podía regular la secreción de *GH*. Esto, junto con el descubrimiento de su potente efecto orexigénico (172) y que inducía adiposidad en roedores (173), despertó un gran interés en este péptido: en saber cómo se regulaba su síntesis y cuál era la fuente de su modificación en el residuo 3, cómo mediaba esas funciones y si intervenía en más procesos fisiológicos, y también su potencial uso como diana terapéutica.

2. Un gen, distintos péptidos.

2.1. Estructura y procesamiento.

El gen *ghrelin* humano está situado en el cromosoma 3p25-26. Consta de 4 exones y 3 intrones. En roedores se ha encontrado también un 5º exón de tan solo 20 bp, que codifica parte de la región 5' que no se traduce (174).

A partir de este gen se obtiene un precursor denominado pre-pro-ghrelin que consta de 117 aa.

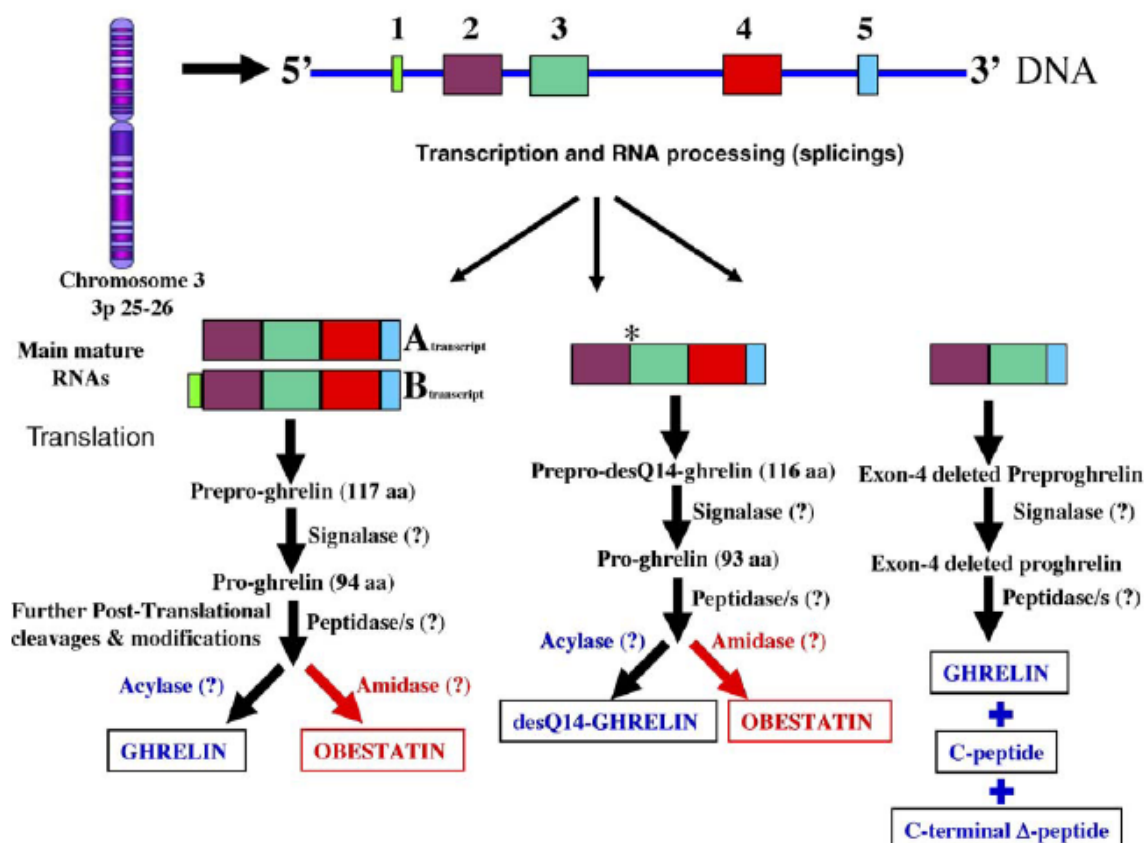


Figura 16: Estructura del gen de ghrelin en ratón, transcripción y *splicing* alternativo, traducción de mRNA maduro y procesamiento postraduccional con la obtención final de ghrelin acilado, ghrelin desacilado y obestatina. Mediante *splicing* alternativo se obtienen dos moléculas de preproghrelin: des-Gln14-pre-pro-ghrelin (sin glutamina en la posición 14) y pre-pro-ghrelin.

El posible codon de iniciación ATG se sitúa en los nucleótidos 34-36 mientras que el codon terminal TAG se encuentra en la posición 385-387 (175). La señal de poliadenilación, AATAAA, está en la posición 494-499 de forma parecida a lo que sucede en roedores (174).

En el gen *ghrelin* se encuentran dos señales de procesamiento: a -80 y -555 del codon de iniciación ATG, dando lugar a dos mRNA diferentes: mRNA-A (preproghrelin) y mRNA-B (Des-Gln14-preproghrelin). Estudios con cDNA de ghrelin humano revelaron que el transcrito mRNA-A (preproghrelin mRNA), producto de un *splicing* alternativo de los exones 2 a 4, da lugar a la principal forma de ghrelin en humano (176).

El preproghrelin contiene una secuencia señal de 23 aa y un proghrelin de 94 aa. Esto incluye el ghrelin maduro de 28 aa (1-28) y una cola de 66 aa (29-94) (92). La secuencia de ghrelin se inicia desde Gly1 y los dos últimos residuos de ghrelin son Pro27-Arg28, que corresponden con la señal de procesamiento. El corte más frecuente suele darse tras el Pro27-Arg28 en el extremo C-terminal, dando lugar al péptido de 28 aa, **ghrelin (1-28)**. También es posible, aunque poco habitual, que en ese mismo precursor se elimine también Arg28, dando lugar a **ghrelin (1-27)** (175). Ambos péptidos son sometidos a una única modificación postranscripcional: acilación del grupo OH de la Ser3. En la mayoría de los casos el ácido graso que se añade es un grupo octanoico (C8:0), pero puede ser también decanoico (C10:0) o (C10:1) (175).

Algunos trabajos sugieren que las distintas modificaciones pueden ser, al menos parcialmente, dependientes de la nutrición: se puede aumentar la acilación de ghrelin mediante el incremento del consumo de ácidos grasos de cadena media o triglicéridos de cadena media (177). Faltaría por demostrar si el efecto es directo o indirecto.

La purificación y caracterización del ghrelin humano y sus análogos del estómago, ha permitido clasificarlos según dos criterios: en función de su longitud (1-28 aa, o 1-27 aa) y en función del tipo de acilación (desacilado, octanoilado, decanoilado y posiblemente decenoilado).

Aunque la forma más activa del ghrelin humano es el de 28 aa y octanoilado, pueden encontrarse también las siguientes formas: ghrelin (1-28) decanoilado, ghrelin (1-28)

decanoilado, ghrelin (1-27) octanoilado y ghrelin (1-27) decanoilado. Todas estas formas de ghrelin son encontradas tanto en estómago humano como en plasma (175).

Recientes resultados indican que la cola de 66 aa del extremo C-terminal de proghrelin puede circular como péptido completo (**C-ghrelin**) o ser procesado dando lugar a péptidos más pequeños, principalmente **obestatina**. Ambos con importancia biológica.

Pemberton *et al* (178) demostraron la presencia de C-ghrelin circulante en plasma en humanos, a una concentración mayor del ghrelin (1-28) octanoilado, en casos de fallo cardíaco, sugiriendo una posible función para este péptido. Más recientemente, Bang *et al* (179) propusieron que la mayoría de péptidos derivados de C- ghrelin , tanto en tejidos como circulantes, presentan la secuencia C-terminal completa de proghrelin y respondían a manipulación metabólica de forma similar a ghrelin (1-28), al menos en humanos. Ellos también demostraron que la distribución de C-ghrelin se corresponde con el ghrelin (1-28), siendo el estómago la fuente principal.

En 2005, Zhang *et al.* (180), mediante análisis comparativo de las secuencia de preproghrelin de 11 especies de mamíferos distintas, propusieron la existencia de un nuevo péptido del extremo C-terminal de proghrelin. Este nuevo péptido, se denominó obestatina ("Obese" del latín "obedere" que significa devorar y "statin" que significa supresión). La estructura de la obestatina fue deducida mediante la secuenciación de un péptido de 20 aa, combinada con datos de espectrometría, para generar una secuencia de 23 aa (proghrelin (53-75)). En el extremo C-terminal tiene un motivo Gly-Lys, lo que sugiere un posible lugar de amidación, siendo este paso un requisito previo para tener actividad biológica (180). Además, la masa espectrométrica indicó que ese péptido podía ser procesado para generar un péptido de 13aa, obestatina (11-23). Aunque es necesaria más información sobre cómo y dónde se forma esta proteína, hay resultados que sugieren que posee actividad biológica.

La obestatina fue originalmente extraída de estómago de rata, y posteriormente se propuso que también era un péptido circulante, variando en plasma de forma similar a ghrelin. La administración icv de obestatina en ratas inhibía la ingesta, la contracción

del yeyuno y disminuía la ganancia de peso. Inicialmente se consideró que la obestatina se unía al receptor huérfano, asociado a proteína G, GPR39 (180). Sin embargo, hay muchos resultados contradictorios, algunos de los cuales dudan de la existencia de la obestatina, especialmente como hormona circulante, en humanos (179).

Pre-pro-des-Gln14-ghrelin (mRNA-B), se obtiene a partir del mismo gen y está procesado de forma similar a preproghrelin. Da lugar a un péptido de 27 aa, **Des-Gln14-ghrelin** (181), que al igual que ghrelin está octanoilado en la Ser 3 pero que carece de glutamina en la posición 14. Aunque en estómago humano la cantidad de des-Gln14-ghrelin es prácticamente despreciable (175), esto cambia en otras especies. Así, el ratio entre los precursores de ghrelin/des-Gln14-ghrelin es de 5:1 en estómago de rata y 6:5 en estómago de ratón (174).

Yeh *et al* (182), descubrieron la expresión de un nuevo transcrito de ghrelin humano que carecía de exón 3 (**ghrelin deleccionado en el exón 3**) en cáncer de mama y próstata, y que tenía un homólogo murino que carecía del exón 4 (**ghrelin deleccionado en el exón 4**)(183). La delección del exón 3 en el preproghrelin resulta en un péptido maduro de ghrelin, además de un péptido de 16 aa (COOH-terminal $\Delta 3$), que aún no se sabe si está presente en circulación como el C-ghrelin; estudios preliminares indican que no influye en la proliferación celular ni en apoptosis. Sin embargo, la amplia expresión de C-ghrelin sugiere que puede desempeñar una función fisiológica aún desconocida y soporta la hipótesis que la generación de un C-péptido desde la variante de proghrelin con exón 3 deleccionado que puede tener alguna función fisiológica.

Comparación de secuencias entre ghrelin y motilina, muestra que ambas moléculas tienen un número idéntico de aa, lo que hizo pensar en su momento en un posible precursor común. Sin embargo, se comprobó que no sufrían la misma modificación postranscripcional (184).

2.2. Distribución

El gen *ghrelin* humano puede generar muchas moléculas activas mediante *splicing* alternativo y modificaciones postraduccionales. Estas moléculas pueden ser clasificadas en tres grupos principales: ghrelin y análogos, C-ghrelin y Obestatina.

El primer grupo incluye ghrelin octanoilado (1-28), ghrelin octanoilado (1-27), ghrelin decanoilado (1-28), ghrelin decanoilado (1-27), ghrelin desacilado (1-28) y ghrelin desacilado (1-27). Todas estas formas moleculares de ghrelin fueron encontradas en plasma humano así como en estómago, siendo las formas más comunes ghrelin (1-28) octanoilado y desacilado (175).

La distribución de ghrelin y UAG (ghrelin desacilado) parece ser similar. En mamíferos adultos, los tejidos con mayores niveles de ghrelin y UAG son el estómago, seguido de distintas partes del tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleo, ciego y colon) (181). En fetos, sin embargo, el estómago presenta una concentración de ghrelin muy baja aumentando ésta después del nacimiento. Algunos trabajos consideran al páncreas y al pulmón como principales fuentes de ghrelin durante este período (185).

En el cambio lactante-destete la concentración de ghrelin total (que incluye UAG y todas las formas aciladas de ghrelin con extremo C terminal) en estómago murino permanece estable.

En estómago, las células que sintetizan y secretan ghrelin han sido identificadas como las X/A, que son más abundantes en el *fundus* (90). En el estómago humano, el ratio UAG: ghrelin es 2:1 (175:179) mientras que circulante el UAG supera el 90% del ghrelin total.

Ghrelin se expresa, además, en otros tejidos pero a niveles más bajos: hipotálamo, hipófisis, glándula adrenal, tiroides, mama, ovario, placenta, testículo, próstata, hígado, vesícula biliar, páncreas, tejido adiposo, linfocitos humanos, bazo, músculo esquelético, miocardio, venas y piel (186). Aunque en muchos de estos tejidos se expresa también el receptor (GHS-R1a), se desconoce si ejercen algún efecto fisiológico autocrino o paracrino, ya que teniendo en cuenta los bajos niveles de expresión un efecto endocrino parece improbable.

La distribución de los péptidos que se obtienen del extremo C-terminal es igual que para ghrelin, siendo el ghrelin deleccionado en el exón 3 ó 4 encontrado además, en líneas celulares de cáncer de próstata y en carcinoma respectivamente.

Asimismo, se ha visto que se encuentra obestatina en células de la mucosa gástrica, páncreas perinatal y testículo de ratas (180;187;188). Un estudio reciente mostró que las células inmunorreactivas para preproghrelin y obestatina fueron más numerosas que las inmunorreactivas para ghrelin en el estómago de rata, sugiriendo la falta de ghrelin en algunas células X/A. En el páncreas la obestatina está presente en partes periféricas de los islotes, con una distribución distinta de las células productoras de glucagón, insulina y polipéptido pancreático (189).

2.3. Péptidos circulantes

Dos tercios del ghrelin circulante son producidos por las células X/A de la mucosa oxíntica del estómago y parte del restante de las células X/A del intestino delgado (90).

La forma más abundante de ghrelin circulante es el UAG (90%). La vida media de ghrelin acilado en plasma es mucho menor que la de UAG debido, fundamentalmente a: unión al receptor en distintos tejidos y el rápido proceso de desacetilación de ghrelin para dar lugar a UAG (190).

Ghrelin y UAG están presentes en plasma humano. Al igual que en el estómago ambos son activos. Existen dos teorías al respecto: 1) UAG podría resultar de una acetilación incompleta del péptido, siendo ambas formas secretadas mediante dos rutas independientes y 2) UAG podría ser el resultado de la desacetilación de ghrelin. En la primera teoría, UAG podría ser un péptido activo producido directamente desde el gen *ghrelin*. En la segunda, UAG podría ser producido a partir de ghrelin; en este sentido se han encontrado en suero humano numerosos enzimas que pueden llevar a cabo esta acción (191), mientras que en rata solo la carboxilesterasa (lysophospholipase I) ha sido implicada. Estos enzimas están asociados con lipoproteínas del suero, que también participan en transporte del ghrelin circulante. El

proceso de desacetilación puede llevarse a cabo incluso después de ser recogida o ser manipulada a temperatura ambiente.

Hay estudios que sugieren que, mientras UAG circula como un péptido libre, la mayoría de ghrelin circulante está unido a otras moléculas, especialmente lipoproteínas (191;192) tales como lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de muy alta densidad (VHDL). El aumento de hidrofobicidad en el ghrelin debido a la unión de un ácido graso en la Ser3 puede causar su unión a estas otras moléculas en sangre (191).

El péptido C-ghrelin es también detectado en circulación en humanos, siendo sus niveles especialmente altos en pacientes con problemas cardíacos (178). Aún no se sabe si el alternativo C-ghrelin o sus potenciales productos proteolíticos desde el preproghrelin con exón 3 deleccionado circulan en sangre en humanos como hace el C-ghrelin derivado del preproghrelin.

2.4. Variabilidad genética

Desde el descubrimiento de ghrelin en el 99, muchos grupos estudiaron mutaciones en este gen y su posible implicación en obesidad humana:

- Korbonits *et al* : estudiaron un grupo de 70 niños. Encontraron un polimorfismo común Leu72 por Met (L72M), que estaba asociado con un mayor BMI, y con variaciones en el test de tolerancia a glucosa, aunque no se observaban variaciones en los niveles de esta. Concluyeron que la variación génica de ghrelin contribuía a obesidad en niños, y podía alterar también la secreción de insulina inducida por glucosa (193).
- Un polimorfismo Arg51 por Gln también asociado con obesidad (194).
- Hinney *et al*/estudiaron el gen ghrelin en 215 niños y adolescentes alemanes obesos (grupo 1) y 93 estudiantes con peso normal (grupo 2). Ellos encontraron, además de algunas ya conocidas, dos nuevas variantes dentro de la región codificante: cambio Gln a Leu en el codon 90, y una mutación en un individuo con peso normal (195).

- Recientemente, dos nuevas variantes y cuatro ya conocidas han sido identificadas en personas caucásicas danesas (196), aunque no encontraron relación alguna entre estas variantes y obesidad o diabetes tipo II, tanto en adultos como en niños (197).
- Steinle *et al*/ analizaron tres polimorfismos (Arg51Gln, Leu72Met and Gln90Leu) en un estudio sobre diabetes en personas Amish, y concluyeron que estas mutaciones podían suponer un riesgo de padecer síndrome metabólico (198).

3. GHRELIN ACILADO (= ghrelin)

El ghrelin acilado es un péptido de 28 aa, aunque también puede presentar 27 aa, y está caracterizado por presentar un grupo O-n-octanoico en el residuo 3 (Ser), aunque aquí también puede haber variaciones.

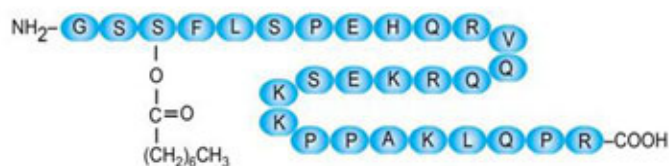


Figura 17: Ghrelin acilado, con un grupo octanoico en la Ser3.

3.1 GOAT

Teniendo en cuenta la importancia funcional que tiene la presencia del grupo octanoico en la Ser3, una de las principales cuestiones pendientes en relación con el estudio de ghrelin era qué y cómo se realiza esa modificación. El enzima encargado ha sido recientemente identificado (199). Se denomina GOAT (ghrelin O-acyltransferasa) y pertenece a la familia de acyltransferasas unidas a membrana (MBOAT) encargadas de unir ácidos grasos a lípidos o proteínas (200); de ahí que también se conozca como MBOAT-4. Consta de 8 segmentos transmembrana y su secuencia está altamente conservada en mamíferos y aves, siendo también altamente conservado el posible lugar catalítico asparragina-histamina.

GOAT es el primer miembro de esta familia que transfiere de forma específica un ácido graso de cadena media como el octanoico, ya que lo que se conocía hasta el momento era que añadían ácidos grasos de cadena larga. Actúa, al igual que otras *MBOATs*, sobre proteínas que se encuentran en la superficie luminal, siendo octanoilado el preproghrelin antes de ser transportado al golgi, donde es cortado por la prohormona convertasa 1/3 (PC 1/3) para formar el ghrelin maduro. Esto sugiere que *GOAT* se encuentra en el retículo endoplasmático (RE). El donante es probablemente octanoyl-CoA pero como pasa al RE no está claro, aunque puede que sea el propio *GOAT* quien realice esta acción (199).

Teniendo en cuenta que las células de mamíferos casi no sintetizan ácidos grasos de cadena media, es posible pensar que la fuente de ácido octanoico sea la dieta (177), pero no se puede descartar que se obtenga movilizándolo los depósitos propios de grasa, o incluso que lo sintetizen células especializadas que coexpresan *GOAT* y ghrelin.

La distribución de *GOAT* es similar a la de ghrelin, siendo especialmente alta en estómago. Sin embargo, sus niveles son menores que los de ghrelin, reflejando la proporción de ghrelin acilado (20-30%) y pudiendo tratarse, además, de un mecanismo de regulación entre enzima y sustrato.

A pesar de la alta homología, algunas diferencias han sido descritas entre *GOAT* murino y humano en cuanto a su distribución y el tamaño del ácido graso que pueden incorporar: *GOAT* se expresa mayoritariamente en estómago y tracto intestinal, pero se puede encontrar también en otras zonas tales como testículo en roedores y páncreas en el caso de humanos; y además, mientras que en roedores une a la Ser 3 de ghrelin específicamente un grupo octanoico, en humanos puede unir también ácidos grasos de tamaño variable (desde el acetato hasta grupos decanoicos).

Aunque se sabe que ghrelin acilado puede regular la secreción de insulina, la fuente de este ghrelin no está tan clara. El hecho de que se exprese en páncreas tanto ghrelin como *GOAT*, sugiere que quizás el ghrelin acilado producido localmente puede estar mediando los efectos observados en la secreción de insulina.

Una cuestión importante es mediante qué mecanismos y bajo qué situaciones fisiológicas se activa o inhibe GOAT. Se sabe que el ayuno a largo plazo inhibe la acetilación de ghrelin pero no la secreción total, mientras que la ingesta suprime la secreción de ambos, ghrelin acilado y UAG (201). También se ha demostrado en ratas que la restricción crónica de comida provoca un aumento en la expresión de GOAT en la mucosa gástrica, lo que podría explicar los altos niveles de ghrelin observados en personas con anorexia. En este estudio demuestran además que con la administración de ob periférica a animales sometidos a ayuno se consigue un aumento de expresión de GOAT. Esto sugiere que, al menos en ayuno, la expresión de GOAT está regulada por leptina (202).

Yang *et al*, mediante un ensayo bioquímico sobre células de insectos que sobreexpresan GOAT de ratón, proponen que GOAT reconoce una secuencia determinada en preproghrelin, que incluye a la Ser3: Gly1, Ser3 y PheAla4 (203).

El descubrimiento de GOAT abre nuevas e interesantes vías de estudio:

- La existencia de un ratón KO para GOAT (204) supone una posibilidad para conocer mejor la importancia biológica de UAG, del ratio UAG/ghrelin acilado, e incluso posibles efectos de estos dos péptidos derivados del mismo gen. Puede resultar especialmente útil también en el estudio de la regulación de la secreción de insulina por parte de ghrelin.
- Posible diana terapéutica para prevenir y tratar la obesidad bloqueando de forma indirecta el efecto de ghrelin. Ya que esta es la única hormona conocida que sufre este tipo de modificación postraducciona, la inhibición de GOAT afectaría a ghrelin de forma directa y exclusiva, evitando posibles efectos secundarios.

3.2 Regulación de la expresión de ghrelin

a) **Ayuno-Ingesta**: los niveles de ghrelin circulantes varían en función del estado energético, aumentando en situaciones de ayuno (205) y disminuyendo tras la ingesta.

Un par de horas antes de la ingesta aumentan los niveles plasmáticos de ghrelin, actuando como una señal para el inicio de la ingesta, y caen a niveles basales una hora después de ésta (206). Ese incremento preprandial se produce sin la intervención de ninguna señal relacionada con la comida, mientras que la supresión postprandial de los niveles de ghrelin se produce en proporción a las calorías ingeridas (207).

Sin embargo, no está muy claro como se regula la expresión de ghrelin según la ingesta:

- la administración oral de glucosa disminuye los niveles de ghrelin plasmáticos (208;209).

- la distensión gástrica mediante la ingesta de agua no cambia los niveles plasmáticos de ghrelin, indicando que la expansión física del estómago no induce liberación de ghrelin (208;209).

- la disminución de los niveles de ghrelin ocurre después de la ingesta de comida rica en grasa, mientras que no cambia si es rica en proteínas (210;211), pero se incrementan si la dieta es baja en proteínas (212).

- ayuno prolongado durante 3 días no cambia los niveles de ghrelin comparado con el estado basal (213).

- en humanos una dieta rica en hidratos de carbono causa una caída en los niveles de ghrelin superior a la observada con dieta alta en grasa, mientras que la administración oral de aa esenciales o proteínas no causa ningún cambio (211).

b) **Nervio Vago**: la vagotomía subdriafragmática no afecta ni a los niveles de ghrelin basales ni a la supresión de los niveles de ghrelin mediante los nutrientes (214), pero sí se evita completamente el aumento de los niveles de ghrelin causados por la privación de comida. Esto indica que la vía eferente del nervio vago contribuye al incremento de ghrelin durante el ayuno, mientras que la aferente interviene en la transmisión del efecto orexigénico del ghrelin desde el estómago hacia el CNS.

c) **Peso corporal**: los niveles de ghrelin plasmático son bajos en obesos y altos en anoréxicos (215;216).

- **Obesidad:** los niveles de ghrelin en líquido cefalorraquídeo de obesos, así como los plasmáticos en obesos sometidos a ayuno, están negativamente correlacionados con el BMI, porcentaje de grasa corporal y los niveles de leptina e insulina en el ayuno (216). Esos niveles se van incrementando a medida que el sujeto va perdiendo peso (217).

Una excepción dentro de los obesos es el **Síndrome de Prader Willi**. Esta compleja enfermedad genética está caracterizada por retraso mental moderado, hiperfagia y obesidad, corta estatura (bajos niveles de GH), hipotonía muscular y peculiaridades en el comportamiento. A pesar de ser obesos e hiperleptinémicos, estos sujetos tienen altos niveles de ghrelin plasmático que parecen ser responsables de la hiperfagia observada. Poco se sabe, sin embargo, de cómo se produce ese aumento de ghrelin en estos pacientes (218).

- **Anorexia:** en personas con anorexia los niveles de ghrelin están muy elevados y descienden a valores normales con el aumento de peso. Lo mismo sucede en casos de bulimia nerviosa (209).

- **Otros:** bajos niveles de ghrelin en pacientes con resistencia a insulina tales como síndrome de ovario poliquístico y DMII (219), pacientes con by-pass gástrico pierden peso y sus niveles de ghrelin disminuyen (215), pacientes con síndrome de intestino corto presentan bajos niveles de ghrelin (220).

d) **Hormonas y otros péptidos:**

La **hormona de crecimiento** exógena desciende los niveles de mRNA de ghrelin en el estómago y en plasma (221).

Por otra parte, el bloqueo del nervio vago aferente atenúa la secreción de GH hipofisaria inducida por la administración periférica de ghrelin, tanto en ratas como en humanos (222;223). Esto refleja la existencia de *feedback* negativo entre la producción de GH y ghrelin, y la intervención del nervio vago en la secreción de GH inducida por ghrelin.

El efecto de la **insulina** sobre los niveles de ghrelin parece contradictorio. Algunos trabajos en humanos indican que disminuye los niveles de ghrelin postprandiales (208;224), pero otros consideran que no es así (225). Mientras la administración de

insulina disminuye los niveles de ghrelin plasmáticos a los 10 minutos, la administración de glucosa lo consigue a los 5; sin embargo, la insulina tiene capacidad para disminuir los niveles de ghrelin independientemente de la concentración de glucosa (226).

La **somatostatina (SST)** exógena y sus análogos (Ostreotide) suprimen los niveles de ghrelin plasmáticos (227;228). La SST endógena inhibe la síntesis de ghrelin y el eje adrenal a través de mecanismos independientes. Sin embargo, no contribuye al incremento inducido por el ayuno en los niveles de ghrelin (229). El ratón KO para SST (*sst^{-/-}*) presenta altos niveles plasmáticos de ghrelin total, no el octanoilado, con un aumento en los niveles de expresión de ghrelin a nivel del estómago pero no en hipotálamo o hipófisis.

El **glucagón** disminuye de forma significativa los niveles de ghrelin en humanos (230) actuando a nivel central. El eje adrenal juega un importante papel en la supresión de ghrelin inducida por la administración de glucagón periférico (231).

Los niveles de ghrelin son elevados en los ratones *ob/ob*, y disminuyen tras la administración de **leptina**, mientras que están disminuidos en los *db/db* (232;233). La sobreexpresión de leptina en el hipotálamo de rata incrementa los niveles de ghrelin circulantes (234).

En humanos con deficiencia de leptina, los niveles de ghrelin son bajos, en función del BMI (228). Algunos estudios, sin embargo, sugieren efectos opuestos de la leptina: la administración de leptina a voluntarios humanos no causa ningún cambio en los niveles de ghrelin a corto o largo plazo (213).

e) Mediante **bypass gástrico** la secreción de ghrelin total se reduce hasta un 70% (215;235), perdiendo también las fluctuaciones relacionadas con la comida y la ritmicidad diurna de ghrelin. Esto puede ser debido a que el contacto directo entre la mucosa gástrica y la comida sea importante para la producción y secreción de ghrelin.

3.3 Receptor: GHS-R

a) Características generales:

El gen que da lugar al receptor de secretagogos de GH (GHS-R) se sitúa en la posición 3q26.2. Está compuesto por 2 exones y 1 intrón: el exón 1 codifica para los primeros 265 aa, que incluyen la región transmembrana I a V, mientras que el exón 2 da lugar a la región transmembrana VI y VII (236).

Hay dos variantes de cDNA para este receptor derivados del mismo gen: tipo 1a y tipo 1b. El **GHS-R1a** está formado por 366 aa con 7 dominios transmembrana, presentando el extremo C-terminal intracelular y el N-terminal hacia el lado extracelular. El **GHS-R1b** consta de 289 aa y 5 dominios transmembrana. El GHS-R1a se activa por los secretagogos de GH, incluyendo el ghrelin, mientras que la función del GHS-R1b aún es desconocida.

Es un receptor asociado a proteína G, que pertenece a una familia de receptores que incluye: receptor de motilina, receptor 1 y 2 de neurotensina, GPR39, y receptores 1 y 2 de neuromedina.

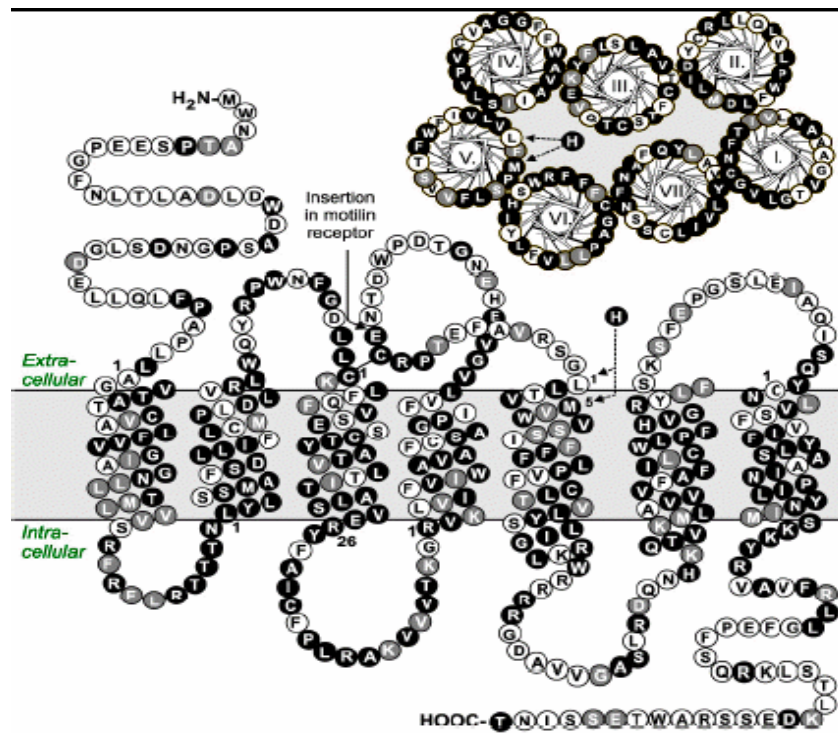


Figura 18: Estructura de GHS-R1a.

b) Localización:

Mediante distintas técnicas se ha comprobado que se expresa **GHS-R1a** en un amplio rango de tejidos: hipófisis (especialmente en las células somatotropas), hipotálamo (especialmente núcleo ARC), médula oblongata, plexo coroideo del córtex cerebral y algunos tejidos periféricos como el páncreas, glándula tiroidea, miocardio, glándula adrenal, gónadas, arterias, pulmón, hígado, bazo, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo, venas, útero, piel, nódulos linfoides, estómago e intestino (237-240).

La expresión del receptor en el hipotálamo y a nivel hipofisario es coherente con su papel en la regulación de la secreción de GH, mientras que su presencia en otras regiones del sistema nervioso central y algunos tejidos periféricos, puede indicar su participación en diferentes funciones fisiológicas.

Sin embargo, la forma del receptor más ampliamente distribuida es el **GHS-R1b** que se encuentra en: pulmón, mucosa bucal, esófago, fundus estomacal, duodeno, yeyuno, ileon, colon, hígado, mama, ovario, trompa de falopio, placenta, testículo, próstata, nódulos linfoides, piel, tejido adiposo, músculo y tejidos vasculares (238-241).

c) Mecanismo de acción:

Una de las características de GHS-R1a es la actividad basal constitutiva que presenta en ausencia de antagonista, resultando en una alta proporción de internalización del receptor así como de actividad de la señal.

Mediante estudios cinéticos se ha comprobado que GHS-R1a pasa al interior mediante vesículas de clatrina, a través de un mecanismo endosomal (242): GHS-R1a media la entrada de ghrelin y la degradación mediante una ruta de internalización implicando esencialmente vesículas de clatrina, disociación del complejo ligando receptor en endosomas y reaparición del receptor en superficie de membrana (100% a las 6 horas) mediante vías de reciclaje. En este sentido, la desensibilización del receptor y endocitosis previenen una sobreestimulación y determina la frecuencia de respuesta a ghrelin.

Algunos trabajos plantean la posibilidad de que el receptor GHS-R1a forme homodímeros o heterodímeros (243): por un lado sugieren la posibilidad de que se

formen homodímeros del receptor de secretagogos para evitar que se unan dos moléculas de ghrelin al mismo tiempo, aunque no así de otros agonistas no peptídicos más pequeños, y por otra parte, ghrelin puede amplificar la señal de la dopamina a través de un mecanismo que implica la formación del heterodímero GHS-R1a/Dopamina-R1 (D1R).

El mecanismo a través del cual la activación del sistema ghrelin/GHS-R1a desencadena la secreción de GH, es uno de los mejor caracterizados para este receptor. En las células somatotropas, el enzima PLC (fosfolipasa C), actúa sobre el fosfoinositol 4,5 difosfato (PIP₂) en la cara interna de la membrana plasmática generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (240): IP₃ media la liberación de Ca⁺² desde el RE y DAG activa PKC. La liberación de Ca⁺² dependiente de IP₃ causa la inhibición de canales de K⁺ independientes de voltaje, y esto, junto con la activación de PKC por DAG, causan la despolarización de la membrana, la apertura de canales de Ca⁺² (tipo L y T) y la entrada de éste. Los altos niveles de Ca⁺² intracelular disparan la liberación de GH al medio extracelular (244).

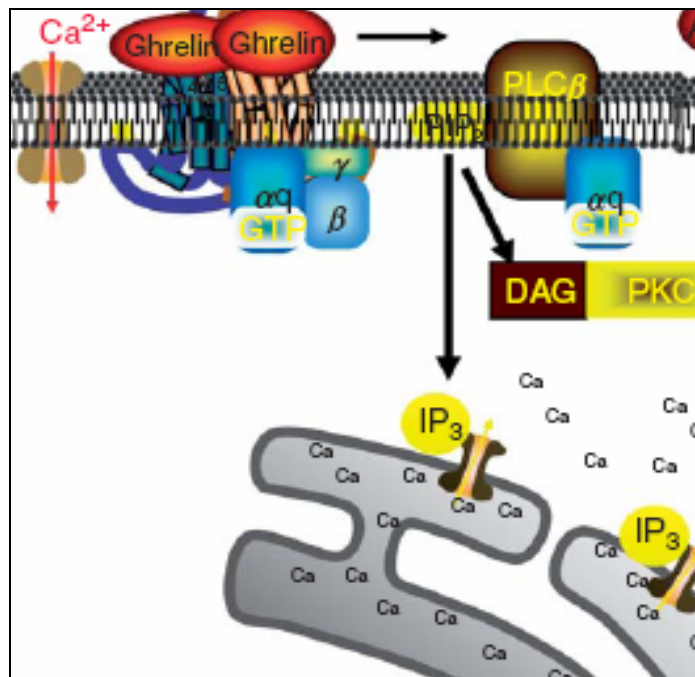


Figura 19: Mecanismo de transducción de la señal del receptor GHS-R a través de la vía (PLC/PKC/IP3). Usada por ghrelin y otros secretagogos como GHRP-6.

Sin embargo, ghrelin estimula otras rutas de señalización, dependiendo del tipo celular:

- En células hipofisarias de cerdo se ha encontrado la activación de tres vías distintas en respuesta a la administración de ghrelin (22): AC/PKA (adenilato ciclasa/proteína Kinasa A), PLC/PKC y señal de Ca^{+2} extracelular.
- En células de hepatoma que expresan GHS-R, ghrelin estimula un mecanismo intracelular caracterizado por fosforilación de Tyr del sustrato del receptor de insulina 1, unión de GRB-2 a IRS-1 y aumento de la actividad de MAPK (245).
- En neuronas que contienen NPY, ghrelin induce una corriente de Ca^{+2} mediante canales de Ca^{+2} tipo N (mientras que en las células hipofisarias se activan los tipo L), usando la vía PKA/cAMP (22).

La administración de ghrelin *in vivo*, que da lugar a un aumento de la ingesta, activa AMPK a nivel hipotalámico. Además, la acción de ghrelin sobre AMPK interviene en la distribución de grasa y en el metabolismo de forma tejida específica, ya que causa la activación de AMPK en corazón, pero la inhibe en hígado y tejido adiposo (246).

En relación con el control de la ingesta, ghrelin también activa la óxido nítrico sintasa (NOS) en el hipotálamo, pudiendo modificar los niveles de NO a través de las neuronas productoras de NPY (247).

- En células de ovario de hamster, que sobreexpresan GHS-R, la administración de ghrelin resultó en la activación de la ruta ERK1/2 mediante PLC (248).
- La activación de NF- κ B, asociado al aumento de secreción de IL-8, ha sido observado en procesos de inflamación de colon (249); mientras que también se ha observado la inhibición de NF- κ B por parte de ghrelin como mecanismo protector frente a algunos procesos inflamatorios.
- La actividad proliferativa de ghrelin lleva a la activación de MAPK en distintos tipos celulares, alguno de los cuales implicado en funciones vasculares.

d) GHS-R1a: ¿Único receptor de ghrelin?

Teniendo en cuenta el amplio espectro de funciones de ghrelin, las distintas vías de señalización que activa según el tipo celular y la existencia de diferencias en la

unión y función entre ghrelin y otros secretagogos (peptídicos y no peptídicos), parece improbable que el GHS-R1a sea el único receptor de secretagogos de GH (171).

La presencia de un inespecífico y no caracterizado receptor de ghrelin, distinto de GHS-R1a, ha sido descrito en condrocitos (250) y cardiomiocitos (251).

Otro subtipo puede mediar la influencia de ghrelin sobre la secreción de insulina y el metabolismo de glucosa, ya que este efecto no es compartido por secretagogos sintéticos que prácticamente mimetizan al ghrelin (252). Esto podría explicar también el efecto antagónico que parece ejercer ghrelin y UAG en el metabolismo de la glucosa.

Recientemente se ha sugerido la presencia de un receptor de ghrelin desconocido, que medie la acción de éste sobre la ganancia de peso, basándose en el descubrimiento de un análogo de ghrelin (BIM-28163). Este péptido antagoniza completamente GHS-R1a pero no lo activa, bloquea la secreción de GH inducida por ghrelin *in vivo* (253) y, sin embargo, actúa como un agonista en cuanto a la ganancia de peso (254).

Ha sido demostrado que un subtipo de GHS-R es capaz de unir ghrelin acilado y UAG, y que probablemente medie acciones biológicas (255) como por ejemplo en líneas celulares de cáncer de mama (256), en cardiomiocitos (257) y en la promoción de adipogénesis de BAT *in vivo*.

A pesar de eso, parece que ghrelin y UAG actúan como hormonas independientes a través de distintos receptores (252;256;258).

Son muchos los datos que sugieren la presencia de receptores alternativos, distintos de GHS-R1a, que parecen estar implicados en mediar las mayores acciones de ghrelin, GHSs y probablemente de UAG. Sin embargo, estos datos son bastante ambiguos y muchas cuestiones fundamentales necesitan ser aclaradas, por ejemplo las acciones comunes y antagónicas descritas para ghrelin y UAG en los sistemas periféricos, la existencia de un receptor común o por el contrario la existencia de receptores específicos para cada uno, y si esto sucede, el grado de afinidad por cada uno de ellos.

3.4 Funciones de ghrelin

➤ Secreción de GH

El descubrimiento de ghrelin supuso un cambio en lo que se conocía sobre la secreción de GH. Se consideraba que estaba controlada por dos neuropéptidos hipotalámicos: GHRH (activa) y SST (inhibe). Sin embargo, se ha demostrado que la administración de ghrelin tiene un potente y específico efecto estimulador de la secreción de GH, *in vitro* e *in vivo*, tanto en animales como en humanos.

Mediante experimentos llevados a cabo en ratas en libre movimiento se ha comprobado que la administración de ghrelin es un potente secretor de GH, incluso mayor que GHRH, causando una rápida respuesta a todas las dosis estudiadas (91). En el mismo sentido apuntan también datos obtenidos en humanos (259): en sujetos normales la secreción de GH se ve estimulada tras la administración de ghrelin de forma dosis dependiente. También se ha demostrado que ghrelin induce la secreción de GH en otras especies como pollo (260), peces y rana (261).

En cultivo primario de células hipofisarias se ha comprobado que ghrelin también puede actuar a este nivel, estimulando la secreción de GH aunque en menor medida que *in vivo*. Esto sugiere que existen otros factores implicados *in vivo* para que los niveles de secreción de GH por la administración de ghrelin sean máximos.

El efecto liberador de GH por ghrelin parece resultar de la unión de ghrelin al receptor GHS-R1a en células somatotropas de la hipófisis (262), activación de las neuronas GHRH inducida por ghrelin y retraso de las neuronas productoras de SST a nivel de hipotálamo (263), además de la activación aferente vagal inducida por ghrelin (264).

La activación del receptor GHS-R1a parece esencial para los efectos de ghrelin sobre la estimulación de GH, ya que la administración de ghrelin exógeno a ratones *ghs-r^{-/-}* no causa ningún efecto sobre la secreción de la hormona de crecimiento. Por otro lado el ratón *ghrelin^{-/-}* presenta un fenotipo muy similar al wt en términos de crecimiento y respuesta al ghrelin exógeno (265;266).

El reciente descubrimiento de que ghrelin induce la expresión de un factor de transcripción pit-1 (267), que es responsable de la expresión específica en las células

somatotropas del gen de GH, aporta nuevos datos acerca del papel fisiológico de ghrelin en la diferenciación de la célula somatotropa y su función.

➤ **Ingesta y peso corporal**

A) **Regulación Ingesta:**

Desde que Arvat E *et al* (172) publicaron en el 2000 que la administración de ghrelin causaba secreción de GH en humanos y que estos voluntarios presentaban como efecto colateral un aumento de la ingesta, son muchos los trabajos que confirman la participación de ghrelin no solo en la regulación de la ingesta (268;269) sino también del balance energético y del peso corporal (173;270).

Los niveles plasmáticos de ghrelin se incrementan desde unas 2 horas antes de cada comida y caen hasta niveles mínimos a lo largo de 1 hora después de la ingesta (216;271). Se comprobó en humanos que los niveles de ghrelin previos a la comida determinaban no solo el inicio de la comida, de forma voluntaria y sin ningún tipo de pauta, sino también la cantidad de comida ingerida; mientras que la disminución de los niveles de ghrelin postprandiales estaba determinada por la cantidad de calorías ingeridas (207). Esta variación en los niveles de ghrelin pre y postprandiales apoyan la hipótesis, observada tanto en animales como en humanos, de que ghrelin es una señal de hambre marcando el inicio de la ingesta (271).

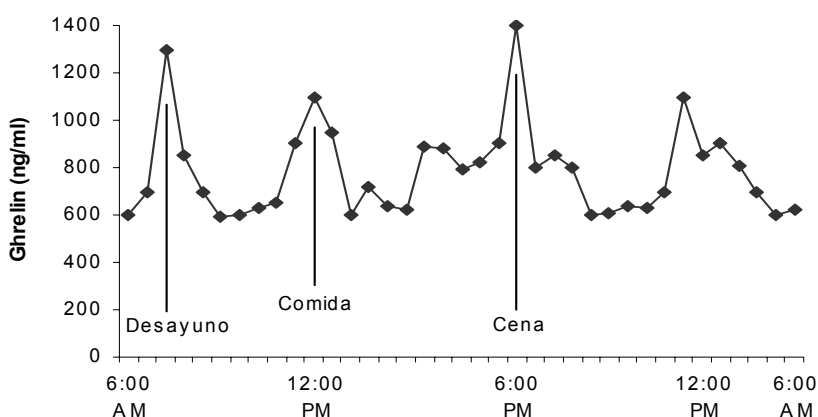


Figura 20: Representación de los niveles plasmáticos de ghrelin durante un período de 24 horas; se producen picos de ghrelin previos a las comidas y disminuyen después de estas.

El efecto orexigénico de ghrelin es ejercido **a nivel hipotalámico**: el péptido ghrelin, aunque es mayoritariamente secretado por el estómago, también se expresa en el hipotálamo; análisis inmunohistoquímicos revelaron la existencia de neuronas que contienen ghrelin en el núcleo ARC y también en PVN, VMN y DMN (272).

Asimismo, el receptor *GHS-R1a* se expresa en distintas regiones del cerebro entre ellas distintos núcleos hipotalámicos (ARC, PVN y VMN) importantes en la regulación del apetito y la ingesta (237).

La presencia de ghrelin y su receptor en el hipotálamo, en concreto en el ARC (donde la expresión de *GHS-R1a* es especialmente densa) sugería que la regulación de la ingesta por parte de ghrelin se realizaba a nivel central.

Se comprobó en ratas que la administración intracerebroventricular (30;173;269;273;274) de ghrelin, así como ip, iv o sc (205; 274), causa un significativo aumento de la ingesta, siendo este péptido orexigénico el más potente de los conocidos.

Mediante la cuantificación de la expresión de *c-fos*, un marcador de actividad neuronal, se pudo ver que tanto la administración central como periférica de ghrelin causa la activación de neuronas que expresan *GHS-R1a* y, en el caso del ARC, también expresan NPY y AgRP. Esto hizo pensar en la posibilidad de que el efecto orexigénico de ghrelin pudiera implicar a estos neuropéptidos. Coincidiendo con estas observaciones, se comprobó que la administración de ghrelin aumenta la expresión de NPY y AgRP en el hipotálamo, demostrando también la existencia de sinapsis entre las neuronas productoras de ghrelin y las productoras de NPY.

De hecho se demostró que en el ARC, estas neuronas que contienen ghrelin envían fibras eferentes sobre las neuronas productoras de NPY y AgRP estimulando la liberación de estos neuropéptidos orexigénicos, mientras que suprime la liberación del anorexigénico POMC. En el PVN, además, las neuronas productoras de ghrelin envían fibras aferentes sobre las neuronas NPY que suprimen la liberación de GABA, estimulando la liberación de CRH y por tanto aumentando la secreción de ACTH y cortisol (272).

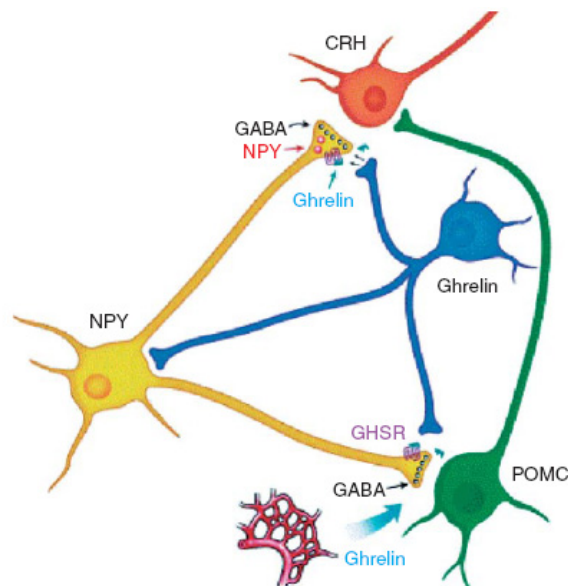


Figura 21: Circuito hipotalámico implicado en el efecto de ghrelin sobre la regulación de la ingesta: activación de NPY e inhibición de POMC.

Estudios fisiológicos en ratas indicaban que al menos parte del efecto orexigénico de ghrelin estaba mediado por NPY y AgRP: el pretratamiento con anticuerpos anti-NPY bloqueaba el efecto orexigénico de ghrelin; la coadministración de ghrelin y antagonistas de los receptores de NPY, Y1R e Y5R, también bloqueaba el efecto de ghrelin sobre la ingesta; con melanocortinas o anti-AgRP se suprimía la ingesta inducida por ghrelin.

Fue posteriormente, a través de experimentos con ratones KO, cuando se confirmó la participación de los neuropéptidos NPY y AgRP en el efecto de ghrelin sobre la ingesta. Chen *et al* (275), comprobaron mediante delección individual o combinada de GHS-R1a, MCR, NPY o AgRP que el GHS-R1a era necesario para el efecto orexigénico de ghrelin periférico y que este efecto estaba disminuído en los ratones MCR-KO y NPY-KO, se mantenía intacto con la delección de AgRP y desaparecía en el dKO NPY/AgRP. Esto refleja que la delección de NPY y AgRP impide el efecto orexigénico de ghrelin, y que esta señal también depende de la integridad del sistema central de melanocortinas.

Además de en las neuronas NPY y AgRP, se estimula la expresión *c-fos* en respuesta a ghrelin en las neuronas productoras de orexina, un neuropéptido hipotalámico que estimula ingesta (276). Esto llevó a pensar en la posible conexión entre ambos péptidos, ghrelin y orexina, sobre la regulación de la ingesta.

En el ratón *null-orexina* se observa una reducción en la capacidad de ghrelin para estimular ingesta; efecto que es atenuado también con pretratamiento con IgG anti-orexina pero no con IgG anti-MCH. Sin embargo, la coinfección de ghrelin con un antagonista de Y-R1 e IgG anti-orexina muestra una supresión de ingesta del 87% comparado con la inyección de ghrelin solo. Se ha comprobado también que existe conexión entre las neuronas orexina y las productoras de NPY y AgRP (277). Estos resultados indican que ghrelin y orexina colaboran en la regulación de la ingesta.

Teniendo en cuenta que la administración de ghrelin, central y periférica, aumenta la ingesta mediante la modificación de neuronas a nivel del hipotálamo (278;279) y que el porcentaje de ghrelin periférico que cruza la BBB es muy bajo, se consideró la existencia de otras vías de paso alternativas.

Se comprobó mediante distintos experimentos la intervención del nervio vago en esa transmisión: presencia de receptores de ghrelin en neuronas del nervio vagal aferente en el ganglio donoso en rata (222;280;281) y la administración icv de ghrelin induce *c-fos* en el núcleo dorsomotor del nervio vago y estimula la secreción ácida (282). La vagotomía inhibe, sin modificar los niveles basales de ghrelin, la capacidad de este para estimular la ingesta y la secreción de GH (222;283). Además, la vagotomía subdiafragmática o el tratamiento con atropina consiguen revertir completamente el aumento en los niveles de ghrelin inducido por el ayuno (90;214). Se ha comprobado, también, que la señal orexigénica de ghrelin llega al ARC mediante la activación de las vías aferentes del vago: tras la activación de GHS-R1a sobre las fibras aferentes vagales en el estómago, la señal inducida por ghrelin llega a NTS, a través del cual pasa al hipotálamo (284).

Por último, mencionar que ghrelin puede ejercer su efecto orexigénico de forma directa sobre otras regiones del CNS conocidas también por su implicación en la regulación de la ingesta. En este sentido, se ha encontrado alta expresión de GHS-R en zonas del tronco cerebral (área postrema, núcleo tracto solitario y núcleo motor dorsal del vago) o en otras regiones como el VTA (área tegmental ventral), hipocampo, y la sustancia negra (285). Esto último sugiere un posible efecto de ghrelin sobre la ingesta por motivos distintos del hambre, como por ejemplo el sabor y la activación de la ruta dopaminérgica asociada a procesos de recompensa. Así, mientras la microinyección de ghrelin en el VTA aumenta la ingesta, la administración de antagonistas de GHS-R bloquea el efecto orexigénico de ghrelin (286;287). Ya que se ha comprobado que las neuronas del VTA no se conectan con las neuronas NPY, es probable que sea el propio ghrelin, quien mediante la activación de su receptor, aumente la liberación de dopamina en las regiones diana del VTA (287).

El primer trabajo de delección de ghrelin sugería que este péptido no jugaba ningún papel en la regulación de la ingesta y el peso corporal, ya que el fenotipo y la respuesta a ghrelin exógeno eran muy similares entre el ratón KO y el wt (288). Sin embargo, en ratones *ghsr-1a*^{-/-} no se observaba aumento de la ingesta tras la administración de ghrelin, lo que reflejaba que el efecto orexigénico de ghrelin estaba mediado por la activación de este receptor. Fue en estudios posteriores en los que se sometió a los ratones KO, ghrelin y GHS-R1a, a dieta alta en grasa (HFD) en los que se pudo comprobar el efecto de ghrelin en la regulación de la ingesta y del peso corporal, ya que presentaban resistencia a la obesidad inducida por dieta (289).

Un estudio reciente sobre *ghrelin*^{-/-} indica que la delección de este péptido no solo no varía la ingesta, sino que tampoco varía otras pautas de comportamiento asociados a esta. Así, se encuentra en ambos grupos, KO y wt, una similar capacidad de recuperación a estados de déficit energético, memoria asociada a localización y búsqueda de la comida, y pauta de ingesta siendo ésta mayor en la fase nocturna (290).

B) Regulación Peso Corporal:

Además de su efecto orexigénico, ghrelin puede regular el peso corporal a largo plazo dado que los niveles de ghrelin se incrementan después de la pérdida de peso y caen tras la ganancia de este (205).

La administración de ghrelin a largo plazo promueve ganancia de peso, no solo mediante estimulación de la ingesta sino también mediante la regulación de otros factores que intervienen en la homeostasis energética. De hecho, ghrelin incrementa la preferencia por la dieta grasa (291), favorece el uso de hidratos de carbono como fuente de energía y promueve directamente adipogénesis (292). Puede también disminuir: lipólisis (293), apoptosis de adipocitos (294), gasto energético y actividad del sistema nervioso simpático (122), temperatura corporal (295), producción de citokinas inflamatorias y actividad locomotora (296).

Los resultados obtenidos en ratón KO para GHS-R muestran que su activación es esencial para los efectos de ghrelin sobre la estimulación de la ingesta ya que tras la administración de ghrelin no se observaba aumento en la cantidad de comida ingerida (288). Sin embargo, en el trabajo de Zigman *et al* en el que se somete a estos ratones KO a una dieta alta en grasa (HFD) se pudo observar como había una acumulación de grasa significativamente menor en los animales GHS-R-*null* respecto de los controles, y esta diferencia se obtenía tanto en machos como en hembras (289).

Aunque inicialmente, el fenotipo observado en ratones *ghrelin*^{-/-} descartaba cualquier actividad funcional de este péptido sobre la ingesta y el peso corporal, la exposición de estos ratones a dietas altas en grasa sugiere que la delección de la señal de ghrelin aporta a estos ratones cierta resistencia a la obesidad inducida por dieta. Así, mientras que el grupo de De Smet (297) observa que el ratón *ghrelin*^{-/-} presenta aumento de gasto energético y descenso del peso corporal bajo dieta normal, otros grupos solo observan estas diferencias cuando someten a los animales a dietas altas en grasa (266;289;298).

El estudio del fenotipo de tres tipos de ratones - *ghrelin*^{-/-}, *ghs-r*^{-/-} o doble KO (dKO)- indica un efecto aditivo de dependencia génica de modo que la deficiencia de ghrelin tiene menos impacto sobre el metabolismo energético que la deficiencia del receptor, pero solo la delección simultánea de ambos lleva a diferencias significativas respecto de los wt. Así, bajo condiciones de dieta normal, mientras los ratones *ghrelin*^{-/-} o *ghs-r*^{-/-} no se diferenciaban de los wt, los ratones dKO presentaban descenso del peso, de longitud (en los dKO viejos) e incremento del gasto energético y de la actividad motora (299).

Sin embargo, un estudio reciente con ratones *ghrelin*^{-/-} y *ghs-r*^{-/-} congénicos (n=10), minimizando su *background* genético, indica que la delección de la señal de ghrelin no hace que estos ratones sean resistentes a obesidad inducida por dieta (300).

➤ **Metabolismo: glucosa y lípidos**

A) **Metabolismo glucosa**

Aunque la principal fuente de ghrelin es el estómago, se expresa también en otros órganos entre ellos el páncreas: se ha encontrado expresión de ghrelin en distintos tipos celulares (células α , β , ϵ , ...) de los islotes pancreáticos (301). Se ha comprobado que ghrelin ejerce efectos directos sobre los niveles plasmáticos de glucosa e insulina:

- La administración sistémica de ghrelin causa un aumento significativo en los niveles de glucosa en sangre, y esto ha sido observado tanto en roedores como en humanos (252;302;303). Por ejemplo, en ratones sometidos a ayuno nocturno, la administración ip de ghrelin aumentaba de forma significativa los niveles de glucosa a los 30 minutos de la administración (304).

- Aunque no todos, son muchos los trabajos realizados en roedores y humanos en los que se observa que la administración exógena de ghrelin inhibe la síntesis de insulina, sugiriendo una asociación negativa entre estas dos hormonas. Inicialmente se creía que la inhibición de la secreción de insulina era independiente de los niveles de glucosa en sangre (252); estudios posteriores proponen que esta inhibición solo afecta a la insulina estimulada por glucosa sin alterar sus niveles basales (305).

- Por su parte la administración aguda de glucosa a nivel intravenoso causaba, en ratas anestesiadas, un descenso en los niveles prehepáticos de ghrelin mientras que no variaba los niveles sistémicos. Esto sugería un papel de ghrelin en el metabolismo de la glucosa y/o sensibilidad a insulina en el hígado (306).

Además, bajos niveles plasmáticos de ghrelin han sido asociados a distintas enfermedades caracterizadas por la alteración de la homeostasis de la glucosa como por ejemplo la DMII, a menudo relacionada con resistencia a insulina y obesidad. Tanto en modelos animales como en humanos diabéticos se observan bajos niveles de ghrelin circulante, lo que supone una posible asociación entre los niveles de ghrelin, resistencia a insulina y obesidad.

En conjunto, la acción directa de ghrelin sobre los niveles de glucosa e insulina y la relación inversa entre ghrelin-regulación de glucosa observada en algunas enfermedades sugieren que el péptido ghrelin ejerce un papel fisiológico en la homeostasis de la glucosa y del balance energético (216;271;307).

Ya que el receptor GHS- R se expresa (170), además de en el hipotálamo, en otros órganos periféricos importantes en la regulación de la glucosa tales como páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo, es posible que ghrelin pueda influir en la regulación de la glucosa a través de la acción directa sobre estos tejidos.

La explicación a algunos de los resultados obtenidos con experimentos *in vivo* se obtuvo a través de experimentos *in vitro*. Mediante estudios realizados sobre páncreas perfundido o islotes pancreáticos aislados se ha podido comprobar que la administración de ghrelin exógeno inhibe la liberación de insulina estimulada por glucosa mediante la acción directa sobre las células β (inhibición del incremento de la $[Ca^{2+}]$ que precede a la liberación de insulina). Efecto que era eliminado mediante antagonistas de GHS-R o inmunoneutralización del ghrelin endógeno.

Por otro lado, trabajos realizados en líneas celulares o cultivos primarios han permitido conocer el efecto de ghrelin en la regulación de la glucosa a nivel de tejidos periféricos. Así, el efecto hiperglicémico de ghrelin es debido a la disminución de la secreción de insulina a nivel pancreático y también por acción directa sobre los

hepatocitos, donde ya ha sido demostrado que es capaz de modular la síntesis de glucógeno y gluconeogénesis, estimulando la producción de glucosa hepática (245;308). Además, ghrelin refuerza la acción de la insulina sobre la disposición de glucosa en el músculo esquelético de ratones (309), inhibe la secreción de adiponectina (310) (proteína sensible a la insulina) desde los adipocitos y estimula la secreción de hormonas contrareguladoras, incluyendo GH, cortisol y adrenalina (262) y posiblemente glucagón (311).

Mediante la obtención de ratones delecionados para ghrelin y/o GHS-R se pudo observar la relevancia fisiológica de ghrelin en la regulación de la glucosa.

Aunque no había diferencias en el fenotipo de *ghrelin*^{-/-} y wt en cuanto a ingesta, peso y niveles de glucosa plasmáticos en estado fed, los *ghrelin*^{-/-} mostraban un marcado aumento en la respuesta a insulina y un descenso en la respuesta a glucosa (288). El número y tamaño de los islotes pancreáticos, así como la cantidad de insulina por islote, no fueron muy distintos entre los ratones *ghrelin*^{-/-} y sus wt, mientras que la liberación de insulina inducida por glucosa, no la basal, era mayor en islotes aislados de los KO. Esto suponía que la mayor cantidad de insulina liberada por los islotes del *ghrelin*^{-/-} se debía a una mayor respuesta secretora a glucosa.

Cuando los ratones wt y *ghrelin*^{-/-} son sometidos a HFD se produce un aumento en los niveles de glucosa plasmática en los wt pero no en los KO, y un aumento en los niveles de insulina que era mayor en los KO. Mediante el test de tolerancia a glucosa e insulina, GTT e ITT respectivamente, se comprobó que la deficiencia de ghrelin promovía liberación de insulina y protegía frente a la intolerancia a glucosa en el modelo de obesidad inducida por dieta.

Sun Y *et al* demostraron que en ratones obesos (*ob/ob*) la deleción de ghrelin aumentaba la liberación de insulina, reduciendo por tanto la hiperglicemia (312).

Así, la deleción de ghrelin protege frente a intolerancia a glucosa en dos modelos distintos de obesidad, puede que debido a un incremento de la capacidad de liberar insulina inducida por glucosa, permitiendo que los islotes secreten más insulina ante un aumento de la demanda causado por la obesidad.

El estudio del fenotipo de tres tipos de ratones - *ghrelin*^{-/-}, *ghs-r*^{-/-} o doble KO- indica que los dKO muestran también tendencia a tolerancia a glucosa y sensibilidad a insulina, pero no corroboran lo observado en los *ob/ob* con delección de ghrelin (299).

Un estudio reciente con ratones *ghrelin*^{-/-} y *ghs-r*^{-/-} congénicos (n=10), minimizando su *background* genético, indica que la delección de la señal de ghrelin no hace que estos ratones sean resistentes a obesidad inducida por dieta. Sin embargo, bajo condiciones de balance energético negativo muestran deficiencia en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (300).

En conjunto, se cree que el ghrelin producido y liberado por los islotes pancreáticos juega un papel en la regulación de la secreción de insulina actuando de forma autocrina, paracrina o endocrina sobre las células β dado que (307):

- en los islotes pancreáticos se expresa ghrelin y GHS-R1a.
- los niveles de ghrelin son mayores en la vena pancreática que en la arteria, lo cual indica que el páncreas secreta ghrelin.
- la inmunoneutralización de ghrelin y el uso de antagonistas de GHS-R aumentan la liberación de insulina inducida por glucosa desde páncreas perfundidos e islotes aislados.
- ghrelin actúa directamente sobre las células β del páncreas para inhibir la excitabilidad de membrana inducida por la glucosa, el incremento de la $[Ca^{2+}]$ y la liberación de insulina.
- en ratas gastrectomizadas, que supone un descenso significativo en los niveles de ghrelin circulante, la administración de antagonistas de GHS-R incrementa la concentración de insulina en plasma y el incremento era similar al observado en ratas normales.
- en ratones *ghrelin*^{-/-}, la liberación de insulina inducida por glucosa era mayor que en los wt.

B) Metabolismo lípidos

Ghrelin, mediante su acción a nivel central, puede regular directamente la homeostasis energética del tejido adiposo. Se ha comprobado que la administración crónica de ghrelin icv aumenta la ingesta y, de forma independiente, regula el metabolismo lipídico: en **WAT** favorece la entrada de glucosa y triglicéridos, incrementa la síntesis de lípidos aumentando la expresión de enzimas lipogénicas (LPL, ACC α , FAS y SCD-1), e inhibe la β -oxidación disminuyendo la expresión de CPT-1; en **BAT**, la administración central de ghrelin disminuye la expresión de UCP-1 y UCP-3, que normalmente contribuyen a la disipación de energía por termogénesis. Este efecto de ghrelin es dependiente de la dosis pero no de la hiperfagia, y parece estar mediado por el sistema nervioso simpático (313).

Ghrelin también ha sido implicado en la regulación del metabolismo de lípidos con efectos directos sobre el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. En el hígado induce expresión de enzimas lipogénicos, aumento de triglicéridos y disminución de la actividad de AMPK (con lo que disminuye la β -oxidación de ácidos grasos) (314). En el músculo gastronecnius, ghrelin reduce el contenido de triglicéridos, aumenta la actividad de enzimas oxidativas mitocondriales e incrementa la expresión de UCP2 de forma independiente de cambios en la expresión de genes de metabolismo de lípidos y fosforilación de AMPK (314). PPAR γ reduce el contenido de grasa muscular, que era selectivamente aumentada en músculo esquelético (314). Así, ghrelin favorece el depósito de triglicéridos en el hígado sobre el músculo esquelético.

Además, actúa directamente sobre el tejido adiposo, estimulando lipogénesis en adipocitos diferenciados *in vitro* e *in vivo*, mediante el incremento de PPAR α y la entrada de glucosa inducida por insulina (292;315), reduce la lipólisis, y estimula la proliferación y diferenciación de preadipocitos (316).

➤ Gastrointestinales

Ghrelin afecta a muchos aspectos del tracto gastrointestinal incluyendo secreción exocrina, protección epitelial y motilidad.

En cuanto a la acción de ghrelin sobre la secreción de ácido gástrico se han publicado trabajos en los que se observa un efecto estimulador (317) (probablemente por activación de las células parietales a través del nervio vago), otros apuntan a un efecto inhibitor (318) mientras que algunos no observan ningún tipo de efecto (319). Estos datos conflictivos pueden reflejar la presencia de ambas vías, estimulación e inhibición, y que las condiciones experimentales y los modelos usados determinen como se equilibran.

La acción estimuladora de ghrelin sobre la secreción de ácido gástrico, junto con la estimulación de la secreción de proteínas pancreáticas (320), puede ser importante en preparar el estómago para procesar la comida.

También puede regular la proliferación y diferenciación de células del epitelio gastrointestinal. De hecho, un efecto gastroprotector ha sido demostrado en varios modelos, entre ellos úlceras causadas por estrés o etanol, que parece depender principalmente de la actividad vagal, de sensores nerviosos y hiperemia mediada por los sistemas óxido nítrico sintasa-óxido nítrico (NOS-NO) y ciclooxigenasa-prostaglandinas (321).

También se ha comprobado recientemente que la administración de ghrelin, tanto ip como icv, suprime la apoptosis de mucosa intestinal en ratas en ayuno (322).

La relación estructural entre ghrelin y motilina, llevó a la evaluación de los efectos sobre motilidad del ghrelin. Se ha demostrado que ghrelin, al igual que la motilina, induce el complejo mayor de migración (MMC) y acelera el vaciado gástrico e intestinal, tanto en humanos como en roedores (323). Estas acciones procinéticas de ghrelin son mediadas a través del sistema colinérgico, por mecanismos centrales y probablemente mediante el plexo mesentérico (324;325).

➤ **Reproducción**

Una de las principales hormonas implicadas en la conexión entre reserva energética y reproducción es la leptina. Sin embargo, ghrelin ha sido propuesto como un antagonista funcional de los efectos de leptina sobre el balance energético, actuando ambas hormonas en conjunto sobre la regulación de la ingesta y el peso

corporal. Posiblemente la interacción leptina/ghrelin, junto con otras señales metabólicas, contribuyan a la regulación de la capacidad reproductiva en función del estado energético (265;290).

A pesar de que trabajos realizados con ratones KO no hayan aportado demasiada luz en este sentido, ya que ghrelin y GHS-R KO presentan un fenotipo normal en cuanto a fertilidad y el número y tamaño de las crías, son muchos los trabajos (*in vivo* y *ex vivo*) que señalan a ghrelin como regulador de diferentes parámetros reproductivos tales como secreción de gonadotropinas, inicio de la pubertad y función gonadal (265;326-329).

Estudios realizados en rata, mono y oveja han demostrado que la administración de ghrelin es capaz de modificar la secreción de LH pero no de FSH: la administración central de ghrelin reduce la frecuencia de pulsos de LH en monos y ratas ovariectomizadas (330;331), mientras que la administración de ghrelin a ratas y ovejas intactas causa la reducción de los niveles basales de LH (332;333). En concordancia con esto, la administración de ghrelin suprime la pulsatilidad (tanto amplitud como frecuencia de pulsos) y los niveles basales de LH pero no la respuesta de LH a GnRH en humanos (334). La administración intravenosa de ghrelin en ratas en libre movimiento, de forma tanto aguda como crónica (7 días), provoca un significativo descenso en los niveles circulantes de LH (335).

Ghrelin también es capaz de disminuir la liberación de GnRH en explantes hipotalámicos de ratas hembra ovariectomizadas (336). Estas observaciones, junto con los efectos causados sobre la pulsatilidad de LH, sugieren que el hipotálamo es un importante lugar de acción para el efecto inhibitor de ghrelin sobre el eje gonadotrópico ya que actúa sobre la secreción de gonadotropinas, probablemente en condiciones de hiperghrelinemia tales como déficit energético (337).

El receptor de ghrelin se expresa también en hipófisis (171;338) por lo que se ha sugerido que el efecto de ghrelin sobre el eje gonadotropo podría ser a este nivel. Sin embargo, cuando se comparan resultados obtenidos *in vivo* (administración central y periférica) y *ex vivo* (efectos directos sobre hipófisis) parece claro que el principal

papel de ghrelin en el eje gonadotropo es una acción inhibitoria, probablemente conducida a nivel central, y que podría estar reforzada por su capacidad para suprimir la liberación de LH inducida por GnRH en la hipófisis.

El inicio de la pubertad es especialmente sensible al estado de las reservas energéticas (337) siendo necesario una cantidad mínima para iniciar y asegurar la capacidad reproductora ("hipótesis de la masa crítica"). Teniendo en cuenta, además, que ghrelin actúa como señal de insuficiencia energética regulando el balance energético a largo plazo, se ha sugerido que esta hormona puede intervenir en el inicio y mantenimiento de la capacidad de reproducción.

Así, mediante estudios realizados en rata, en los que se valoraron índices de activación del eje reproductivo -niveles de gonadotropinas y esteroides sexuales, y marcadores externos (apertura vaginal en hembras y separación balanoprepucial en machos) (336) - se pudo comprobar que: la administración repetida de ghrelin c/12 horas (7 días) durante la transición puberal disminuía significativamente los niveles de LH y testosterona y reducía parcialmente la separación balanoprepucial en ratas macho (335). Mientras que con protocolo similar en hembras prepuberales no se observaba el mismo efecto (336). Estos datos indican que con altos niveles de ghrelin no solo se conseguía la inhibición de la secreción de LH sino también el retraso en el inicio de la pubertad de forma más evidente en ratas macho, aunque las hembras son también sensibles a este efecto inhibitor a altas dosis de ghrelin.

Se ha demostrado que tanto ghrelin como su receptor, GHS-R1a, se expresan en testículo (327;329;339) y ovario (326;340;341) de distintas especies (rata, pollo, y humano). En concreto, se ha encontrado en las células de Leydig (329;339) en las que actúa como un regulador local de la función de este tipo celular (esteroidogénesis y proliferación) (327;342). Mediante una combinación de experimentos *in vivo* y *ex vivo*, se ha comprobado que ghrelin inhibe la expresión de SCF (mayor estimulador paracrino del desarrollo de células germinales) en las células de Sertoli (343). Esto sugiere que las gónadas son fuente de ghrelin y que éste, derivado sistémicamente o producido a nivel local, puede ejercer efectos directos sobre las gónadas. Esto fue

reforzado por el hecho de que la expresión de ambos, ghrelin y receptor, está regulada por señales hormonales, LH, FSH, y el propio ghrelin (principal regulador de su receptor).

En cuanto al papel de ghrelin en la gestación, se ha demostrado que ghrelin puede inhibir la preimplantación de los embriones durante su desarrollo y mediar contracciones espontáneas e inducidas por oxitocina (328;344). Además, los niveles de ghrelin aumentan en ratas durante el primer tercio de la gestación y luego caen (340); el tratamiento crónico con ghrelin durante este período causa la disminución del tamaño de las crías.

Aunque se ha demostrado la expresión de ghrelin y GHS-R1a en la glándula mamaria y la leche (345), su papel durante la lactancia no está muy claro. Mientras que los niveles de ghrelin circulante son menores en ratas en lactancia que en sus respectivos controles (346), la administración crónica de ghrelin a madres durante lactancia suponen el aumento significativo de la secreción de leche y con ello del peso de las crías (347).

➤ **Cardiovascular**

En circulación sistémica, ghrelin tiene un potente efecto vasodilatador, independiente de endotelio, que implica mecanismos centrales y periféricos: la administración iv de ghrelin en humanos causa un significativo descenso en la presión arterial pero no del ritmo cardíaco (348).

Ghrelin es capaz de mejorar la función endotelial mediante la inhibición de la producción, basal e inducida por TNF- α , de citokinas quimiotácticas incrementando la bioactividad del óxido nítrico e inhibiendo la migración inducida por angiotensina II de las células endoteliales de la aorta en humanos (349;350).

Estos efectos pueden ser debidos, no solo a un aumento de GH, ingesta, vasodilatación y descenso de producción de citokinas, sino también de efectos directos del ghrelin sobre los cardiomiocitos. *In vitro* ghrelin inhibe apoptosis de cardiomiocitos y células endoteliales (257), mejora la función del miocardio durante isquemia/repercusión y el

infarto inducido por isoproterenol (351) y disminuye la tasa de infarto (352). En voluntarios sanos (348) y pacientes con fallo crónico de corazón (353), ghrelin disminuye la resistencia vascular, que resulta en un incremento de la función cardíaca.

➤ **Sistema Inmune**

El receptor GHS-R1a se expresa en órganos linfoides y en distintos tipos de células del sistema inmune sugiriendo que ghrelin puede ejercer algún papel en la generación y/o el control de este proceso. De hecho, varios estudios han demostrado que ghrelin puede modular la activación y proliferación de las células inmunes, y la secreción de citokinas inflamatorias.

Recientemente, se ha demostrado que se encuentra ghrelin y su receptor en células T humanas y monocitos, donde inhibe específicamente la síntesis, inducida por LPS y leptina, de citokinas proinflamatorias tales como leptina, IL-1b, IL-6 y TNF- α (349;354;355). Estos datos han establecido un nuevo papel para ghrelin sobre la función de las células del sistema inmune, como un regulador negativo de la expresión de citokinas inflamatorias inducida por antígenos, mitógenos o leptina. Esto supone una nueva función en la que los efectos de ghrelin y leptina se antagonizan.

➤ **Proliferación celular**

Existen evidencias que sugieren que ghrelin está implicado en la regulación de la proliferación, apoptosis y diferenciación de varias líneas celulares, normales y neoplásicas, mediante mecanismos dependientes e independientes de GHS-R1a ya que estimula la proliferación de cardiomiocitos, preadipocitos, osteoblastos, células β pancreáticas, células de la piel, células de la zona glomerulosa de la adrenal y de la médula espinal (de feto en rata). Además, ghrelin estimula la diferenciación de células osteoblásticas y de mioblastos.

Evidencias de que ghrelin y ghrelin/GHSs se coexpresan en varias líneas celulares de tumores adrenales sugieren que el sistema de ghrelin puede jugar un importante papel autocrino/paracrino en el desarrollo de neoplasmas.

Experimentos *in vitro*, demostraron que ghrelin puede estimular e inhibir la proliferación de varias líneas celulares de tumores.

En conjunto, las acciones periféricas de ghrelin no solo causan la modulación de la función sino también la regulación de la supervivencia/proliferación de las células diana (356).

➤ **Fisiología del hueso**

Uno de los efectos periféricos de ghrelin puede ser la regulación del crecimiento y el metabolismo del hueso. Tanto osteoblastos como líneas celulares de osteoblastos de distintas especies, expresan GHS-R1a (357). El tratamiento con ghrelin estimula directamente la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas de feto de rata, así como la movilización y depósito de calcio (357). Con el bloqueo de GHS-R1a se pierden estos efectos lo que sugiere que ghrelin incrementa la proliferación y diferenciación, y disminuye la apoptosis de osteoblastos de rata y ratón probablemente a través de GHS-R1a. Además, ghrelin incrementa la densidad mineral del hueso tanto en ratas normales como en deficientes en GH (358). Esto indica que ghrelin estimula directamente la formación de hueso.

➤ **Otros efectos**

El número de funciones que se atribuyen a ghrelin sigue en aumento. Incluyen: estimulación de la secreción de PRL, ACTH, AVP, promoción del sueño de onda corta, retención de memoria, comportamiento tipo ansiedad o relajación/dilatación de los músculos del ojo (356).

4. GHRELIN DESACILADO (UAG)

La diferencia entre ghrelin y el ghrelin desacilado (UAG) es la presencia o no de un ácido graso (n-octanoico) en la Ser 3. Inicialmente se consideró que UAG carecía de función ya que esta modificación condicionaba la unión, y por tanto la activación del receptor GHS-R1a, a través del cuál se creía que ghrelin mediaba todas sus acciones.

Sin embargo, actualmente se considera que ni ghrelin realiza todas sus funciones mediante el receptor GHS-R1a (171) ni UAG es una molécula inerte (335;359;360).



Figura 22: Ghrelin desacilado (UAG).

4.1 Funciones Fisiológicas

➤ Secreción de GH

Bajo situaciones normales UAG no influye en la secreción de GH ya que no puede unirse al GHS-R1a.

UAG, en humanos, no modifica la respuesta de GH, PRL y ACTH a ghrelin (361). Sin embargo, ratones transgénicos que sobreexpresan UAG presentan menor tamaño que los wt, lo que indica que UAG puede modular el eje GH-IGF (disminución de la respuesta de GH a ghrelin) (258).

➤ Regulación de la ingesta y del peso corporal

Dependiendo de las condiciones experimentales, se ha publicado que **UAG** es capaz de no afectar (258;360;362), inhibir (363-365) o estimular (360) la ingesta. Ratones transgénicos que sobreexpresaban UAG tenían un fenotipo normal comparado con los wt en cuanto a ingesta y peso corporal (258).

Neary *et al*/observaron que mientras la administración de ghrelin ip causa aumento de la ingesta en situaciones de alimentación y ayuno, UAG no causa ningún efecto. Datos similares fueron publicados posteriormente: la administración ip no modifica la ingesta, ni en ratas ni en ratones (362).

Un estudio reciente indica que, mientras la administración ip de UAG solo no modifica la ingesta, la administración conjunta de UAG y ghrelin consigue anular el efecto

orexigénico característico de ghrelin, posiblemente mediante la activación de neuronas de Nesfatin-1 (366).

El efecto inhibitor de la ingesta, observado por otros grupos, parece ser específico para la administración central y está mediada por el incremento de la expresión génica de CART y Urocortina en el PVN y el ARC a nivel de hipotálamo (363). Además, la sobreexpresión de UAG en ratón da lugar a un fenotipo caracterizado por un descenso en el peso corporal y la cantidad de grasa, acompañado de un moderado descenso del crecimiento lineal. Esto sugiere que, a diferencia de ghrelin, UAG genera un balance negativo (372).

Una posible vía mediante la cual UAG puede mediar sus efectos es cruzando la BBB, pasando directamente al cerebro, y actuar a través del receptor 2 del factor liberador de corticotropina (CRF-R2) para inducir el efecto anorético y el cambio en la actividad motora en el estómago durante el ayuno (364).

Por otro lado, se ha publicado también que la administración central de UAG incrementa la ingesta, y que este efecto puede ser a través de la ruta de las orexinas (360). Ese efecto orexigénico también se observaba en ratones deficientes en GHS-R1a, sugiriendo que este péptido actúa sobre un receptor específico para él.

➤ **Regulación del metabolismo de glucosa y lípidos**

A) **Metabolismo glucosa**

En los islotes pancreáticos se expresa ghrelin, en su forma acilada y desacilada, y también el receptor GHS-R1a (238;301;304;367).

Mediante experimentos *in vivo*, realizados tanto en roedores como en humanos, se ha podido comprobar que la administración de UAG no induce cambios significativos en los niveles sistémicos de insulina y glucosa en estado de ayuno (303;304;368;369).

Sin embargo, se sabe que la administración iv de UAG actúa como secretagogo de insulina en la vena portal en ratas anestesiadas, aumentando también la respuesta de insulina a glucosa. El hecho de que UAG incremente, además, la tasa de eliminación de insulina a nivel hepático puede explicar por qué las diferencias observadas en los niveles de insulina en la vena portal no se reflejan a nivel sistémico.

Mediante la coadministración de ghrelin y UAG, al igual que bloqueando GHS-R1a, se revierte el efecto de ghrelin sobre la secreción de insulina. Esto soporta la hipótesis de que UAG juega un importante papel en el metabolismo de glucosa a nivel de hígado (370).

Además, la sobreexpresión de UAG en islotes pancreáticos mejora la sensibilidad a la insulina tras la administración de glucosa ip en ratones (371), y cuando se coadministra ghrelin y UAG se bloquea el aumento de los niveles de glucosa causado por ghrelin y empeora la sensibilidad a la insulina (309;361;369).

Por otro lado, la glucosa también afecta a los niveles de UAG: en ratas en ayuno anestesiadas, la administración aguda de glucosa a nivel intravenoso causa el descenso de los niveles de UAG tanto en circulación portal como sistémica, mientras que el descenso en los niveles de ghrelin solo se observaba a nivel portal. Teniendo en cuenta además que, tanto en condiciones basales como estimuladas por glucosa, los niveles de ghrelin total (acilado y UAG) son mayores en la circulación portal que en la periférica, parece que los cambios en los niveles de ghrelin total son debidos fundamentalmente a variación en los niveles de UAG. Aunque no está del todo claro, la distinta tasa de eliminación de ghrelin y UAG a nivel hepático (UAG \ll ghrelin) puede explicar las diferencias en el ratio ghrelin/UAG a nivel portal y sistémico. Además puede que ese aumento en los niveles de UAG sirva para contrarrestar los efectos del ghrelin acilado (306).

Un estudio reciente demuestra que la sobreexpresión del gen *ghrelin* de forma específica en el tejido adiposo de ratón, mediante un promotor FABP4, causa el aumento significativo de los niveles plasmáticos de UAG y una mejoría de la tolerancia a glucosa y de la sensibilidad a insulina (372).

Para esclarecer el papel de UAG en el metabolismo de la glucosa, son muchos también los trabajos realizados *in vitro*. En este sentido se ha publicado que la administración de UAG no tiene efectos sobre la liberación de insulina en modelos de páncreas

perfundidos (368). Sin embargo, UAG causa aumento de la secreción de insulina en líneas celulares de insulinoma expuestas a altas concentraciones de glucosa (359;373). A una concentración diez veces superior a ghrelin (correspondiente al ratio de los dos péptidos en circulación) UAG suprime los efectos de ghrelin sobre la secreción de insulina desde islotes pancreáticos aislados de rata y de ratón (374). Además, entorpece la capacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa endógena pero no tiene efectos sobre su eliminación. El efecto restringido de UAG y ghrelin sobre la acción de la insulina hepática es eliminado con la administración conjunta de ambos péptidos (309;315). Finalmente, UAG inhibe la producción de glucosa en hepatocitos primarios y contrarresta el efecto estimulador de ghrelin sobre la secreción de glucosa. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que UAG no puede antagonizar la acción de ghrelin sobre el GHS-R, sugiere que la actividad antagónica de UAG está mediada por un mecanismo indirecto, quizás implicando un receptor de UAG específico (308).

En conjunto, estos datos indican el papel de ghrelin en la regulación negativa de la secreción de insulina, sensibilidad a insulina y metabolismo de glucosa, mientras que un aumento en los niveles de UAG, en concreto del ratio ghrelin/UAG, mejora la sensibilidad a la insulina regulando su secreción.

B) Metabolismo lípidos

De forma similar a ghrelin, UAG promueve lipogénesis *in vivo* (292;303) e inhibe lipólisis inducida por isoproterenol en adipocitos de rata mediante un mecanismo independiente de GHS-R1a (293).

Mediante cultivo de adipocitos humanos de grasa abdominal y subcutánea, se ha comprobado que UAG presenta efecto antilipolítico como ghrelin, y actúa como un factor proadipogénico aunque no media sus efectos a través de GHS-R1a. Al igual que ghrelin disminuye la secreción de leptina en estos tejidos (375).

Sin embargo, un estudio reciente demuestra que la sobreexpresión del gen ghrelin de forma específica en el tejido adiposo de ratón, mediante un promotor FABP4, provoca

un descenso significativo en la cantidad de tejido WAT mientras que no afecta a BAT, en comparación con los wt (372).

➤ **Gastrointestinales**

UAG no parece influir en la secreción gástrica (319). En cuanto a motilidad, UAG periférico inhibe el vaciado gástrico sin alterar el tránsito del intestino delgado, posiblemente mediante la activación directa de los receptores del cerebro (CRF2) cruzando la BBB pero no mediante la activación de rutas aferentes vagales (363;364;376). El efecto sobre la proliferación celular y diferenciación del epitelio gastrointestinal no ha sido estudiado.

➤ **Reproducción**

UAG parece que es capaz de mimetizar el efecto inhibitorio de ghrelin sobre la secreción de LH y el eje gonadotro: la administración aguda y repetida a ratas macho adultas en libre movimiento demostró que UAG es capaz de suprimir parcialmente la activación del eje gonadotropo en la pubertad, como se evidencia mediante un descenso en los niveles de LH y el porcentaje de separación balanoprepucial, similar al observado en los grupos tratados con ghrelin (335). Así, el papel reproductivo del sistema de ghrelin sobre la regulación del eje gonadotropo parece llevado a cabo por ambas formas de ghrelin: acilada y desacilada (377).

➤ **Cardiovasculares**

UAG presenta una potencia vasodilatadora similar a la de ghrelin (378), inhibe inotropismo (379), inhibe apoptosis de cardiomiocitos y tiene efectos cardioprotectores sobre lesión de miocardio inducido por isoproterenol en ratas (351).

➤ **Proliferación celular**

UAG comparte con ghrelin muchos efectos sobre la regulación de proliferación celular, apoptosis y diferenciación (356):

- UAG promueve la supervivencia e inhibe apoptosis de la línea celular H9c2 de cardiomiocitos (257) y en células β pancreáticas (380).
- *In vitro*, UAG induce proliferación de médula espinal fetal de rata (381) y de células de la piel (377).
- UAG promueve la diferenciación y fusión de los mioblastos C2C12.
- Al igual que ghrelin, UAG inhibe la proliferación e incrementa la apoptosis de líneas celulares de pequeñas células de carcinoma y ejerce diferentes efectos sobre la proliferación celular en líneas celulares de carcinoma de próstata (382).

➤ **Otros efectos** (356)

Aunque hay muy pocos datos acerca del papel de UAG sobre la **fisiología del hueso**, un estudio reciente demuestra que UAG estimula la proliferación de osteoblastos humanos en ausencia de GHS-R1a.

UAG no influye en el **sistema inmune, sueño, memoria o comportamiento**.

5. **OBESTATINA**

Zhang *et al* (180) identificaron, mediante una estrategia bioinformática, una proteína altamente conservada en 11 especies de mamíferos que derivaba del mismo precursor de ghrelin (segmento 76 a 98 de proghrelin). Esta proteína, que posteriormente aislaron de extractos de estómago de rata, constaba de 23 aa y un grupo amida en el extremo C-terminal que parecía importante para su actividad biológica. La llamaron obestatina: "*Obese*" del latín "obedere" que significa devorar y "*statin*" que significa supresión.

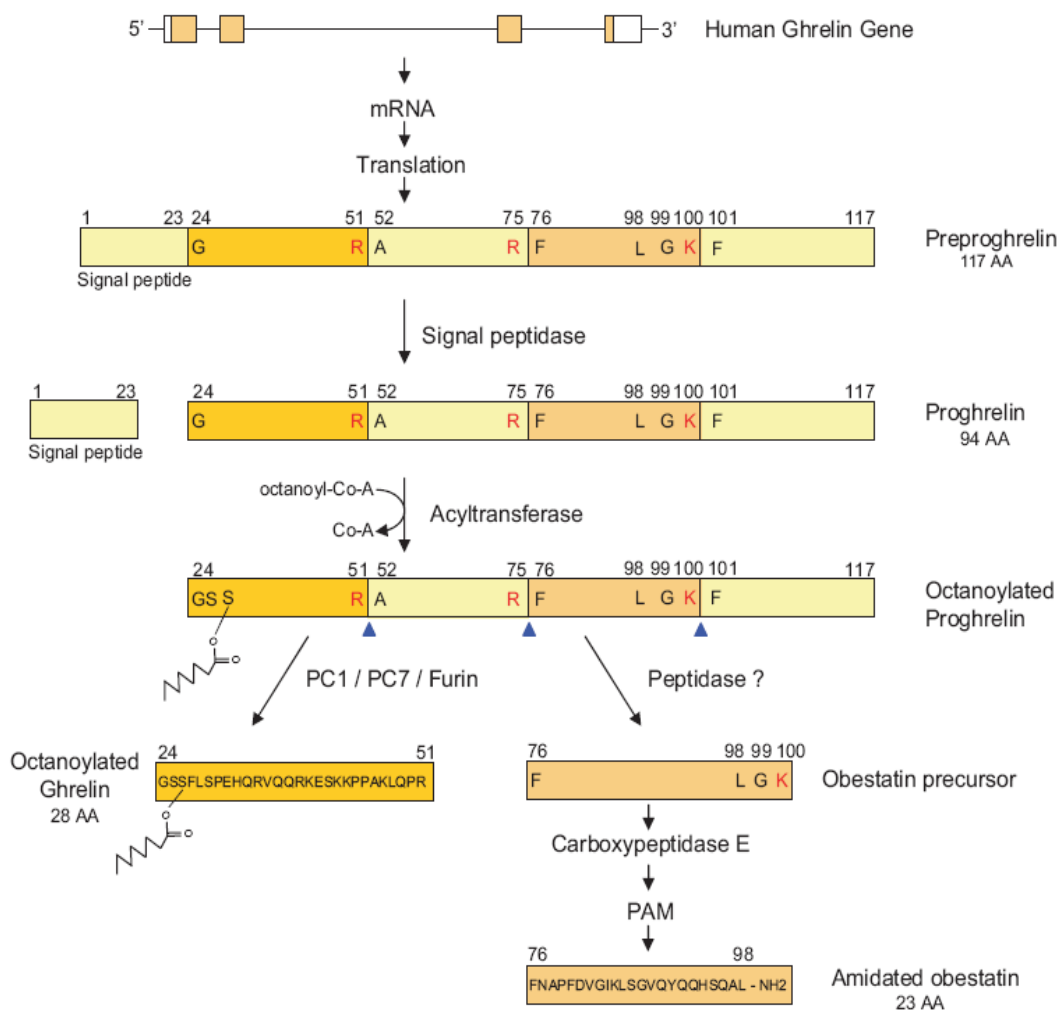


Figura 23: Mecanismo propuesto para la formación de obestatina; mediante prohormona convertasas (PC) se corta el proghrelin en posiciones 75 y 100, se elimina Lys del extremo C-terminal, y se añade NH₂ mediante una Carboxipeptidasa E.

5.1 Expresión

En roedores, se ha descrito su expresión en (180): intestino, estómago (mucosa), riñón, córtex cerebral y páncreas perirrenal de ratas, y células de Leydig.

5.2 Receptor

GPR39 es un receptor asociado a proteína G, consta de 7 segmentos transmembrana, y pertenece a la subfamilia de receptores de ghrelin. Se expresa en distintas regiones del tracto gastrointestinal y del CNS.

Inicialmente, Zhang *et al*/publicaron que la obestatina se unía a GPR39 (180), a través del cual ejercía sus acciones sobre la regulación de la función gastrointestinal y metabólica (383).

Sin embargo, Chartrel *et al* (384) aportaron evidencias de que la obestatina no se une a GPR39 con una serie de ensayos funcionales en los que se usaba el mismo cDNA de GPR39 humano, la misma obestatina comercial y otra sintetizada por ellos, y bajo las mismas condiciones experimentales que en el trabajo de Zhang *et al*. Comprobaron que, tras la incubación con obestatina de dos líneas celulares CHO sobreexpresando el receptor, no se observaba ninguna unión específica de I¹²⁵obestatina-GPR39 así como tampoco se observaba ningún aumento en la producción de cAMP, en la concentración de Ca⁺² intracelular o en la internalización del receptor.

Otros grupos (385-387) presentaron también trabajos similares en los que demostraban que no conseguían reproducir los datos de Zhang *et al*, quienes posteriormente reconocieron que su resultado inicial que apuntaba a la unión de GPR39 y obestatina era irreproducible (384).

Comparando ratones *gpr39*^{-/-} y wt, se comprobó que no había diferencias en la ingesta, el peso corporal y la adiposidad, y tampoco en los niveles de glucosa e insulina en ayuno. Además, la administración de obestatina ip no modificaba la ingesta después de ayuno nocturno del ratón *gpr39*^{-/-} ni de los wt (387).

Sin embargo, se ha relacionado a este receptor con la motilidad del intestino ya que los ratones *gpr39*^{-/-} presentan un incremento en el vaciado gástrico comparado con los wt (388).

Así, tanto el receptor de obestatina como el ligando endógeno de GPR39, permanecen sin ser descubiertos.

5.3 Funciones Fisiológicas

En el trabajo inicial de Zhang *et al*/se considera que la obestatina está implicada en la regulación de la ingesta y el peso corporal, ejerciendo efectos opuestos a ghrelin (180):

- la administración ip e icv de obestatina provocaba en ratones un descenso de la ingesta de forma tiempo y dosis dependiente; efecto que disminuía si la obestatina carecía del grupo amida.
- la administración de obestatina ip tres veces al día durante 8 días causaba en ratas un descenso en el peso corporal.
- este tratamiento con obestatina suprimía la actividad de vaciado gástrico. En concreto se comprobó, mediante experimentos *in vitro*, que la obestatina disminuía la actividad contráctil del yeyuno, que podía inducir una señal de saciedad a través del nervio vago.

Mediante cultivos de hipófisis de ratas encontraron que, a diferencia de ghrelin, la obestatina no incrementaba la secreción de GH.

OBJETIVOS

1. Comprobar si los distintos péptidos derivados del mismo gen que ghrelin- GHR-d3, GHR-d4, UAG y obestatina- poseen funciones similares, o modifican de alguna forma, el efecto orexigénico y secretor de GH que caracterizan a ghrelin.
2. Estudiar el papel de mTOR en la secreción de GH.
3. Estudiar el papel de AMPK en la secreción de GH y si este efecto está mediado por el metabolismo de lípidos.
4. Estudiar el efecto de la administración crónica de ghrelin a nivel central sobre el metabolismo de lípidos periférico y si en esta función lipogénica interviene la hormona de crecimiento.

MATERIALES y MÉTODOS

I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para realizar estos experimentos se utilizan ratas *Sprague-Dawley* (Animalario General, Universidad de Santiago de Compostela), ratas *Lewis enanas (dwarf)* (HsdOla:Dwarf-dw-4)(Harlam Ibérica) y *Lewis* de genotipo salvaje (LEW/SsNHsd) (Harlam Ibérica). En todos los casos se trata de ratas macho adultas.

Los animales permanecen en el animalario durante 5 ó 6 días antes de ser usados, para que se adapten a las condiciones de temperatura y luz. Estas condiciones, que se mantienen constantes, son de 20° C e iluminación controlada con ciclos alternos de 12h (luz/oscuridad). Las ratas se alimentan con pienso comercial y agua *ad libitum*.

En aquellos casos en los que es necesaria la cirugía se utiliza como anestésico una mezcla de Ketamina-Xilazina, en unas proporciones determinadas. Se utiliza una dosis de 200 µl/100 gramos de peso corporal, considerándose ésta una dosis adecuada para conseguir una anestesia de grado II-III durante períodos de una o dos horas, siendo la mortalidad muy baja. La anestesia se administra vía intraperitoneal.

SOLUCIÓN ANESTÉSICA:

- i. KETAMINA: 42.5% Ketolar, Parke-Davis, Morris Plañís N.J., (USA). 50 mg/ml.
- ii. XILAZINA: 20% Rompun, Bayer Leverkusen, Alemania. 2mg/ml
- iii. SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA 37.5%.

Todos los experimentos se realizan de acuerdo con el *Comité Ético Animal* de la Universidad de Santiago de Compostela, cumpliendo las *Normas de Cuidado de Animales de Laboratorio y la Ley Internacional de Experimentación Animal*.

II. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

a. CANULACIÓN INTRAVENOSA (iv):

Esta es una técnica que se usa para la realización de experimentos de secreción pulsátil en animales en libre movimiento.

La operación debe realizarse al menos 4 días antes del experimento para dar tiempo a la perfecta recuperación del animal, para que se elimine el anestésico y también para que desaparezca el estrés ocasionado con la cirugía, que podrían alterar la correcta secreción pulsátil.

Se utilizan cánulas de polietileno (PE-50, Clay-Adams, Becton-Dickson, New Jersey, USA) con un calibre muy fino (0.58mm de diámetro externo y 0.960 mm de diámetro interno) y una longitud de 8 cm. El extremo de la cánula, que se va a introducir en la vena, lleva un tubo de silastic (Dow Corning) de 4.5 cm de longitud para facilitar la entrada en la vena. Para evitar el sangrado, y por tanto la consecuente obturación de las cánulas, se introduce dentro de las mismas una guía de nylon de calibre 30 (diámetro 0.32 mm) que se ajusta perfectamente al diámetro interno de la cánula. Se rellena el espacio residual entre la guía y las paredes con aceite vegetal que es inerte e impide, por su viscosidad, que penetre sangre en la cánula ya colocada.

Para la canulación intravenosa se elige la vena yugular como vía de acceso al sistema cardiovascular dada la proximidad que esta vena presenta a la piel del cuello, su gran calibre en esa zona y la facilidad de su disección.

Una vez anestesiada la rata, se fija el animal a una superficie rígida en posición supino, se hace una incisión en la piel del cuello, y se disecciona el músculo hasta que aparezca la vena yugular externa. Para evitar el sangrado de la vena se rodea con un hilo de seda quirúrgica que se usará para anudar el extremo cervical de esta. A continuación se realiza una pequeña incisión en la pared de la vena con una microtijera, a través de ella se introduce la cánula de silastic de aproximadamente 4.5 cm hasta llegar a una confluencia de la vena cava superior y la aurícula derecha, y se fija fuertemente a los músculos del cuello con un hilo de seda. Finalmente se hace pasar por un trayecto subcutáneo hasta la zona retrocervical, dejando este

extremo libre para realizar la extracción de muestras de sangre y/o administración de estímulos.

Tras esta operación los animales se mantienen en jaulas individuales, evitando así, que se arranquen las cánulas entre ellos, y con alimentación *ad libitum* hasta el día del experimento.

b. **CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (icv):**

Como en el caso de la canulación intravenosa, esta operación debe llevarse a cabo aproximadamente unos 4 días antes del experimento. El objeto de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral.

Se utilizan cánulas de polietileno (PE-20, Clay-Adams, Becton-Dickinson, New Jersey, USA) de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro interno). En uno de los extremos de la cánula se pone un tope y se corta en bisel a unos 3/4 mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce en el cerebro y que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se sella hasta el día del experimento.

Una vez anestesiados los animales se realiza un corte transversal en la piel de la cabeza, a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localiza a simple vista el bregma, que separa frontales de occipitales, y que se utiliza como punto de referencia para realizar un orificio (1.2 mm lateral y 1 mm posterior) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente, se añade cianoacrilato para que la cánula se quede perfectamente fijada y se selle toda la zona abierta.

Para comprobar que la cánula se ha colocado en la posición correcta se inyecta con Protamina 2%, disuelto en agua con acetato sódico, lo cual claramente tiñe el ventrículo lateral, demostrando así que la cánula ha sido bien colocada.

c. COLOCACIÓN DE BOMBAS OSMÓTICAS:

Para la realización de un tratamiento crónico (8 días) a nivel central se usan bombas osmóticas (modelo 2001; Alza Corp., Palo Alto, CA) conectadas mediante un tubo silastic a la cánula icv. Estas bombas, que tienen un volumen de expulsión constante de 1 μ l/hora, se rellenan con el péptido a estudiar o su vehículo hasta un volumen total de 200 μ l, y se ponen sobre salino en un baño a 37 °C durante, al menos, 4 horas previas a la operación para asegurar que ya están liberando el tratamiento cuando se colocan sobre el animal.

Para colocar estas bombas se procede primero a colocar la cánula icv tal y como se ha descrito previamente. Luego se coloca la bomba debajo de la piel en la parte retrocervical del animal y se conecta mediante silastic, que se dilata con Xileno para que quede perfectamente pegado a la cánula icv. Posteriormente se sella la zona craneal con cianoacrilato.

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

○ **TRATAMIENTOS INTRACEREBROVENTRICULARES (icv).**

➤ **Estudio del efecto de la administración icv de los distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* sobre la ingesta.**

1.1.1 Administración icv de ghrelin y ghrelin deleciónado en el exón 4 (GHR-d4).

Para ello contamos con cuatro grupos de ratas distribuidas del siguiente modo:

- 8 ratas tratadas con Ghrelin (5 μ g/5 μ l) + Salino 5 μ l.
- 8 ratas tratadas con Ghrelin (5 μ g/5 μ l) + GHR-d4 (5 μ g/5 μ l).
- 8 ratas tratadas con Salino 5 μ l + GHR-d4 (5 μ g/5 μ l)
- 8 ratas control (5 μ l de salino + 5 μ l de salino)

Intervalo de 30 minutos entre ambas administraciones.

** Ghrelin: (Human Ghrelin; ref G3902; Sigma Aldrich)

**Ghrelin delecionado en el exón 4: generosamente suministrado por AC Herington, Queensland University of Technology (Autralia).

1.1.2 Administración icv de ghrelin y ghrelin desacilado (UAG).

Para ello contamos con cuatro grupos de ratas distribuidas del siguiente modo:

- 8 ratas tratadas con Ghrelin (5 µg/5 µl) + Salino 5 µl.
- 8 ratas tratadas con Ghrelin (5 µg/5 µl) + UAG (5 µg/5 µl).
- 8 ratas tratadas con Salino 5 µl + UAG (5 µg/5 µl).
- 8 ratas control (5 µl de salino + 5 µl de salino).

Intervalo de 30 minutos entre ambas administraciones.

** Ghrelin (Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

** UAG (Des-octanoyl-Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H-5948; Bachem)

1.1.3 Administración icv de obestatina.

Se establecen los siguientes grupos experimentales:

- 8 ratas tratadas con Obestatina (5 µg/10 µl).
- 8 ratas control (10 µl de salino)

** Obestatina: (Obestatin rat/mouse; Phoenix Pharmaceuticals)

En todos los casos los animales son previamente canulados siguiendo el protocolo descrito con anterioridad.

El experimento se inicia a las 10:00 de la mañana, con la administración icv correspondiente. A continuación se lleva a cabo un control de la ingesta a unos tiempos determinados: 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas.

En el caso de GHR-d4 y obestatina, se repite el mismo proceso durante los días que dura el experimento.

Además, todos los animales se pesan cada dos días para comprobar que evolucionan correctamente.

➤ **Estudio del efecto de la administración crónica de ghrelin a nivel central sobre el metabolismo lipídico.**

Para ello se utilizan ratas macho *dwarf/Lewis*, a las que se le coloca una bomba osmótica subcutánea conectada a nivel central mediante una cánula icv.

Grupos:

- *Lewis* + Ghrelin (20 µg/día durante 8 días)
- *Lewis* + Salino (20 µl/día durante 8 días)
- *Dwarf* + Ghrelin (20 µg/día durante 8 días)
- *Dwarf* + Salino (20 µl/día durante 8 días)

** Ghrelin (Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

** Bombas osmóticas (modelo 2001; Alza Corp.)

** Ratas *Lewis* enanas (*dwarf*) (HsdOla:Dwarf-dw-4)(Harlam Iberica), *Lewis* de genotipo salvaje (LEWIS/SsNHsd)(Harlam Iberica)

○ **TRATAMIENTO INTRAVENOSO.**

En todos los casos unos 4 días antes de la realización del experimento se procede a la canulación intravenosa (e intracerebroventricular en aquellos casos que fuera necesario) de las ratas, tal y como se ha descrito previamente.

El experimento se repite durante varios días en los que se alternan animales representativos de todos los grupos hasta completar un n =7

A) Péptidos derivados del gen *ghrelin*

➤ **Estudio del efecto de la administración iv de los distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* sobre la respuesta y/o secreción pulsátil de GH.**

1.2.1 Efecto de la administración iv de ghrelin delecionado en exón 4 (GHR-d4) sobre la respuesta de GH.

Se establecen distintos grupos experimentales:

- Ghrelin (10 µg/ 200 µl)
- GHR-d4 (10 µg/ 200 µl)
- GHR-d4 (10 µg) + Ghrelin (10 µg) /200 µl

** Ghrelin: (Human Ghrelin; ref G3902; Sigma Aldrich)

** Ghrelin deleccionado en el exón 4: generosamente suministrado por AC Herington, Queensland University of Technology (Autralia).

1.2.2 Efecto de la administración iv de ghrelin deleccionado en exón 3 (GHR-d3) sobre la respuesta de GH.

Se establecen distintos grupos de ratas:

- 7 ratas tratadas con Ghrelin (10 µg/ 200 µl)
- 7 ratas tratadas con GHR-d3 (10 µg/ 200 µl)
- 7 ratas tratadas con GHR-d3 (10 µg) + Ghrelin (10 µg)/ 200 µl.

** Ghrelin: (Human Ghrelin; ref G3902; Sigma Aldrich)

** Ghrelin deleccionado en el exón 4: generosamente suministrado por AC Herington, Queensland University of Technology (Autralia).

1.2.3 Efecto de la administración iv de ghrelin desacilado (UAG) sobre la respuesta de GH.

Se establecen distintos grupos de ratas:

- Ghrelin (10 µg/ 200 µl)
- Ghrelin desacilado (UAG) (50 µg/ 200 µl)
- UAG (50 µg) + Ghrelin (10 µg)/ 200 µl.

** Ghrelin (Human Ghrelin; ref G3902; Sigma Aldrich)

** UAG (Des-octanoyl-Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H-5948; Bachem)

1.2.4 Efecto de la administración iv de la obestatina sobre la secreción de GH.

a) Respuesta a ghrelin

Se establecen distintos grupos de ratas:

- Ghrelin (10 µg/200 µl)
- Obestatina (100 µg/200 µl)
- Obestatina (100 µg) + Ghrelin (10 µg) /200 µl.

b) Respuesta a GHRH

Se establecen distintos grupos de ratas:

- GHRH (5 µg/200 µl)
- Obestatina (100 µg/200 µl)
- Obestatina (100 µg) + GHRH (5 µg)/200 µl.

c) Secreción pulsátil de GH

Se establecen distintos grupos de ratas:

- 7 ratas tratadas con Obestatina (10 µg/200 µl)
- 7 ratas control (200 µl de salino)

** Ghrelin (Human Ghrelin; ref G3902; Sigma Aldrich)

** Obestatina (Obestatin rat mouse, Phoenix peptide)

** GHRH (GRF (1-29) amida (human), ref: H-3705; Bachem).

B) Papel de mTOR sobre la regulación de la secreción de GH

Los animales se canulan 4 días antes de llevar a cabo el experimento. En este caso se colocan dos cánulas: una icv por la que recibe el tratamiento y una iv por la que se extraen las muestras.

➤ **Estudio del efecto del papel de mTOR a nivel central sobre el patrón de pulsatilidad de GH.**

2.1 Efecto de la administración icv de **RAPAMICINA** sobre la secreción pulsátil de GH.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **RAPAMICINA:**

- 7 ratas tratadas con RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl).
- 7 ratas control (5 µl de DMSO).

** RAPAMICINA (ref: 553210; Calbiochem)

➤ Estudio del efecto del papel de mTOR a nivel central sobre la respuesta de GH a estímulos.

◆ α ghrelin

2.2 Efecto de la administración icv de **RAPAMICINA** sobre la respuesta de GH inducida por ghrelin.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **RAPAMICINA:**

- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).

** RAPAMICINA (ref: 553210; Calbiochem)

** Ghrelin (Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

◆ α GHRH

2.3 Efecto de la administración icv de **RAPAMICINA** sobre la respuesta de GH inducida por GHRH.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **RAPAMICINA:**

- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl).

** RAPAMICINA (ref: 553210; Calbiochem)

** GHRH (GRF (1-29) amida (human), ref: H-3705; Bachem).

C) AMPK y metabolismo de lípidos.

Compuesto	Nivel de Acción	Efecto
AICAR	Activa AMPK	Inhibe síntesis de lípidos
COMPUESTO C	Inhibe AMPK	Activa síntesis de lípidos
TOFA	Inhibe ACC	Inhibe síntesis de lípidos
ETOMOXIR	Inhibe CPT-1	Inhibe β-oxidación ácidos grasos

Tabla 1: Compuestos utilizados y sus efectos

➤ **Estudio del papel de AMPK a nivel central sobre el patrón de pulsatilidad de GH.**

➤ **Sobre la secreción espontánea de GH**

Los animales se canulan 4 días antes de llevar a cabo el experimento. En este caso se colocan dos cánulas: una icv por la que recibe el tratamiento y una iv por la que se extraen las muestras.

3.1.1 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la secreción pulsátil de GH.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **AICAR:**

- 7 ratas tratadas con AICAR icv (3 µg/5 µl).
- 7 ratas control (5 µl de Salino).

❖ **COMPUESTO C:**

- 7 ratas tratadas con COMPUESTO C icv (10 µg/ 5 µl).
- 7 ratas control (5 µl de DMSO).

** AICAR (ref: A9978; Sigma Aldrich)

** COMPUESTO C (ref: P5499; Sigma Aldrich)

➤ **Sobre la respuesta de GH a estímulos**

A) **a ghrelin**

3.1.2 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH inducida por ghrelin.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **AICAR:**

- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de salino) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).

❖ **COMPUESTO C:**

- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).

** AICAR (ref: A9978; Sigma Aldrich)

** COMPUESTO C (ref: P5499; Sigma Aldrich)

** Ghrelin (Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

B) a GHRH

3.1.3 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH inducida por GHRH.

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **AICAR:**

- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- AICAR icv (3µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de salino) + GHRH iv (10 µg/200 µl).

❖ **COMPUESTO C:**

- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl).

** AICAR (ref: A9978; Sigma Aldrich)

** COMPUESTO C (ref: P5499; Sigma Aldrich)

** GHRH (GRF (1-29) amida (human), ref: H-3705; Bachem)

➤ **Estudio del papel del metabolismo de lípidos a nivel central sobre la regulación de la secreción de GH.**

➤ **Sobre la secreción espontánea de GH**

3.2.1 Efecto de la administración icv de TOFA sobre la secreción pulsátil de GH

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ **TOFA:**

- 7 ratas tratadas con TOFA icv (5 µg/5 µl).
- 7 ratas control (5 µl de DMSO).

** TOFA (ref: T6575; Sigma Aldrich)

➤ Sobre la respuesta de GH a estímulos.

3.2.2 y 3.2.3 Efecto de la administración icv de TOFA y ETOMOXIR sobre la respuesta de GH inducida por ghrelin

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ TOFA:

- TOFA icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- TOFA icv (5 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).

❖ ETOMOXIR:

- ETOMOXIR icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- ETOMOXIR icv (10 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).
- Salino icv (5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl).

** TOFA (ref: T6575; Sigma Aldrich)

** ETOMOXIR (ref: E1905; Sigma Aldrich)

** Ghrelin (Ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

3.2.4 y 3.2.5 Efecto de la administración icv de TOFA y ETOMOXIR sobre la respuesta de GH inducida por GHRH

Se establecen distintos grupos de ratas para cada uno de los compuestos a estudiar:

❖ TOFA:

- TOFA icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- TOFA icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl).

❖ **ETOMOXIR:**

- ETOMOXIR icv (10 µg/5 µl) + Salino (200 µl).
- ETOMOXIR icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).
- Salino icv (5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl).

** TOFA (ref: T6575; Sigma Aldrich)

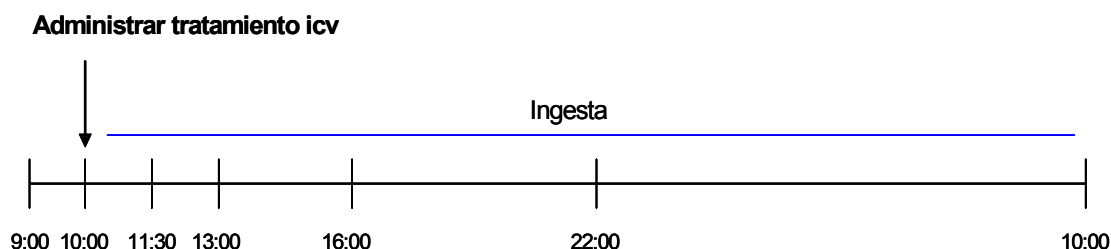
** ETOMOXIR (ref: E1905; Sigma Aldrich)

** GHRH (GRF (1-29) amida (human), ref: H-3705; Bachem)

IV. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

1. Efecto sobre la ingesta de la administración icv de distintos péptidos derivados del gen ghrelin.

Los animales se canulan icv unos 4 días antes del experimento, y permanecen desde entonces en jaulas individuales.



El día del experimento los animales se colocan en la mesa sobre la que van a ser pinchados una hora antes para que se tranquilicen y sea más fácil aplicar el tratamiento. Si corresponde (cada dos días), también se pesan.

Después del pinchazo se pone una cantidad de comida previamente fijada, y se realiza un seguimiento de la ingesta a unos tiempos determinados con el objetivo de poder diferenciar posibles efectos, y si estos son a tiempos cortos o largos. Así, se pesa la comida a las 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas de haber administrado el tratamiento.

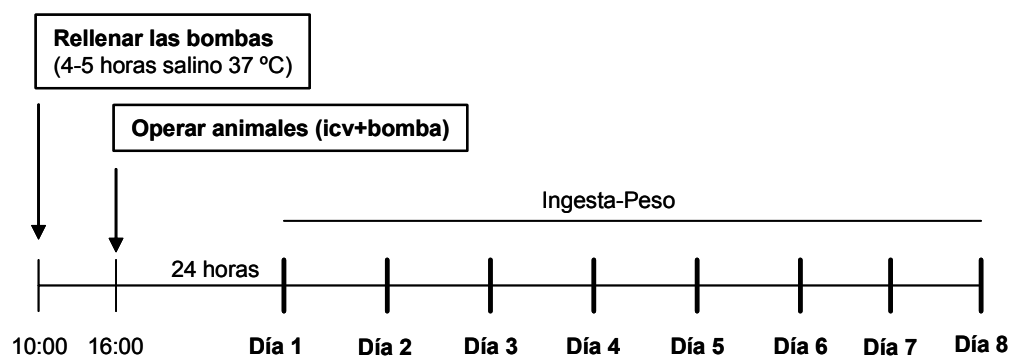
2. Efecto sobre el metabolismo de la administración crónica a nivel central de ghrelin

Para este experimento se usan ratas macho *Dwarf/Lewis*. El tratamiento crónico se consigue mediante las bombas osmóticas, que se colocan como se ha descrito previamente.

El día del experimento se procede al rellenado de las bombas (ghrelin/salino) unas 4-5 horas antes de su colocación. Durante este tiempo deben permanecer en salino y a 37 °C.

Después de la operación los animales se ponen en jaulas individuales donde permanecen durante los 8 días que dura el experimento. Tanto los animales como la comida se pesan, siempre a la misma hora, para ver si se observa algún efecto del tratamiento en estos parámetros.

El último día los animales son sacrificados mediante decapitación, y se extrae sangre y tejidos que se guardan a -20 y -80 °C, respectivamente, hasta su posterior análisis.



3. Secreción de GH

A) **Secreción pulsátil de GH**

Está ampliamente demostrado que la secreción de GH sigue un patrón pulsátil que presenta un claro dimorfismo sexual. En el caso de las ratas macho la pulsatilidad de GH se caracteriza por unos picos con una baja Frecuencia de pulsos (cada 3-4 horas) pero una alta Amplitud pulsátil (de 1.5-2 horas de duración). Durante el interpulso la concentración de GH es indetectable. En el caso de las hembras aunque la Frecuencia pulsátil es mayor que en los machos, la Amplitud pulsátil es más baja y los valores interpulso más altos. Los pulsos están relacionados con los ciclos luz-oscuridad y suelen ocurrir a la misma hora.

La pulsatilidad varía con la edad del animal siendo máxima la amplitud de los pulsos durante la adolescencia, y disminuyendo progresivamente con el envejecimiento.

La secreción pulsátil de GH se ve profundamente afectada por los factores externos del entorno del animal como los ruidos fuertes, cambios de temperatura etc..., pero sin duda el factor externo que más afecta a la secreción de GH es el estrés, de ahí que se ponga especial interés en que el animal esté lo más adaptado posible a ser manipulado así como al lugar en el que se realiza el experimento.

Teniendo en cuenta el bajo volumen sanguíneo de la rata, y que se realizan extracciones seriadas durante largos períodos de tiempo, se repone de forma continuada el volumen de líquido extraído, evitando así la hipovolemia y posibles alteraciones en los parámetros que se quieren medir. También se deben reponer los eritrocitos, para impedir que se vea afectada la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre.

Para realizar el análisis estadístico se usa el programa ULTRA 8, que permite estimar parámetros que caracterizan la secreción pulsátil de GH tales como: Niveles Medios, Área bajo la curva, y Respuesta Máxima.

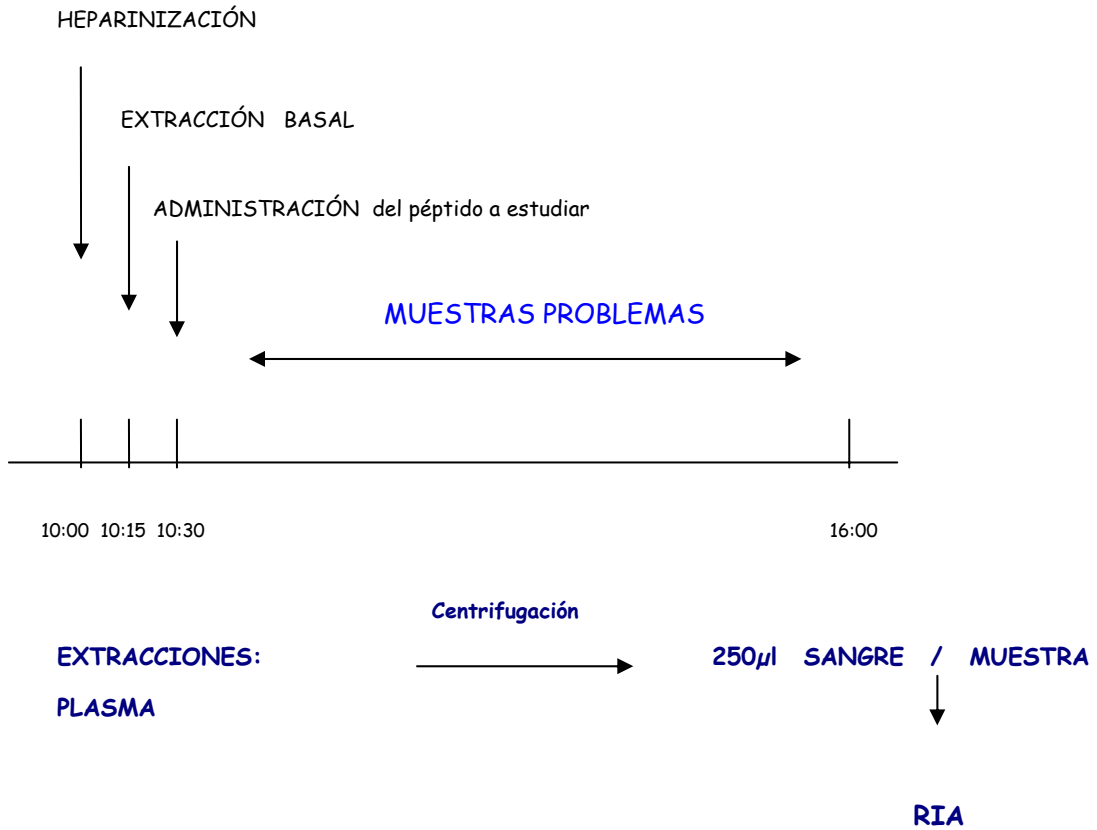
PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Después de someter a los animales a la intervención deben mantenerse en jaulas individuales durante al menos 4 días practicando, diariamente si es posible un simulacro del experimento para que se aclimaten al animalario y se acostumbren a ser manipuladas, evitando así cualquier tipo de estrés que pueda afectar a los parámetros que se quieren medir.

Para cada grupo experimental se necesitan al menos 7 animales, completándose el experimento en tandas consecutivas. Es importante que dentro de un mismo experimento se alternen ratas controles con ratas tratadas, para evitar así posibles variaciones entre los distintos grupos experimentales.

El día del experimento se conecta a la cánula del animal un tubo de silicona (PE-50). A tiempo 0, que se corresponde con las 10:00 horas de la mañana y antes de obtener la primera muestra de sangre, se inyectan 300 UI de heparina al 1% de Orbi, a través de la cánula para evitar la formación de coágulos. A partir de este momento es decir, desde las 10:00 de la mañana hasta las 16:00 horas de la tarde se realizan extracciones manuales de sangre cada 15 minutos. Inmediatamente después de cada extracción las muestras se centrifugan a 4° C y 13500 rpm durante 4 minutos. A continuación se debe separar el plasma que se almacena a -20° C hasta el momento de su análisis mediante radioinmunoensayo. Los glóbulos rojos se resuspenden en salino al 0.9% y se reponen a cada rata tras las siguientes extracciones.

❖ **PROTOCOLO DE PULSATILIDAD**



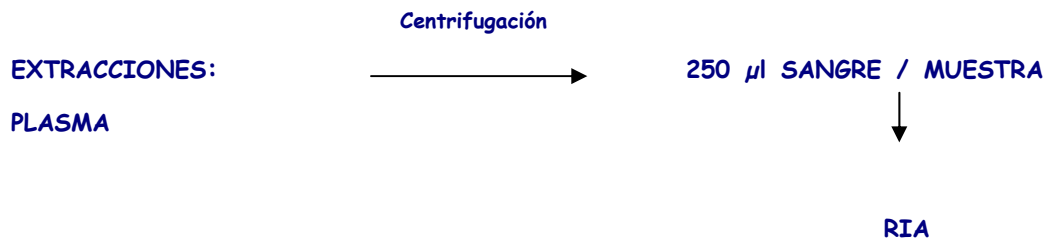
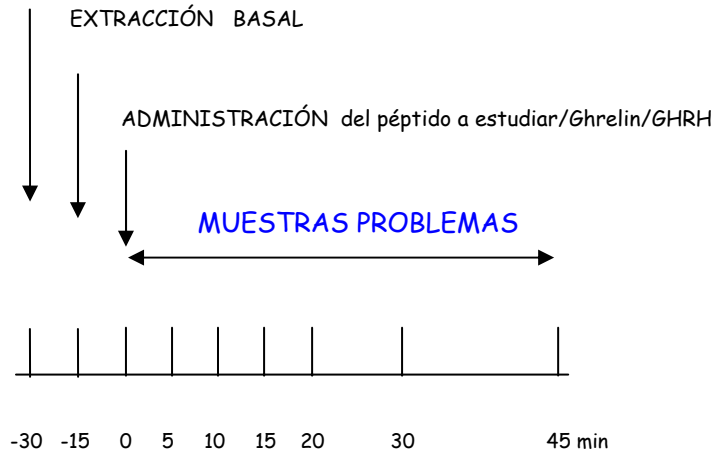
B) Respuesta de GH a estímulos

Para estos experimentos el proceso de canulación, así como la aclimatación al animalario, es exactamente igual a lo descrito en el apartado anterior para la secreción pulsátil de GH. En este caso se estudia la respuesta de GH a estímulos tales como GHRH y ghrelin.

Después de heparinizar la ratas se realizan dos extracciones que se consideran basales, luego se procede a la administración de los estímulos (tiempo cero) y a partir de ese momento se extraen las muestras problemas a unos tiempos determinados; en concreto a los 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos tras la administración del estímulo.

❖ **PROTOCOLO DE RESPUESTA:**

HEPARINIZACIÓN



V. MÉTODOS ANALÍTICOS.

1. RADIOINMUNOENSAYO:

1.1 RÍA de GH

El RIA (radioinmunoanálisis) se utiliza para determinar la concentración de GH en las muestras de plasma que se han obtenido en los distintos experimentos *in vivo*. Esta técnica se lleva a cabo por el método del doble anticuerpo; para separar la fracción libre de la ligada se utiliza PEG (Polietilenglicol). Para la cuantificación de la hormona se aprovecha la propiedad que presentan las moléculas de esta para competir con otras moléculas de la misma hormona que llevan unido un isótopo radiactivo, que es en este caso I^{125} y que se denomina **hormona marcada o trazador**; a las moléculas de hormona que nosotros queremos medir se las denomina **hormona fría**. Se van a formar dos tipos de complejos antígeno-anticuerpo como consecuencia de la competición entre los dos tipos de hormonas, por un lado se forma el complejo hormona fría-anticuerpo y por otro lado la hormona marcada-anticuerpo. Se mide en un contador de radiación gamma la radiactividad del complejo constituido por la hormona marcada y esta radiactividad será inversamente proporcional a la cantidad de hormona fría en la mezcla de reacción.

Para la homologación de los resultados se usa como estándar GHRP-2 del NHPP.

1.1.1 Marcaje de GH con I^{125}

Se utiliza como isótopo I^{125} (Perkim-Elmer (IMS-30)). La técnica que se utiliza para el marcaje de la hormona es el llamado método de la Cloramina T, que consiste en incorporar el I^{125} a los restos de Tirosina de la cadena peptídica, con alta resolución y especificidad, siendo este el método más rápido y efectivo de todos los conocidos.

Justo antes de empezar con el marcaje se disuelven en 10 ml de tampón fosfato 0.05 M la **Cloramina T** (10 mg) y el **Metabisulfito** (10 mg). En ambos

casos se mantiene la disolución en botes tapados con albal para evitar que se degraden por oxidación dada su alta sensibilidad a la luz.

Se parte de una alícuota inicial de GH (GH-RP-2, NHPP) de 5 μg que previamente se había disuelto en 25 μl de NaHCO_3 .

A esta alícuota se le añade:

- 50 μl de Tampón fosfato 0.5 M
- 1 mCi de I^{125} (10 μl)
- 20 μl de Cloramina T (incorpora el I^{125} a la GH)

↓ 25 segundos

- 50 μl de Metabisulfito. Para detener la reacción.

Para separar la hormona marcada del I^{125} que no ha sido incorporado se utiliza la cromatografía de exclusión, pasando a través de una columna de Sephadex G-50, la disolución con la hormona; como eluyente se utiliza tampón barbital (0.05 M).

Antes de proceder a la separación de GH marcada del resto de I^{125} que no se une se pasa por la columna BSA (0.2%) para ocupar los lugares de unión inespecífica.

Mediante un colector específico, y sobre tubos con 200 μl de PBS-BSA, se recogen aproximadamente 30-40 fracciones de 1ml.

Posteriormente se mide la radiactividad, en un contador gamma, 10 μl de cada fracción. Esto permite determinar las fracciones en las que se encuentra la hormona marcada. (Primero sale el pico de la hormona marcada y a continuación el del I^{125})

Del pico de la hormona se seleccionan entre 6-10 fracciones que presenten la mayor actividad. En ellas se determina el porcentaje de unión específica al primer anticuerpo mediante la siguiente fórmula, y se seleccionan las que posea un porcentaje de unión superior al 30%.

(B-N / T)*100 siendo: B = unión específica al anticuerpo.

N = unión inespecífica.

T = actividad total.

1.1.2 Construcción de la curva estándar.

A partir de un estándar previamente disuelto en 1 ml de PBS-BSA, se hacen diluciones seriadas, 1:2, y se construye una curva formada por 10 tubos o patrones, que se corresponden con las siguientes concentraciones: 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 ng/ml. Estas diluciones se hacen siempre en PBS-BSA.

Para conseguir las mismas condiciones químicas en las que se realiza la reacción competitiva entre antígeno y anticuerpo, se añade a cada tubo de la curva estándar un volumen de suero de rata hipofisectomizada (SRH), en el caso de experimentos *in vivo*.

Todas las muestras, tanto de la curva como problema, se procesan por duplicado.

1.1.3 Protocolo de ensayo.

	SRH	Plasma	PBS	1°Ab	GH*	2°Ab	PEG
T					100 µl		1ml
NSB	20 µl		400 µl		100 µl	100 µl	1ml
Bo	20 µl		200 µl	200 µl	100 µl	100 µl	1ml
STD	20 µl		200 µl	200 µl	100 µl	100 µl	1ml
Muestras		20 µl	200 µl	200 µl	100 µl	100 µl	1ml

Tabla 2: protocolo del RIA de GH

Se realiza la curva estándar, como se explicó anteriormente, y se pipetea 20µl de todas las muestras problema por duplicado con pipeta de arrastre (se cambia la punta cada 100 tubos aproximadamente).

Se añade según corresponda (ver tabla) PBS-BSA, el primer anticuerpo y se mezcla por agitación. Se realiza una preincubación de los tubos con el primer anticuerpo de 12 horas a T^o ambiente.

Pasado este tiempo se añade la hormona marcada radiactivamente, se vuelve a agitar y se deja incubar otras 24 horas.

Posteriormente se pipeta el segundo anticuerpo y se realiza otra incubación de 12 horas.

Finalmente se añade el agente precipitante (PRG), se centrifugan los tubos a 3500 rpm durante 30 minutos a 4° C, se aspira el sobrenadante y se lee la radiactividad del precipitado en un contador gamma (Wizard 1470, Wallac) conectado a un ordenador que, utilizando el programa RIAcalc-LKB, construye la curva estándar y calcula automáticamente los valores de GH en cada una de las muestras problema.

1.2 RIA de ghrelin

Los niveles circulantes de ghrelin se determinan mediante la utilización de un radioinmunoensayo (RIA). Los reactivos que se necesitan formaban parte de un kit comercial para ghrelin total de rata (*Linco Research*).

Reactivos:

- Hormona estándar (hormona fría): ghrelin total
- Curva estándar: 96.1, 192.2, 384.75, 768.75, 1537.5, 3075 y 6150 pg/ml.
- Hormona marcada: ghrelin total- I¹²⁵ (1.5 µCi).
- Primer Anticuerpo: anti- ghrelin obtenido de conejo
- Tampón de ensayo: 0.01M Tampón fosfato, 0.01M EDTA, 0.08% Azida sódica and 0.1% *Gelatin*, pH 8.5.
- Agente Precipitante: suero anti-conejo Ig-G (cabra), 3% PEG, 0.05% Triton X-100 en 0.05M fosfosalino, 0.025M EDTA, 0.08% Azida sódica.

Se cogen 100µl muestra (duplicado), luego se añade el primer anticuerpo (incubación 20-24 horas a 4°C). Al día siguiente se echa la hormona marcada a todos los tubos (100µl) y de nuevo incubación 20-24 horas a 4°C. Al 3^{er} día se añade el PEG (1ml) a todos los tubos excepto totales. Incubación 20 minutos a 4°C. Pasado este tiempo se centrifuga durante 25 minutos a 3600 rpm y 4°C. Después de decantar, la radiactividad del precipitado se mide con un contador y (*Wizard 1470, Wallac*). El contador se conecta a un ordenador, que mediante el programa *RIAcalc-LBK* calcula automáticamente las concentraciones de ghrelin.

TUBO	BUFFER	ST/MUESTRA	Ghrelin AB	Ghrelin-I125	PEG
1,2		Cuentas totales		100 µl	1 ml
3,4	300 µl	Uniones no específicas		100 µl	1 ml
5,6	200 µl	Uniones totales	100 µl	100 µl	1 ml
7,8	100 µl	ST 96.1 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
9,1	100 µl	ST 192.2 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
11,12	100 µl	ST 384.375 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
13,14	100 µl	ST 768.75 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
15,16	100 µl	ST 1537.5 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
17,18	100 µl	ST 3075 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
19,2	100 µl	ST 6150 pg/ml	100 µl	100 µl	1 ml
21,22	100 µl	100 µl Control calidad 1	100 µl	100 µl	1 ml
23,24	100 µl	100 µl Control calidad 2	100 µl	100 µl	1 ml
25,26 etc	100 µl	100 µl Muestra	100 µl	100 µl	1 ml

Tabla 3: Protocolo del RIA de ghrelin

2. WESTERN BLOT (WB):

El análisis mediante WB de las distintas proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos se realiza en base a protocolos estandarizados por nuestro grupo de investigación.

a) Extracción de proteínas totales:

Se realiza todo el proceso en hielo para evitar que las proteínas se degraden.

- Las muestras de tejido se homogenizan mecánicamente hasta que estén completamente disgregadas.
- Se añade tampón de lisis en proporción al tejido (1:5 peso:volumen).

**** Tampón de lisis (500ml):** 3.0285 ml TRIS-HCl pH=7.5, 5 ml Triton X-100 v/v, 0.185 ml EDTA, 0,19 ml EGTA, 0.092 ml Ortovanadato sódico, 1.0495 ml Fluoruro Sódico, 1.115 ml Pirofosfato Sódico, y 42.75 Sacarosa.

Esta solución se conserva a 4° C y en el momento de su uso se le añaden los inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics): 1 pastilla de cóctel de inhibidores/5ml tampón de lisis.

Después de añadir los inhibidores de proteasas se añade β -mercaptoetanol.

Así en cada ml de Tampón de lisis: 900 μ l Tampón de lisis, 100 μ l inhibidores y 10 μ l β -mercaptoetanol.

- Se centrifuga a 13500 rpm a 4°C durante 30 minutos. En el sobrenadante se determina la concentración de proteína (método colorimétrico Bradford) mediante el reactivo Bio-Rad Protein Assay Kit, (Bio-Rad Laboratorios, Inc., Richmond, CA).
- Después se guarda la muestra a -80°C, hasta que se vayan a usar.
- En el momento en que se utilicen las muestras se añade el tampón de carga y tampón de lisis, y se calientan a 95°C durante 10 minutos.

b) Electroforesis y Transferencia

- La separación por peso de las proteínas se realiza por electroforesis en geles SDS-PAGE, compuesto por dos fases: fase superior o *stacking* (permite homogeneizar la entrada de las proteínas en el gel separador), y la fase inferior o separadora (permite la separación de las proteínas exclusivamente en función del tamaño). El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del tamaño de las proteínas a estudiar.

**** Gel 6%:** 7 ml H₂O d 13.5 ml Tampón A (90.1 g Tris-HCl, 2g SDS, 1 l H₂O d; pH=8.8), 5.4 ml Acrilamida, 75 µl TEMED y 150 µl APS.

**** Gel 8%:** 5.2 ml H₂O d, 13,5 ml Tampón A, 7.2 ml Acrilamida, 75 µl TEMED y 150 µl APS

La cantidad total de proteína cargada: 40 µg de hipotálamo, 20 µg de hígado o 15 µg en el caso del tejido adiposo.

Para determinar el peso de las proteínas y confirmar la transferencia de las muestras se utiliza un marcador comercial (Precision plus protein Standard, Bio-RAD)

Para cargar el gel, la proteína se lleva a un volumen de 16 µl con tampón de lisis, y se le añade tampón de carga 5X (el tampón de carga debe de quedar en la muestra a 1X).

**** Tampón de carga 5X (25 ml):** 12,5 ml glicerol, 1,25 ml β-mercaptoetanol, 2,5 g SDS, 0.125 ml azul de bromofenol y 6,25 ml Tris-HCl pH 6.8.

- La electroforesis se realiza durante 60-75 minutos bajo las siguientes condiciones: Voltaje constante 130 V y Amperaje 180 mA.

**** Tampón de electroforesis 5X (1 l):** 72 g Glicina, 15 g Tris base y 5 SDS. Para pasar a 1X: 100 ml de tampón de electroforesis 5X en un volumen final de 500 ml.

- La transferencia (Transferencia Semiseca) se realiza sobre membrana de PVDF (Millipore), que debe ser activada previamente (5 minutos en Etanol, 2 minutos en H₂O d y 2 minutos en Tampón de Transferencia).

**** Tampón de transferencia 25X (500 ml):** 72.5 g Tris base, 36.5 g Glicina y 4.5 g de SDS. Para pasar a 1X: 40 ml del tampón de transferencia 25X, 200 ml de Metanol en un volumen final de 1 L de H₂O d.

Duración trasferencia: 90 minutos a 25 V y 180 mA.

- Finalizada la Transferencia se bloquea la membrana con exceso de proteína (BSA 3%) durante 60 minutos de agitación a temperatura ambiente.

c) **Inmunodetección**

- Se lava la membrana con solución de lavado TBS-TWEEN 0.1 % (24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl y 1 ml Tween 20® en un volumen final de 1L, a un pH=7.6) durante unos 30 minutos.
- Se incuba con el Anticuerpo primario toda la noche a 4°C ó 2 horas a Tª ambiente en solución de bloqueo (TBS-TWEEN al 0.1% + 3% BSA) en agitación.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.
- Se incuba 1 hora a Tª ambiente con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.
- Se incuba la membrana durante 1-2 minutos con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia a volúmenes iguales (1ml de cada), en oscuridad y sin agitación.

** Para detectar la proteína usamos anticuerpo secundario conjugado con HRP y quimioluminiscencia.

** Sustrato de Quimioluminiscencia: Pierce® ECL Wb substrate (Thermo scientific)

Cuando el anticuerpo secundario se incuba con el sustrato y el potenciador se emite una reacción luminosa que permite la visualización, mediante autorradiografía, de la interacción de los anticuerpos con la proteína de la muestra.

- Se coloca la membrana en un cassette de autorradiografía con películas fotográficas (*Amersham, Hiperfilm M RPN 6K*) y se revelan las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

ANTICUERPO Primario	DILUCIÓN	Casa Comercial	ANTICUERPO Secundario	DILUCIÓN	Casa Comercial
ACC	1:500	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pACC	1:2000	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
AMPKa1	1:1000	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pAMPK	1:2000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
FAS	1:1000	Santa Cruz	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
CPT1-M	1:500	Santa Cruz	anti-conejo	1:7000	Dako cytomation
β -Actina	1:5000	Sigma Aldrich	anti-ratón	1:5000	Dako cytomation

Tabla 4: Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados y sus correspondientes diluciones.

- Para rehibridar la membrana con otros anticuerpos es necesario incubarla en solución de "stripping" durante 30 minutos a 50°C. Así se consigue despegar el anticuerpo de la membrana.

**** Solución de "stripping":** 6.25 ml Tris-HCl pH 6.8, 20 ml SDS, 710 μ l β -mercaptoetanol. Completar con H₂O hasta un volumen final de 100 ml.

A continuación se lava con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos) y se procede a bloquear de nuevo la membrana.

Para conservar la membrana para futuros experimentos se lava en PBS, se seca al aire sobre un papel de filtro y se guarda.

3. RT-PCR:

I. EXTRACCION DE RNA TOTAL

a) Extracción de RNA de los tejidos

Las muestras congeladas fueron homogenizadas mecánicamente (Polytron) después de añadirle una cantidad determinada de Trizol (Invitrogen): 400 μ l en el caso del hígado, y 500 μ l en el caso de la grasa.

Después de la homogeneización la muestra se dejan reposar a T^a ambiente durante unos 5 minutos.

b) Aislamiento de RNA

A continuación se añade 1 ml de cloroformo y se agita fuertemente durante varios segundos, y luego se dejan reposar durante unos minutos.

Transcurrido ese tiempo se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a 4°C observando ya claramente las 2 fases: una fase acuosa (donde se halla el RNA) y una fase fenólica (que contiene las proteínas y los lípidos), entre ambas se encuentra la interfase (donde está el DNA).

Se retira la fase acuosa con cuidado pasándola a otro tubo de polipropileno autoclavado y se desprecia la fase fenólica. De esa manera separamos el RNA del resto de los componentes celulares.

c) Precipitación de RNA

Una vez separado el RNA, se le añade 1 ml de isopropanol, se agita y se mete a -20°C durante unos 10 minutos, consiguiendo así que el RNA precipite. Transcurrido este tiempo se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm a 4°C para concentrar el RNA al fondo.

d) Lavado

Una vez eliminado el sobrenadante se añade 1 ml de etanol al 70% en H₂O-DEPC, y tras una agitación corta se centrifuga durante unos 5 minutos a 12000 rpm y 4°C.

Para eliminar la mayor cantidad de etanol posible, se vuelve a centrifugar 1 minuto a 13500 rpm y 4°C, y posteriormente se retira el sobrenadante con una pipeta.

Finalmente se resuspende en H₂O DEPC calentándolo a 60 °C durante 15 minutos.

e) Cuantificación

La concentración de ARN de la muestra se determinaba en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorción a 260 nm proporciona la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinaba estudiando el cociente 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1.8 y 2.

** TRIZOL® Reagent (Invitrogen)

** Cloroformo

** Isopropanol

** Etanol 70%

** H₂O DEPC: agua bidestilada con dietilpirocarbonato al 0.1%. Tras una noche a T^a ambiente se autoclave.

II. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo en un volumen total de 30 µl, con las siguientes proporciones:

- Volumen de muestra necesario para obtener: 500 ng de (grasa) ó 100 ng (hígado) de RNA total
- 6 µl de tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer; Invitrogen)(250 nM Tris-HCl, pH 8.3, 375nM KCl, 15mM MgCl₂, 50nM DDT)
- 1.5 µl ClMg₂ de 50 mM (Invitrogen)
- 6 µl de mezcla de dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp, con una concentración de 10 mM de cada uno
- 0.17 µl de cebadores (Random primers, Invitrogen)
- 0.25 µl inhibidor de RNasa(*RNaseOUT*®, 40 U/ µl Invitrogen)
- 2 µl de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/ µl, Invitrogen)
- Volumen correspondiente de H₂O MQ para obtener el volumen final de 30 µl

También se realizó una RT- (30 μ l de mezcla de reacción excepto mMLV, cuyo volumen era sustituido por H₂O MQ)

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se incubaron en un termociclador, que realiza los siguientes pasos: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C, y finalmente las muestras se mantenían a 4°C.

III. PCR Tiempo (TAQMAN)

Se usa como sistema de detección las Sondas Taqman (Sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas.

El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580nm.

Los primers usados fueron diseñados según la base de datos BLAST.

La mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final era de 12 μ l estaba constituida por:

- 2.92 μ l H₂O-MQ
- 0.36 μ l Oligonucleótido sentido (10 μ M)
- 0.36 μ l Oligonucleótido antisentido (10 μ M)
- 0.36 μ l Sonda (5 μ M)
- 6 μ l Taqman Universal PCR master mix; (Applied Biosystems)
- 2 μ l Muestra (RT)

Además de las muestras, se añadió un control negativo (-RT), un blanco y 6 muestras para la realización de una curva patrón tanto para el gen problema como para el *housekeeping* o gen constitutivo, todo ello por duplicado.

** Curva patrón: consta de 6 puntos realizados por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40 μ l resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2 μ l de distintos productos de RT, pero siempre del mismo tratamiento o tejido).

Las condiciones de amplificación fueron de:

- 1) 50°C durante 2 minutos
- 2) 95°C durante 10 minutos,
- 3) 95 ° durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Número de ciclos: 40

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) mediante el programa informático 7300 System Software® (Applied Biosystems).

El análisis de los datos se realiza en base a un gen de referencia, en este caso el 18S, en concreto calculando la diferencia entre eficiencias de ambos genes: referencia y problema.

mRNA	Secuencia	
ACCα	Sonda	FAM-5'-ACCTTTGAAGATTCGTCAGGATCTTTGATGA-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT -3'
	Primer reverse	5'-AGTCGCAGAAGCAGCCATT-3'
FAS	Sonda	FAM-5'-CTGCCAGGACAGGAACCG-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-GACATTTATCAGGCCACC-3'
	Primer reverse	5'-CCTCTAGCAGCCGACCTC-3'
LPL	Sonda	FAM-5'-CCTGCCGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA-3'
	Primer reverse	5'-CCGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'
SCD-1	Sonda	FAM-5'-TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCACGCACGG-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-TGCCAGAGGGAATAGGGAAA-3'
	Primer reverse	5'-CTCTCCCATCCTTACTTACAAACCA-3'
MCD	Sonda	FAM-5'-TGGTCAAGGAGCTGCAGAAGGAGTTTCCT -3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-CGGCACCTTCCTCATAAAGC -3'
	Primer reverse	5'-TGGAAAAGGCCCCAGAT -3'
CPTM	Comercial	
INSIG	Sonda	FAM-5'-CGCTGTTGTCGGCTTATTGTATCCCTTGT -3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-TGCTGTGGCACGGCAG -3'
	Primer reverse	5'-CTCCAGGTGACTGTCA -3'
SREBP 1-c	Sonda	FAM-5'-CCCTGGCCTATTTGATGCC-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-CTCATCAACAACCAAGACAG-3'
	Primer reverse	5'-CCTGTCTCACCCCAAGCAT-3'
18S	Sonda	FAM-5'-GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA-3'-TAMRA
	Pimer forward	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
	Primer reverse	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

Tabla 5: Parejas de primers y sondas utilizadas en las distintas reacciones de PCR

4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

A) ACC

Para medir la actividad de ACC se utiliza un método isotópico mediante fijación de $^{14}\text{CO}_2$ a productos ácido-estables.

Para iniciar la reacción: en tubos de 2 ml con tapa, y a una temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$, se mezcla la muestra (30-50 μg de proteína) con el buffer de ensayo hasta un volumen final de 350 μl (50 μl de muestra y 300 μl de mezcla de reacción).

** Mezcla de reacción (concentración final): 50 mM-Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl_2 , 20 mM-citrato potásico, 0.3 mM-acetyl-CoA, 5 mM-glutation, 0.75 mg BSA/ml, 3 mM ATP y 10 mM [^{14}C] bicarbonato sódico (actividad específica ≥ 9.2 kBq/mM); ajustado a pH 7.4.

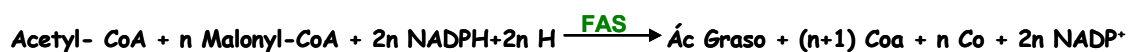
Los blancos se determinan igual, pero sin acetyl-CoA en la mezcla de reacción.

A los 10 minutos se detiene la reacción; para ello se añade 100 μl 5M-HCl, y se agita fuertemente. Las muestras acidificadas se ponen sobre hielo durante unos 15 minutos, y luego se centrifugan. Las muestras (300 μl) de la fracción de sobrenadante se transfieren a viales de centelleo, y se dejan toda la noche a $60\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras secas se disuelven en 400 μl de H_2O destilada y, justo antes de medir la radiactividad se añaden 4 ml de líquido de centelleo.

Las unidades de ACC, definidas como μmoles de sustrato transformado en producto/minuto a la temperatura de ensayo ($37\text{ }^\circ\text{C}$), se expresan por mg de proteína soluble (actividad específica).

B) FAS

- Principio de reacción



Medimos la desaparición de NADPH a 340 nm durante 5 minutos.

○ Medida:

** Tampón de medida: 20 mM K₂HPO₄ (pH 6.8), 40 mM KHPO₄, 1.3 ml NADPH, 0.61 mM Acetyl-Coa.

** Sustrato: 0.33 mM Malonyl-CoA, excepto en los controles.

Para realizar la medida, antes de añadir el sustrato, se incuba la muestra con solución de medida durante 10 minutos a 37°C. Después se añade 20 µl de Malonyl (la concentración dependerá del tejido) y se mide la desaparición de NADPH a 340 nm durante 5 minutos.

C) MCD

○ Principio de reacción y Medida:



El grupo tiol (SH) unido al CoA, que se obtiene tras la reacción de la Carnitina Acyltransferasa, se detecta a través del reactivo de Ellman (DNTB).

Medida cinética a 412 nm durante 5 minutos.

En un volumen final de 250 µl: 10 mM TRIS-HCl (pH 7.1), 0.2 mM DNTB, 1 mM L-Carnitina, 12 U/ml Carnitina Acetyltransferasa, 10 mM Malonyl-CoA (excepto en los blancos), y la muestra.

D) CPT-1

- Principio de reacción:



El CoA-SH que obtenemos se determina con el reactivo de Ellman (DTNB).

Medir 5 minutos a 412 nm. Los resultados se expresan como la cantidad de CoA-SH obtenido por unidad de tiempo y proteína.

- Medida:

En un volumen total de 240 µl: 60 mM TRIS-HCl (pH 8), 2.125 mM EDTA, 1.7 mM DTNB, 0,17% TRITÓN X-100, Muestra (20 µl; dilución 1:5).

Después de incubar 5 minutos a 30°C, añadimos los sustratos: 0.5 mM L-Carnitina y 0.5 mM Palmitoyl-CoA (excepto en los controles).

E) G6PDH y 6PGDH

- Principio de reacción:



** Mezcla de reacción (concentración final): 50 mM Tris (pH 8.1), 0.2 mM NADP⁺ y 1mM MgCl₂

** Sustrato: glucosa 6 fosfato (0.5mM) y 6 fosfogluconato (0.5mM)

La actividad enzimática se determina, durante 5 minutos a 340 nm, midiendo la tasa de conversión de NADP⁺ a NADPH.

G6PDH cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona que es rápidamente hidrolizado a 6-fosfogluconato por 6PGDH. En ambas reacciones se transforma NADP⁺ a NADPH, produciendo así un aumento de la absorbancia que no será exclusivo de la actividad de G6PDH, sino una suma de la actividad de ambas

enzimas; por ello la actividad de la G6PDH no puede ser medida directamente tras añadir su sustrato (glucosa-6-fosfato) a la reacción. Para obtener la actividad enzimática exacta de ambas enzimas se mide en conjunto la actividad deshidrogenasa total (G6PDH + 6PGDH) añadiendo en una única reacción el sustrato de ambas enzimas, y la actividad de la 6PGDH sola en otra reacción que únicamente llevará el sustrato de esta enzima. La actividad de G6PDH se calcula restando la actividad de 6PGDH de la actividad deshidrogenasa total.

En todos los casos las reacciones se realizan sobre una microplaca estéril de fondo plano, y luego se leen en un lector de placa Tecan tipo *Sunrise* (Charles River Laboratorios)

5. Determinación Malonyl-Coa.

La determinación de Malonyl-CoA se lleva a cabo mediante un método radioenzimático. (Realizado por A.K. Saha .Diabetes Research Unit, EBRC-827, Boston Medical Center, Boston, MA, USA)

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se expresaron como Media \pm SEM.

- Los datos de ingesta y peso se analizan mediante un test no-paramétrico Mann-Whitney, tomando como grado de significación $p < 0.05$
- En el caso de las pulsatilidades y respuestas de GH se determinan los parámetros característicos para cada grupo mediante la utilización del programa ULTRA, y los análisis estadísticos se analizan con el test no-paramétrico Mann-Whitney, estableciéndose el grado de significación en $p < 0.05$.
- Los datos de mRNA, proteína y actividad enzimática obtenidos se analizan mediante ANOVA y test *post hoc* Tukey, estableciéndose el grado de significación en $p < 0.05$.

RESULTADOS

I. EFECTO DE DISTINTOS PÉPTIDOS DERIVADOS DEL GEN *ghrelin* SOBRE INGESTA Y LA SECRECIÓN DE GH.

A) Efecto de la administración icv de distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* sobre la ingesta.

El péptido ghrelin es el único de los conocidos que, siendo producido por el estómago, provoca sensación de hambre y aumento de la ingesta (268). Dado el característico papel orexigénico de ghrelin a nivel central nos planteamos si el resto de péptidos que se obtienen del mismo gen por distintos procesamientos causan o no el mismo efecto. En concreto, analizamos el efecto sobre la ingesta de la administración icv de: ghrelin deleccionado en el exón 4 (GHR-d4), ghrelin desacilado (UAG), obestatina y el propio ghrelin.

Para llevar a cabo este estudio administramos los distintos péptidos a ratas macho *Sprague-Dawley*. En todos los casos, los animales se canulan icv siguiendo el protocolo descrito con anterioridad. (Ver materiales y métodos)

El experimento se inicia a las 10:00 de la mañana con la administración icv correspondiente, tras la cual se pone a cada rata una cantidad de comida determinada. A continuación se lleva a cabo un seguimiento de la ingesta a unos tiempos concretos (1.5, 3, 6, 12 y 24 horas).

Se repite el mismo protocolo los sucesivos días que dura el experimento, y se hace un seguimiento del peso de los animales para comprobar que estos evolucionan correctamente.

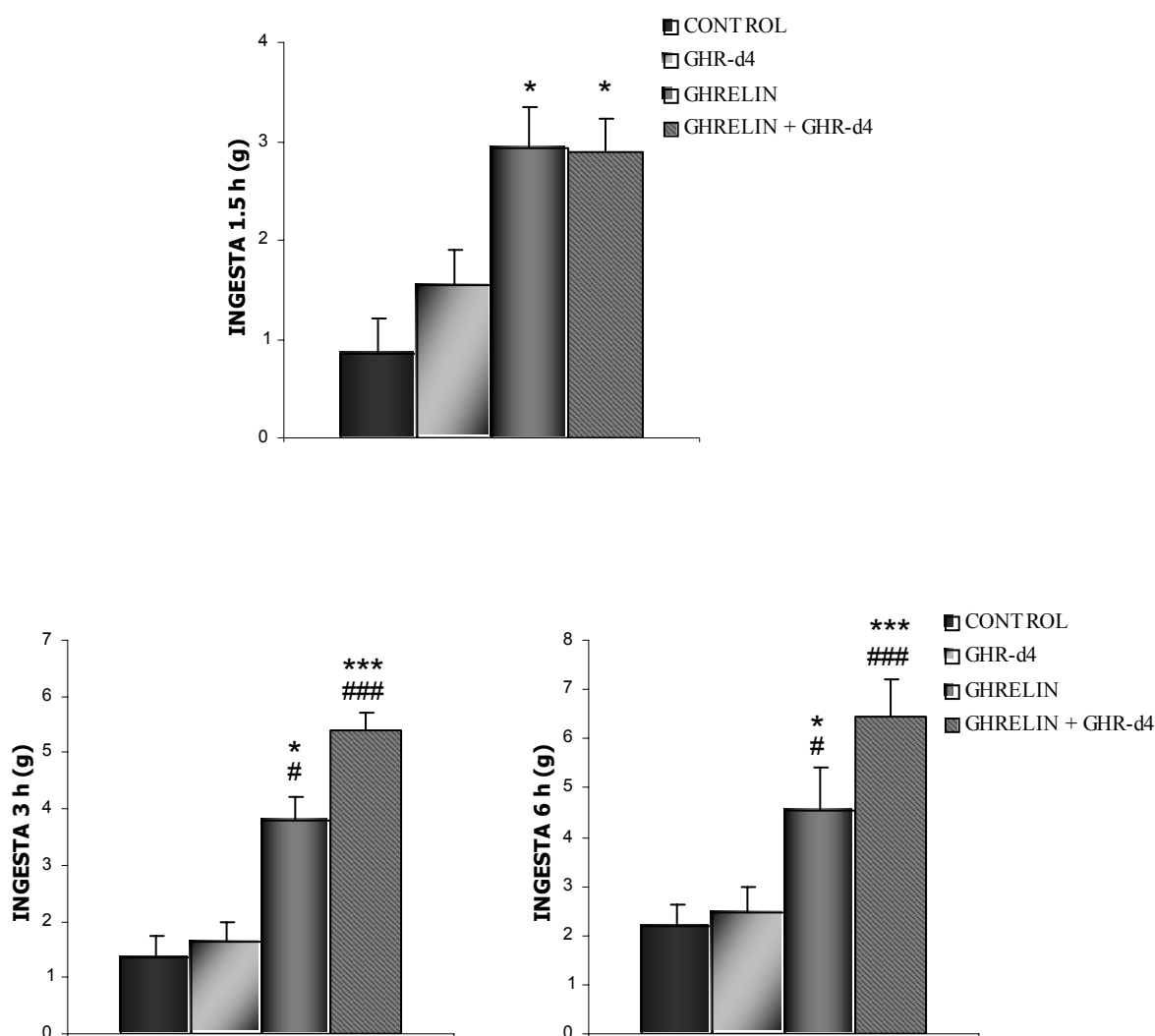
1.1.1 Administración icv de ghrelin y ghrelin deleccionado en el exón 4 (GHR-d4).

Para ver el efecto que causa el GHR-d4 a nivel central sobre la ingesta partimos de ratas canuladas icv distribuidas en cuatro grupos experimentales:

- Control: Salino 5 μ l + Salino 5 μ l
- GHR-d4: GHR-d4 (5 μ g /5 μ l) + Salino 5 μ l
- Ghrelin: Salino 5 μ l + Ghrelin (5 μ g/5 μ l)
- GHR-d4 (5 μ g /5 μ l) + Ghrelin (5 μ g/5 μ l)

Podemos comprobar que la administración icv de GHR-d4 no causa ningún efecto sobre la ingesta, ya que no encontramos diferencias estadísticamente significativas con el grupo control a ninguna de las horas estudiadas (1.5, 3, 6, 12 y 24 horas). Comprobamos, además, que no modifica el efecto orexigénico de ghrelin puesto que la administración conjunta de ghrelin y GHR-d4 provoca el aumento característico en la ingesta causado por ghrelin, que es estadísticamente significativo respecto del grupo control y también del grupo de animales tratados con GHR-d4. A las 24 horas de la administración no hay diferencias en la ingesta acumulada entre los distintos grupos experimentales.

Estos resultados se repiten a lo largo de los 5 días que dura el experimento.



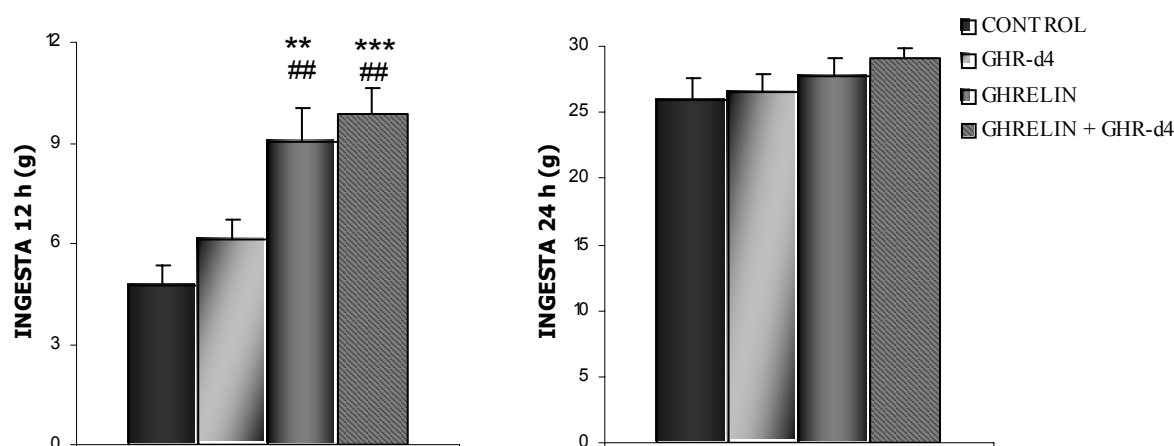


Figura 1: Ingesta acumulada a las 1,5, 3, 6, 12 y 24 horas después de la administración icv del tratamiento en los distintos grupos experimentales; control (5 μ l + 5 μ l salino), GHR-d4 (5 μ g/5 μ l) + salino 5 μ l, salino 5 μ l + ghrelin (5 μ g/5 μ l), y GHR-d4 (5 μ g/5 μ l) + ghrelin (5 μ g/5 μ l). Día 1
 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$; siendo * vs Control y # vs GHR-d4.

1.1.2 Administración icv de ghrelin y ghrelin desacilado (UAG).

Para ver el efecto que causa el ghrelin desacilado (UAG) a nivel central sobre la ingesta partimos de ratas canuladas icv distribuidas en cuatro grupos experimentales:

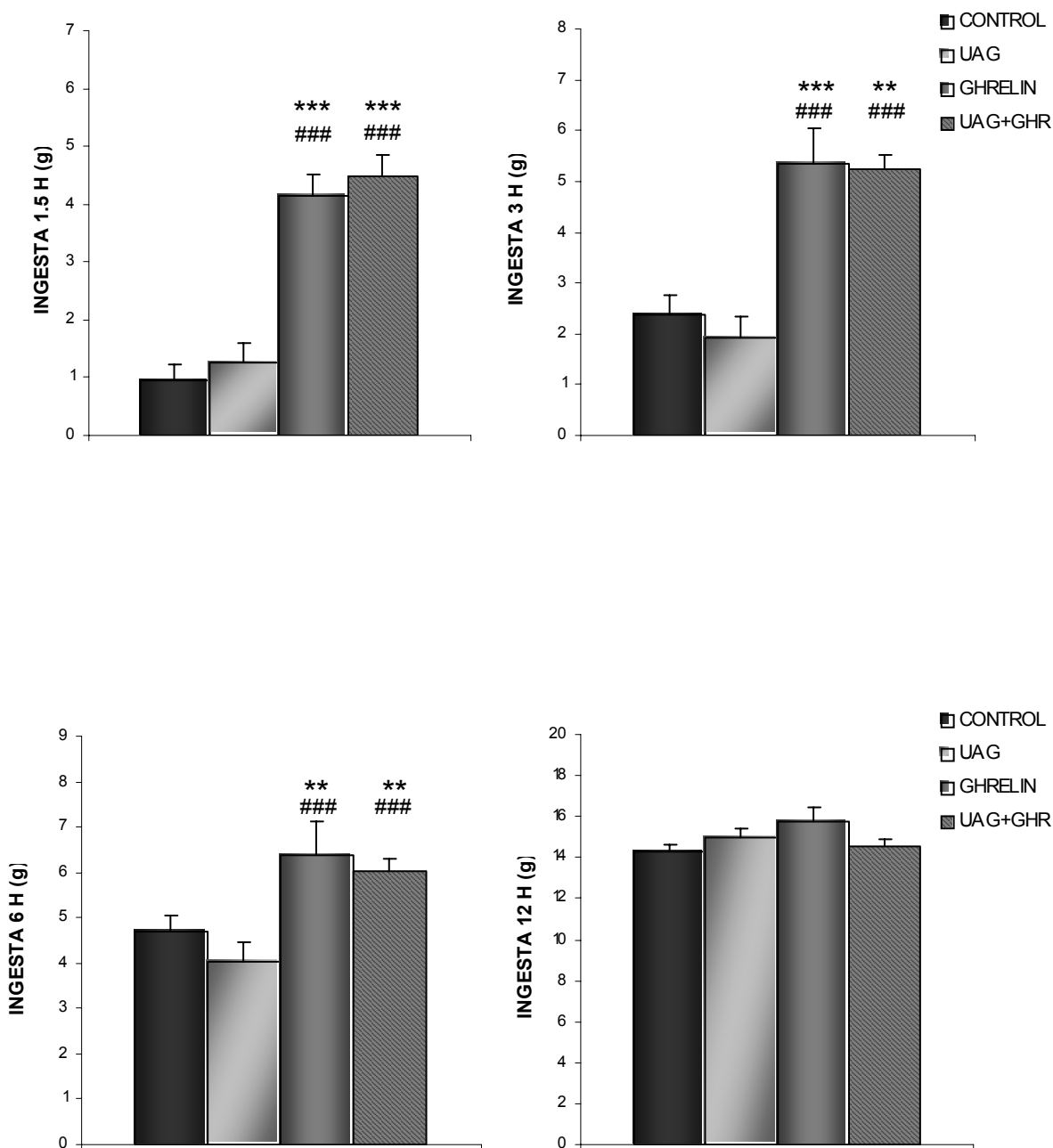
- Salino 5 μ l + Salino 5 μ l (Control)
- Salino 5 μ l + UAG (5 μ g/5 μ l)
- Ghrelin (5 μ g/5 μ l) + Salino 5 μ l
- Ghrelin (5 μ g/5 μ l) + UAG (5 μ g /5 μ l)

Podemos comprobar que la administración icv de UAG no causa ningún efecto sobre la ingesta ni modifica el efecto orexigénico de ghrelin.

Así, tras la administración de UAG no encontramos diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control, a ninguna de las horas estudiadas (1,5, 3, 6, 12 y 24 horas). Comprobamos, además, que no modifica el efecto orexigénico de ghrelin puesto que la administración conjunta de ghrelin y UAG provoca el aumento

característico en la ingesta causado por ghrelin, que es estadísticamente significativo respecto del grupo control y también del grupo de animales tratados con UAG.

Como era de esperar, la administración aguda de ghrelin causa efecto orexigénico a corto plazo ya que las diferencias se observan durante las primeras 6 horas, a partir de las cuales, la ingesta entre los distintos grupos se compensa llegando a ser prácticamente iguales a las 24 horas.



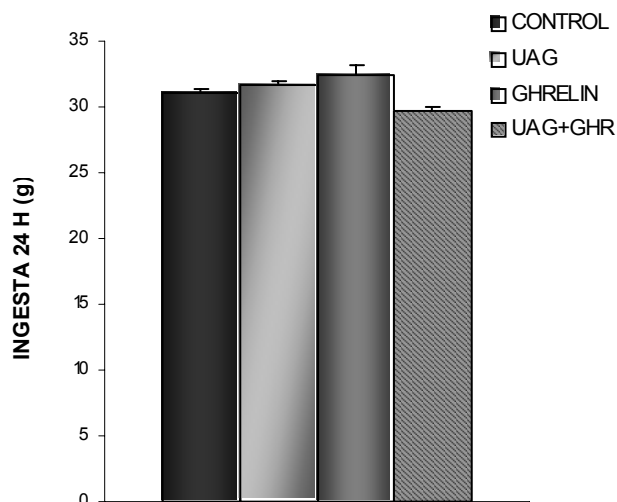
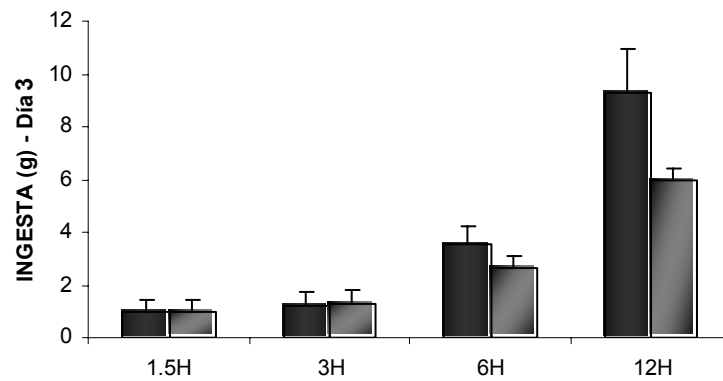
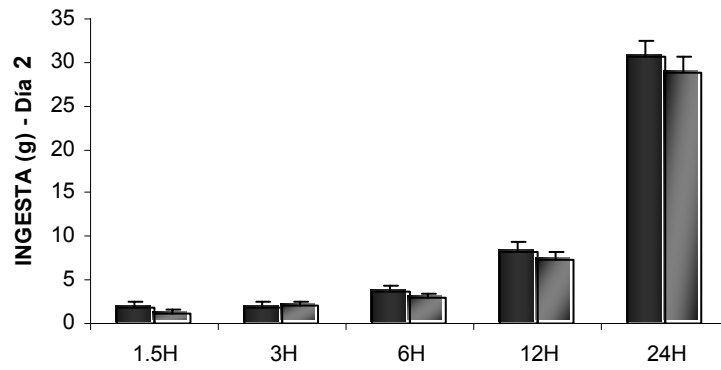
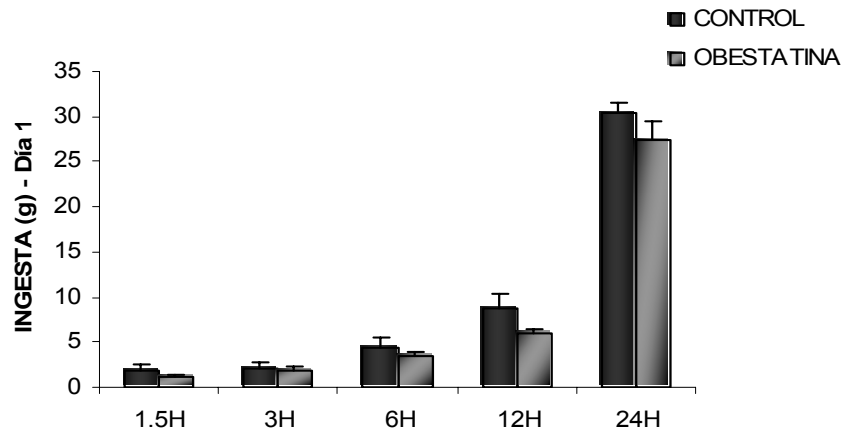


Figura 2: Ingesta acumulada (gramos) a las 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas después de la administración icv de ghrelin (5 μ g/5 μ l) + salino (5 μ l), ghrelin (5 μ g/5 μ l) + UAG (5 μ g/5 μ l), salino (5 μ l) + UAG (5 μ g/5 μ l) y Control (salino (5 μ l) + salino (5 μ l)).
 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$; siendo * *vs* Control y # *vs* UAG

1.1.3 Administración icv de obestatina.

Para comprobar si la obestatina administrada a nivel central causa algún efecto sobre la ingesta, partimos de dos grupos experimentales: ratas tratadas con obestatina (5 μ g/ 10 μ l) y ratas tratadas con 10 μ l de salino que usamos como control. A partir del día 2 de experimento los animales son sometidos a ayuno nocturno con el objetivo de asegurarnos de que todos parten con las mismas condiciones en el momento de administrar el tratamiento, y poder así descartar que la ausencia de efecto observada los dos primeros días de tratamiento se deba a diferencias en la cantidad de comida ingerida durante la noche.

Podemos comprobar como la obestatina administrada a nivel central no causa ningún efecto sobre la ingesta. Así, a ninguna de las distintas horas estudiadas de ninguno de los 5 días que dura el experimento, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la ingesta de los animales tratados con obestatina respecto de los usados como control.



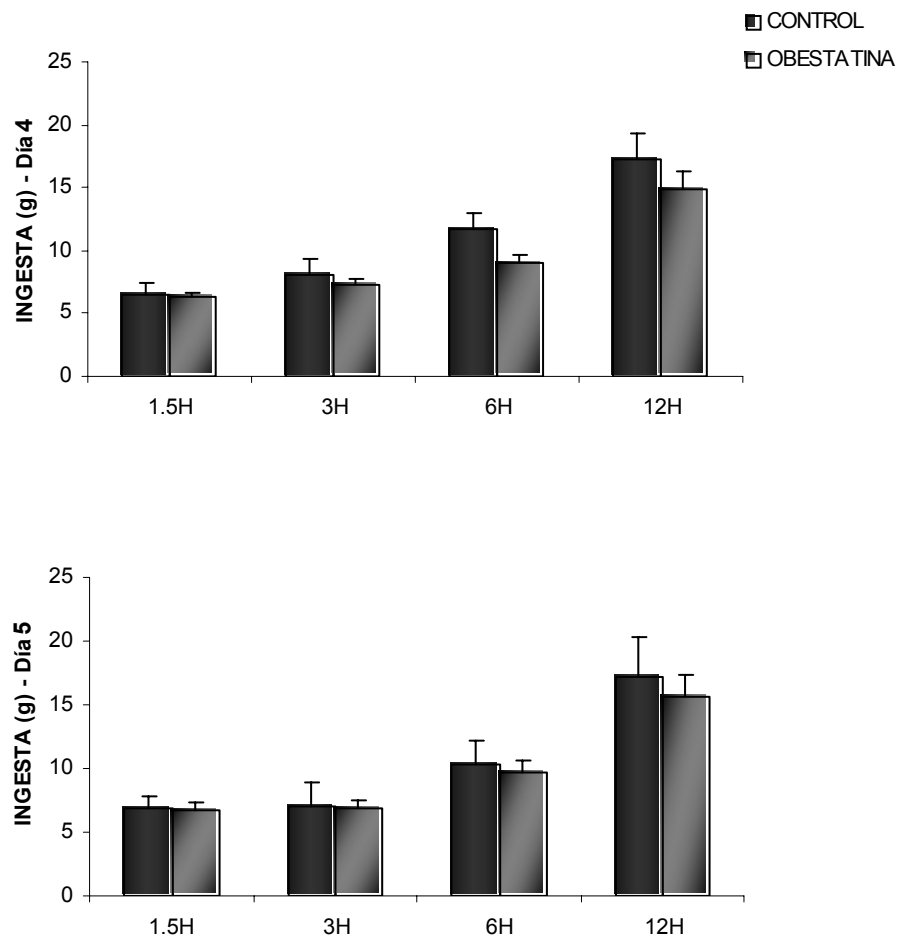


Figura 3: Ingesta acumulada a las 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas (días 1 y 2) tras la administración icv de obestatina (5 μ g/ 10 μ l) o VH (10 μ l Salino) durante los 5 días que dura el experimento.

B) Efecto de la administración iv de distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* sobre la secreción de GH.

Una de las funciones fisiológicas que caracterizan al péptido ghrelin es la de actuar como secretagogo de GH a través del receptor GHS-R1a, con un efecto superior al ejercido por GHRH, tal y como se ha comprobado con experimentos *in vivo* (91).

Nos planteamos si los distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* poseen algún efecto sobre la secreción espontánea de GH y la respuesta a ghrelin. Para ello contamos con ratas macho *Sprague-Dawley* que son sometidas a canulación intravenosa, como se ha descrito previamente. (Ver materiales y métodos)

Los distintos grupos se van completando en sucesivos días de experimento, en los que se alternan animales de todos los grupos hasta completar un $n = 7$.

➤ **Estudio del efecto de la administración iv de los distintos péptidos derivados del gen *ghrelin* sobre la respuesta de GH.**

1.2.1 Efecto de la administración iv de *ghrelin* delecionado en exón 4 (GHR-d4) sobre la respuesta de GH.

Para la realización de este estudio se sigue el protocolo típico de respuesta (91), y se administra, según el grupo correspondiente:

- GHR-d4 (10 μ g/ 200 μ l)
- GHR-d4 (10 μ g) + Ghrelin (10 μ g)/ 200 μ l
- Ghrelin (10 μ g/ 200 μ l)

Podemos comprobar como la administración iv de ghrelin provoca un esperado aumento en los niveles plasmáticos de GH, produciéndose la Respuesta Máxima a los 10 minutos (88.08 ± 22.16 ng/ml). Mientras que la administración intravenosa de GHR-d4 no causa ningún efecto sobre los niveles de GH, así como tampoco modifica la respuesta de GH a ghrelin ya que la administración conjunta de

ambos péptidos no se diferencia de modo estadísticamente significativo respecto del grupo tratado con ghrelin en ninguno de los tres parámetros estudiados: AUC (Área Bajo la Curva), Respuesta Máxima y Media. (Datos recogidos en la Figura 4; Tabla 1)

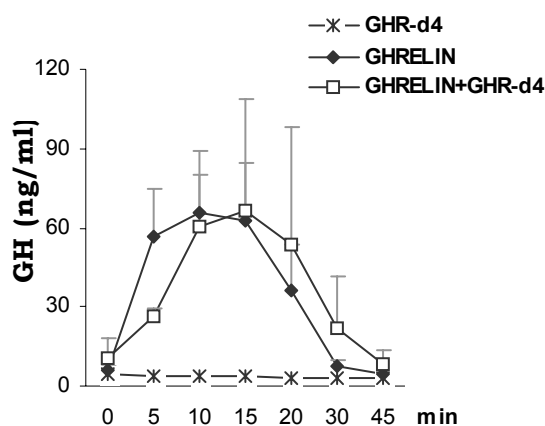


Figura 4: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media \pm SEM después de la administración iv de GHR-d4, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

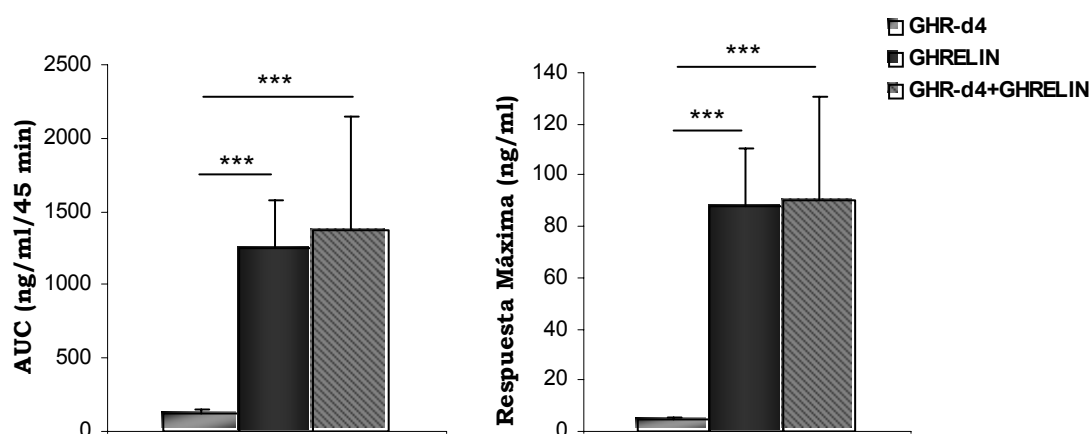


Figura 4: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH plasmáticos (ng/ml) obtenidos tras la administración iv de GHR-d4, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

*p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
GHR-d4	128.62±18.00	3.08±0.39	4.92±0.62
GHR-d4 +GHRELIN	1376.33±768.8	39.47±20.76	90.53±40.35
GHRELIN	1251.25±327.12	38.91±10.46	88.08±22.16

Tabla 1: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y GHR-d4. Los resultados están expresados en media ± SEM.

1.2.2 Efecto de la administración iv de ghrelin deleccionado en exón 3 (GHR-d3) sobre la respuesta de GH.

Para comprobar si el GHR-d3 posee algún efecto sobre la secreción de GH o bien si modifica la respuesta de GH a ghrelin, administramos a nivel iv:

- GHR-d3 (10 µg/ 200 µl)
- GHR-d3 (10 µg) + Ghrelin (10 µg)/ 200 µl
- Ghrelin (10 µg/ 200 µl)

Siguiendo el protocolo de respuesta, y analizando los parámetros característicos de esta, podemos comprobar como el ghrelin administrado vía intravenosa causa un característico aumento en los niveles de GH, alcanzando la Respuesta Máxima a los 10 minutos (88.08 ± 22.16 ng/ ml). Mientras que la administración iv de GHR-d3 no causa ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de GH ni modifica la respuesta de GH a ghrelin ya que en términos de AUC, Respuesta Máxima y Media no se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con ghrelin y el grupo de animales tratados con ambos péptidos.

(Figura 5, y Tabla 2)

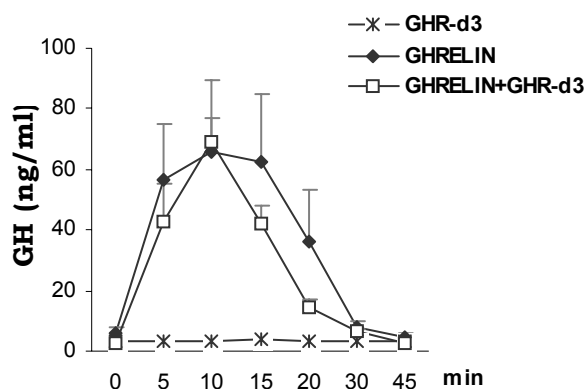


Figura 5: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media \pm SEM después de la administración iv de GHR-d3, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

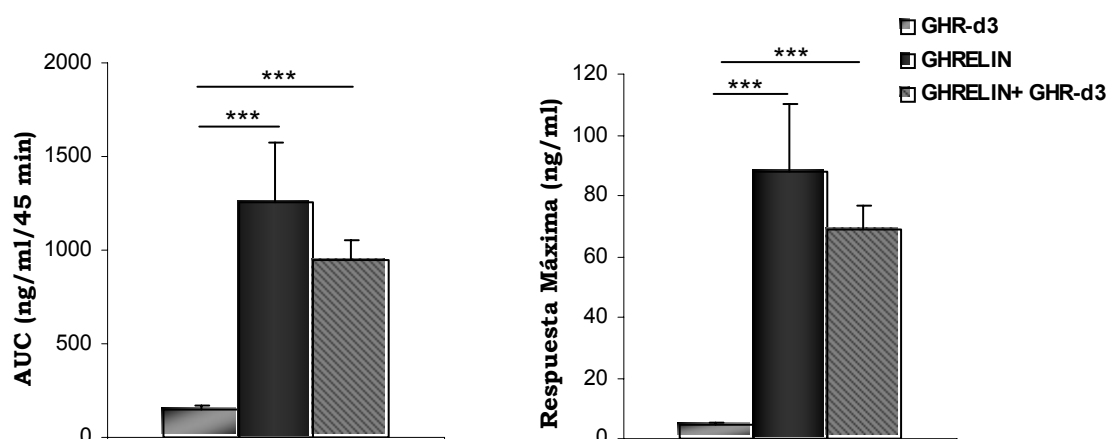


Figura 5: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración iv de GHR-d3, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
GHR-d3	151.26 \pm 16.52	3.37 \pm 0.32	4.43 \pm 0.56
GHR-d3 +GHRELIN	952.08 \pm 104.99	29.7 \pm 3.65	68.9 \pm 8.06
GHRELIN	1251.25 \pm 327.12	38.91 \pm 10.46	88.08 \pm 22.16

Tabla 2: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y GHR-d3. Los resultados están expresados en media \pm SEM.

1.2.3 Efecto de la administración iv de ghrelin desacilado (UAG) sobre la respuesta de GH.

Para llevar a cabo este estudio administramos, vía intravenosa:

- UAG (50 µg/ 200 µl)
- UAG (50 µg) + Ghrelin (10 µg) /200 µl
- Ghrelin (10 µg/ 200 µl)

Podemos comprobar como la administración iv de UAG no provoca ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de GH, y tampoco modifica la respuesta de GH a ghrelin.

Así, la administración de ghrelin y de ghrelin + UAG, presentan un efecto estimulador similar sobre GH, con unos valores de AUC de 938.65 ± 260.11 y 989.98 ± 201.44 ng/ml, respectivamente. En cuanto a la Respuesta Máxima y la Media tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. (Figura 6; Tabla 3)

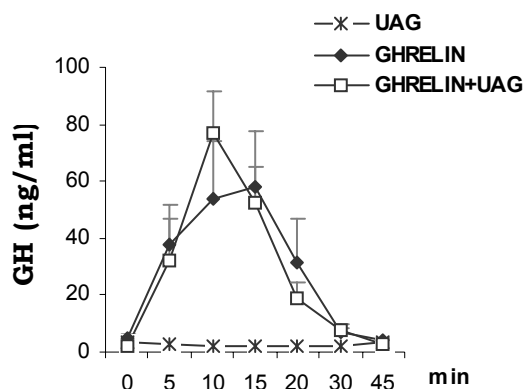


Figura 6: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ después de la administración iv de UAG, ghrelin o ambos péptidos, en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$).

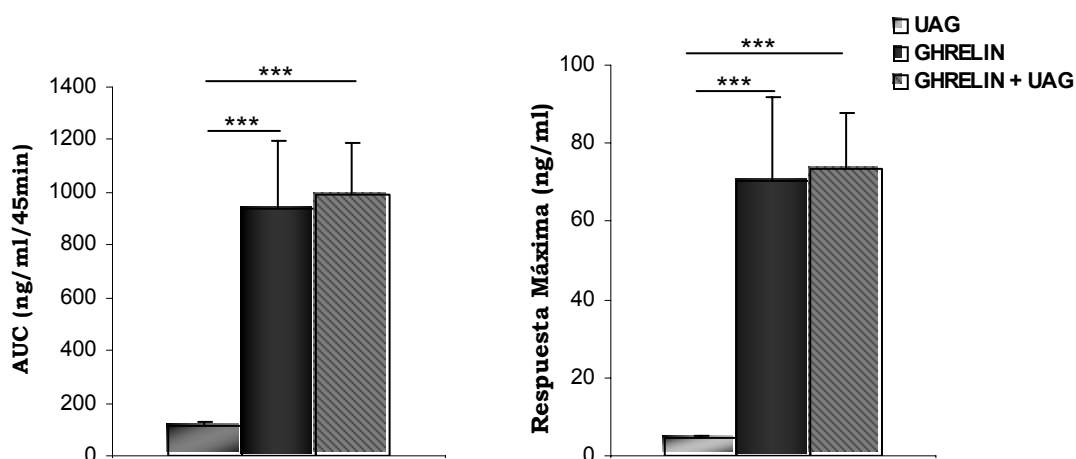


Figura 6: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración iv de UAG, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
UAG	110.65±20.54	2.47±0.40	4.62±0.70
GHRELIN+ UAG	989.98±201.41	29.18±6.97	73.63±14.21
GHRELIN	938.65±260.11	31.92±9,76	70,48±21,45

Tabla 3: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y UAG. Los resultados están expresados en media ± SEM.

1.2.4 Efecto de la administración iv de la obestatina sobre la respuesta a estímulos y la secreción pulsátil de GH.

A) Respuesta de GH a ghrelin:

Para realizar este estudio se establecen distintos grupos experimentales:

- Obestatina (100 µg/ 200 µl)
- Obestatina (100 µg) + Ghrelin (10 µg)/ 200 µl
- Ghrelin (10 µg/ 200 µl)

Comprobamos como mientras el ghrelin presenta un característico efecto estimulador de la secreción de GH, observado en términos de AUC y Respuesta Máxima, (877.06 ± 158.61 y 65.30 ± 6.71 ng/ml, respectivamente), la administración conjunta de ghrelin y obestatina no modifica ese efecto, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores de AUC, Respuesta Máxima y Media entre los dos grupos experimentales. Por su parte, obestatina no posee efecto alguno sobre los niveles plasmáticos de GH. (Figura 7; Tabla 4)

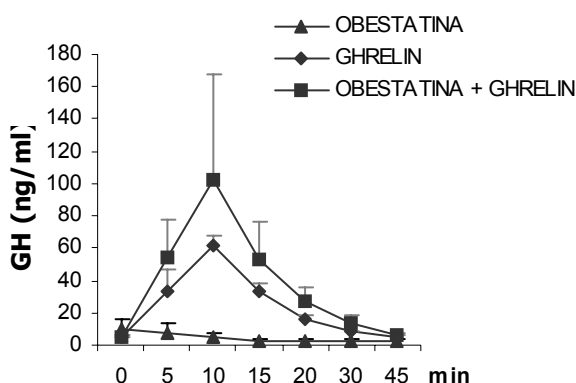


Figura 7: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $media \pm SEM$ después de la administración iv de obestatina, ghrelin o ambos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$).

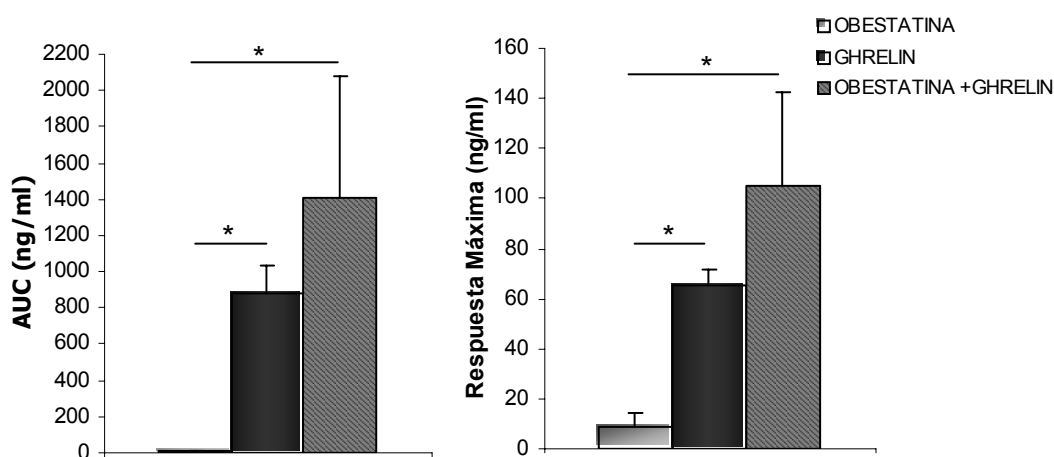


Figura 7: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración iv de obestatina, ghrelin o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
OBESTATINA	43.45±10.20	3.67±2.47	8.36±5.73
OBEST+ GHRELIN	1405.71±669.47	42.6±21.08	105.00±65.41
GHRELIN	877.06±158.61	26.18±4.91	65.30±6.71

Tabla 4: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y obestatina. Los resultados están expresados en media ± SEM.

B) Respuesta de GH a GHRH

Para llevar a cabo este estudio se establecen los siguientes grupos experimentales en función del tratamiento:

- Obestatina (100 µg/ 200 µl)
- Obestatina (100 µg) + GHRH (5 µg)/ 200 µl
- GHRH (5 µg/ 200 µl)

Los animales tratados con GHRH presentan un aumento significativo en los niveles plasmáticos de GH, siendo su AUC (1092.01±218.49 ng/ml) y su Respuesta Máxima (53.47±10.05 ng/ml) características.

En cuanto a la obestatina, no tiene ningún efecto sobre la secreción de GH, presentando valores mínimos de AUC y Respuesta Máxima, y tampoco modifica el efecto de GHRH sobre GH ya que la administración conjunta de ambos péptidos no se diferencia de forma estadísticamente significativa en términos de AUC, Respuesta Máxima y Media con respecto a los obtenidos con la administración de GHRH. (Figura 8; Tabla 5)

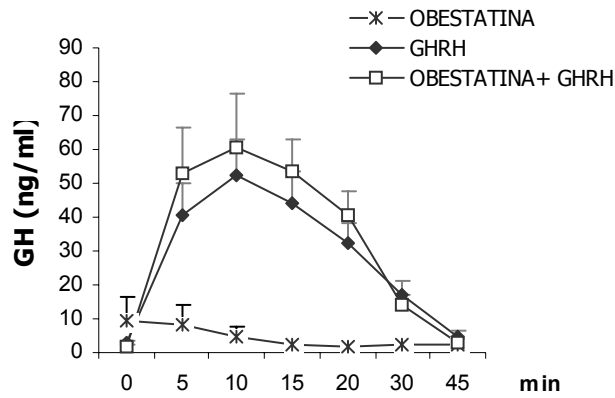


Figura 8: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración iv de obestatina, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

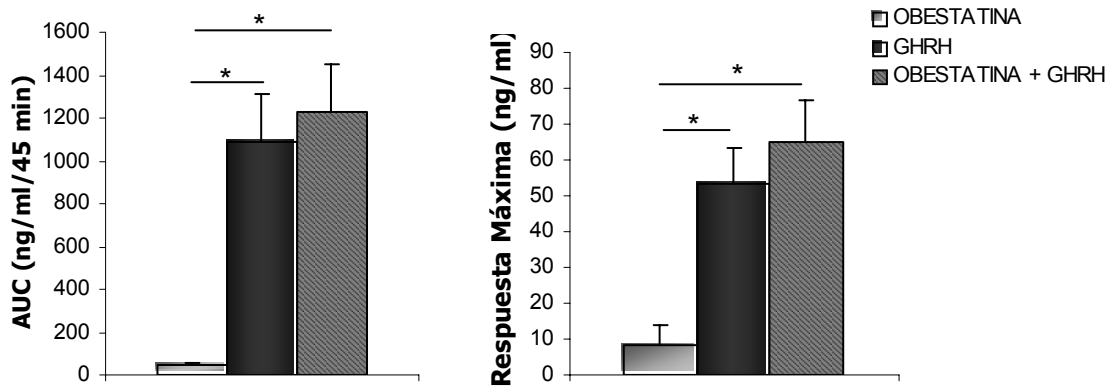


Figura 8: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración iv de obestatina, GHRH o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MÁX (ng/ml)
OBESTATINA	43.45±10.20	3.67±2.47	8.36±5.73
OBEST+ GHRH	1227.19±225.52	37.57±9.66	65.26±13.18
GHRH	1092.01±218.49	31.94±6.39	53.47±10.05

Tabla 5: Estudio de la respuesta de GH a GHRH y obestatina. Los resultados están expresados como media ± SEM.

C) Secreción pulsátil de GH.

Para comprobar si la obestatina presenta algún efecto sobre la secreción espontánea de GH utilizamos ratas macho canuladas iv y distribuidas en dos grupos: obestatina (10 μ g/200 μ l) y salino (200 μ l) que usamos como control. Siguiendo el protocolo de pulsatilidad, descrito anteriormente, comprobamos como el grupo control presenta un patrón de secreción de GH típico, con unos niveles medios de 6.43 ± 2.18 ng/ml, una Amplitud media de GH de 30.22 ± 8.23 ng/ml y un valor de secreción total de GH (AUC) de 2027.28 ± 687.26 ng/ml. Mientras que tras la administración de obestatina no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros característicos de pulsatilidad estudiados, siendo AUC, Amplitud y Media 2979.62 ± 697.42 , 38.02 ± 8.29 y 10.25 ± 2.31 ng/ml, respectivamente. (Figura 9)

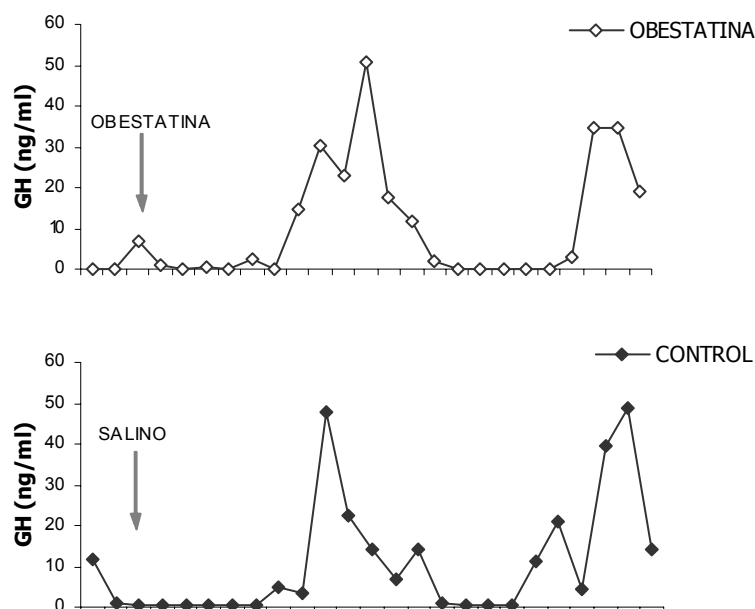


Figura 9: A. Perfil representativo de secreción pulsátil de GH en ratas macho en libre movimiento tras la administración por vía intravenosa de obestatina (10 μ g/rata) o vehículo.

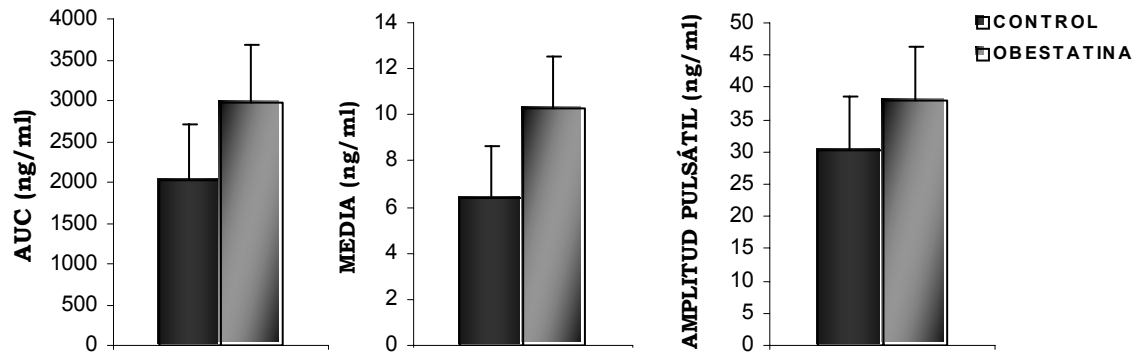


Figura 9: B. Parámetros característicos del patrón pulsátil de GH en ratas macho tratadas con obestatina o vehículo vía intravenosa.

II. ESTUDIO DEL PAPEL DE mTOR EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH.

➤ SECRECIÓN ESPONTÁNEA DE GH

2.1. Efecto de la administración icv de RAPAMICINA sobre la secreción pulsátil de GH.

❖ RAPAMICINA:

Rapamicina es un inhibidor selectivo de mTORC-1, que está descrito como un sensor de nutrientes y un importante punto de control integrando señalización de factores de crecimiento y metabolismo celular.

Para ver como afecta la administración de Rapamicina a nivel central sobre el patrón de secreción de GH, partimos de dos grupos de ratas: tratadas con RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) y ratas tratadas con 5 µl de DMSO que usamos como control.

Obtenemos los siguientes resultados:

- El grupo control presenta un patrón de secreción pulsátil típico con unos valores medios de GH de 5.09 ± 0.35 ng/ml y una secreción total de 1667.46 ± 113.84 ng/ml a lo largo de las casi 6 horas que dura el estudio.
- En el grupo tratado con Rapamicina los niveles medios de secreción de GH son de 6.5 ± 0.81 ng/ml y la secreción total es de 2145.21 ± 268.90 ng/ml.

Teniendo en cuenta estos y otros parámetros típicos de pulsatilidad, no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto del grupo control. Esto nos indica que el bloqueo de mTOR a nivel central, mediante la administración de Rapamicina, no modifica el patrón de secreción de GH.

(Figura 10)

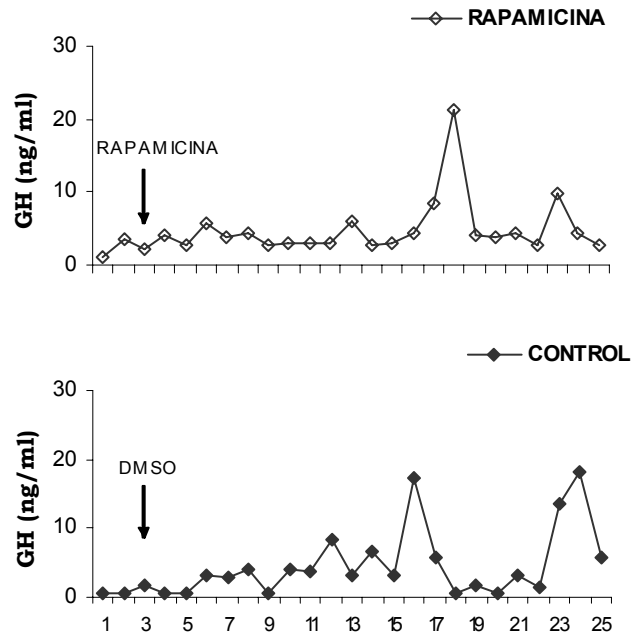


Figura 10: A. Perfil representativo de secreción pulsátil de GH en ratas macho en libre movimiento tras la administración de Rapamicina (50 µg/rata) o Vehículo.

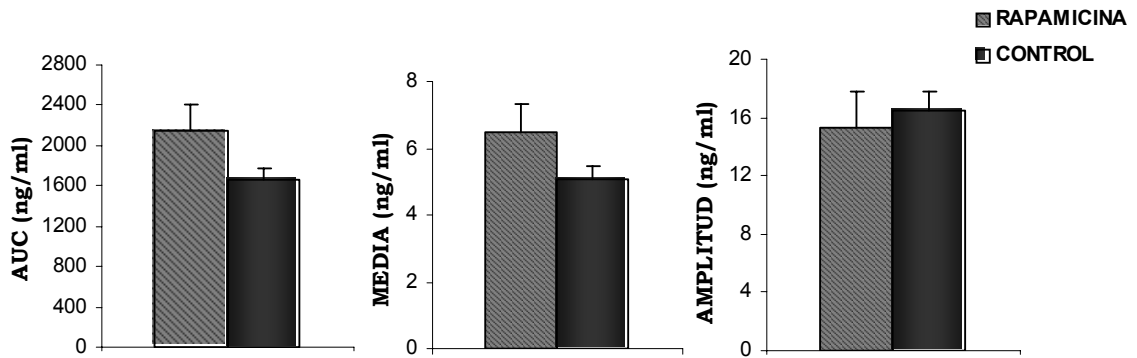


Figura 10: B. Parámetros característicos del patrón pulsátil de GH en ratas macho tratadas con Rapamicina o Vehículo.

➤ RESPUESTA DE GH A ESTÍMULOS

a) a GHRELIN

3.2. Efecto de la administración icv de RAPAMICINA sobre la respuesta de GH a ghrelin.

❖ RAPAMICINA:

Para ver si la administración a nivel central de Rapamicina causa algún efecto sobre la respuesta de GH a ghrelin partimos de los siguientes grupos de animales según el tratamiento:

- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)

Podemos comprobar como la administración de Rapamicina a nivel central no causa ningún efecto sobre la secreción de GH, mientras que la administración de ghrelin iv causa un aumento de secreción de GH definido en términos de AUC (1461.17±326.97 ng/ml), Respuesta Máxima (137.55±29.22 ng/ml, a los 10 minutos tras la administración del péptido) y Media (47.11±10.75 ng/ml).

Sin embargo, la administración conjunta de Rapamicina icv y ghrelin iv no modifica el efecto estimulador de ghrelin sobre GH, presentando unos niveles medios de GH, AUC y Respuesta Máxima que no se diferencian, de forma estadísticamente significativa, de los que se obtenían en el grupo de animales tratados solo con ghrelin. (Figura 11; Tabla 6)

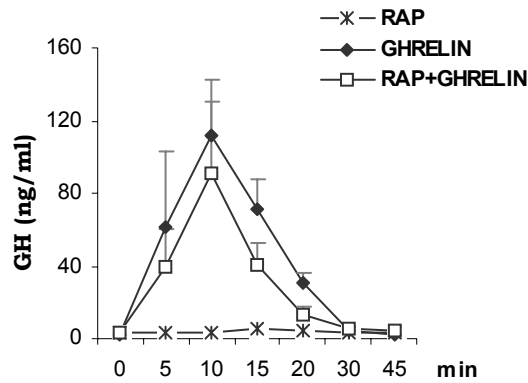


Figura 11: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $media \pm SEM$ después de la administración de Rapamicina, ghrelin o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

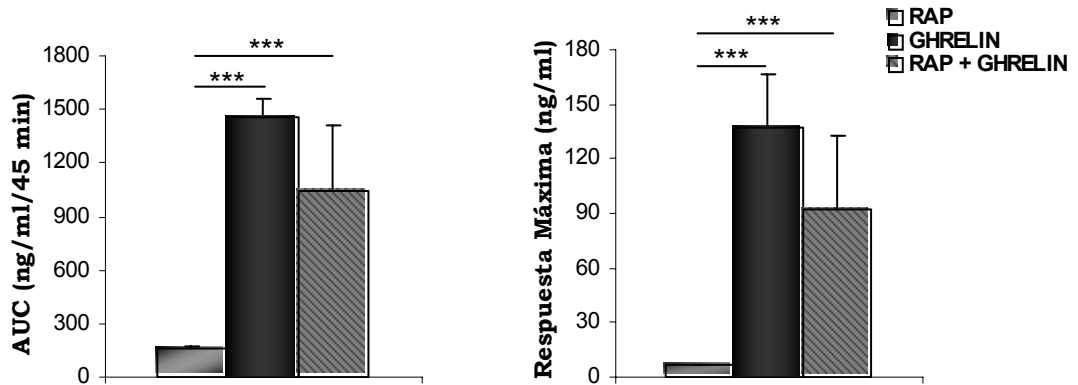


Figura 11: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Rapamicina, ghrelin o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	Resp Máxima (ng/ml)
RAP	159.56±14.80	3.74±0.36	6.37±0.89
RAP + GHRELIN	1041.56±365.26	32.44±12.19	92.16±40.10
GHRELIN	1461.17±326.97	47.11±10.75	137.55±29.22

Tabla 6: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y Rapamicina. Los resultados están expresados en $media \pm SEM$.

b) a GHRH3.3. Efecto de la administración icv de RAPAMICINA sobre la respuesta de GH a GHRH.❖ RAPAMICINA:

Para evaluar el efecto de la inhibición de mTOR, considerado junto con AMPK uno de los sensores del balance energético a nivel hipotalámico, sobre la respuesta de GH a GHRH administramos Rapamicina icv del siguiente modo:

- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- RAPAMICINA icv (50 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl)

Siguiendo el protocolo de respuesta observamos los siguientes resultados:

- La administración de Rapamicina icv no causa ningún efecto sobre la secreción de GH.
- La administración de GHRH iv provoca un significativo aumento en los niveles de secreción de GH como se podía comprobar con los valores medios de secreción , AUC y Respuesta Máxima alcanzados, siendo estos de 66.12 ± 17.45 ng/ml, 1761.16 ± 315.74 ng/ml y 113.24 ± 16.16 ng/ml, respectivamente.
- Con la administración de Rapamicina icv y GHRH iv, se obtienen unos valores medios de secreción de GH de 105.46 ± 41.46 ng/ml, unos valores totales de GH plasmático de 1519.75 ± 401.27 ng/ml y se alcanza la Respuesta Máxima de 96.65 ± 27.34 ng/ml a los 10 minutos de la administración. Estos valores no presentan diferencias estadísticamente significativas con los observados en el grupo de animales tratados con GHRH iv.

Por tanto, estos resultados nos indican que la administración de Rapamicina icv, y la consecuente inhibición de mTOR, no modifica el efecto estimulador de secreción de GH que posee el neuropéptido GHRH. (Figura 12; Tabla 7)

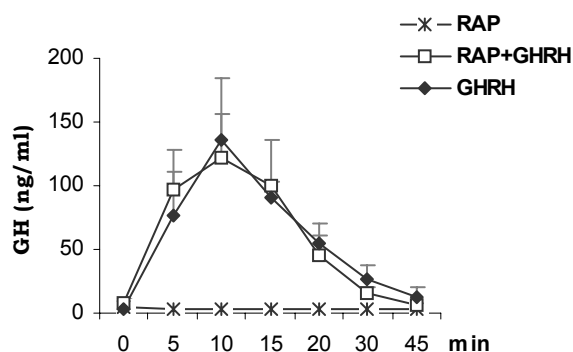


Figura 12: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $media \pm SEM$ después de la administración de Rapamicina, GHRH o ambos en ratas adultas con movimiento libre. (n = 7/grupo).

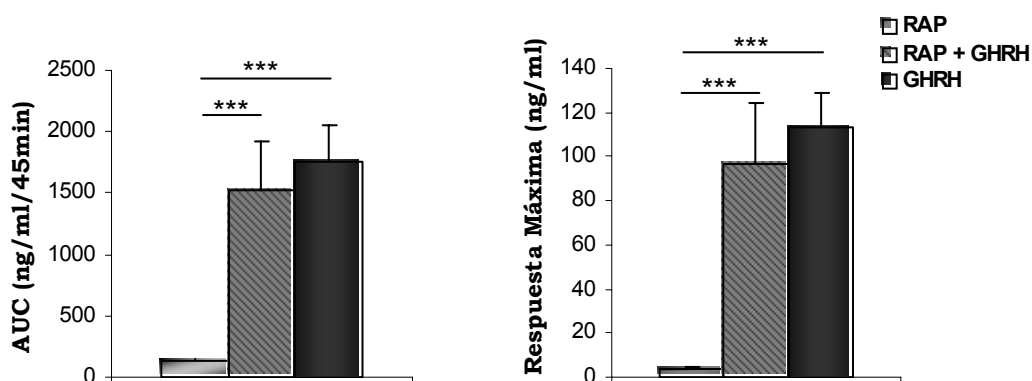


Figura 12: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Rapamicina, GHRH o ambos péptidos en ratas adultas con movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
RAP	127.90±13.21	2.97±0.26	3.95±0.32
RAP+ GHRH	1519.75±401.27	105.46±41.43	96.65±27.34
GHRH	1761.24±16.16	66.12±17.45	113.24±16.16

Tabla 7: Estudio de la respuesta de GH a GHRH y Rapamicina. Los resultados están expresados en $media \pm SEM$.

III. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA AMPK y METABOLISMO LIPÍDICO EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH.

En los últimos años muchos trabajos han demostrado que tanto AMPK como el metabolismo de lípidos (su principal diana), especialmente a nivel hipotalámico, están implicados en la regulación del balance energético de todo el organismo respondiendo a nutrientes y señales hormonales procedentes tanto del CNS como de órganos periféricos (94). Teniendo en cuenta, además, que la hormona de crecimiento juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética y el metabolismo, nos planteamos estudiar el posible papel de la vía AMPK y el metabolismo lipídico a nivel central sobre la regulación de la secreción de GH.

Para ello, modificamos la actividad de AMPK o de determinados enzimas clave en el metabolismo de lípidos mediante la administración de distintos compuestos icv, y mediante los protocolos típicos de pulsatilidad y respuesta de GH a estímulos, comprobamos su efecto sobre la secreción de GH. (Ver materiales y métodos).

Usamos ratas macho *Sprague-Dawley* que se canulan 4 días antes de llevar a cabo el experimento. En este caso se colocan dos cánulas: una intracerebroventricular por la que se administra el tratamiento y una intravenosa por la que se extraen las muestras. Son necesarios distintos días de experimento, en los que se alternan animales de todos los grupos, para poder completar un n =7 en cada uno de los distintos grupos experimentales.

➔ PAPEL DE AMPK A NIVEL CENTRAL SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH.

➤ SECRECIÓN ESPONTÁNEA DE GH

3.1.1 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la secreción pulsátil de GH

❖ **AICAR:**

Partimos de dos grupos experimentales: AICAR icv (3 µg/5 µl) y Control (5 µl de Salino)

La administración de AICAR icv supone la fosforilación y activación de AMPK a nivel hipotalámico. Mediante el protocolo de pulsatilidad y la administración de AICAR icv, podemos comprobar que la activación de AMPK a nivel central no causa ninguna modificación en el patrón de secreción de GH.

Los animales tratados con AICAR presentan unos valores medios de secreción de GH de 5.27 ± 1.00 ng/ml, una Amplitud de 18.62 ± 2.95 ng/ml y una AUC de 1690 ± 333.06 ng/ml; valores que no se diferencian de forma estadísticamente significativa de los que se observan en los animales utilizados como control cuya Media, Amplitud y AUC son, respectivamente, 6.40 ± 1.05 ng/ml, 38.89 ± 4.84 ng/ml y 2094 ± 342.49 ng/ml. (Figura 13)

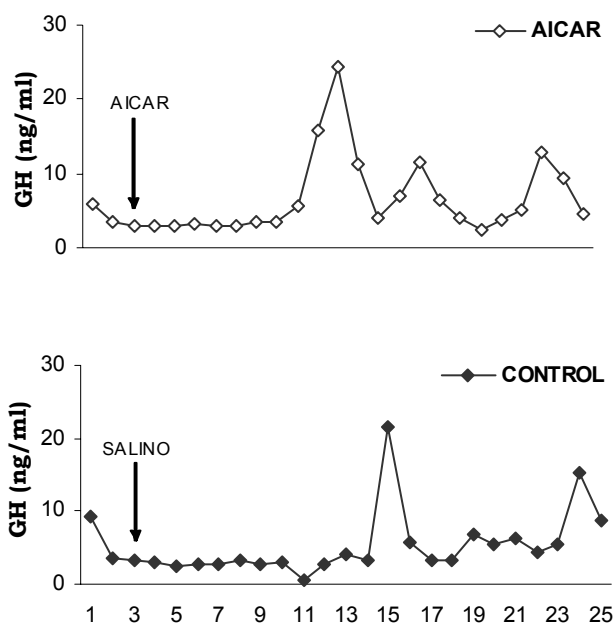


Figura 13: A. Perfil representativo de secreción pulsátil de GH en ratas macho en libre movimiento tras la administración por vía intracerebroventricular de AICAR (3 µg/rata) o Vehículo.

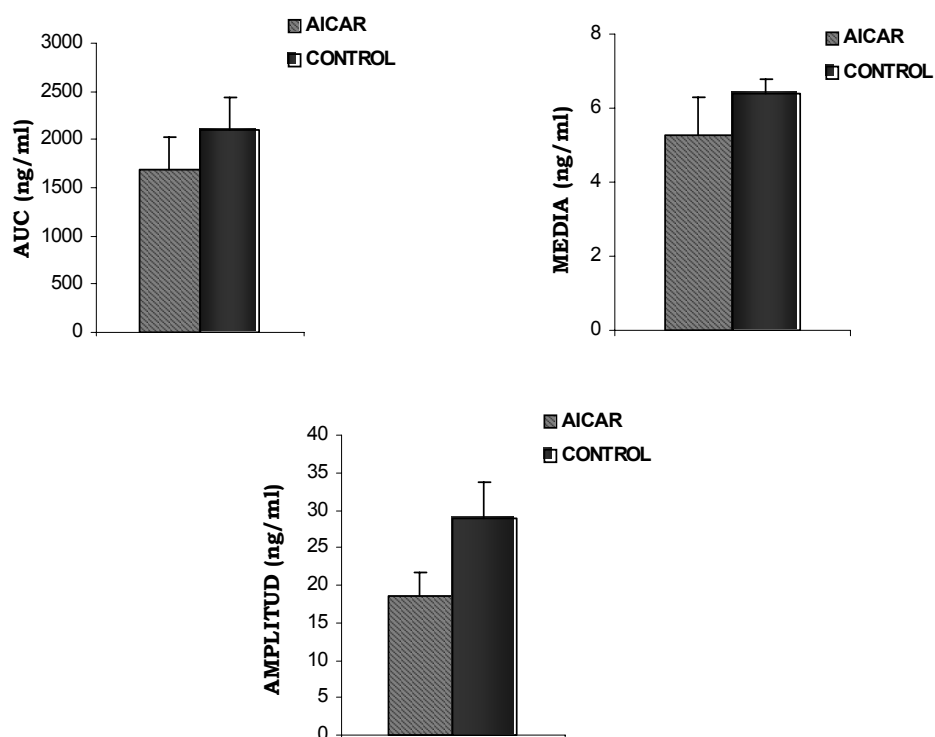


Figura 13: B. Parámetros característicos del patrón pulsátil de GH en ratas macho tratadas con AICAR o Vehículo a nivel central.

❖ **COMPUESTO C:**

La administración icv de Compuesto C supone la inhibición de AMPK a nivel hipotalámico. Para comprobar si este efecto causa alguna modificación en el patrón de secreción de GH, usamos ratas tratadas con COMPUESTO C icv (10 μ g/ 5 μ l) y ratas control (5 μ l de DMSO).

Siguiendo el protocolo de pulsatilidad observamos como no hay diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo tratado con Compuesto C y el grupo control, en los parámetros característicos estudiados.

Así, si el grupo de animales tratados con Compuesto C presenta unos niveles medios de GH plasmática de 4.68 ± 0.85 ng/ml, una secreción total de GH de 1671.15 ± 145.10 ng/ml y con una Amplitud de 24.42 ± 4.02 ng/ml, en el grupo

control los niveles medios de secreción son de 5.09 ± 0.35 ng/ml, el AUC es de 1667.46 ± 113.84 ng/ml y la Amplitud 16.42 ± 1.34 ng/ml. (Figura 14)

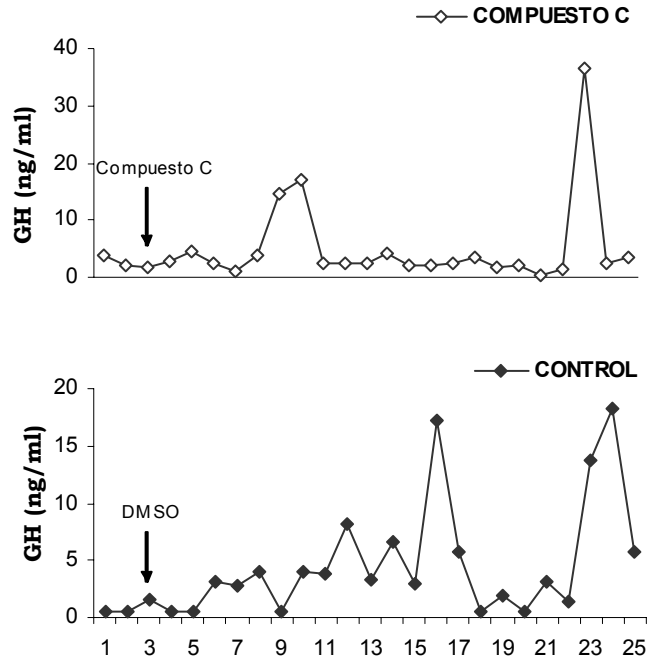


Figura 14: A. Perfil representativo de secreción pulsátil de GH en ratas macho en libre movimiento tras la administración de Compuesto C (10 µg/rata) o Vehículo.

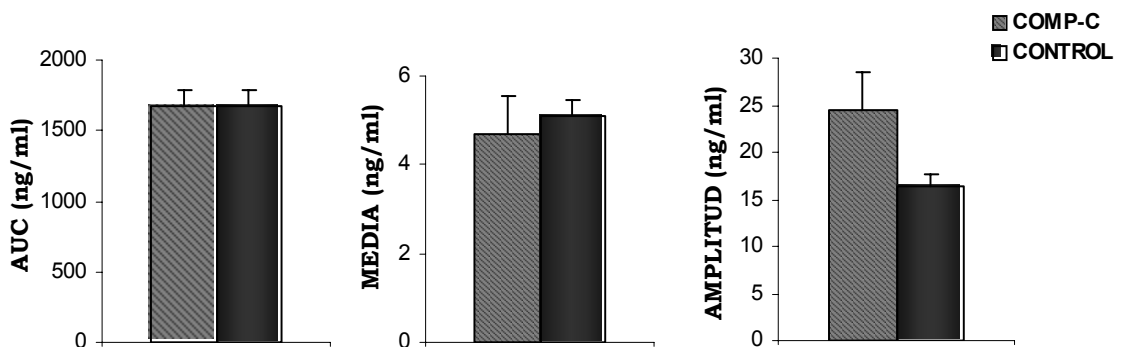


Figura 14: B. Parámetros característicos del patrón pulsátil de GH en ratas macho tratadas con COMPUESTO C o Vehículo a nivel central.

➤ RESPUESTA DE GH A ESTÍMULOS

3.1.2 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH a ghrelin

❖ AICAR:

La administración de AICAR supone la fosforilación y activación de AMPK. Así, podemos comprobar si la activación de AMPK a nivel del hipotálamo causa algún efecto en la respuesta de GH a ghrelin.

Aplicamos los siguientes tratamientos:

- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Salino (200 µl)
- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de salino) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)

Los resultados son los siguientes:

- La administración de AICAR a nivel central no causa ningún efecto sobre la secreción de GH.
- La administración de ghrelin a nivel intravenoso causa el esperado efecto estimulador de secreción de GH, con unos niveles medios de GH plasmática de 37.02 ± 10.20 ng/ml, niveles totales de GH de 1184.94 ± 329.23 ng/ml, y la Respuesta Máxima alcanza valores de 92.54 ± 26.96 ng/ml a los 10 minutos de la administración del péptido.
- La administración conjunta de AICAR icv y ghrelin iv no modifica el efecto de la respuesta de GH a ghrelin ya que presenta valores de Media, AUC y Respuesta Máxima similares al grupo tratado solo con ghrelin; siendo éstos 32.66 ± 7.15 ng/ml, 1049.56 ± 174.76 ng/ml y 87.28 ± 19.42 ng/ml, respectivamente.

Esto nos indica que la activación de AMPK a nivel del hipotálamo no causa ningún efecto sobre la secreción de GH, así como tampoco modifica el efecto estimulador de ghrelin sobre la secreción de GH. (Figura 15; Tabla 8)

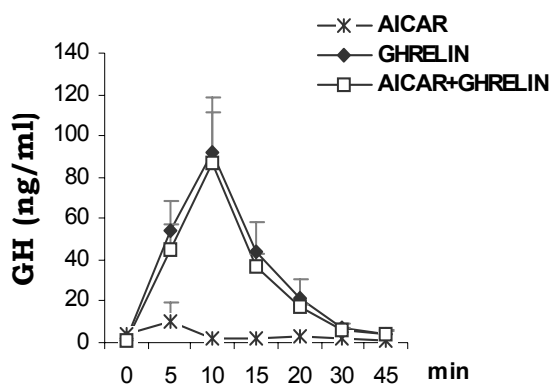


Figura 15: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $\text{media} \pm \text{SEM}$ después de la administración de AICAR, ghrelin o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$).

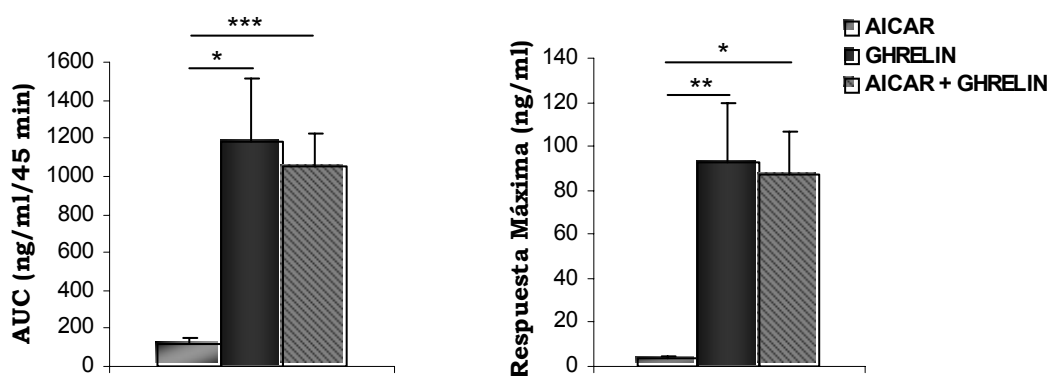


Figura 15: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de AICAR, ghrelin o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	Resp Máxima (ng/ml)
AICAR	112.79 \pm 41.29	3.13 \pm 1.32	3.51 \pm 0.91
AICAR+GHRELIN	1049.56 \pm 174.76	32.66 \pm 7.15	87.28 \pm 19.42
GHRELIN	1184.94 \pm 329.23	37.02 \pm 10.20	92.54 \pm 26.96

Tabla 8: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y AICAR. Los resultados están expresados en $\text{media} \pm \text{SEM}$.

❖ COMPUESTO C:

Para comprobar si la administración de Compuesto C, inhibidor de AMPK, tiene algún efecto sobre la respuesta de GH a ghrelin, realizamos el siguiente tratamiento:

- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)

Siguiendo el protocolo de respuesta obtenemos los siguientes resultados:

- La administración de Compuesto C icv no causa, por si mismo, ningún efecto sobre la respuesta de GH.
- La administración de ghrelin iv causa, como se esperaba, un efecto estimulador sobre la secreción de GH alcanzando la Respuesta Máxima (137.55 ± 29.22 ng/ml) a los 10 minutos tras la administración del péptido; con una Media de secreción (47.11 ± 10.75 ng/ml) y unos niveles totales de GH plasmática (1461.17 ± 326.97 ng/ml) también característicos.
- La administración conjunta de Compuesto C icv y ghrelin iv consigue revertir el efecto estimulador de GH del péptido ghrelin. Así, para los tres parámetros de respuesta estudiados (Media, Respuesta Maxima y AUC) existen diferencias estadísticamente significativas ($***p < 0.001$) respecto de los valores observados en el grupo de animales tratados solo con ghrelin iv, siendo éstos 3.19 ± 0.33 ng/ml, 4.34 ± 0.39 ng/ml y 135.3 ± 12.85 ng/ml, respectivamente.

Nuestros resultados nos indican que la inhibición de AMPK a nivel hipotalámico, mediante la administración icv de Compuesto C, antagoniza el efecto estimulador sobre la secreción de GH que ejerce el péptido ghrelin. (Figura 16; Tabla 9)

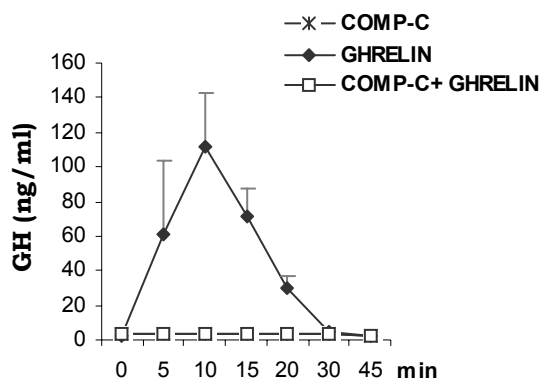


Figura 16: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración de Compuesto C, ghrelin o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

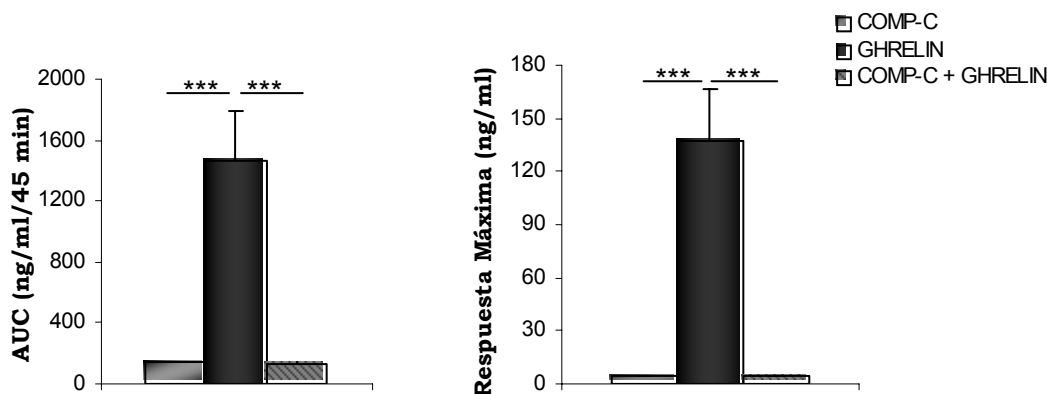


Figura 16: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Compuesto C, ghrelin o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	Resp Máxima (ng/ml)
COMP-C	138.17±6.62	3.14±0.16	4.40±0.41
COMP-C+GHRELIN	135.3±12.85	3.19±0.33	4.34±0.39
GHRELIN	1461.17±326.97	47.11±10.75	137.55±29.22

Tabla 9: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y Compuesto C. Los resultados están expresados en media ± SEM

3.1.3 Efecto de la administración icv de AICAR y COMPUESTO C sobre la respuesta de GH a GHRH

❖ AICAR:

Para saber si la activación de AMPK a nivel central causa algún efecto sobre la respuesta de GH a GHRH realizamos tres tipos de tratamiento:

- AICAR icv (3 µg/5 µl) + Salino (200 µl)
- AICAR icv (3 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de salino) + GHRH iv (10 µg/200 µl)

Obtenemos los siguientes resultados:

- La administración de AICAR icv no provoca ningún efecto sobre la respuesta de GH a GHRH.
- La administración de GHRH iv da lugar a un aumento en la secreción de GH caracterizado por unos niveles medios de GH plasmática de 40.51 ± 12 ng/ml, un AUC de 1326.89 ± 406.39 ng/ml, y una Respuesta Máxima de 119.48 ± 40.23 ng/ml, que se alcanza a los 10 minutos de la administración del neuropéptido.
- Mientras que la administración conjunta de AICAR icv y GHRH iv presenta unos valores de Media, AUC y Respuesta Máxima que no se diferencian de forma estadísticamente significativa de los conseguidos en el grupo de animales tratados solo con GHRH. (38.05 ± 7.06 ng/ml, 1340.77 ± 270.64 ng/ml y 91.78 ± 17.66 ng/ml, respectivamente).

Esto nos indica que la administración de AICAR icv, y por tanto la activación de AMPK a nivel hipotalámico, no modifica el efecto estimulador que ejerce el neuropéptido GHRH sobre la secreción de GH. (Figura 17; Tabla 10)

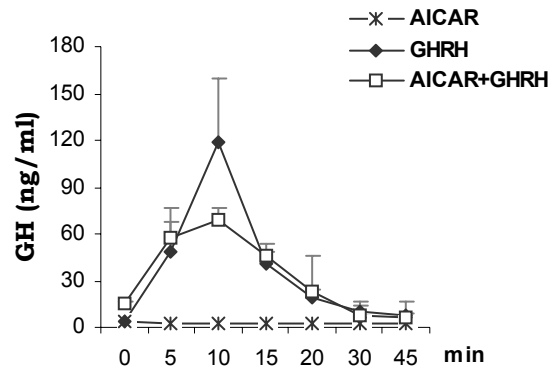


Figura 17: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $media \pm SEM$ después de la administración de AICAR, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

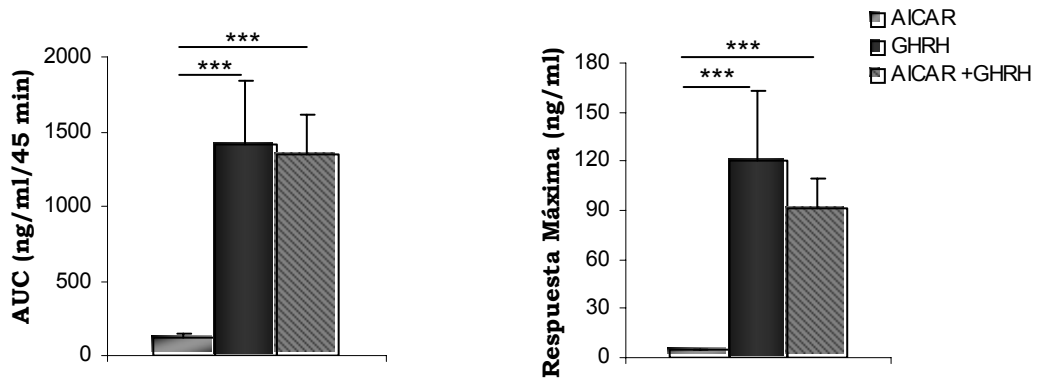


Figura 17: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de AICAR, GHRH o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
AICAR	125.33±19.83	2.73±0.39	4.56±0.66
AICAR+ GHRH	1340.77±270.64	38.05±7.06	91.78±17.66
GHRH	1326.89±406.39	40.51±12	119.98±40.23

Tabla 10: Estudio de la respuesta de GH a GHRH y AICAR. Los resultados están expresados en $media \pm SEM$.

❖ COMPUESTO C:

Realizamos los siguientes tratamientos:

- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- COMPUESTO C icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl)

Siguiendo el protocolo típico de respuesta, observamos los siguientes resultados:

- La administración icv de Compuesto C no causa ningún efecto sobre la secreción de GH. (Valores Medios= 3.53 ± 0.57 ng/ml, AUC= 153.50 ± 18.79 ng/ml y Respuesta Máxima= 4.91 ± 1.10 ng/ml).
- Los animales tratados con GHRH presentan un aumento en los niveles de secreción de GH plasmática característicos, alcanzando unos valores totales de GH de 1761.16 ± 315.74 ng/ml, una Media de secreción de 66.12 ± 17.45 ng/ml y con una Respuesta Máxima de 113.24 ± 16.16 ng/ml a los 10 minutos.
- La administración de Compuesto C icv y GHRH iv da lugar a un aumento significativo en la secreción de GH comparado con la administración de Compuesto C icv solo, pero que no alcanza los valores observados con la administración del neuropéptido GHRH iv. En concreto se obtienen unos valores medios de secreción de 14.94 ± 4.88 ng/ml, Respuesta Máxima de 44.48 ± 15.67 ng/ml y un AUC de 579.04 ± 153.61 ng/ml.

Para los tres parámetros característicos de respuesta estudiados encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con ambos compuestos (Compuesto C icv y GHRH iv) y los otros dos grupos experimentales (tratados solo con Compuesto C y tratados solo con GHRH), siendo el grado de significación de $p < 0.01$ en ambos casos.

Esto nos indica que la inhibición de AMPK a nivel del hipotálamo consigue disminuir, pero no revertir, el efecto estimulador de la secreción de GH que ejerce el neuropéptido GHRH. (Figura 18; Tabla 11)

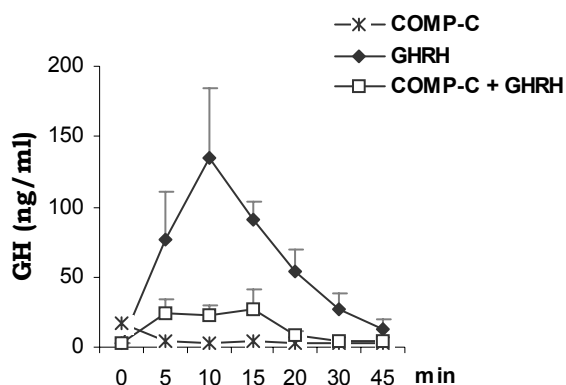


Figura 18: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como $media \pm SEM$ después de la administración de Compuesto C, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$).

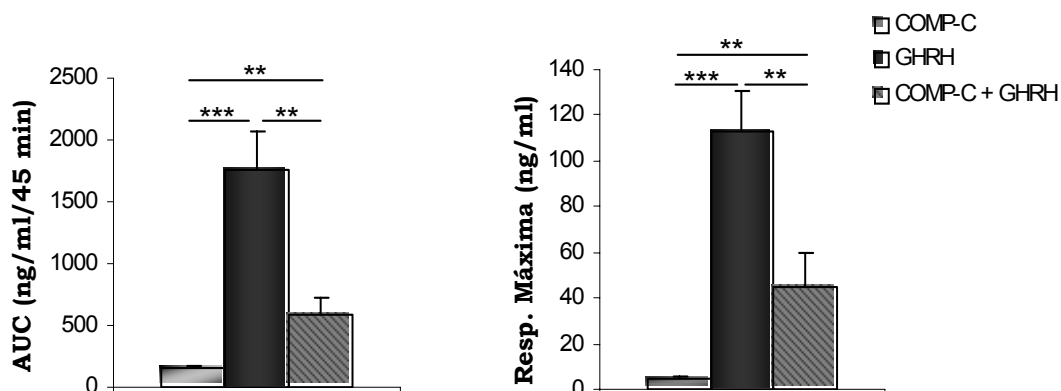


Figura 18: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Compuesto C, GHRH o ambos péptidos en ratas adultas en movimiento libre. ($n = 7/\text{grupo}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
COMP-C	153.50±18.79	3.52±0.47	4.91±1.10
COMP-C + GHRH	579.04±153.61	14.94±4.88	44.48±15.67
GHRH	1761.16±315.74	66.12±17.45	113.24±16.16

Tabla 11: Estudio de la respuesta de GH a GHRH y Compuesto C. Los resultados están expresados en $media \pm SEM$.

➔ PAPEL DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS A NIVEL CENTRAL SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH.

➤ SECRECIÓN ESPONTÁNEA DE GH

3.2.1 Efecto de la administración icv de TOFA sobre la secreción pulsátil de GH

❖ TOFA:

Partimos de dos grupos experimentales: ratas tratadas con TOFA (10 µg/5 µl) y ratas control (5 µl de DMSO).

Comprobamos como la administración a nivel central de TOFA, y por tanto la inhibición de la síntesis de lípidos a nivel hipotalámico, no causa ningún efecto sobre el patrón de secreción pulsátil de GH.

Así, las ratas tratadas con DMSO, y que utilizamos como control, presentan unos niveles plasmáticos de GH característicos, con unos niveles medios de 5.09 ± 0.35 ng/ml, una Amplitud de 16.42 ± 1.34 ng/ml y un valor de secreción total de GH recogido en el parámetro AUC de 1667.46 ± 113.84 ng/ml.

Por su parte, el grupo de animales tratados con TOFA presenta niveles medios de 5.39 ± 0.41 ng/ml, y unos valores de AUC y Amplitud de 1779.28 ± 136.05 y 20.11 ± 2.56 ng/ml, respectivamente.

(Figura 19)

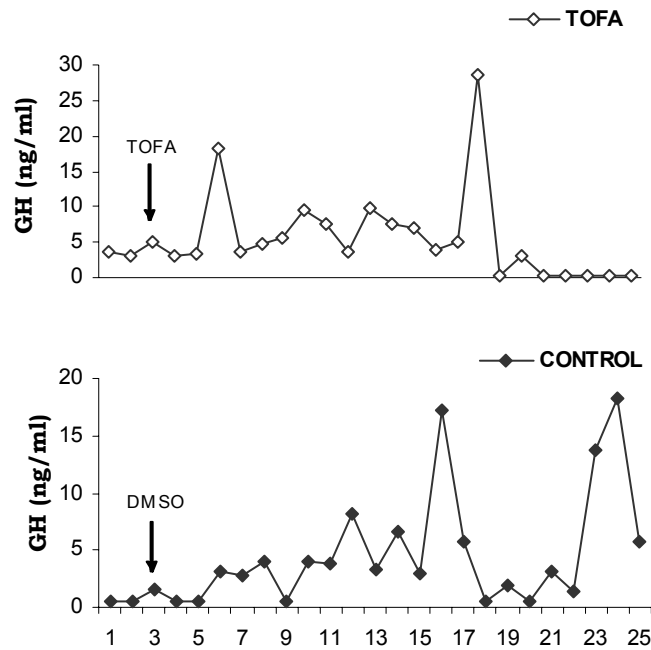


Figura 19: A. Perfil representativo de secreción pulsátil de GH en ratas macho en libre movimiento tras la administración vía icv de TOFA (10 µg/rata) o Vehículo.

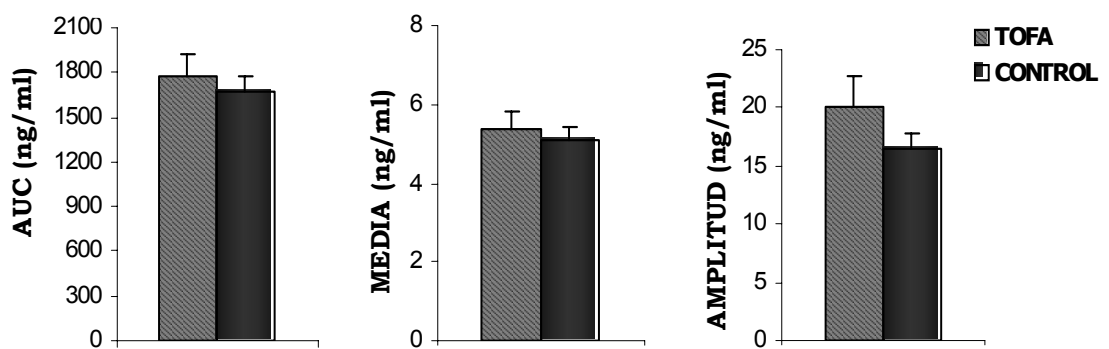


Figura 19: B. Parámetros característicos del patrón pulsátil de GH en ratas macho tratadas con TOFA o Vehículo vía icv.

➤ RESPUESTA A ESTÍMULOS

a) a GHRELIN

3.2.2 Efecto de la administración icv de TOFA sobre la respuesta de GH a ghrelin

❖ TOFA:

Con el objetivo de observar el efecto de la inhibición de la síntesis de lípidos a nivel hipotalámico sobre la respuesta de GH a ghrelin, partimos de los siguientes grupos de animales:

- TOFA icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- TOFA icv (10 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + Ghrelin iv (10 µg/200 µl)

Los resultados son los siguientes:

- Los animales tratados con TOFA a nivel central no sufren ningún efecto sobre la secreción de GH siendo sus niveles medios, el AUC y la Respuesta Máxima 1.40 ± 0.21 ng/ml, 70.55 ± 17.38 ng/ml y 3.60 ± 0.68 ng/ml respectivamente.
- Los animales tratados con ghrelin a nivel intravenoso presentan unos mayores niveles medios de GH plasmáticos, 47.11 ± 10.75 ng/ml, alcanzando unos niveles totales de GH de 1461.17 ± 326.97 ng/ml y con una Respuesta Máxima, a los 10 minutos de la administración del péptido, de 137.55 ± 29.22 ng/ml.
- Los animales tratados con ambos péptidos presentan unos valores de GH similares a los observados en el grupo tratado con ghrelin iv: niveles medios de GH plasmática de 56.84 ng/ml, AUC de 1785.13 ± 560.08 ng/ml y la Respuesta Máxima, que se produce a los 10 minutos, de 138.81 ± 40.91 ng/ml.

Estos datos nos indican que la inhibición de la síntesis de lípidos a nivel hipotalámico mediante la administración icv de TOFA, no causa ningún efecto sobre la secreción de GH, así como tampoco modifica el efecto estimulador de secreción típico del péptido ghrelin ya que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los parámetros característicos de respuesta a

estímulo entre los animales tratados solo con ghrelin y los tratados con ambos péptidos. (Figura 20; Tabla 12)

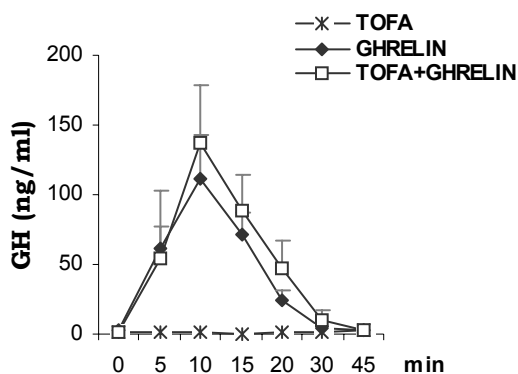


Figura 20: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración de TOFA, ghrelin o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

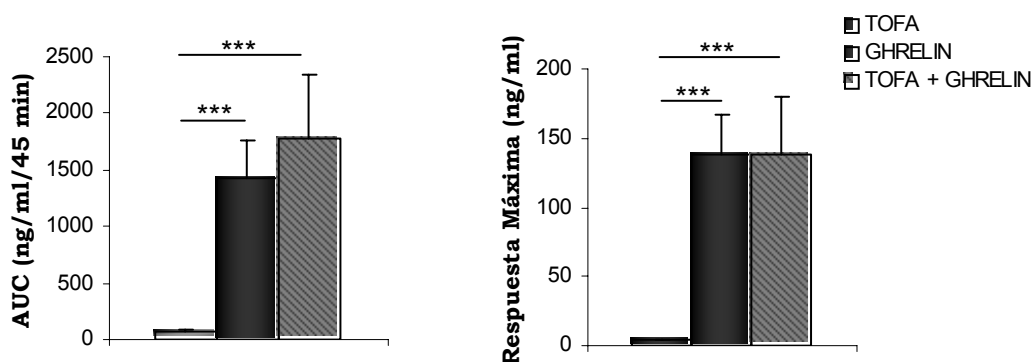


Figura 20: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de TOFA, ghrelin o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	Resp Máxima (ng/ml)
TOFA	70.55±17.38	1.40±0.21	3.60±0.98
TOFA+GHRELIN	1785.13±560.08	56.84±17.31	138.81±40.91
GHRELIN	1461.17±326.97	47.11±10.75	137.55±29.22

Tabla 12: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y TOFA. Los resultados están expresados en media ± SEM.

3.2.3 Efecto de la administración icv de **ETOMOXIR** sobre la respuesta de GH a ghrelin

❖ **ETOMOXIR:**

La administración icv de Etomoxir provoca la inhibición de la actividad de CPT-1, enzima que interviene en el paso de ácidos grasos de cadena larga (LCFAs) desde el citosol a la mitocondria para que puedan ser degradados y obtener así ATP.

Para estudiar el efecto de la inhibición de esta enzima sobre la respuesta de GH a ghrelin se establecen los siguientes grupos:

- Etomoxir icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- Etomoxir icv (10 µg/5 µl) + Ghrelin iv (10µg/200 µl)
- Salino icv (5 µl) + Ghrelin iv (10µg/200 µl)

En función de los parámetros característicos de respuesta, podemos comprobar como el grupo de animales tratados con salino icv + ghrelin iv, presentan unos valores de respuesta de GH a ghrelin típicos, con unos niveles medios de GH plasmática de 37.02 ± 10.20 ng/ml, unos niveles de GH total de (AUC) 1184.99 ± 329.23 ng/ml y con una Respuesta Máxima de 92.54 ± 26.96 ng/ml a los 10 minutos de la administración.

Mientras los animales tratados con ambos péptidos (etomoxir + ghrelin) presentan valores medios de GH y AUC muy similares a los observados en los tratados con ghrelin iv (57.11 ± 14.65 y 1860.87 ± 506.02 ng/ml, respectivamente). Tampoco hay diferencias en la Respuesta Máxima que en este caso alcanza, a los 10 minutos de la administración, valores de 124.52 ± 24.78 ng/ml.

En conjunto, comprobamos como la administración de Etomoxir icv, y por tanto la inhibición de la ruta de β -oxidación de lípidos a nivel de hipotálamo, no causa ningún efecto sobre la respuesta de GH, así como tampoco modifica el característico efecto estimulador de secreción de GH que presenta el péptido ghrelin. (Figura 21 y Tabla 13)

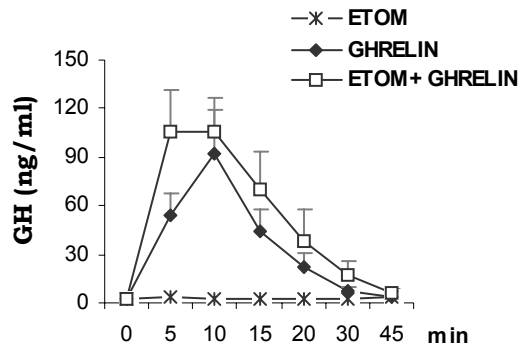


Figura 21: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración de Etomoxir, ghrelin o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo)

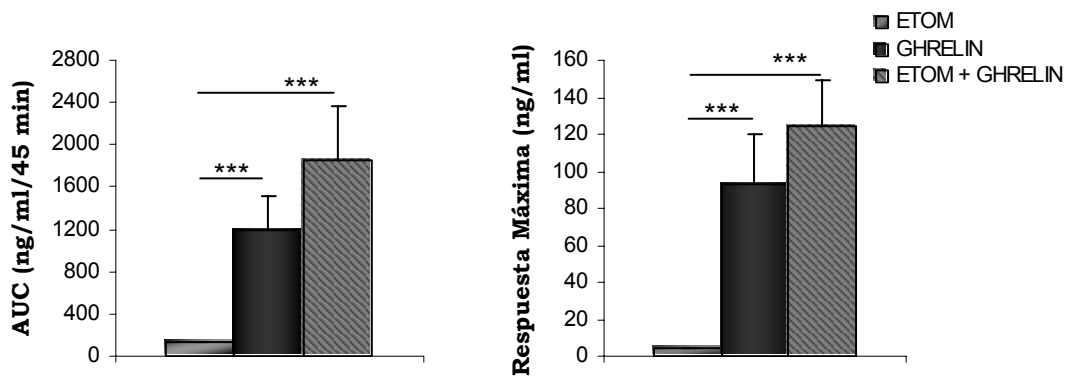


Figura 21: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Etomoxir, ghrelin o Etomoxir + ghrelin en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	Resp Máxima (ng/ml)
ETOM	130.27±11.56	2.83±0.3	3.80±0.45
ETOM+GHRELIN	1860.87±506.02	57.11±14.65	124.52±24.78
GHRELIN	1184.94±329.23	37.02±10.20	92.54±26.96

Tabla 13: Estudio de la respuesta de GH a ghrelin y Etomoxir. Los resultados están expresados en media ± SEM.

b) a GHRH3.2.4 Efecto de la administración icv de TOFA sobre la respuesta de GH a GHRH.❖ TOFA:

Con el objetivo de estudiar el efecto de la administración icv de TOFA sobre la respuesta de GH a GHRH, establecemos los siguientes grupos de animales según el tratamiento que reciban:

- TOFA icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- TOFA icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10 µg/200 µl)
- VH icv (5 µl de DMSO) + GHRH iv (10 µg/200 µl)

El hecho de administrar TOFA icv no causa ningún efecto sobre la secreción de GH (Niveles medios de secreción, AUC y Respuesta Máxima de 2.32 ± 0.57 ng/ml, 109.69 ± 0.69 ng/ml y 3.18 ± 0.53 ng/ml respectivamente).

Los animales que recibían GHRH iv presentan un aumento esperado en la secreción de GH, caracterizado por unos niveles medios de secreción de 66.12 ± 6.2 ng/ml, una Respuesta Máxima a los 10 minutos de la administración del neuropéptido de 113.24 ± 16.16 y con unos niveles totales de secreción de GH de 1761.24 ± 315.64 ng/ml.

Por su parte, los animales que recibían TOFA icv y GHRH iv, presentan unos niveles medios (50.19 ± 9.26 ng/ml), AUC (1874.64 ± 189.51 ng/ml) y Respuesta Máxima (142.86 ± 24.60) muy similares a los que se observan en los animales tratados solo con GHRH.

Estos resultados nos indican que la administración icv de TOFA, y por tanto la inhibición de la síntesis de ácidos grasos a nivel hipotalámico mediante la inhibición de ACC, no modifica el efecto estimulador que ejerce GHRH sobre la secreción de GH. (Figura 22; Tabla 14)

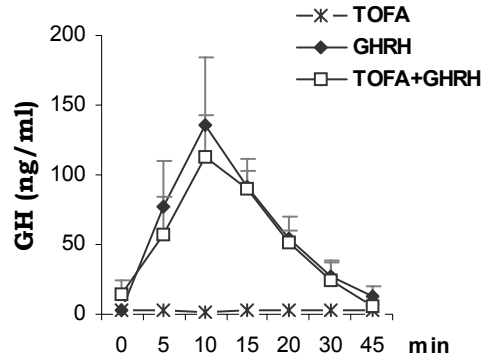


Figura 22: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración de TOFA, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

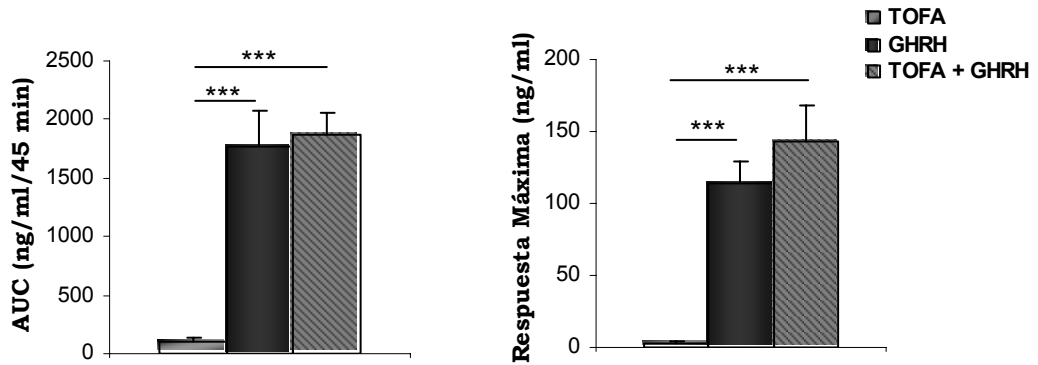


Figura 22: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng /ml) obtenidos tras la administración de TOFA, GHRH o ambos compuestos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MAX (ng/ml)
TOFA	109.69±0.69	2.35±0.57	3.18±0.53
TOFA+ GHRH	1874.64±189.51	50.10±9.26	142.86±24.60
GHRH	1761.24±315.74	66.12±6.2	113.24±16.16

Tabla 14: Estudio de la respuesta de GH a GHRH y TOFA. Los resultados están expresados en media ± SEM.

3.2.5 Efecto de la administración icv de **ETOMOXIR** sobre la respuesta de GH a GHRH

❖ **ETOMOXIR:**

Para analizar el efecto de la administración icv de Etomoxir sobre la respuesta de GH a GHRH partimos de los siguientes grupos experimentales:

- Etomoxir icv (10 µg/5 µl) + Salino 200 µl
- Etomoxir icv (10 µg/5 µl) + GHRH iv (10µg/200 µl)
- Salino icv (5 µl) + GHRH iv (10µg/200 µl)

Siguiendo el protocolo de respuesta y analizando los parámetros característicos de ésta, obtenemos los siguientes resultados:

- La administración icv de Etomoxir no tiene ningún efecto sobre la secreción de GH.
- La administración de GHRH iv causa un esperado aumento de la secreción de GH, con unos niveles totales de GH plasmática de 1326.89 ± 406.39 ng/ml, una secreción media de 40.51 ± 12 ng/ml y alcanzando la Respuesta Máxima (119.48 ± 40.23 ng/ml) a los 10 minutos de la administración del neuropéptido.
- La administración conjunta de Etomoxir icv y GHRH iv provoca un efecto sobre la secreción de GH similar al ejercido por GHRH: niveles medios de GH de 38.96 ± 9.82 ng/ml, AUC de 1292.96 ± 380.21 ng/ml y la Respuesta Máxima, a los 10 minutos, de 85.89 ± 19.26 ng/ml.

El hecho de que no se observen diferencias estadísticamente significativas, en ninguno de los parámetros estudiados, entre los animales tratados con GHRH y los tratados con Etomoxir y GHRH nos indica que la administración de Etomoxir icv, y por tanto la inhibición de la ruta de B-oxidación de ácidos grasos a nivel hipotalámico, no modifica el efecto estimulador de secreción de GH ejercido por la administración iv de GHRH.

(Figura 23; Tabla 15)

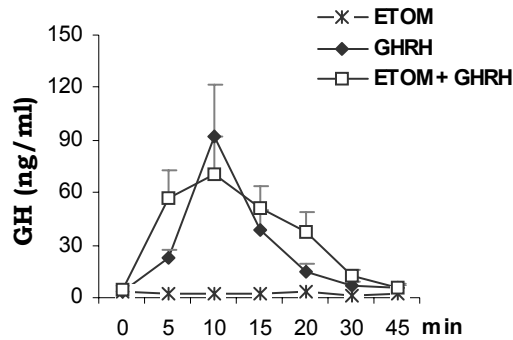


Figura 23: A. Niveles plasmáticos de GH expresados como media±SEM después de la administración de Etomoxir, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo).

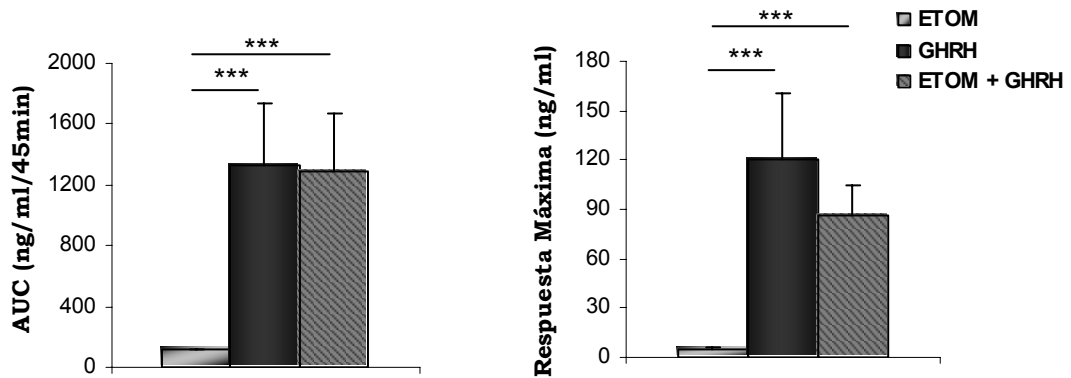


Figura 23: B. Área bajo la curva (AUC) y Respuesta Máxima de niveles de GH (ng/ml) obtenidos tras la administración de Etomoxir, GHRH o ambos en ratas adultas en movimiento libre. (n = 7/grupo). *p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

	AUC (ng/ml/45 min)	MEDIA (ng/ml)	RESP. MÁX (ng/ml)
ETOM	112.51±15.42	2.57±0.36	4.73±0.88
ETOM+ GHRH	1292.96±380.21	38.96±9.82	85.89±19.26
GHRH	1326.89±406.39	40.51±12	119.98±40.23

Tabla 15: Estudio de la respuesta de GH a G HRH y Etomoxir. Los resultados están expresados en media ± SEM.

IV. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE GHRELIN A NIVEL CENTRAL SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO.

Recientemente se ha descrito como la administración de ghrelin a nivel central ejerce un importante papel en la regulación del metabolismo periférico (313). En concreto, promueve lipogénesis e inhibe la oxidación de lípidos en el tejido adiposo.

Teniendo en cuenta que ghrelin es un secretagogo de GH y que esta hormona tiene una gran importancia a nivel de metabolismo nos propusimos comprobar si en ese efecto adipogénico de ghrelin estaba implicada la hormona de crecimiento.

Para ello utilizamos ratas macho Lewis deficientes en GH (*dwarf*) y Lewis wt, que usamos como control. El tratamiento se realiza mediante una bomba osmótica subcutánea conectada a nivel central mediante una cánula icv.

Establecemos los siguientes grupos:

- *Lewis* + Ghrelin (20 µg/día durante 8 días)
- *Lewis* + Salino (20 µl/día durante 8 días)
- *dwarf* + Ghrelin (20 µg/día durante 8 días)
- *dwarf* + Salino (20 µl/día durante 8 días)

Todos los animales se pesan, al igual que la comida, durante los 8 días que dura el experimento.

➔ Lewis wt

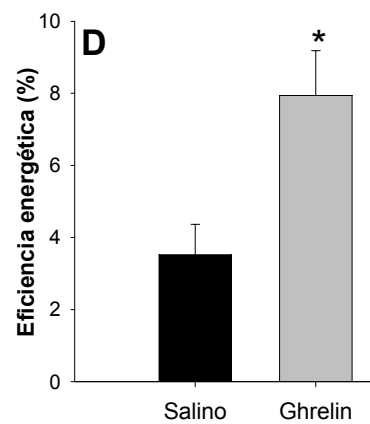
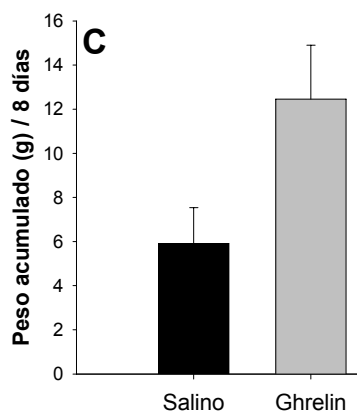
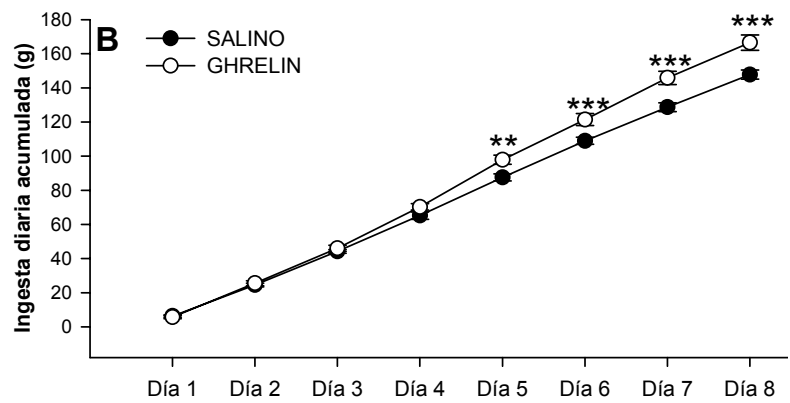
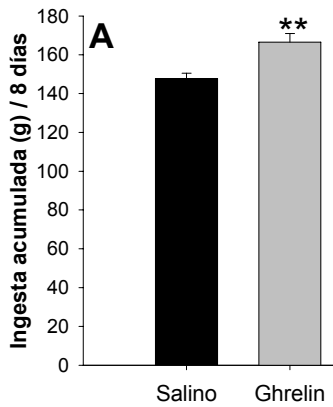
➤ Efecto sobre la ingesta y el peso corporal.

La administración crónica de ghrelin a nivel central (20 µg/día) provoca el aumento de la ingesta y el peso corporal en las ratas Lewis normales.

Así, comprobamos que la ingesta acumulada es mayor en los animales tratados con ghrelin que en los que reciben salino, y comparando la ingesta acumulada diaria vemos que esa diferencia es estadísticamente significativa a partir del 5º día de tratamiento.

El aumento en la ingesta va acompañado de un incremento en la ganancia de peso corporal, con una mayor eficiencia energética (* $p < 0.05$), en los animales tratados con ghrelin respecto de los tratados con salino.

En función del Índice Somático y de la cantidad total de tejido adiposo vemos que las ratas Lewis tratadas con ghrelin presentan una mayor cantidad de WAT, aunque no estadísticamente significativa; en concreto poseen un mayor porcentaje (* $p < 0.05$) de tejido adiposo omental y visceral.



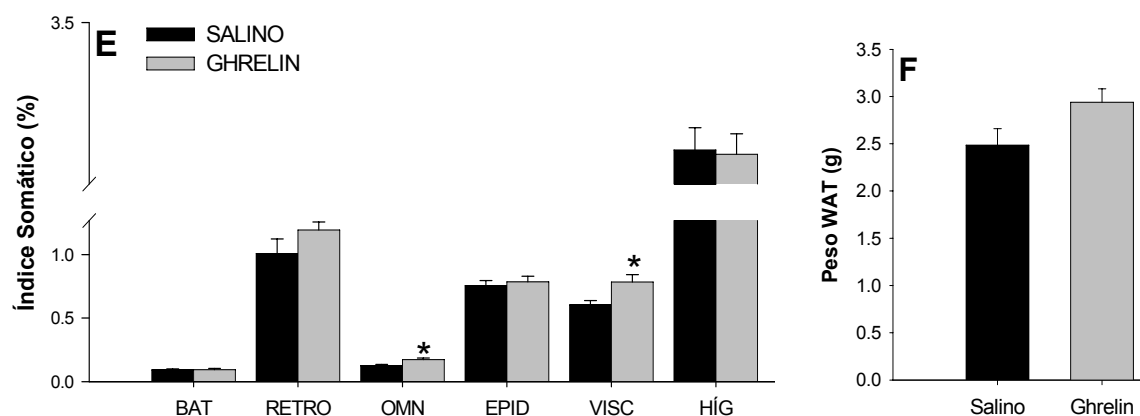


Figura 24: Ingesta (A y B) y peso acumulado (C) durante el tratamiento crónico con ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{día}$) o VH (20 μl salino/ día) a nivel central en ratas macho *Lewis*. D. Eficiencia energética. E. Índice somático (BAT- tejido adiposo pardo, RETRO- retroperitoneal, OMN- omental, EPID- epididimal, VISC- visceral, Híg- Hígado), F. Suma de WAT (retroperitoneal, epididimal, visceral y omental).

Siendo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

➤ Efecto sobre parámetros plasmáticos.

La administración crónica de ghrelin a nivel central causa el aumento (***) $p < 0.001$) de los niveles de ghrelin plasmáticos en las ratas *Lewis*, mientras que los niveles de glucosa e insulina no varían respecto de los tratados con salino y que usamos como control de tratamiento.

	SALINO	GHRELIN
Ghrelin (ng/ml)	1.02 \pm 0.11	1.93 \pm 0.15 ***
Insulina (ng/ml)	1.19 \pm 0.15	1.35 \pm 0.08
Glucosa (mg/dl)	85.08 \pm 2.69	91.96 \pm 2.71

Tabla 16: Niveles plasmáticos (media \pm SEM) de ghrelin total, glucosa e insulina, en ratas *Lewis* tras la administración continua de ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{día}$) o VH (20 μl salino/ día) a nivel central. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

➤ **Efecto sobre el metabolismo lipídico en WAT.**

Mediante RT-PCR a tiempo real podemos comprobar como la administración crónica de ghrelin a nivel central aumenta, de forma estadísticamente significativa, los niveles de mRNA de enzimas que promueven adipogénesis tales como $ACC\alpha$, FAS, SCD-1 y MCD. En el caso de CPT-1M, aunque se observa aumento en los niveles de expresión en los animales tratados con ghrelin estas diferencias no son estadísticamente significativas.

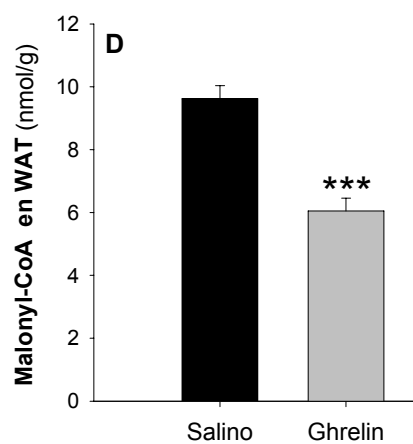
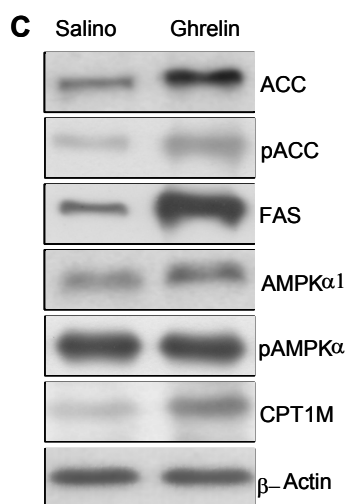
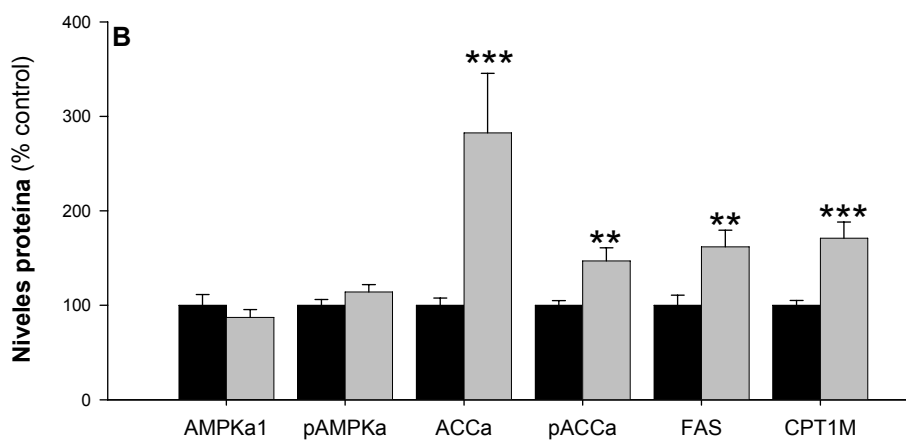
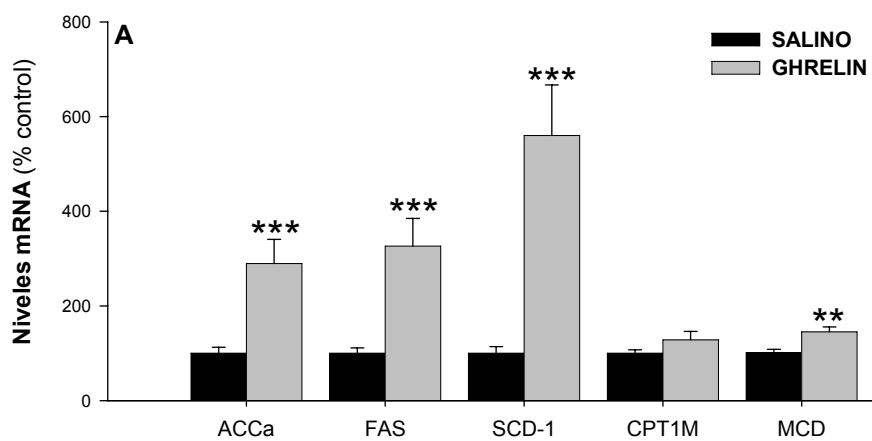
Mediante WB, observamos que la administración crónica de ghrelin causa los siguientes efectos:

- Los niveles de $AMPK\alpha1$ y pAMPK (la forma activa) no varían.
- Los niveles de $ACC\alpha$, p $ACC\alpha$, FAS y CPT-1M aumentan de forma estadísticamente significativa.

Al igual que en los niveles de mRNA y proteína, la administración crónica de ghrelin a nivel central incrementa la actividad enzimática de ACC, FAS, MCD y CPT-1, siendo este aumento estadísticamente significativo en el caso de FAS, MCD y CPT-1.

La actividad enzimática de G6PDH y 6PGDH aumenta ($p < 0.01$) tras el tratamiento con ghrelin.

En concordancia con el aumento observado en la actividad de FAS, MCD y CPT-1, los niveles de Malonyl-CoA son menores en el grupo tratado con ghrelin, con un grado de significación ($***p < 0.001$).



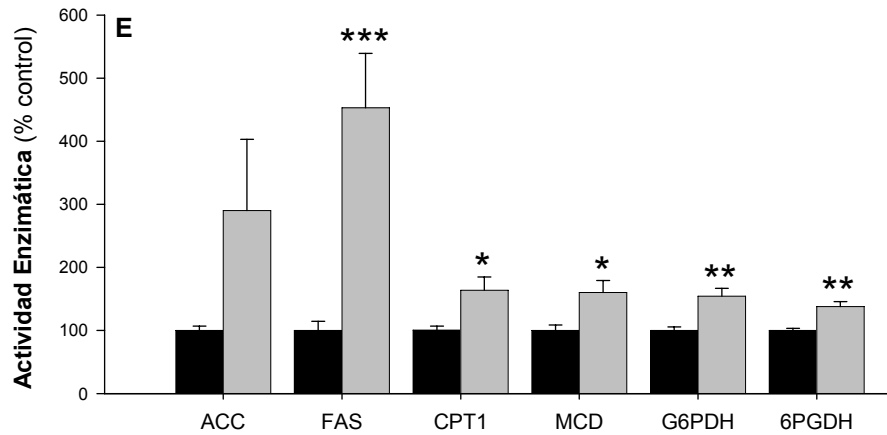


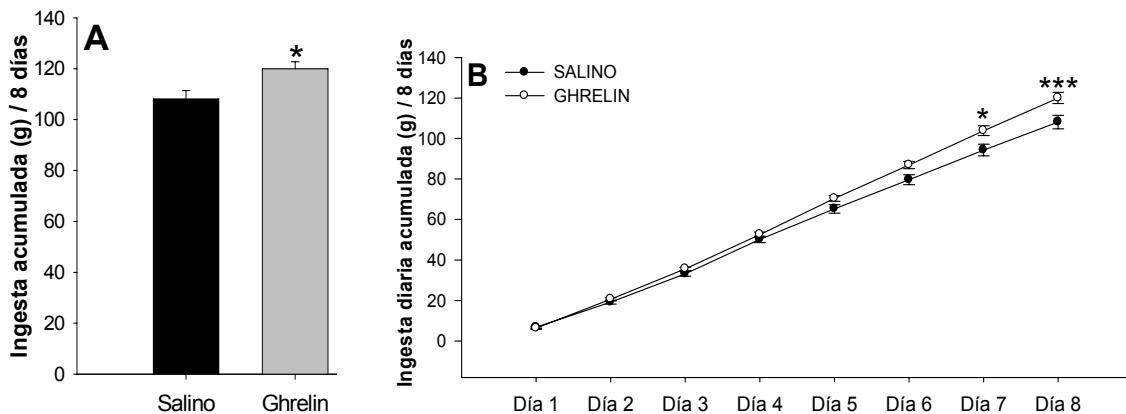
Figura 25: Efecto del tratamiento crónico de ghrelin icv en ratas Lewis normales sobre los niveles de mRNA (A), proteína (B y C) y actividad enzimática (E) de distintos enzimas implicados en el metabolismo de lípidos. D. niveles de Malonyl-CoA (nmol/g) en WAT.

Siendo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

➤ Lewis deficientes en GH (*dwarf*)

➤ Efecto sobre la ingesta y el peso corporal.

Al igual que sucede con las ratas Lewis normales, la administración crónica de ghrelin icv a ratas Lewis deficientes en GH causa aumento de la ingesta, del peso corporal y de la eficiencia energética en comparación con el grupo tratado con salino. Sin embargo, no se observan diferencias entre los dos grupos en cuanto a la cantidad de tejido adiposo total acumulado, ni en ninguno de los depósitos en particular.



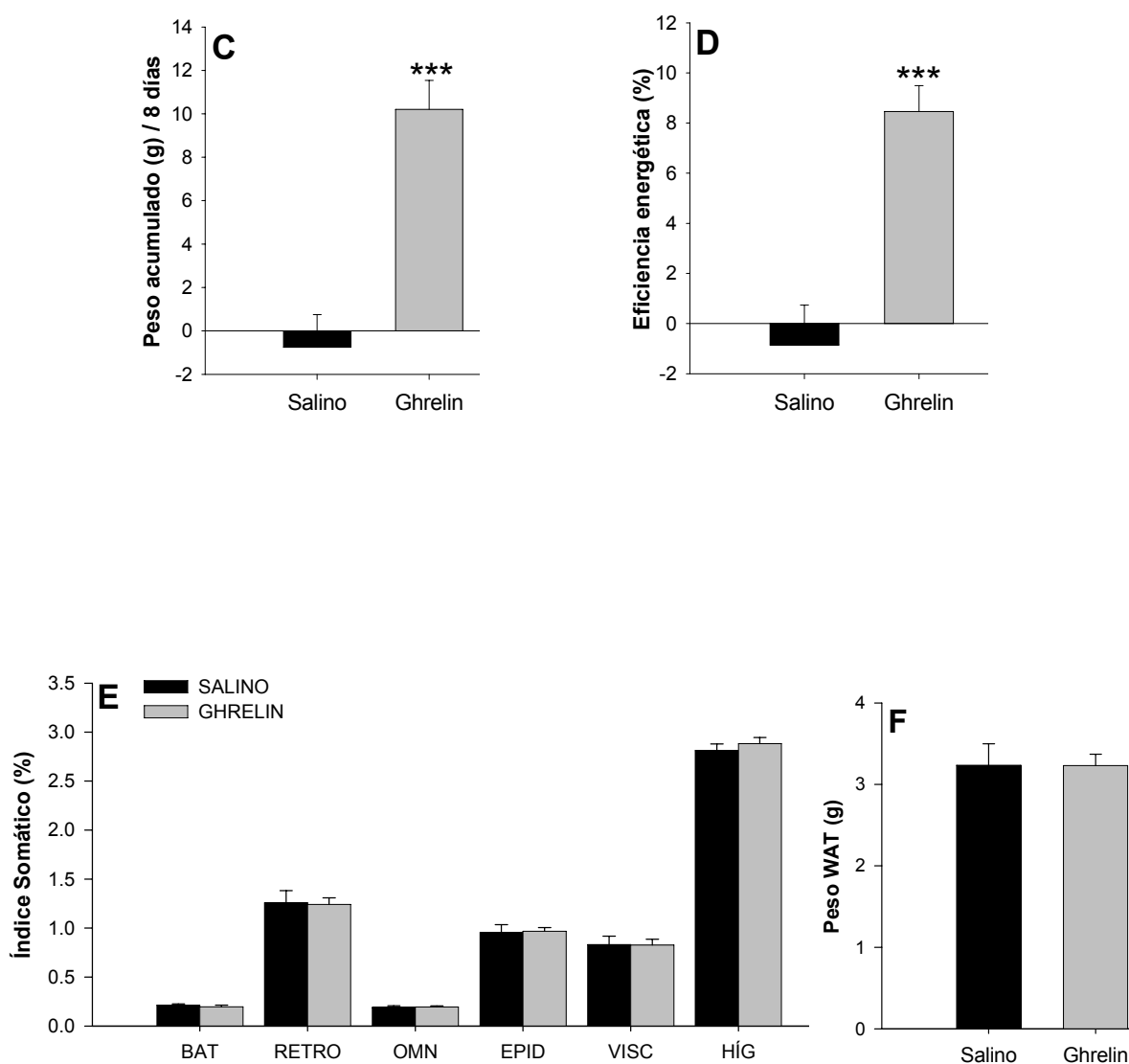


Figura 26: Ingesta (A y B) y peso acumulado (C) durante el tratamiento crónico con ghrelin a nivel central en ratas macho *dwarf*. Ghrelin (20 µg/día) o VH (20 µl salino/día) durante 8 días. D. Eficiencia energética. E. Índice somático (BAT- tejido adiposo pardo, RETRO- retroperitoneal, OMN- omental, EPID- epididimal, VISC- visceral, Híg- Hígado), F. Suma de WAT (retroperitoneal, epididimal, visceral y omental).

Siendo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

➤ **Efecto sobre parámetros plasmáticos.**

La administración crónica de ghrelin causa el aumento, de forma estadísticamente significativa, de los niveles de ghrelin, insulina y glucosa en las ratas *dwarf*.

	SALINO	GHRELIN
Ghrelin (ng/ml)	1.04 ± 0.04	1.99 ± 0.18 ***
Insulina (ng/ml)	0.83 ± 0.10	1.24 ± 0.11 **
Glucosa (mg/dl)	92.03 ± 2.81	102.78 ± 4.18 *

Tabla 17: Niveles plasmáticos (media ± SEM) de ghrelin total, glucosa e insulina, en ratas *dwarf* tras la administración continua de ghrelin (20 µg/día) o VH (20 µl salino/día) a nivel central. * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

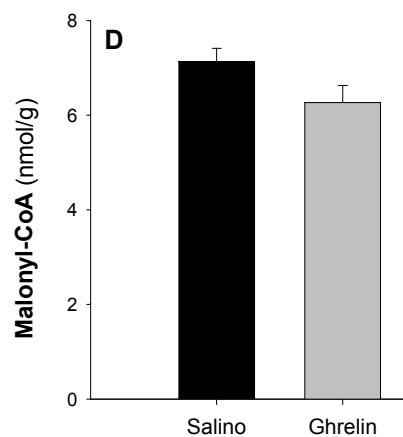
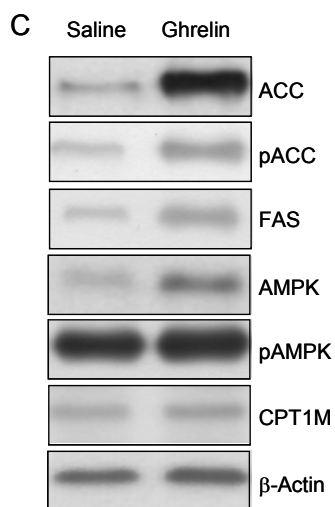
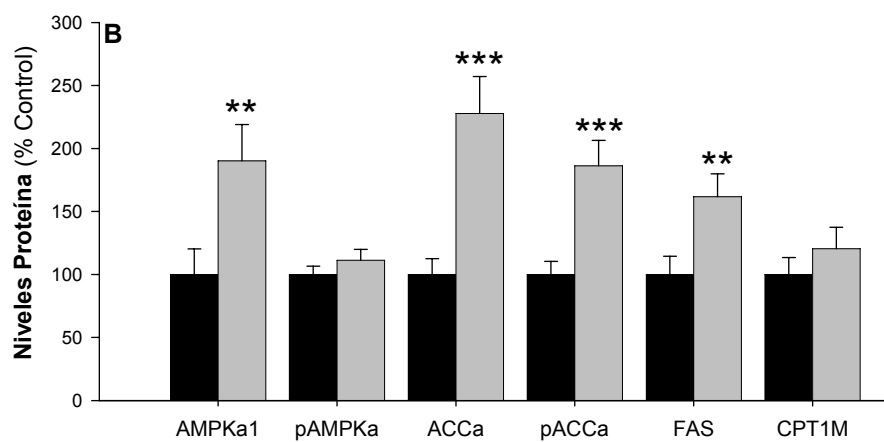
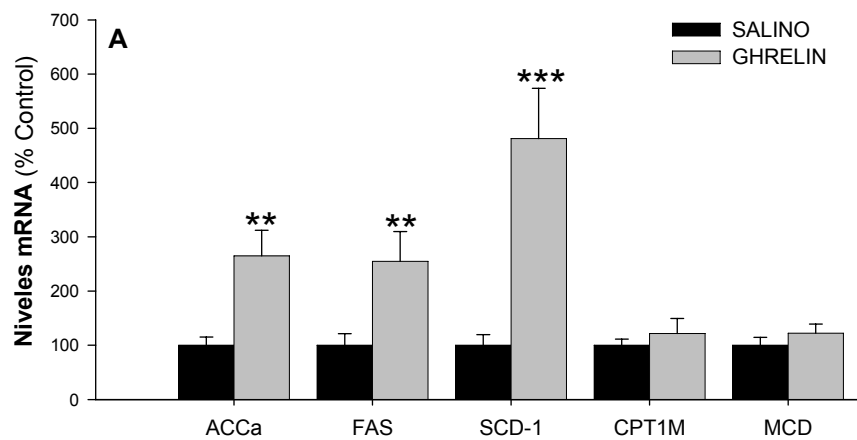
➤ **Efecto sobre el metabolismo lipídico en WAT.**

La administración crónica de ghrelin a nivel central en ratas *dwarf* nos permite evaluar el efecto de ghrelin sobre el metabolismo de lípidos en ausencia de GH. Para ello medimos en estos animales los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática de distintos enzimas implicados tanto en la síntesis como en la oxidación de lípidos.

La administración de ghrelin causa el aumento en la expresión (mRNA) de ACC α , FAS y SCD-1 respecto de los control, de forma estadísticamente significativa, mientras que no varían los niveles de expresión de CPT-1M y MCD.

En cuanto a los niveles de proteína, en las ratas *dwarf* tratadas con ghrelin observamos el aumento en los niveles de AMPK α 1, ACC α , pACC α y FAS, mientras que pAMPK α y CPT-1M no varían.

La actividad enzimática de ACC, FAS, MCD, CPT-1, G6PDH y 6PGDH aumentan de forma significativa en los animales tratados con ghrelin respecto de los control. Mientras que los niveles de Malonyl-CoA no varía en función del tratamiento.



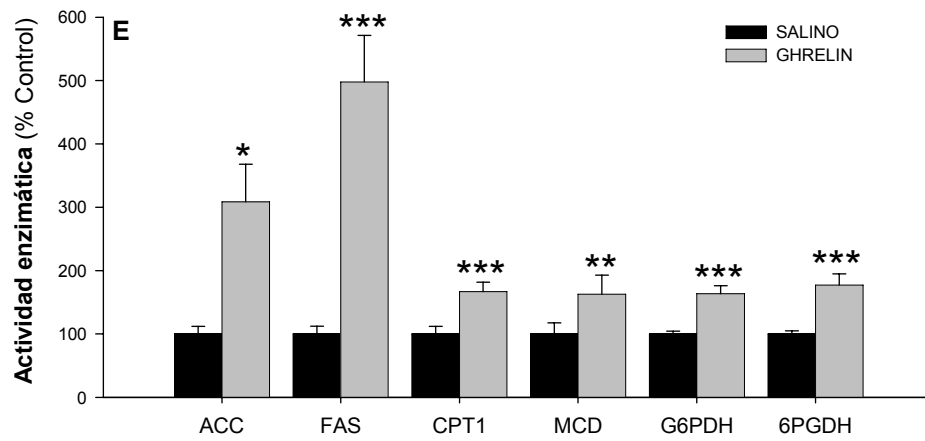


Figura 27: Efecto del tratamiento crónico de ghrelin icv en ratas *dwarf* sobre los niveles de mRNA (A), proteína (B y C) y actividad enzimática (E) de distintos enzimas implicados en el metabolismo de lípidos. D. niveles de Malonyl-CoA (nmol/g) en WAT. Siendo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

DISCUSIÓN

PEPTIDOS DERIVADOS DEL GEN GHRELIN EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA Y LA SECRECIÓN DE GH

El péptido ghrelin, inicialmente identificado por el grupo de Kojima *et al* a partir de extractos gástricos de rata, se expresa mayoritariamente en las células X/A de la mucosa del *fundus* desde donde pasa al torrente sanguíneo, aunque también se puede encontrar en menor proporción en otros tejidos (90;92).

La forma acilada (ghrelin) se caracteriza por la presencia de un ácido graso en la Ser 3, unión que realiza una enzima recientemente identificada, GOAT. Sin embargo, según el número de aa (27 ó 28) y el ácido graso incorporado (octanoico, decanoico, ...) puede dar lugar a distintas formas moleculares. De las posibles, la forma más activa consta de 28 aa y un grupo octanoico (175). La peculiaridad de estar acilada es importante dado que parece ser necesaria para que se una al receptor GHS-R1a (389), a través del cual desempeña numerosas funciones (172;173;268).

Dos de las principales acciones de ghrelin son la regulación de la ingesta (269;274) y la secreción de GH (91;172). En este sentido, se ha comprobado que posee un potente efecto orexigénico, determinando no solo el inicio de la ingesta sino también la cantidad de alimento ingerido (207), y además actúa como secretagogo de GH.

Teniendo en cuenta que del mismo gen *ghrelin* mediante *splicing* alternativo y modificaciones postraduccionales se obtienen distintos péptidos (175;176), nos planteamos estudiar el papel de algunas de estas formas en la regulación de la ingesta y de la secreción de GH. En concreto, analizamos el propio ghrelin, ghrelin deleccionado en el exón 4 (GHR-d4), ghrelin deleccionado en el exón 3 (GHR-d3), ghrelin desacilado (UAG) y obestatina.

Regulación de la ingesta

Tanto en humanos como en roedores la administración de ghrelin causa un significativo aumento de la ingesta; este efecto orexigénico se ha comprobado además, en el caso concreto de roedores, tras la administración por distintas vías (icv, ip, iv o sc) (30;269;274).

Uno de los péptidos que se obtienen a partir del gen de ghrelin es el resultado de la delección del exón 3 (GHR-d3), que se ha identificado en muestras humanas de cáncer de mama y próstata (182), y que presenta un homólogo murino con delección del exón 4 (GHR-d4) (183).

Mediante la administración icv de GHR-d4, ghrelin o ambos péptidos comprobamos como mientras la administración de ghrelin causa un característico aumento de la ingesta, la administración de una dosis similar de GHR-d4 no causa ningún efecto ni tampoco modifica el efecto orexigénico de ghrelin.

La forma desacilada (UAG) está caracterizada por la ausencia del grupo octanoico en la Ser3 (175). Esto impide la unión de UAG al receptor típico de ghrelin, GHS-R1a, lo cual llevó a pensar que UAG no causaba ningún efecto sobre la ingesta. Sin embargo, existen al respecto datos controvertidos dependiendo especialmente de las condiciones experimentales.

El grupo de Toshinai *et al*/ sugiere que UAG administrado icv posee efecto orexigénico y que este, mediado probablemente por las orexinas, es independiente de GHS-R1a (360).

Otros trabajos consideran que UAG administrado a nivel central o periférico (ip) posee efecto inhibitor de la ingesta (363;364), llegando incluso a causar un balance energético negativo con descenso del peso corporal y de la cantidad de grasa acumulada, en caso de sobreexpresión (258).

Pero también existen trabajos realizados en ratas y en ratones en los que se observa que la administración ip de UAG, tanto en condiciones *fed* como *fasting*, no causa

ningún efecto sobre la ingesta (362). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de UAG en ratones no varía ni la ingesta ni el peso corporal respecto de los wt (372).

En este sentido apuntan también nuestros resultados. Mediante la administración icv de ghrelin, UAG o ambos a ratas en condiciones de alimentación *ad libitum* y durante la fase de luz, comprobamos como la administración de UAG no causa por si solo ningún efecto sobre la ingesta ni modifica el efecto orexigénico de ghrelin: mientras la administración icv de ghrelin causa un potente efecto orexigénico a corto plazo, la administración de la misma dosis de UAG no causa ningún efecto (la ingesta en este grupo no se diferencia de la observada en el grupo control). Además, a diferencia de lo observado por otros grupos (366), la administración conjunta a nivel central de UAG y ghrelin, no antagoniza el efecto orexigénico de ghrelin.

Estas discrepancias pueden ser debidas a las distintas condiciones experimentales tales como fase de ciclo luz/oscuridad en la que se realizan los experimentos así como en la distinta vía de administración utilizada.

Basado en una prueba bioinformática, en el 2005 el grupo de Zhang *et al* identificó dos posibles lugares de corte en el precursor de proghrelin que podían dar lugar a una proteína de 23 aa, que posteriormente aislaron de extractos de estómago de rata, y que estaba caracterizada por poseer efectos antagónicos a ghrelin, de ahí que la denominaran **obestatina**. Este trabajo sugería que la obestatina sintética administrada ip o icv en ratones disminuía la ingesta, el vaciado gástrico y el peso corporal, de una forma aguda y dosis dependiente, mediante la unión a lo que se consideraba su receptor GPR39. A pesar del descenso del peso corporal, no observaban cambios en los niveles de leptina circulantes (180).

Sin embargo, datos publicados por Nogueiras *et al*, entre los que se incluyen los datos mostrados en esta tesis, y en los que se sigue de forma estricta todas la condiciones experimentales del artículo original de Zhang *et al* (180) -protocolo de disolución de la hormona, dosis, vía de administración etc- no consiguen replicar esos resultados. En este caso, la administración central y periférica de la misma dosis de obestatina (procedente de tres suministradores distintos) en ratas y ratones, y en fase de luz y

oscuridad, no causa ningún efecto sobre la ingesta, el peso corporal o el vaciado gástrico. Además se observó, mediante la administración conjunta de ambos péptidos, que la obestatina no modifica el efecto de ghrelin sobre estos parámetros (390).

Aunque algunos trabajos posteriores publicaron datos parecidos al artículo original (318;391-394), muchos otros no consiguieron reproducir esos resultados (383;385;387;395-397). No solo no observaban ningún efecto de la obestatina sobre la ingesta sino que tampoco encontraban ninguna variación en la ingesta estimulada por ghrelin o por ayuno (398), independientemente de las dosis usadas, de la vía de administración, duración de los tratamientos, estado de *fed* o *fasting/refeeding* o incluso de la especie utilizada.

En este sentido se comprobó, además, que la administración icv de obestatina no modificaba la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos clave en la regulación de la ingesta tales como NPY/AgRP o POMC/CART (318).

Dada la controversia entorno al papel de la obestatina en el control del balance energético y en la regulación de la ingesta en particular, tratamos ratas macho con obestatina/vehículo vía intracerebroventricular una vez al día, durante 5 días, y cuantificamos la cantidad de comida ingerida a distintas horas y el peso de cada rata una vez al día, lo que nos permitiría diferenciar un posible efecto del péptido a corto y/o a largo plazo, tanto en la regulación de la ingesta como del peso corporal.

En concordancia con la mayoría de publicaciones al respecto, nosotros no observamos ningún efecto sobre la ingesta tras la administración de obestatina icv (5 µg/10 µl) en comparación con los tratados con vehículo. Así, el tratamiento con obestatina durante cinco días, no causa ningún efecto sobre la ingesta acumulada a ninguna de las distintas horas en las que la comida fue testada (1,5, 3, 6 y 12), descartando un posible efecto tanto a corto como a largo plazo. Incluso, cuando los animales son sometidos a ayuno nocturno, lo que nos facilitaría diferenciar un posible efecto anorexigénico, no observamos ninguna diferencia entre las ingestas acumuladas de ambos grupos. Además, durante los días que duró el tratamiento, la evolución del peso corporal fue igual en ambos grupos (datos no mostrados).

Datos publicados por Sibia *et al* corroboraron la ausencia de efecto de la administración de obestatina a largo plazo sobre la ingesta y el peso corporal, y también sobre otros parámetros relacionados con el metabolismo energético tales como composición corporal, gasto energético, actividad locomotora, coeficiente respiratorio o neuropéptidos hipotalámicos relacionados con la regulación del balance energético (318).

Un estudio reciente demuestra en humanos que los niveles de obestatina plasmática están negativamente correlacionados con el BMI, leptina, insulina y glucosa, pero positivamente con ghrelin y UAG en sujetos con obesidad o anorexia nerviosa (399). Sin embargo, si tenemos en cuenta además, que la concentración de obestatina plasmática apenas varía tras períodos de *fed/fasting/refeeding* (397), que su vida media en sangre es muy corta (400), y que la administración ip de distintas dosis de obestatina no causa ningún efecto sobre la ingesta ni la motilidad gástrica en ratones *ghrelin*^{-/-} (descartando un posible enmascaramiento del efecto de la obestatina por el ghrelin endógeno), todo apunta a que la obestatina no participa en la regulación de la ingesta, poniendo incluso en duda su papel como hormona circulante (401).

A pesar de que la obestatina parece que no ejerce el papel inicialmente publicado en la regulación de la ingesta y del peso corporal, a lo largo de los últimos años se le han atribuido distintas funciones, algunas de las cuales también contradictorias.

Mientras que no hay nada descrito sobre el papel de la obestatina en el metabolismo de lípidos, si se ha relacionado con el metabolismo de glucosa ya que algunos estudios realizados en humanos sugieren un descenso en los niveles de obestatina en relación con el deterioro de la regulación de la glucosa y la DMII (399;402). En este sentido, se ha detectado expresión de la obestatina en células de islotes pancreáticos, aunque el efecto de ésta sobre la secreción de glucosa e insulina no está muy claro: la administración ip de obestatina en ratones alimentados, pero no en ayuno, inhibe la ingesta, reduce la glucosa y la respuesta de la insulina (403;404); en ratas anestesiadas, la administración iv de obestatina reducía la respuesta de la insulina tras un bolo intravenoso de glucosa (405); la administración iv de obestatina no tiene ningún efecto sobre la concentración de glucosa e insulina, ni a nivel de circulación

portal ni sistémica (406); bajo condiciones basales, la administración de obestatina no afecta a la concentración de insulina o glucosa, mientras que inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa *in vivo* y en islotes pancreáticos aislados (405). Estas discrepancias pueden ser explicadas mediante diferencias entre especies, un distinto método de administración, el uso de diferentes dosis de obestatina y glucosa, así como por usar obestatina de distintas casas comerciales.

Los efectos *in vitro* de la obestatina sobre el metabolismo de glucosa también son controvertidos: la incubación de islotes pancreáticos aislados de rata y de ratón con una concentración de glucosa constante indica que la obestatina inhibe la secreción de insulina mientras que a concentraciones normales de glucosa la activa, y a baja concentración carece de efecto (374;405); por su parte Granata *et al* encontraron que a bajas concentraciones de glucosa la obestatina potencia la secreción de insulina inducida por glucosa en islotes pancreáticos humanos (407); la administración de obestatina en páncreas perfundido aumenta la liberación de insulina inducida por glucosa mientras que la inhibe si es administrada a altas dosis (408); de forma similar, Unniappan *et al* muestran que la obestatina no tiene efecto sobre la secreción de insulina en islotes de ratón incubados en presencia de altos niveles de glucosa (404). Esto sugiere que los niveles de glucosa condicionan el efecto de la obestatina sobre la secreción de insulina a nivel pancreático.

Por otro lado, se ha publicado que la administración icv de obestatina disminuye la cantidad de agua bebida en ratas *ad libitum*, para agua y comida, en comparación con ratas deprivadas de ambas cosas. Además, mediante experimentos *in vitro*, se ha comprobado que la obestatina activa zonas cerebrales implicadas en la regulación de la sed. Estos autores proponen que el efecto anorexigénico que observaban en la obestatina podría ser debido a su acción inhibidora sobre la cantidad de agua ingerida (395).

En cuanto a la función de obestatina sobre la motilidad del tracto gastrointestinal también hay discrepancias. Algunos trabajos, *in vivo* e *in vitro*, sugieren que la obestatina suprime el vaciado gástrico, disminuye la actividad contráctil del yeyuno antagonizando los efectos de ghrelin, y que este efecto inhibitorio puede estar

mediado por neuronas POMC y receptores CRF en el cerebro (observado en ratas *fed* conscientes) (180;409), mientras que otros trabajos realizados en roedores en los que la obestatina, administrada por distintas vías (ip, iv o icv) y en un amplio rango de dosis, parece no afectar al vaciado gástrico ni a la motilidad del tracto gastrointestinal (401), al igual que tampoco modifica el efecto procinético de ghrelin (388).

También se ha relacionado a la obestatina con otras funciones: reproducción (un estudio *in vitro*, realizado en cerdos, demuestra que la obestatina puede controlar directamente la función de las células de la granulosa del ovario, estimular la proliferación y la apoptosis de estas células y la secreción de progesterona (410); proliferación celular (induce proliferación celular de forma dosis dependiente mediante la fosforilación de MEK/ERK 1/2 (411), promueve la *supervivencia* de islotes pancreáticos mediante incremento de cAMP y la ruta AC/cAMP/PKA (407), pero sin embargo puede inhibir la proliferación y diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 de forma contraria al efecto de ghrelin), memoria, ansiedad, sueño o viabilidad celular (356).

Regulación de la secreción de GH

Otra de las principales características de ghrelin es su potente efecto secretor de GH, efecto que ha sido comprobado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*, en humanos y roedores, así como en otras especies (91;259-261).

El efecto de ghrelin sobre las somatotropas, causando la síntesis y liberación de GH, parece ser dependiente de su unión al receptor GHS-R1a (262), y está caracterizado por ser potente, específico, dosis dependiente y sinérgico con el efecto de GHRH. Aunque actúa como secretagogo tras ser administrado a nivel central o periférico ejerce mayor efecto a nivel iv (412).

Para comprobar si alguno de los otros péptidos que se obtienen del gen *ghrelin* posee algún efecto sobre la secreción de GH utilizamos el protocolo de repuesta a estímulos.

Esto nos permitiría comprobar no solo si estimulaba o no la secreción de GH, sino también si modificaba la respuesta de GH a ghrelin.

Nuestros resultados nos indican que ni **GHR-d4**, ni **GHR-d3**, poseen ningún efecto sobre la secreción de GH, así como tampoco modifican la respuesta de GH a ghrelin.

Mientras la administración iv de 10 µg de ghrelin causa un aumento en la secreción de GH característico, alcanzando la Respuesta Máxima a los 10 minutos de la administración y descendiendo a valores basales a los 30 minutos, la administración de GHR-d4 o GHR-d3 no causa ningún efecto sobre los niveles de GH. Además, la administración conjunta de ambos péptidos no se diferencia de modo estadísticamente significativo respecto del grupo tratado con ghrelin en ninguno de los tres parámetros estudiados -AUC (Área Bajo la Curva), Respuesta Máxima y Media-, lo que nos indica que no modifican la respuesta de GH a ghrelin.

Es decir, no detectamos ningún efecto sobre la ingesta y la secreción de GH tras la administración icv e iv, respectivamente. Esto nos sugiere que GHR-d4, al igual que su homólogo humano GHR-d3, no poseen ningún papel directo sobre la regulación de la homeostasis energética y la secreción de GH, ni tampoco indirectamente por interacción con ghrelin.

A pesar de los trabajos que sugieren que **UAG** posee funciones biológicas (335;359;360), en muchos casos antagónicas a las de ghrelin, y que no todas las acciones de ghrelin están mediadas por el receptor GHS-R1a, la activación de este receptor parece esencial para mediar el efecto de ghrelin sobre la secreción de GH (266;288). Por tanto cabía esperar que UAG, que no puede activar GHS-R1a, no tuviera efecto secretor de GH tal y como indican nuestros resultados.

La administración iv en ratas macho en libre movimiento de **UAG** (incluso a una dosis muy superior a la que es efectiva en el caso de ghrelin) nos permitió comprobar que UAG no ejerce ningún efecto sobre la secreción de GH. Además, la administración conjunta de ambos péptidos (UAG y ghrelin) da lugar a unos parámetros de secreción característicos del péptido ghrelin, alcanzando la Respuesta Máxima a los 10 minutos y

recuperando los niveles basales a los 30 minutos de la administración. Esto nos indica que UAG no solo no posee ningún efecto sobre la secreción de GH, sino que tampoco modifica el efecto estimulador de GH por parte de ghrelin.

Sin embargo, a pesar de la ausencia de efecto de UAG sobre la secreción de GH, se ha demostrado su participación en la regulación del eje gonadotropo ya que causa el mismo efecto que ghrelin sobre la secreción de LH. Así, cuando se administra UAG de forma aguda y repetida a ratas macho adultas en libre movimiento es capaz de suprimir parcialmente la activación del eje gonadotropo en la pubertad, como se evidencia mediante un descenso en los niveles de LH y el porcentaje de separación balanoprepucial, similar al observado en los grupos tratados con ghrelin (335).

A diferencia de lo que sucedía en la regulación de la ingesta, la mayoría de trabajos publicados coinciden en que la **obestatina** carece de efecto sobre la secreción de GH: estudios realizados en roedores, *in vivo* e *in vitro*, demuestran que la administración de obestatina no modifica los niveles basales de GH (390;391;395;396) así como tampoco modifica el efecto secretor de GH de la hexarelina (391) ni el inhibidor que ejerce la somatostatina. A pesar de esto, un estudio reciente indica que la obestatina, en determinadas condiciones, puede inhibir la acción del ghrelin exógeno sobre la liberación de GH (397), aunque faltaría por estudiar si la obestatina modula la acción sobre GH del ghrelin endógeno.

Nosotros comprobamos que la administración iv de obestatina en ratas en libre movimiento no modifica el patrón de secreción espontánea de GH y tampoco modifica el aumento en los niveles de GH causado por GHRH y ghrelin. Mediante el protocolo de pulsatilidad, con extracción de muestras cada 15 minutos durante 6 horas, no observamos cambios en ninguno de los parámetros característicos entre el grupo tratado con obestatina y el grupo control. Por otro lado, mediante el protocolo de respuesta a estímulos, comprobamos que la administración de obestatina no causa ningún efecto sobre la secreción de GH. Además, tras la administración simultánea de obestatina y ghrelin o GHRH, obtenemos el característico aumento en los niveles de GH que observamos tras la administración de cada uno de los estímulos por separado.

De acuerdo con nuestros datos se comprobó que la administración de obestatina a nivel central y periférico, en ratas macho anestesiadas, no causa ninguna modificación en los niveles plasmáticos de GH, ACTH, PRL y TSH, lo que sugiere que la obestatina no tiene ningún efecto a nivel hipofisario (396).

En definitiva, nuestros resultados no indican ningún posible papel de la obestatina sobre la regulación de la ingesta o la secreción de GH, que están reforzados por el hecho de que trabajos recientes duden de que esta hormona pueda sintetizarse en humanos, mientras otros no han conseguido detectarla ni en distintos tejidos ni circulante tanto en roedores como en humanos. Así, Bang *et al* no encontraron evidencias que sostengan que la obestatina sea un péptido circulante, en rata y en humano, o sea una hormona secretada en distintos tejidos de rata. En este estudio, inmunoensayos específicos directos al N-terminal, C-terminal y región intermedia de proghrelina (29-94) sugieren que la única forma presente era el C-ghrelina, cuyos niveles responden a *fasting/refeeding* de forma similar a ghrelina (1-28), al menos en humanos (179).

Además, Garg *et al*, consideran improbable la presencia de obestatina en humanos debido al procesamiento que debe sufrir proghrelina para generarlo (413): requiere dos cortes (en el extremo N-terminal y en el C-terminal), la digestión *in vitro* de proghrelina con distintas prohormona convertasas (PC; enzimas que intervienen en el procesamiento de ghrelina) no dan lugar a obestatina, los posibles puntos de corte propuestos para dar lugar a obestatina son inespecíficos y poco probables teniendo en cuenta la secuencia de aa y las señales que reconen las PC (corte por el extremo C-terminal de una secuencia aa dibásica), y en primates, además, se ha detectado un cambio de aa (Arginina por Glutamina) en la posición 75, que sugiere que estas especies no sintetizan obestatina. El hecho de que no se conserve evolutivamente puede indicar que no ejerce un papel vital (413).

PAPEL DE mTOR EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH

mTOR es una kinasa altamente conservada que ha sido propuesta como sensor energético a nivel celular, de forma que integra información de señales nutricionales, factores de crecimiento y metabolismo energético para activar, en caso de suficiencia energética, síntesis proteica, proliferación y el crecimiento celular (34;161). De hecho, se ha comprobado en células de hepatoma como la administración de GH activa rápidamente la síntesis de proteínas a través de la activación de mTOR (414). También ha sido propuesto como diana de AMPK, de forma que la activación de AMPK inhibe mTOR, pudiendo existir también la relación inversa entre ambos sensores energéticos (162).

Aunque se ha descrito la implicación de mTOR en la regulación de la ingesta existen datos contradictorios en este sentido: mientras Cota *et al* (34) proponen que mTOR media el efecto anorexigénico de la leptina y que la inhibición aguda con Rapamicina aumenta la ingesta a través de las neuronas AgRP, un estudio reciente demuestra como la activación crónica de mTOR en las neuronas POMC hace que estas pierdan su capacidad anorexigénica causando hiperfagia y obesidad, y proponen que el efecto de mTOR sobre la ingesta depende del papel que ejerza mTOR de forma específica en cada población neuronal (415).

Para comprobar si mTOR a nivel hipotalámico está implicado en la regulación de la secreción de GH lo inhibimos mediante la administración intracerebroventricular de RAPAMICINA; con esto se consigue la inhibición selectiva de uno de los dos complejos proteicos que forma mTOR, el mTORC-1, que se considera sensible a nutrientes y directamente implicado en la regulación de la ingesta y la activación de las rutas anabólicas atribuidas a mTOR (161).

En el caso de la secreción pulsátil comprobamos, mediante la extracción de muestras cada 15 minutos a lo largo de 6 horas, que los animales tratados con Rapamicina a nivel central presentan los mismos niveles de GH que los que reciben vehículo y que tomamos como control. Ninguno de los parámetros estudiados presenta diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Por otro lado, la administración de Rapamicina y ghrelin o GHRH causa una respuesta de GH similar a lo observado para cada uno de los estímulos por separado; mientras que la administración solo de Rapamicina no provoca ningún efecto sobre los niveles de GH.

Así, mediante los protocolos de pulsatilidad y respuesta a estímulos no observamos ningún efecto de la inhibición de mTOR sobre la secreción pulsátil de GH ni sobre la respuesta a ghrelin o GHRH. Esto sugiere que mTOR no posee ningún efecto sobre la secreción de GH, de forma que la posible activación /inhibición de mTOR en función de la energía disponible no regula la secreción espontánea o inducida de la hormona de crecimiento.

PAPEL DE AMPK Y METABOLISMO DE LÍPIDOS EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH.

AMPK

A nivel celular, uno de los sensores del nivel energético es AMPK, una proteína kinasa heterotrimérica que consta de una subunidad catalítica (α) y dos reguladoras (β y γ). Se activa por alteración del ratio AMP:ATP o mediante fosforilación (Thr 172) por otras kinasas (133).

Se sabe que AMPK está implicada en la regulación del balance energético de todo el organismo respondiendo a nutrientes y señales hormonales procedentes tanto del CNS como de órganos periféricos. Su papel en la regulación del peso corporal y la homeostasis energética lo desempeña a nivel periférico (hígado, tejido adiposo, músculo,...) y también central, ya que está altamente expresada en distintas regiones cerebrales (133;416). De hecho, en estado de ayuno aumenta la actividad de AMPK hipotalámica mientras que tras realimentación esta disminuye.

En concreto se había propuesto a AMPK como una diana de ghrelin; recientemente se ha confirmado que durante el *fasting* aumentan los niveles de ghrelin, cuyo efecto orexigénico está mediado por la activación de AMPK (94;417).

Teniendo esto en cuenta nos propusimos saber si en la regulación de la secreción de GH estaba implicada AMPK. Para ello recurrimos a la activación e inhibición farmacológica de AMPK, mediante la administración icv de AICAR y COMPUESTO C respectivamente, y el posterior análisis de la secreción de GH.

Mediante el protocolo de pulsatilidad comprobamos como la activación de AMPK a nivel hipotalámico no modifica la secreción espontánea de GH ya que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre los animales tratados con AICAR y los control. Lo mismo sucede con la inhibición de AMPK: las ratas tratadas con COMPUESTO C a nivel central presentan el mismo patrón de secreción espontánea de GH que las que reciben vehículo.

Para ver el papel de AMPK en la regulación de la secreción de GH mediada por ghrelin y GHRH utilizamos el protocolo de respuesta a estímulos. La activación de AMPK no causa ningún efecto sobre la secreción de GH ni modifica el efecto estimulador de GH por parte de ghrelin o GHRH, tal y como comprobamos tras la administración de AICAR y AICAR + ghrelin o GHRH. Sin embargo, la inhibición de AMPK, aunque no posee efecto por si solo sobre la secreción de GH, si consigue revertir el efecto estimulador de ghrelin y disminuye, pero no suprime, el de GHRH. Tras la administración conjunta de Compuesto C y ghrelin, se consigue inhibir completamente ($***p<0,001$) la secreción de GH típica de ghrelin, presentando valores de AUC, Respuesta Máxima y Media basales. En el caso de la administración conjunta de GHRH y Compuesto C, estos valores se diferencian de forma estadísticamente significativa ($**p<0,01$) respecto de ambos grupos: tratados solo con Compuesto C y solo con GHRH.

La secreción de GH está regulada por GHRH, SST y ghrelin. El neuropéptido GHRH actúa sobre el receptor GHRH-R activando la secreción de GH y además actúa como agonista de GHS-R1a a nivel de las somatotropas potenciando el efecto de ghrelin (418;419). La SST inhibe la secreción de GH, de forma que solo se libera GH cuando los niveles de SST son basales; este neuropéptido determina los picos de GH y la característica secreción pulsátil. Por su parte, ghrelin actúa directamente sobre las

somatotropas, mediante unión al GHS-R1a, y también a través del hipotálamo donde disminuye el efecto inhibitor que ejerce la SST e incrementa la liberación de GHRH.

Se ha comprobado que la ausencia de GHRH evita el efecto secretor de GH por parte de los secretagos tanto sintéticos (GHs) como endógeno (ghrelin): pacientes que presentan una masa tumoral que les causa disociación hipotalámico-hipofisaria conservan la capacidad de secretar GH tras la administración de GHRH mientras que no es así en el caso de los GHs y ghrelin; en ratones *ghrh*^{-/-} la administración de GHRP-2 no estimula la secreción de GH; mientras que la administración de antagonistas de GHRH bloquea la respuesta de GH a GHs en rata. Sin embargo, el efecto de GHRH sobre las somatotropas no está condicionado por el bloqueo de la acción de ghrelin. Esto sugiere que el efecto de ghrelin sobre las somatotropas está condicionado por un factor hipotalámico, que puede ser GHRH.

El efecto estimulador de GH por parte de ghrelin, al igual que sucedía con el efecto orexigénico, está mediado por AMPK, ya que si bloqueamos esta vía a nivel hipotalámico bloqueamos el efecto de ghrelin. Teniendo en cuenta que es necesaria la presencia de GHRH, y que esta a su vez está regulada por SST, nos lleva a pensar que la inhibición de AMPK supone el aumento de la actividad de SST, bien por mayor expresión o por aumento de la sensibilidad a este neuropéptido, que provoca inhibición de GHRH y por tanto el bloqueo del efecto de ghrelin. Esto también explicaría lo observado en la respuesta de GH a GHRH: el aumento causado en la SST por bloqueo de AMPK disminuiría el efecto de GHRH, aunque no lo suficiente como para suprimirlo. Sin embargo, para comprobar qué neuropéptido está condicionado por la inhibición de AMPK son necesarios más estudios, por ejemplo con anticuerpos anti-GHRH y anti-SST. Muchas otras dudas quedan pendientes: mecanismo que lleva a la variación de estos neuropéptidos, si es específico para la secreción de GH o si la vía AMPK está implicada en la secreción de otras hormonas hipofisarias, efecto solo en hipotálamo o también a nivel de hipófisis, papel del ghrelin endógeno, etc.

METABOLISMO DE LÍPIDOS

Una de las principales dianas de AMPK a nivel hipotalámico es el metabolismo de lípidos (133): la activación de AMPK fosforila e inhibe ACC que causa el descenso de

los niveles de Malonyl-CoA, disminuyendo entonces la inhibición que este ejerce sobre CPT-1, quien a su vez media el paso de LCFA-CoA al interior de la mitocondria. En definitiva, la activación de AMPK causa la inhibición de la síntesis de lípidos y el aumento de la β -oxidación.

Para comprobar si la variación del metabolismo de lípidos a nivel hipotalámico ejerce algún efecto sobre la secreción de GH, modificamos pasos concretos de la ruta (94) mediante la administración icv de distintos compuestos: TOFA, causando inhibición de ACC, y ETOMOXIR, inhibiendo la actividad de CPT-1.

Así, podemos comprobar como la inhibición de ACC, y por tanto de la síntesis de lípidos, no causa ningún efecto sobre la secreción espontánea de GH ya que los animales tratados con TOFA no se diferencian de los que recibían vehículo en ninguno de los parámetros característicos de la pulsatilidad de GH. Y tampoco modifica la respuesta de GH a ghrelin o a GHRH: la administración de TOFA no causa ningún efecto sobre la secreción de GH mientras que tras la administración de TOFA y ghrelin o GHRH obtenemos una respuesta similar a la observada tras la administración de cada uno de los estímulos por separado.

Por su parte, la inhibición de CPT-1 no modifica la respuesta de GH a ninguno de los dos estímulos estudiados, ghrelin y GHRH, ya que la administración icv de ETOMOXIR por si solo no causa ningún efecto sobre los niveles de GH y tampoco varía la respuesta de ghrelin o GHRH cuando se administra junto a cada uno de los estímulos.

En conjunto, nuestros datos sugieren que AMPK está implicada en la regulación de la secreción de GH, especialmente en la regulación de la respuesta de GH a estímulos, ya que la inhibición de AMPK bloquea y entorpece la respuesta de GH a ghrelin y GHRH, respectivamente. Sin embargo, esta acción parece ser llevada a cabo por otra vía distinta del metabolismo de lípidos, a diferencia de lo observado en el papel orexigénico de ghrelin.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE GHRELIN A NIVEL CENTRAL SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS.

El péptido ghrelin es el ligando endógeno para GHS-R. Además de su efecto estimulador de la secreción de GH aumenta la ingesta, tanto en humanos como en roedores, incrementa el peso corporal y el porcentaje de tejido adiposo (173;269;274;420).

GHS-R se expresa tanto a nivel central como periférico, de modo que ghrelin actúa a ambos niveles (171).

Los efectos de ghrelin sobre la ingesta se producen a nivel hipotalámico, mediante el sistema AMPK/metabolismo de lípidos/UCP2 y expresión de neuropéptidos (133). Además, la administración de ghrelin a nivel central puede regular el metabolismo de lípidos, especialmente en el tejido adiposo a través del SNS y de forma independiente de la ingesta (274;313). En concreto, ghrelin aumenta los niveles de enzimas lipogénicas tales como LPL, ACC, FAS, SCD-1 y disminuye CPT-1 que determina el paso de LCFA-CoA para iniciar β -oxidación.

Sin embargo, el efecto de la GH en la acción lipogénica de ghrelin no está muy claro: a pesar de que en ratas deficientes en GH se ha descrito que la ganancia de peso y el aumento de tejido adiposo causada por ghrelin es independiente de su capacidad para secretar GH (173;269;274), la deficiencia de GH-R bloquea el efecto orexigénico de ghrelin en ratones (22) y ghrelin no aumenta los niveles de GHS-R en el hipotálamo de las *dwarf* (421).

Para comprobar si el efecto lipogénico de ghrelin está mediado por GH, recurrimos al tratamiento crónico con ghrelin en ratas Lewis normales y deficientes en GH (*dwarf*). Nuestros datos demuestran que el tratamiento crónico de ghrelin a nivel central aumenta la ingesta, la eficiencia energética y el peso corporal, incrementando además los niveles de expresión -mRNA y proteína- y actividad de los enzimas relacionados con la síntesis de lípidos en WAT; efectos que son independientes de GH. Datos que son además coherentes con el aumento de la actividad enzimática que se observa en

G6PDH y 6PGDH, ya que originan una mayor cantidad de NADPH que es necesario como poder reductor en la síntesis de lípidos *de novo* (422).

Los efectos de ghrelin a nivel central son particularmente interesantes en el caso de AMPK, Malonyl-CoA y CPT-1. Estudios anteriores han demostrado que el ghrelin periférico y central en ratas afecta a la actividad de AMPK de forma tejido específica (AMPK α en el cerebro se activa mientras que se inhibe en hígado y tejido adiposo) (94;158;423-425). Nuestros datos demuestran que el tratamiento crónico de ghrelin a nivel central causa el aumento en los niveles de proteína de AMPK α y pAMPK α en el hígado (datos no mostrados). La actividad de ACC aumentaba después de la infusión de ghrelin central pero los niveles de Malonyl disminuían en el tejido adiposo de las Lewis. Una posible explicación es el aumento que causa ghrelin en la actividad de FAS y MCD, que consumen ese Malonyl-CoA haciendo que sus niveles caigan. Teniendo en cuenta que Malonyl-Coa actúa como inhibidor de CPT-1, enzima que determina la entrada a la mitocondria de LCFA-CoA para ser degradados, ghrelin a nivel central incrementa los niveles de proteína y actividad de CPT-1 en tejido adiposo de ambos modelos animales actuando de forma independiente de GH, posiblemente como un mecanismo compensatorio.

Aunque la administración crónica de ghrelin a nivel central regula el metabolismo lipídico periférico (hígado y tejido adiposo) mayoritariamente de forma independiente de GH, es importante destacar la existencia de efectos de ghrelin específicos de tejido. A diferencia de lo observado en el tejido adiposo, aumento de adipogénesis y aumento de β -oxidación, en el caso concreto del hígado (datos no mostrados) se observa un efecto similar en cuanto a adipogénesis (aumento de ACC y FAS), pero un descenso de la β -oxidación (menor expresión y actividad de CPT-1) que desaparece con la deficiencia de GH (426).

Otra cuestión importante observada tras el tratamiento con ghrelin es que este causa hiperglucemia e hiperinsulinemia, siendo estadísticamente significativo en el caso de las *dwarf*. Los efectos de ghrelin sobre la secreción de insulina en animales de experimentación no son muy consistentes: dependiendo de las dosis y las condiciones

experimentales ha sido demostrado que estimula o inhibe la secreción de insulina (301;427;428). Sin embargo, la acción sistémica de ghrelin exógeno, tanto en humanos como en roedores, aumenta los niveles de glucosa (252;302;304). Varios estudios han demostrado que el ghrelin sistémico está activamente implicado en el control de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de glucosa en situaciones de HFD, o deficiencia de GH o leptina (312;369;429). Además, el ratón *ghrelin*^{-/-} mantenido con HFD mostraba una mejora en los niveles de glucosa, insulina y lípidos comparado con ratones wt, mostrando además una mayor tolerancia a la glucosa (298). Nuestros resultados sugieren que ghrelin es más importante en el control de la sensibilidad a insulina en situaciones que producen estrés metabólico, tales como el déficit de GH mostrado por las *dwarf*.

Finalmente, al igual que otros estudios, observamos que los niveles de ghrelin aumentan tras el tratamiento crónico icv independientemente de la presencia o no de GH. Este incremento podría ser debido a una alteración en la eliminación de ghrelin y/o síntesis de ghrelin gástrico (313;369). La posibilidad de que el ghrelin periférico contribuya al efecto observado es excluido por varios autores mostrando que la infusión periférica de cantidades idénticas de ghrelin a las administradas a nivel central no causaban ningún efecto (173;313).

En resumen, en la presente tesis hemos estudiado el papel desempeñado por diferentes péptidos generados a partir del gen de ghrelin sobre parámetros hormonales y metabólicos. Dado que los principales efectos descritos para ghrelin eran la regulación de la ingesta y la del gen de GH, nos hemos centrado de forma primordial en estos.

Nuestros datos demuestran de forma concluyente que la acción orexigénica y liberadora de GH del ghrelin acilado es altamente específica. De hecho, la pérdida de la esterificación en la serina en posición 3 conlleva la pérdida de sus efectos biológicos sobre ingesta y secreción de GH. Además, el resto de los péptidos estudiados, todos ellos generados a partir del gen de ghrelin, mostraron una ausencia

total de actividad biológica en los paradigmas experimentales valorados. Creemos que en su conjunto nuestro estudio es altamente clarificador en cuanto a que pone de manifiesto que las acciones del ghrelin acilado sobre ingesta y GH son altamente específicas y el resto de péptidos valorados presentan por el contrario actividades escasas o nulas.

Dado la importancia de ghrelin sobre la ingesta y la secreción de GH, nuestro siguiente estudio estuvo encaminado a valorar los efectos sobre ingesta y metabolismo lipídico de estos péptidos en relación a la deficiencia de GH. Nuestros datos han puesto de manifiesto que la acción central del ghrelin sobre la ingesta y el metabolismo lipídico a nivel periférico es independiente de GH. Nuestros datos, además de expandir el conocimiento sobre las acciones del ghrelin en el metabolismo lipídico en WAT, han puesto asimismo de manifiesto que el ghrelin central regula el metabolismo lipídico en hígado, lo que además de su importancia fisiológica abre nuevas vías de abordaje para el diseño de nuevas estrategias de control en situaciones de metabolismo lipídico hepático alterado.

CONCLUSIONES

- ◆ El efecto secretor de GH y orexigénico del ghrelin acilado es altamente específico dado que ninguno de los péptidos derivados del gen de ghrelin aquí estudiados - GHR-d3, GHR-d4, UAG y obestatina- mostraron efecto alguno.
- ◆ El sensor energético, mTOR, no interviene en la regulación de la secreción de GH espontánea ni estimulada por ghrelin o GHRH.
- ◆ En la secreción espontánea de GH no interviene AMPK hipotalámica, mientras que si está implicada en la regulación de la respuesta de GH a estímulos, ghrelin y GHRH. Sin embargo, esta acción parece ser llevada a cabo por una vía distinta del metabolismo de lípidos.
- ◆ La administración crónica de ghrelin acilado a nivel central regula el metabolismo lipídico periférico, siendo su efecto lipogénico independiente de GH.

REFERENCIAS

1. **Rolls ET** 2007 Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1:67-72
2. **Malecka-Tendera E, Mazur A** 2006 Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 2:S1-S3
3. **Baskin DG, Figlewicz LD, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., Schwartz MW** 1999 Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848:114-123
4. **Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr.** 1979 Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505
5. **Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR** 2000 Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125
6. **Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L** 2002 Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8:1376-1382
7. **Burks DJ, Font de MJ, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF** 2000 IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407:377-382
8. **Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D, Jr.** 1992 Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414
9. **Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP** 1992 Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608-3616
10. **Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC** 2002 The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22:9048-9052
11. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
12. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
13. **Coleman DL** 1973 Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294-298
14. **Coleman DL** 1979 Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. *Science* 203:663-665

15. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271
16. **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP** 1996 Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84:491-495
17. **Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK** 2000 Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21:263-307
18. **Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM** 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635
19. **Tartaglia LA** 1997 The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096
20. **Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL** 1997 Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* 45:264-270
21. **Fruhbeck G** 2006 Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393:7-20
22. **Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T** 2003 Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52:948-956
23. **Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ** 2001 Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484
24. **Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL** 2004 Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304:110-115
25. **Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB** 2004 Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108-110
26. **Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M** 1999 Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282:1568-1575
27. **Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C** 2000 Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269:41-45

28. **Sahu A** 1998 Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 139:795-798
29. **Gundlach AL** 2002 Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol* 440:255-268
30. **Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Izawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-232
31. **Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr., Schwartz MW** 2001 Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413:794-795
32. **Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW** 2003 Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231
33. **Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS** 2005 PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115:951-958
34. **Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ** 2006 Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930
35. **Zigman JM, Elmquist JK** 2003 Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144:3749-3756
36. **Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW** 2000 SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. *Regul Pept* 92:9-15
37. **Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB** 2006 Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 12:917-924
38. **Casanueva FF, Dieguez C** 1999 Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 20:317-363
39. **Mounzih K, Lu R, Chehab FF** 1997 Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138:1190-1193
40. **Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME** 1997 Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88-90
41. **McShane TM, May T, Miner JL, Keisler DH** 1992 Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biol Reprod* 46:1151-1157

42. **El MM, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM** 2000 Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6179-6184
43. **Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A** 1999 Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 140:4939-4947
44. **Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De R, V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S** 2007 Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 356:237-247
45. **Tena-Sempere M, Barreiro ML** 2002 Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 188:9-13
46. **Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B** 1998 A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392:398-401
47. **Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C** 1997 Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138:2203-2206
48. **Giustina A, Veldhuis JD** 1998 Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717-797
49. **Seoane LM, Tovar SA, Perez D, Mallo F, Lopez M, Senaris R, Casanueva FF, Dieguez C** 2004 Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol* 150:731-736
50. **Feldt-Rasmussen U** 2007 Thyroid and leptin. *Thyroid* 17:413-419
51. **Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J** 1999 Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3686-3695
52. **Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS** 2003 The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 111:1409-1421
53. **Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C** 2003 Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 548:21-27
54. **Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castaneda TR, Vazquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Dieguez C** 2005 Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol* 153:R1-R5

55. **Vazquez MJ, Gonzalez CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C** 2008 Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 149:4534-4543
56. **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
57. **Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ** 2003 Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 149:331-335
58. **Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L** 2004 Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114:232-239
59. **Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA** 2004 Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303:1195-1198
60. **Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS** 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53:1671-1679
61. **Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE** 2001 The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947-953
62. **Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS** 2006 Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55:3083-3090
63. **Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS** 2007 Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J Neurosci* 27:12924-12932
64. **Singhal NS, Patel RT, Qi Y, Lee YS, Ahima RS** 2008 Loss of resistin ameliorates hyperlipidemia and hepatic steatosis in leptin-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E331-E338
65. **Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ** 2005 Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1092-1101
66. **Lazar MA** 2007 Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* 39:710-716
67. **Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF** 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010

68. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T** 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295
69. **Havel PJ** 2004 Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-S151
70. **Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y** 2001 Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133
71. **Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R** 2003 Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1111-1117
72. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946
73. **Shulman GI** 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176
74. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T** 2003 Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278:2461-2468
75. **Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB** 2002 Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16309-16313
76. **Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ** 2003 Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52:1355-1363
77. **Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE** 2004 A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145:367-383

78. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB** 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343
79. **Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W** 2003 Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 26:1362-1368
80. **Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO** 2002 Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75-79
81. **De Benedetti F, Alonzi T, Moretta A, Lazzaro D, Costa P, Poli V, Martini A, Ciliberto G, Fattori E** 1997 Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* 99:643-650
82. **Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW** 2004 Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282
83. **Ruan H, Lodish HF** 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455
84. **Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I** 2005 Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-430
85. **Beltowski J** 2006 Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 12:RA112-RA119
86. **Ballinger A, McLoughlin L, Medbak S, Clark M** 1995 Cholecystokinin is a satiety hormone in humans at physiological post-prandial plasma concentrations. *Clin Sci (Lond)* 89:375-381
87. **Kissileff HR, Carretta JC, Geliebter A, Pi-Sunyer FX** 2003 Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R992-R998
88. **Moran TH, Kinzig KP** 2004 Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G183-G188
89. **Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, Starlinger M, Eichner M, Raybould HE, Becker HD, Jehle EC** 1999 C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res* 846:1-11
90. **Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2000 Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261

91. **Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C** 2000 Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol* 143:R7-R9
92. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
93. **Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K** 2000 Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 276:905-908
94. **Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodriguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castaneda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschop MH, Dieguez C, Vidal-Puig A** 2008 Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7:389-399
95. **Mendieta-Zeron H, Lopez M, Dieguez C** 2008 Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. *Gen Comp Endocrinol* 155:481-495
96. **Cummings DE, Overduin J** 2007 Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23
97. **Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghattei MA, Bloom SR** 2003 Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349:941-948
98. **Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghattei MA, Cone RD, Bloom SR** 2002 Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418:650-654
99. **Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR** 2004 Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:153-160
100. **Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ** 2001 The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S63-S67
101. **Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA** 1991 Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260:R328-R334
102. **Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickinger A, Lechan RM** 2002 Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 143:4513-4519
103. **Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS** 1991 Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10931-10935
104. **Thorsell A, Heilig M** 2002 Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 36:182-193

105. **Marsh DJ, Miura GI, Yagaloff KA, Schwartz MW, Barsh GS, Palmiter RD** 1999 Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res* 848:66-77
106. **Inui A** 1999 Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol Sci* 20:43-46
107. **Schaffhauser AO, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Cumin F, Gerald C, Whitebread S, Criscione L, Hofbauer KG** 1997 Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46:1792-1798
108. **Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD** 1998 Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* 4:718-721
109. **Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M** 1998 Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15659-15664
110. **Naveilhan P, Hassani H, Canals JM, Ekstrand AJ, Larefalk A, Chhajlani V, Arenas E, Gedda K, Svensson L, Thoren P, Ernfors P** 1999 Normal feeding behavior, body weight and leptin response require the neuropeptide Y Y2 receptor. *Nat Med* 5:1188-1193
111. **Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Zemel MB, Wilkinson JE, Wilkinson WO, Woychik RP** 1997 Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:919-922
112. **Goldstone AP, Unmehopa UA, Bloom SR, Swaab DF** 2002 Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87:927-937
113. **Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS** 1999 Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 140:2387-2397
114. **Yang YK, Thompson DA, Dickinson CJ, Wilken J, Barsh GS, Kent SB, Gantz I** 1999 Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol* 13:148-155
115. **Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR** 1998 A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139:4428-4431
116. **Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ** 2000 Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-R52

117. **Small CJ, Kim MS, Stanley SA, Mitchell JR, Murphy K, Morgan DG, Ghattei MA, Bloom SR** 2001 Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50:248-254
118. **Huang XF, Han M, South T, Storlien L** 2003 Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res* 992:9-19
119. **Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA** 2002 Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R1020-R1026
120. **Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A** 1998 Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-157
121. **Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS** 2002 Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 51:1337-1345
122. **Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H** 2004 Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:235-239
123. **Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S** 2000 Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106:271-279
124. **Lubrano-Berthelie C, Cavazos M, Dubern B, Shapiro A, Stunff CL, Zhang S, Picart F, Govaerts C, Froguel P, Bougneres P, Clement K, Vaisse C** 2003 Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann N Y Acad Sci* 994:49-57
125. **Abbott CR, Rossi M, Kim M, AlAhmed SH, Taylor GM, Ghattei MA, Smith DM, Bloom SR** 2000 Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res* 869:203-210
126. **Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC** 2005 Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8:1289-1291
127. **Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, Pfluger PT, Castaneda TR, Neschen S, Hofmann SM, Howles PN, Morgan DA, Benoit SC, Szanto I, Schrott B, Schurmann A, Joost HG, Hammond C, Hui DY, Woods SC, Rahmouni K, Butler AA, Farooqi IS, O'Rahilly S, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop MH** 2007 The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest* 117:3475-3488

128. **Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P** 2000 Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8:590-596
129. **Li HY, Hwang HW, Hu YH** 2002 Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 323:203-206
130. **Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB** 1999 From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22:221-232
131. **Zheng H, Corkern MM, Crousillac SM, Patterson LM, Phifer CB, Berthoud HR** 2002 Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1773-R1781
132. **Irani BG, Le FC, Dunn-Meynell A, Levin BE** 2008 Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* 149:5146-5154
133. **Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M** 2008 AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14:539-549
134. **Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF** 2003 Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-742
135. **Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El GA, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'Rahilly S, Farooqi IS** 2006 Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55:3366-3371
136. **Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS** 2004 A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7:1187-1189
137. **Gao Q, Horvath TL** 2008 Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* 582:132-141
138. **de LL, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG** 1998 The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327
139. **Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE** 2002 Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36:303-325
140. **Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** 1998 Orexins and orexin receptors: a family of

- hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:1
141. **Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E** 2002 The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu Rev Neurosci* 25:283-313
 142. **Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR** 1999 Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-1105
 143. **Lopez M, Seoane L, Senaris RM, Dieguez C** 2001 Prepro-orexin mRNA levels in the rat hypothalamus, and orexin receptors mRNA levels in the rat hypothalamus and adrenal gland are not influenced by the thyroid status. *Neurosci Lett* 300:171-175
 144. **Garcia MC, Lopez M, Gualillo O, Seoane LM, Dieguez C, Senaris RM** 2003 Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB J* 17:1392-1400
 145. **Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M** 1999 Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437-451
 146. **Kirchgessner AL, Liu M** 1999 Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24:941-951
 147. **Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK** 1998 Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442-459
 148. **Horvath TL, Diano S, van den Pol AN** 1999 Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19:1072-1087
 149. **Saper CB, Chou TC, Elmquist JK** 2002 The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199-211
 150. **Sahu A** 2002 Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Res* 944:232-238
 151. **Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van Der Ploeg LH, Qian S** 2002 Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3240-3245
 152. **Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E** 1996 A role for melanin-

- concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247
153. **Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U** 2008 The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol* 20:850-857
 154. **Elmqvist JK** 1998 CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab Anim Sci* 48:630-637
 155. **Gooley JJ, Schomer A, Saper CB** 2006 The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9:398-407
 156. **Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J** 2005 Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308:1043-1045
 157. **Yi CX, van d, V, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM** 2006 Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147:283-294
 158. **Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ** 2004 AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279:12005-12008
 159. **Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB** 2004 AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428:569-574
 160. **Lopez M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A** 2007 Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 29:248-261
 161. **Woods SC, Seeley RJ, Cota D** 2008 Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr* 28:295-311
 162. **Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS** 2002 AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277:23977-23980
 163. **Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U** 2003 The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431
 164. **Cota D** 2008 Role of the endocannabinoid system in energy balance regulation and obesity. *Front Horm Res* 36:135-145
 165. **Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP** 2008 The putative

- cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139:225-236
166. **Grill HJ, Smith GP** 1988 Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol* 254:R853-R856
 167. **Zhu JN, Wang JJ** 2008 The cerebellum in feeding control: possible function and mechanism. *Cell Mol Neurobiol* 28:469-478
 168. **Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ, Benoit SC** 2007 A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Curr Opin Pharmacol* 7:613-616
 169. **Bowers CY, Reynolds GA, Momany FA** 1984 New advances on the regulation of growth hormone (GH) secretion. *Int J Neurol* 18:188-205
 170. **Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van Der Ploeg LH** 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977
 171. **van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E** 2004 Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457
 172. **Arvat E, Di VL, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E** 2000 Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 23:493-495
 173. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
 174. **Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K** 2001 Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 142:3697-3700
 175. **Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K** 2003 Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278:64-70
 176. **Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2004 Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145:4144-4153
 177. **Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M** 2005 Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 146:2255-2264

178. **Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, Richards M** 2003 C-terminal proghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 310:567-573
179. **Bang AS, Soule SG, Yandle TG, Richards AM, Pemberton CJ** 2007 Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. *J Endocrinol* 192:313-323
180. **Zhang JV, Ren PG, vsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ** 2005 Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996-999
181. **Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K** 2000 Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275:21995-22000
182. **Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK** 2005 Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activates mitogen-activated protein kinase in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11:8295-8303
183. **Jeffery PL, Duncan RP, Yeh AH, Jaskolski RA, Hammond DS, Herington AC, Chopin LK** 2005 Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 146:432-440
184. **Kojima M, Kangawa K** 2008 Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ* 46:89-115
185. **Chanoine JP, Wong AC** 2004 Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology* 145:3813-3820
186. **Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R** 2006 Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest* 29:115-121
187. **Chanoine JP, Wong AC, Barrios V** 2006 Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res* 66:81-88
188. **Dun SL, Brailoiu GC, Brailoiu E, Yang J, Chang JK, Dun NJ** 2006 Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J Endocrinol* 191:481-489
189. **Zhao CM, Furnes MW, Stenstrom B, Kulseng B, Chen D** 2008 Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 331:575-587
190. **Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K** 2004 Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem* 50:1077-1080

191. **De VC, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C** 2007 Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148:2355-2362
192. **Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS** 2003 Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 278:8877-8880
193. **Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoer C, Swan DC, Mein CA, Weill J, Grossman AB, Froguel P** 2002 A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4005-4008
194. **Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjostrom L, Bouchard C** 2001 Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3996-3999
195. **Hinney A, Hoch A, Geller F, Schafer H, Siegfried W, Goldschmidt H, Renschmidt H, Hebebrand J** 2002 Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2716
196. **Larsen LH, Gjesing AP, Sorensen TI, Hamid YH, Echwald SM, Toubro S, Black E, Astrup A, Hansen T, Pedersen O** 2005 Mutation analysis of the preproghrelin gene: no association with obesity and type 2 diabetes. *Clin Biochem* 38:420-424
197. **Bing C, Ambye L, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA** 2005 Large-scale studies of the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits. *Diabet Med* 22:1157-1160
198. **Steinle NI, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR** 2005 Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6672-6677
199. **Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL** 2008 Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396
200. **Hofmann K** 2000 A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 25:111-112
201. **Liu J, Prudom CE, Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, Johnson ML, Veldhuis P, Gordon DA, Howard AD, Witcher DR, Geysen HM, Gaylann BD, Thorner MO** 2008 Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1980-1987
202. **Gonzalez CR, Vazquez MJ, Lopez M, Dieguez C** 2008 Influence of chronic undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *J Mol Endocrinol* 41:415-421

203. **Yang J, Zhao TJ, Goldstein JL, Brown MS** 2008 Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10750-10755
204. **Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE** 2008 Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6320-6325
205. **Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D** 2004 Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E297-E304
206. **Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753-4758
207. **Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS** 2004 Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1319-1324
208. **McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR** 2002 Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:R7-11
209. **Shiyya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S** 2002 Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240-244
210. **Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V** 2003 Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116:101-107
211. **Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N** 2004 Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:382-388
212. **Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A** 2002 Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292:1031-1035
213. **Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS** 2004 Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89:335-343
214. **Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM** 2003 Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144:5184-5187

215. **Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ** 2002 Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623-1630
216. **Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C** 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19-RC21
217. **Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, Jorgensen JO** 2002 Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:203-206
218. **Nicholls RD, Knepper JL** 2001 Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:153-175
219. **Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Heiman ML, Tschop M, Pasquali R** 2002 Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5625-5629
220. **Krsek M, Rosicka M, Papezova H, Krizova J, Kotrlíkova E, Haluzík M, Justova V, Lacinova Z, Jarkovska Z** 2003 Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies. *Eat Weight Disord* 8:207-211
221. **Qi X, Reed J, Englander EW, Chandrashekar V, Bartke A, Greeley GH, Jr.** 2003 Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1028-1032
222. **Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M** 2002 The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123:1120-1128
223. **Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4552
224. **Lucidi P, Murdolo G, Di LC, De CA, Parlanti N, Fanelli C, Santeusano F, Bolli GB, De FP** 2002 Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 51:2911-2914
225. **Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B** 2002 Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1902
226. **Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS** 2003 The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E313-E316
227. **Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA** 2003 Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2180-2184

-
228. **Haqq AM, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Weigle DS, Frayo RS, LaFranchi SH, Cummings DE, Purnell JQ** 2003 Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octreotide therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3573-3576
229. **Luque RM, Gahete MD, Hochgeschwender U, Kineman RD** 2006 Evidence that endogenous SST inhibits ACTH and ghrelin expression by independent pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E395-E403
230. **Arafat MA, Otto B, Rochlitz H, Tschop M, Bahr V, Mohlig M, Diederich S, Spranger J, Pfeiffer AF** 2005 Glucagon inhibits ghrelin secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 153:397-402
231. **Arafat AM, Perschel FH, Otto B, Weickert MO, Rochlitz H, Schofl C, Spranger J, Mohlig M, Pfeiffer AF** 2006 Glucagon suppression of ghrelin secretion is exerted at hypothalamus-pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3528-3533
232. **Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2002 Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143:3341-3350
233. **Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S** 2001 Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1220-1225
234. **Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP** 2002 Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology* 143:726-729
235. **Geloneze B, Tambascia MA, Pilla VF, Geloneze SR, Repetto EM, Pareja JC** 2003 Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery. *Obes Surg* 13:17-22
236. **McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Howard AD** 1997 Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11:415-423
237. **Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Howard AD** 1997 Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48:23-29
238. **Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M** 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988
239. **Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G** 2000 Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3803-3807

240. **Adams EF, Huang B, Buchfelder M, Howard A, Smith RG, Feighner SD, Van Der Ploeg LH, Bowers CY, Fahlbusch R** 1998 Presence of growth hormone secretagogue receptor messenger ribonucleic acid in human pituitary tumors and rat GH3 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:638-642
241. **Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F** 2001 Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788-794
242. **Camina JP, Carreira MC, El MS, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF** 2004 Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 145:930-940
243. **Jiang H, Betancourt L, Smith RG** 2006 Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 20:1772-1785
244. **Anderson LL, Jeffinija S, Scanes CG** 2004 Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:291-302
245. **Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K** 2002 Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-5674
246. **Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M** 2005 Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:25196-25201
247. **Qader SS, Lundquist I, Ekelund M, Hakanson R, Salehi A** 2005 Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul Pept* 128:51-56
248. **Mousseaux D, Le GL, Ryan J, Oiry C, Gagne D, Fehrentz JA, Galleyrand JC, Martinez J** 2006 Regulation of ERK1/2 activity by ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1A involves a PLC/PKCvarepsilon pathway. *Br J Pharmacol* 148:350-365
249. **Zhao D, Zhan Y, Zeng H, Moyer MP, Mantzoros CS, Pothoulakis C** 2006 Ghrelin stimulates interleukin-8 gene expression through protein kinase C-mediated NF-kappaB pathway in human colonic epithelial cells. *J Cell Biochem* 97:1317-1327
250. **Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C** 2005 The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 146:1285-1292
251. **Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F** 2004 Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 62:481-488

252. **Broglia F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2001 Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083-5086
253. **Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath T, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Culler MD** 2004 Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 1:S71-S75
254. **Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath TL, Culler MD** 2005 A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology* 81:339-349
255. **Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G** 2004 Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 150:173-184
256. **Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G** 2001 Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1738-1745
257. **Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglia F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A** 2002 Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159:1029-1037
258. **Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K** 2005 Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology* 146:355-364
259. **Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF** 2000 Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 143:R11-R14
260. **Baudet ML, Harvey S** 2003 Ghrelin-induced GH secretion in domestic fowl in vivo and in vitro. *J Endocrinol* 179:97-105
261. **Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K** 2001 Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem* 276:40441-40448
262. **Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castano JP** 2003 Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380

263. **Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF** 2003 Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3450-3453
264. **Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ** 2006 Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1289-G1297
265. **Sun Y, Ahmed S, Smith RG** 2003 Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 23:7973-7981
266. **Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW** 2004 Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8227-8232
267. **Garcia A, Alvarez CV, Smith RG, Dieguez C** 2001 Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 15:1484-1495
268. **Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M** 2001 Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142:4163-4169
269. **Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S** 2001 A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198
270. **Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M** 2001 Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337-345
271. **Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS** 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719
272. **Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL** 2003 The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661
273. **Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I** 2001 Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50:2438-2443
274. **Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547

275. **Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S** 2004 Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145:2607-2612
276. **Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2003 Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-1512
277. **Niimi M, Sato M, Taminato T** 2001 Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine* 14:269-273
278. **Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y** 2002 Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 325:47-51
279. **Hewson AK, Dickson SL** 2000 Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047-1049
280. **Sakata I, Yamazaki M, Inoue K, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T** 2003 Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett* 342:183-186
281. **Zhang W, Lin TR, Hu Y, Fan Y, Zhao L, Stuenkel EL, Mulholland MW** 2004 Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 559:729-737
282. **Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S** 2001 Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 280:904-907
283. **Andrews PL, Sanger GJ** 2002 Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr Opin Pharmacol* 2:650-656
284. **Korbonits M, Grossman AB** 2004 Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 1:S67-S70
285. **Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK** 2006 Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494:528-548
286. **Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS** 2005 Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* 26:2274-2279
287. **Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschop MH, Gao XB, Horvath TL** 2006 Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 116:3229-3239

288. **Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG** 2004 Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4679-4684
289. **Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK** 2005 Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564-3572
290. **Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, Ikawa M, Okabe M, Kangawa K, Kojima M** 2008 Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. *Regul Pept* 145:7-11
291. **Shimbara T, Mondal MS, Kawagoe T, Toshinai K, Koda S, Yamaguchi H, Date Y, Nakazato M** 2004 Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett* 369:75-79
292. **Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T** 2004 Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145:234-242
293. **Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E** 2004 Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 498:27-35
294. **Kim MS, Namkoong C, Kim HS, Jang PG, Kim Pak YM, Katakami H, Park JY, Lee KU** 2004 Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1264-1271
295. **Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H** 2005 Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept* 130:97-103
296. **Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschop M** 2004 Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology* 145:4645-4652
297. **De SB, Depoortere I, Moechars D, Swennen Q, Moreaux B, Cryns K, Tack J, Buyse J, Coulie B, Peeters TL** 2006 Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 316:431-439
298. **Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW** 2005 Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest* 115:3573-3578
299. **Pfluger PT, Kirchner H, Gunnel S, Schrott B, Perez-Tilve D, Fu S, Benoit SC, Horvath T, Joost HG, Wortley KE, Sleeman MW, Tschop MH** 2008 Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G610-G618

300. **Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG** 2008 Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology* 149:843-850
301. **Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S** 2002 Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129
302. **Broglia F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Prodam F, Grottoli S, Papotti M, Muccioli G, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E** 2002 Endocrine activities of cortistatin-14 and its interaction with GHRH and ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3783-3790
303. **Broglia F, Benso A, Castiglioni C, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, van der Lely AJ, Deghenghi R, Bo M, Arvat E, Ghigo E** 2003 The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1537-1542
304. **Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T** 2004 Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53:3142-3151
305. **Reimer MK, Pacini G, Ahren B** 2003 Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 144:916-921
306. **Gauna C, Uitterlinden P, Kramer P, Kiewiet RM, Janssen JA, Delhanty PJ, van Aken MO, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen AP, van der Lely AJ** 2007 Intravenous glucose administration in fasting rats has differential effects on acylated and unacylated ghrelin in the portal and systemic circulation: a comparison between portal and peripheral concentrations in anesthetized rats. *Endocrinology* 148:5278-5287
307. **Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M** 2008 Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* 4:18-23
308. **Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglia F, Ross RJ, Ghigo E, van der Lely AJ** 2005 Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1055-1060
309. **Heijboer AC, Van den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Pijl H, Corssmit EP** 2006 Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 49:732-738
310. **Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, Tschop M, Klein J** 2002 Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 34:640-645

311. **Salehi A, Dornonville de la CC, Hakanson R, Lundquist I** 2004 Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 118:143-150
312. **Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG** 2006 Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab* 3:379-386
313. **Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schurmann A, Szanto I, Tschop MH, Rohner-Jeanrenaud F** 2006 Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116:1983-1993
314. **Barazzoni R, Biolo G, Zanetti M, Bernardi A, Guarnieri G** 2006 Inflammation and adipose tissue in uremia. *J Ren Nutr* 16:204-207
315. **Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR** 2006 Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept* 134:17-22
316. **Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, Park KS** 2004 The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18:2291-2301
317. **Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, Johno Y, Takayama K** 2006 Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci* 51:1313-1321
318. **Sibilia V, Bresciani E, Lattuada N, Rapetti D, Locatelli V, De L, V, Dona F, Netti C, Torsello A, Guidobono F** 2006 Intracerebroventricular acute and chronic administration of obestatin minimally affect food intake but not weight gain in the rat. *J Endocrinol Invest* 29:RC31-RC34
319. **Dornonville de la CC, Lindstrom E, Norlen P, Hakanson R** 2004 Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 120:23-32
320. **Li Y, Wu X, Zhao Y, Chen S, Owyang C** 2006 Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1350-G1358
321. **Peeters TL** 2005 Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 54:1638-1649
322. **Park JM, Kakimoto T, Kuroki T, Shiraiishi R, Fujise T, Iwakiri R, Fujimoto K** 2008 Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:48-56
323. **Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delporte C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T** 2006 Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 55:327-333

324. **Depoortere I, De WB, Thijs T, De MJ, Pelckmans P, Peeters T** 2005 Comparison of the gastroprokinetic effects of ghrelin, GHRP-6 and motilin in rats in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 515:160-168
325. **Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M** 2003 Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 550:227-240
326. **Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2003 Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88:879-887
327. **Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2004 Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:400-409
328. **Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T** 2003 Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 144:2623-2633
329. **Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E** 2002 Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143:717-725
330. **Furuta M, Funabashi T, Kimura F** 2001 Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 288:780-785
331. **Vulliemoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Germond M, Rivier J, Ferin M** 2004 Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5718-5723
332. **Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L** 2004 Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett* 362:103-107
333. **Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke IJ** 2006 Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology* 147:510-519
334. **Lanfranco F, Bonelli L, Baldi M, Me E, Broglio F, Ghigo E** 2008 Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3633-3639
335. **Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L, Wells T, Dieguez C, Tena-**

- Sempere M** 2006 Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 147:2374-2382
336. **Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L** 2005 Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 82:245-255
337. **Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M** 2006 Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 254-255:127-132
338. **Gualillo O, Lago F, Gomez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C** 2003 Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Lett* 552:105-109
339. **Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2002 Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 67:1768-1776
340. **Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C** 2003 Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144:1594-1602
341. **Sirotkin AV, Grossmann R, Maria-Peon MT, Roa J, Tena-Sempere M, Klein S** 2006 Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:15-25
342. **Barreiro ML, Suominen JS, Gaytan F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M** 2003 Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod* 68:1631-1640
343. **Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M** 2004 Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 145:4825-4834
344. **Hehir MP, Glavey SV, Morrison JJ** 2008 Uterorelaxant effect of ghrelin on human myometrial contractility. *Am J Obstet Gynecol* 198:323-325
345. **Kiersen JA, Dimatteo DM, Locke RG, Mackley AB, Spear ML** 2006 Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr* 95:991-995
346. **Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y** 2004 Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides* 25:279-287
347. **Nakahara K, Hayashida T, Nakazato M, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N** 2003 Effect of chronic treatments with ghrelin on milk secretion in lactating rats. *Biochem Biophys Res Commun* 303:751-755

-
348. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K 2001 Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R1483-R1487
349. Li WG, Gavrila D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL 2004 Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109:2221-2226
350. Rossi F, Bertone C, Petricca S, Santiemma V 2007 Ghrelin inhibits angiotensin II-induced migration of human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 192:291-297
351. Li L, Zhang LK, Pang YZ, Pan CS, Qi YF, Chen L, Wang X, Tang CS, Zhang J 2006 Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Acta Pharmacol Sin* 27:527-535
352. Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R 2003 Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. *Basic Res Cardiol* 98:401-405
353. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K 2001 Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5854-5859
354. Chang L, Du JB, Gao LR, Pang YZ, Tang CS 2003 Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta Pharmacol Sin* 24:45-49
355. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW, Jr., Taub DD 2004 Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:57-66
356. Soares JB, Leite-Moreira AF 2008 Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29:1255-1270
357. Maccarinelli G, Sibilia V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D 2005 Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J Endocrinol* 184:249-256
358. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M 2005 Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 20:790-798
359. Gauna C, Delhanty PJ, van Aken MO, Janssen JA, Themmen AP, Hofland LJ, Culler M, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ 2006 Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 251:103-111
360. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K,

- Nakazato M** 2006 Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147:2306-2314
361. **Broglia F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Aribat T, van der Lely AJ, Ghigo E** 2004 Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3062-3065
362. **Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR** 2006 Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut* 55:135
363. **Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M** 2005 Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54:18-24
364. **Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, Doong ML** 2005 Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med* 16:695-699
365. **Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S** 2006 Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides* 27:2321-2325
366. **Inhoff T, Monnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Kobelt P** 2008 Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29:2159-2168
367. **Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglia F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M** 2002 Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300-1308
368. **Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T** 2006 Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55:3486-3493
369. **Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Aribat T, van KP, Hofland LJ, Broglia F, Ghigo E, van der Lely AJ** 2004 Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5035-5042
370. **Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de ZB, Delhanty PJ, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen AP, van der Lely AJ** 2007 Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E697-E704
371. **Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K** 2005 Analysis of rat insulin

- II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem* 280:15247-15256
372. **Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW** 2008 Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology* 149:4710-4716
373. **Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G** 2007 Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology* 148:512-529
374. **Qader SS, Hakanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A** 2008 Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept* 146:230-237
375. **Kos K, Harte AL, O'Hare PJ, Kumar S, McTernan PG** 2009 Ghrelin and the differential regulation of des-acyl (DSG) and oct-anoyl ghrelin (OTG) in human adipose tissue (AT). *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:383-389
376. **Sibilia V, Muccioli G, Deghenghi R, Pagani F, De L, V, Rapetti D, Locatelli V, Netti C** 2006 Evidence for a role of the GHS-R1a receptors in ghrelin inhibition of gastric acid secretion in the rat. *J Neuroendocrinol* 18:122-128
377. **Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N** 2006 Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology* 147:1333-1342
378. **Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP** 2006 Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res* 69:227-235
379. **Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G** 2003 Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol* 476:87-95
380. **Granata R, Settanni F, Trovato L, Destefanis S, Gallo D, Martinetti M, Ghigo E, Muccioli G** 2006 Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest* 29:RC19-RC22
381. **Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Murakami N** 2006 Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 350:598-603
382. **Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghe C, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M** 2006 Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J Endocrinol Invest* 29:781-790

383. **Moechars D, Depoortere I, Moreaux B, De SB, Goris I, Hoskens L, Daneels G, Kass S, Ver DL, Peeters T, Coulie B** 2006 Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR39-obestatin receptor-knockout mouse. *Gastroenterology* 131:1131-1141
384. **Chartrel N, vear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Reaux-Le GA, Audinot V, Chomarar P, Coge F, Nosjean O, Rodriguez M, Galizzi JP, Boutin JA, Vaudry H, Llorens-Cortes C** 2007 Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science* 315:766
385. **Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW** 2007 GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148:13-20
386. **Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, Schoofs L, Luyten W** 2006 Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochem Biophys Res Commun* 351:21-25
387. **Tremblay F, Perreault M, Klamann LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE** 2007 Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* 148:501-506
388. **Bassil AK, Haglund Y, Brown J, Rudholm T, Hellstrom PM, Naslund E, Lee K, Sanger GJ** 2007 Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 150:58-64
389. **Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV** 2000 Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 43:4370-4376
390. **Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Wiedmer P, Castaneda TR, DiMarchi R, Tschop M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Dieguez C** 2007 Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148:21-26
391. **Bresciani E, Rapetti D, Dona F, Bulgarelli I, Tamiazzo L, Locatelli V, Torsello A** 2006 Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J Endocrinol Invest* 29:RC16-RC18
392. **Carlini VP, Schioth HB, Debarioglio SR** 2007 Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 352:907-912
393. **Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP** 2007 Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 357:264-269
394. **Nagaraj S, Peddha MS, Manjappara UV** 2008 Fragments of obestatin as modulators of feed intake, circulating lipids, and stored fat. *Biochem Biophys Res Commun* 366:731-737

395. **Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV** 2007 Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R637-R643
396. **Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y** 2007 Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* 138:141-144
397. **Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT** 2007 Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148:1648-1653
398. **Seoane LM, Al-Massadi O, Pazos Y, Pagotto U, Casanueva FF** 2006 Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J Endocrinol Invest* 29:RC13-RC15
399. **Nakahara T, Harada T, Yasuhara D, Shimada N, Amitani H, Sakoguchi T, Kamiiji MM, Asakawa A, Inui A** 2008 Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 64:252-255
400. **Pan W, Tu H, Kastin AJ** 2006 Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* 27:911-916
401. **Depoortere I, Thijs T, Moechars D, De SB, Ver DL, Peeters TL** 2008 Effect of peripheral obestatin on food intake and gastric emptying in ghrelin-knockout mice. *Br J Pharmacol* 153:1550-1557
402. **Qi X, Li L, Yang G, Liu J, Li K, Tang Y, Liou H, Boden G** 2007 Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:593-597
403. **Green BD, Irwin N, Flatt PR** 2007 Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides* 28:981-987
404. **Unniappan S, Speck M, Kieffer TJ** 2008 Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats. *Peptides* 29:1354-1361
405. **Ren AJ, Guo ZF, Wang YK, Wang LG, Wang WZ, Lin L, Zheng X, Yuan WJ** 2008 Inhibitory effect of obestatin on glucose-induced insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 369:969-972
406. **Kiewiet RM, Gauna C, van Aken MO, van de ZB, van der Lely AJ** 2008 Bolus administration of obestatin does not change glucose and insulin levels neither in the systemic nor in the portal circulation of the rat. *Peptides* 29:2144-2149
407. **Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghe C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E** 2008 Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* 57:967-979

408. **Egido EM, Hernandez R, Marco J, Silvestre RA** 2009 Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regul Pept* 152:61-66
409. **Fujimiya M, Asakawa A, Ataka K, Kato I, Inui A** 2008 Different effects of ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on gastroduodenal motility in conscious rats. *World J Gastroenterol* 14:6318-6326
410. **Meszarosova M, Sirotkin AV, Grossmann R, Darlak K, Valenzuela F** 2008 The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 108:196-207
411. **Camina JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez C, Casanueva FF** 2007 Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: regulatory mechanisms. *J Cell Physiol* 211:1-9
412. **Wu JT, Kral JG** 2004 Ghrelin: integrative neuroendocrine peptide in health and disease. *Ann Surg* 239:464-474
413. **Garg A** 2007 The ongoing saga of obestatin: is it a hormone? *J Clin Endocrinol Metab* 92:3396-3398
414. **Hayashi AA, Proud CG** 2007 The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1647-E1655
415. **Mori H, Inoki K, Munzberg H, Opland D, Faouzi M, Villanueva EC, Ikenoue T, Kwiatkowski D, Macdougald OA, Myers MG, Jr., Guan KL** 2009 Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab* 9:362-374
416. **Kola B** 2008 Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. *J Neuroendocrinol* 20:942-951
417. **Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S** 2008 UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846-851
418. **Casanueva FF, Camina JP, Carreira MC, Pazos Y, Varga JL, Schally AV** 2008 Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHS-R1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20452-20457
419. **Wagner C, Caplan SR, Tannenbaum GS** 2009 Interactions of ghrelin signaling pathways with the GH neuroendocrine axis: a new and experimentally tested model. *J Mol Endocrinol* 43:105-119
420. **Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5992
421. **Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM** 2004 Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 53:2552-2558

-
422. **Salati LM, mir-Ahmady B** 2001 Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annu Rev Nutr* 21:121-140
423. **Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanetti M, Guarnieri G** 2005 Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E228-E235
424. **Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T** 2008 Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 366:388-392
425. **Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M** 2008 The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3:e1797
426. **Sangiao-Alvarellos S, Vazquez MJ, Varela L, Nogueiras R, Saha AK, Cordido F, Lopez M, Dieguez C** 2009 Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology* 150:4562-4574
427. **Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J** 2002 Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 146:241-244
428. **Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH, Jr.** 2002 Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185-190
429. **Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M** 2003 Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52:947-952

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda, profesional y personal, de mucha gente. Aunque me resulte, sin duda, uno de los apartados más difíciles de esta tesis, me gustaría agradecer a todos los que han colaborado, y de los que he aprendido, de alguna u otra forma. Aprovecho para escribir lo que tanto me cuesta decir!!!

Al director de esta tesis Carlos Diéguez, por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación, por la absoluta libertad con la que me ha permitido trabajar, y por ser un ejemplo a seguir, como científico y como persona.

A Sulay, por haberme enseñado lo que se, por su ayuda en la realización de estos experimentos y por los buenos momentos que pasamos juntas dentro y fuera del laboratorio. A Susana S, por su gran ayuda en estos experimentos, por resolver todas mis dudas, y por su amistad. A Marta y Paqui, por su colaboración en algunos de los experimentos, y por su cariño.

A Rucha, Richi y Luis, por su ayuda día a día, por su confianza en mi y en mi trabajo en los momentos difíciles, por los muchos momentos compartidos y por su amistad. Al resto de compañeros del grupo de Carlos: Katia, Adenis, Pablo, Amparo, Douglas, Miguel y Rubén.

A Marisol, por su amistad y todos esos pedidos! A Luz, por enseñarme a hacer hibridación *in situ*.

A Susana B, por ser una compañera y amiga ejemplar.

A Luis Lima, por su ayuda y consejos con los rias y el animalario, a Anxo y Clara, porque siempre están dispuestos a resolver cualquier duda, al igual que el resto de profesores del departamento.

A Omar y Sisi, por su ayuda y por los momentos de quirófano compartidos.

Al resto de compañeros de Fisio, que a pesar de las dificultades, consiguen que el ambiente de trabajo sea agradable.

A los que ya no están en Fisio: Eduardo (por sus enseñanzas), Cañi, Ana y Eva Vigo.

Al grupo de Fisiología de Manolo Tena, en Córdoba, por las colaboraciones y por su ayuda siempre que la he necesitado.

A María (inseparables desde primero de carrera), Tomás (aunque sea imposible quedar con él), Glori (un apoyo fundamental), y Rober (siempre dispuesto a ayudar), por su amistad, porque se que siempre puedo contar con ellos, en los buenos y los malos momentos, dentro y fuera del laboratorio. A mis compis de facultad (Sara, Grille, Manuel), y a los de Órdenes (Rosa, Vero, María, Lola, Juan), por su amistad y todos los momentos compartidos.

A mis padres y mis hermanos, porque ellos me han dado todo lo que soy; porque con su cariño, apoyo y comprensión incondicional me han permitido llegar aquí y trabajar en lo que me gusta. Al resto de mi familia, por toda su ayuda y cariño.

A todos, **GRACIAS !!!!!**

