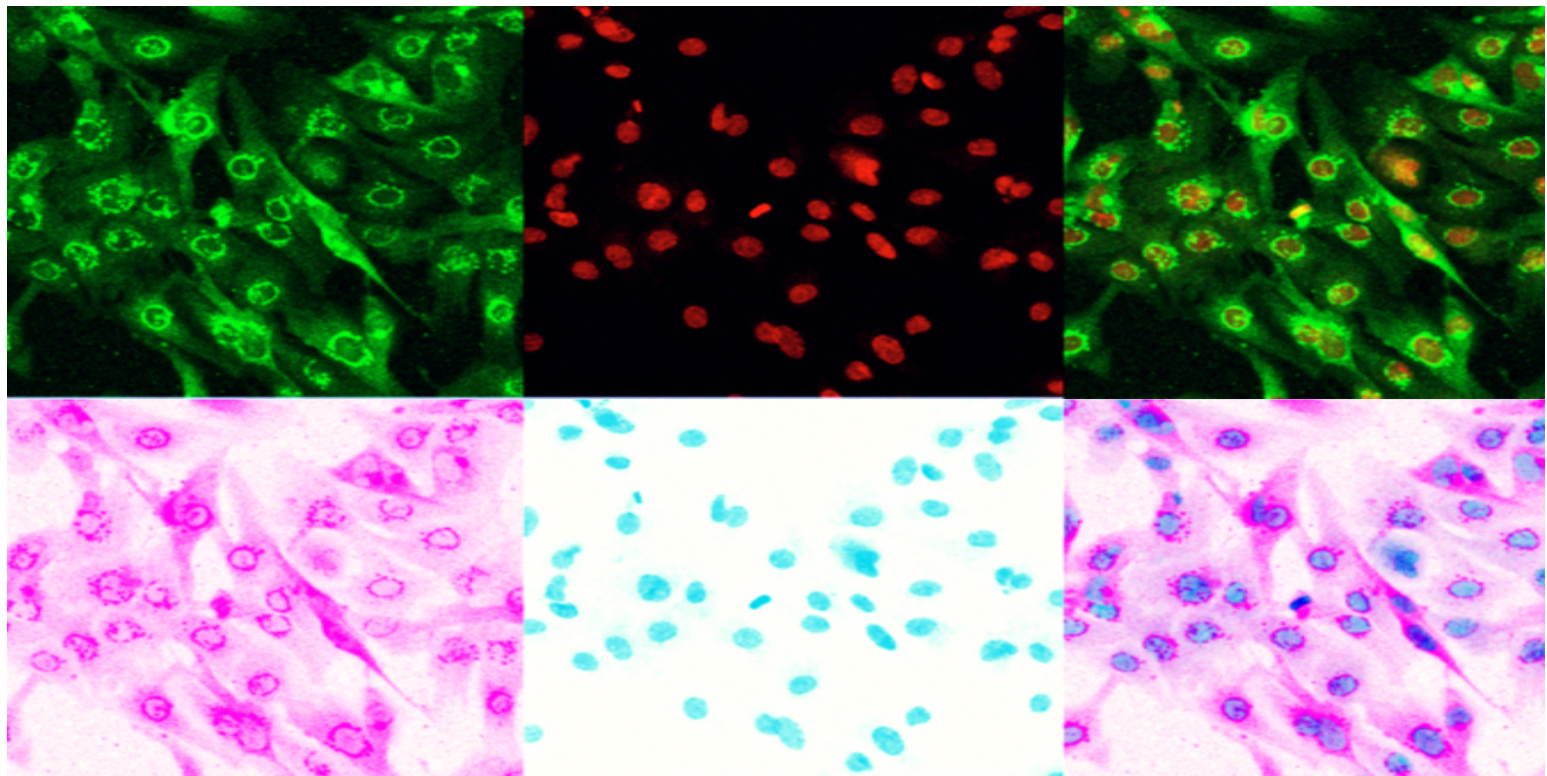


Estudio del papel de la nesfatina-1 en el control de la viabilidad y el metabolismo cardiaco.

Implicaciones en la fisiopatología de las
enfermedades cardiovasculares.

SANDRA FEIJOO BANDIN











Universidade de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago

Área de Inflamación

Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular y Molecular

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA NESFATINA-1 EN
EL CONTROL DE LA VIABILIDAD Y EL
METABOLISMO CARDIACO. IMPLICACIONES
EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS
ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

Tesis Doctoral

Sandra Feijóo Bandín
2014



Doña María Francisca Lago Paz, Investigadora del SERGAS en el Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago, y Don José Ramón González Juanatey, Catedrático de Medicina en la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe del Servicio de Cardiología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

La presente Tesis Doctoral titulada “Estudio del papel de la nesfatina-1 en el control de la viabilidad y el metabolismo cardiaco: implicaciones en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares”, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela), estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, se firma la presente autorización en Santiago de Compostela, Julio 2014.

Fdo: María Francisca Lago Paz

Fdo: José Ramón González Juanatey

Fdo: Sandra Feijóo Bandín



AGRADECEMENTOS

Cando cheguei ó laboratorio, o primeiro que me dixo a miña directora de tese foi “tes que saber que o traballo de investigación non é como un traballo normal, non temos un horario establecido e require de moito esforzo persoal pero, á súa vez, verás que é moi gratificante”. Despois de varios anos como estudante predoutoral, teño que recoñecer que tiña razón en todo, e gustaríame expresar o meu agradecemento a todas aquelas persoas que, en maior ou menor medida, contribuíron á realización deste traballo de tese e á miña formación profesional e persoal.

Grazas ós meus directores de tese, a Dra. María Francisca Lago Paz e o Dr. José Ramón González Juanatey, por darme a oportunidade de traballar no mundo da ciencia, por confiar en min para a realización deste traballo e por formarme como investigadora. A Juanatey pola súa amabilidade, cercanía e boa disposición en todo momento, e a Fran, polo día a día, por ensinarme a superar os retos que a ciencia nos brinda a miúdo, polo seu consello e a súa orientación.

Ós doentes do Servizo de Cardiología da Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela e do Hospital La Fe de Valencia, pola súa cooperación cedendo as mostras de sangue e tecidos.

Ós profesionais do servizo de Cardiología-Cirurxía Cardíaca pola súa colaboración na obtención de mostras e o seu asesoramento no traballo realizado cos doentes, en especial ó Dr. José Rubio e ó Dr. Alfonso Varela.

Ó Dr. Miguel Rivera Otero e todo o seu grupo de investigación, en especial ó Dr. Manuel Portolés, a Dra. Esther Roselló e a Dra. Micaela Molina, polas donacións de tecido ventricular cardíaco humano obtido de corazóns trasplantados, e ás Dras. Luisa María Seoane Camino e Ana Belén Crujeiras polas donacións dos corazóns de rata.

Ós Dres. Giampiero Muccioli, Corrado Guè e Elisa Arnoletti, por acollerme no seu laboratorio en Turín como unha máis e por facer da estancia unha experiencia inolvidable.

Ós Dres. Oreste Gualillo, Carmen Conde, Antonio González, Ezequiel Álvarez, Sonia Eiras, María Pardo, Yolanda Pazos e Jesús Camiña por toda a súa axuda e consellos.

Ó Dr. Tomás García Caballero por poñer á nosa disposición o Servizo de Anatomía Patolóxica para a realización de análisis inmunohistoquímicos.

Ás maravillosas Patri e Marta, pola súa labor técnica de inmunología e microscopía confocal respectivamente, por recibirme sempre con un sorriso, polos seus consellos e polo seu gran traballo.

A Bernardo, por cruzar de maneira desinteresada as nosas ratas. Sen a súa axuda o noso día a día sería moito máis caótico.

A todas as persoas que me encontrei ó chegar, cando aínda éramos catro gatos, quenes me incluíron como unha máis e me axudaron cos meus primeiros pasos neste mundiño da ciencia, en especial a Bruno e Toño, por todas as risas compartidas e por transmitirme a súa paixón pola investigación.

Á República Italiana (e ós nacionais infiltrados), ás rapazas estilosas do laboratorio 10, e ó resto de compañeiros que se foron incorporando nos últimos anos ós novos laboratorios, sobretudo ós colegas de matanzas. Moitas grazas por facer tan bó o ambiente de traballo (e o de lecer tamén).

Ó Dr. Calaza, pola súa enorme paciencia cada vez que acudín a él en busca de axuda, que non foron poucas, complicándolle un pouco a vida..., e por convertirme en fan da estadística. Moitas grazas Manoli.

A Bea e Jana, as miñas crackesas de referencia, por ser unhas persoas estupendas, con un gran corazón, das cales aprendín moito (e sigo) tanto a nivel profesional como a nivel persoal. Bótasevos moito en falta.

Ós meus amigos do clube do tupper, en especial ás novas incorporacións, Nere e Laura, por facer da comida unha hora de alegría, desafogo, debate e aprendizaxe (según o día). E tamén ás novas incorporacións da hora do café, Aida e Susana, por todos os seus consellos.

Ás superenfermeiras de Cardiología, Ana e María, non só polo seu bo traballo senón tamén (e sobretudo) porque sempre é unha alegría cada vez que nos veñen a visitar.

Ós meus compis de laboratorio, os mellores que me poidese encontrar. Ó largo destes anos todo o que aprendín aprendino con vos, coa vosa compañía e apoio, sempre con un momento para dedicarme cando precisei da vosa axuda. Moitas grazas por todas as risas, as idas de olla, os momentos inolvidables na sala de cultivos e os miles de abrazos que nos demos (e as mazaduras, pero esas non volas agradezo). A Manuel, por introducirme no mundo do SPSS e das bases de datos, a Ana, a nosa técnico todoterreno, por todas as horas de traballo altruista e por tirar do carro cando o precisei. A Vane, a nosa banqueta convertida en sofá chaiselongue con masaxe incorporado, polo seu cariño, a súa positividade, a súa enerxía, as miles de conversas polas tardes e por, a pesar de ser a última en chegar, facelo pisando forte e facerse tanto de querer. E a Diego, compañeiro de escritorio, de poiata e de orbital (Vane, a ti tamén te acollemos), con quen comecei e aprendín a traballar. Por toda a súa axuda, por transmitirme a súa serenidade e capacidade de resolución ante os problemas, pola nosa sinerxia á hora de traballar (e de pintar o parvo) e polas rutas turísticas nos congresos e as aventuras aeroportuarias. Xa che dixen que algún día me botarías de menos.

Ás miñas Biólogas & Cía, a Sandra, a Ali, a Mila, a María José e ós amigos de Rois, por todo o seu apoio e confianza, e porque a súa compañía sempre é unha inxección de enerxía.

Á miña familia, por escoitarme, animarme e empuxarme a mirar sempre hacia adiante, en especial a miña nai e a meu irmán, por transmitirme a súa fortaleza e cordura, polo seu apoio incondicional e por obrigarme a seguir o meu propio camiño. Sen a vosa confianza non o conseguiría.

E finalmente, ó meu Luis, por pagar o pato dos meus estreses (xa dende selectividade, pobre...) e por “entender” que nunca sei a que hora vou a salir. Por todo o seu apoio, a súa paciencia, a súa confianza e os seus ánimos. Por centrarme e obrigarme a non abandonar cando as cousas se poñen difíciles. Por confiar en min e por facerme a vida moito máis feliz. Moitas grazas por haber estado ahí todos estes anos e por acompañarme na nova etapa que me espera.







A MEU PAI.





ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1.-OBESIDAD Y MORBILIDAD EN LA SOCIEDAD ACTUAL.	3
1.1.-DEFINICIÓN DE LA OBESIDAD.	4
1.2.-OBESIDAD Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.	6
1.3.-LA PARADOJA DE LA OBESIDAD.	8
2.-EL METABOLISMO CARDIACO.	10
2.1.-COMPONENTES DEL METABOLISMO CARDIACO.	10
2.2.-CAMBIOS EN LA UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS ENERGÉTICOS A NIVEL CARDIACO.	11
Defectos en el metabolismo energético cardíaco.	12
3.-REGULACIÓN DE LA INGESTA.	14
3.1.- HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.	14
3.2.-SISTEMA DE LAS MELANOCORTINAS/NPY.	15
3.3.-PAPEL DE LA INSULINA Y LA GRELINA EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA.	16
Insulina.	16
Grelina.	18
4.-EL TEJIDO ADIPOSO: DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES PRINCIPALES.	21
Tejido adiposo pardo.	21
Tejido adiposo blanco.	22
4.1.-EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO COMO ÓRGANO ENDOCRINO.	24
Tejido adiposo visceral y subcutáneo.	26
Tejido adiposo epicárdico y perivascular.	27
4.2.-PRINCIPALES ADIPOKINAS Y HORMONAS METABÓLICAS.	28
Otras adipokinas.	32
5.-HORMONAS METABÓLICAS Y SISTEMA CARDIOVASCULAR.	34
5.1.-SÍNDROME METABÓLICO.	34
5.2.-PAPEL DE LAS ADIPOKINAS Y HORMONAS METABÓLICAS EN LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR.	37
Leptina.	38
Adiponectina.	39
Resistina.	40
Visfatina.	41
Apelina.	41
Chemerina.	42
Omentina.	42
Grelina.	42

5.3.-PRODUCCIÓN DE ADIPOKINAS Y HORMONAS METABÓLICAS POR OTROS TEJIDOS.	43
Producción de hormonas metabólicas por tejidos cardiovasculares.	43
5.4.-PRODUCTOS ENDOCRINOS DEL CORAZÓN Y REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.	44
6.-NESFATINA-1: UNA NUEVA HORMONA RELACIONADA CON EL CONTROL DE LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL.	46
6.1.-DESCUBRIMIENTO DE LA NESFATINA-1.	46
6.2.-NUCLEOBINDINA 2: PROTEÍNA PRECURSORA DE NESFATINA-1.	47
Estructura proteica de NUCB2.	48
Lugares de producción y principales funciones de NUCB2.	49
6.3.-NESFATINA-1: UNA NUEVA MOLÉCULA ANOREXIGÉNICA.	49
Nesfatina-1 como molécula efectora de NUCB2.	50
Función anorexigénica de nesfatina-1 a nivel cerebral.	51
Identificación del dominio funcional de nesfatina-1.	53
6.4.-DISTRIBUCIÓN Y LUGARES DE PRODUCCIÓN DE NESFATINA-1 EN MURINOS Y HUMANOS.	54
Distribución de Nesfatina-1 en otras especies.	56
6.5.-MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA NESFATINA-1 EN DISTINTOS TEJIDOS.	57
Señalización en el sistema nervioso.	57
Señalización en el páncreas.	60
Señalización en el estómago.	60
6.6.-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NESFATINA-1 EN LOS DISTINTOS TEJIDOS.	61
Regulación en cerebro.	61
Regulación en páncreas.	62
Regulación en estómago.	62
6.7.-NESFATINA-1 Y LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA: POSIBLE PAPEL DE LA NESFATINA-1 EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y LA DIABETES.	63
Efectos pancreáticos de nesfatina-1 sobre la síntesis de insulina.	63
Efectos a nivel cerebral de nesfatina-1 sobre la homeostasis de la glucosa.	64
Efectos de nesfatina-1 sobre la glucemia en plasma.	64
Nesfatina-1 en la obesidad.	65
Nesfatina-1 en la diabetes tipo II.	67
6.8.-NESFATINA-1 COMO HORMONA PLEIOTRÓPICA.	68
Nesfatina-1 y función gástrica.	69
Nesfatina-1 y termorregulación.	69

Nesfatina-1 y respuesta al estrés.	70
Nesfatina-1 y ansiedad/miedo.	70
Nesfatina-1 y regulación del sueño.	70
Nesfatina-1 y función reproductora.	71
Nesfatina-1 y regulación de la viabilidad celular.	72
7.-NESFATINA-1 Y SISTEMA CARDIOVASCULAR.	73
7.1.-NESFATINA-1 Y EL SÍNDROME METABÓLICO.	73
7.2.-EFECTOS DE NESFATINA-1 A NIVEL CEREBRAL SOBRE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR.	73
7.3.-EFECTOS DE NESFATINA-1 A NIVEL VASCULAR.	76
7.4.-EFECTOS DE NESFATINA-1 A NIVEL CARDIACO.	77
OBJETIVOS	81
MATERIAL Y MÉTODOS	83
1.-ÉTICA	85
2.-TEJIDOS HUMANOS.	85
3.-ANIMALES.	88
4.-CULTIVOS CELULARES.	89
Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos.	89
Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.	89
Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1.	90
5.-EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.	91
6.-CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD.	91
7.-WESTERN BLOT.	92
8.-EXTRACCIÓN DE ARN.	93
9.-RT-PCR.	94
10.-ARRAY DE EXPRESIÓN DE GENOMA COMPLETO: GENECHIP® DE AFFYMETRIX®.	96
11.-ENSAYO DE CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS: BODIPY®.	97
12.-CITOMETRÍA DE FLUJO.	97
13.-TINCIÓN VITAL HOECHST 33258.	98
14.-ENSAYO DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL: MITT.	98
15.-INMUNOHISTOQUÍMICA.	99
16.-MICROSCOPÍA CONFOCAL.	100
17.-ENSAYO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA.	102
18.-ELISA DE NESFATINA-1 DE RATA Y HUMANO.	102

20.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	104
RESULTADOS	107
1.-EXPRESIÓN GÉNICA DE NUCB2 EN CARDIOMIOCITOS HUMANOS Y MURINOS.	109
2.-SÍNTESIS DE NESFATINA-1 POR CARDIOMIOCITOS HUMANOS Y MURINOS.	111
3.-SECRECIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 POR CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA EN CULTIVO.	113
4.-EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NESFATINA-1 SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE GLUT-4.	113
5.-EFECTO DE NESFATINA-1 SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA POR CARDIOMIOCITOS MURINOS.	115
6.-EFECTO DE NESFATINA-1 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE AKT, AS160 Y ERK1/2.	117
7.-EFECTO DE NESFATINA-1 SOBRE LA CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA.	120
8.-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA POR ESTÍMULOS PROINFLAMATORIOS Y ANTIINFLAMATORIOS.	121
9.-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA POR LA INSULINA.	123
10.-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN CARDIACOS DE NESFATINA-1 EN RATA POR LA DIETA, EL AYUNO, LA OBESIDAD INDUCIDA GENÉTICAMENTE Y EL RETRASO EN EL DESTETE.	123
Dieta alta en grasa.	123
Ayuno.	126
Obesidad inducida genéticamente.	127
Retraso en el destete.	129
11.-ARRAY DE EXPRESIÓN DE GENOMA COMPLETO DE RATA.	130
12.-EFECTO DE NESFATINA-1 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.	134
Actividad mitocondrial.	134
Apoptosis.	135
Ciclo celular.	138
13.-ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN TEJIDO HUMANO CARDIACO.	139
Expresión de NUCB2 en tejido auricular en función del sexo.	139
Expresión de NUCB2 en tejido auricular en pacientes a tratamiento con IECAs.	139

Expresión de NUCB2 en tejido auricular en pacientes a tratamiento con antidiabéticos orales.	140
Expresión de NUCB2 en tejido auricular en función del gap de glicación.	142
Expresión de NUCB2 en tejido ventricular de pacientes en la fase final de la insuficiencia cardíaca.	144
14.-NIVELES PLASMÁTICOS DE NESFATINA-1 EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA.	145
DISCUSIÓN	147
1.-PRODUCCIÓN DE NESFATINA-1 EN EL CORAZÓN.	150
2.-NESFATINA-1 Y METABOLISMO ENERGÉTICO CARDIACO.	151
3.-REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NESFATINA-1 EN TEJIDO CARDIACO DE RATA.	154
Dieta.	154
Ayuno.	155
Obesidad.	155
Retraso en el destete.	156
4.-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA POR ESTÍMULOS PRO Y ANTIINFLAMATORIOS.	157
5.-REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA POR LA INSULINA.	157
6.-ANÁLISIS MEDIANTE MICROARRAY DE GENOMA COMPLETO DE LOS EFECTOS DE NESFATINA-1 SOBRE EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CARDIOMIOCITOS NEONATALES DE RATA EN CULTIVO.	158
7.-EFECTO DE NESFATINA-1 SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR CARDIOMIOCITARIA.	159
8.-ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE NUCB2/NESFATINA-1 EN TEJIDO CARDIACO HUMANO.	160
Relación entre los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 y el género.	160
Relación entre los niveles cardíacos de NUCB2/nesfatina-1 e hipertensión arterial.	161
Relación entre los niveles cardíacos de NUCB2/nesfatina-1, la diabetes y el gap de glicación.	161
Diabetes.	162
Gap de glicación.	163
Relación entre los niveles de NUCB2/nesfatina-1 en ventrículo izquierdo de pacientes en la fase final de la insuficiencia cardíaca.	164
9.-NIVELES DE NESFATINA-1 EN PLASMA DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA QUE PRESENTAN REDUCCIÓN DE LA TOLERANCIA AL EJERCICIO.	165

10.-NESFATINA-1 COMO UN POSIBLE BIOMARCADOR DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.	166
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	173
ANEXO	211





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



ACC: acetil-CoA carboxilasa.	AVPR: receptor de vasopresina.
ACTH: corticotropina.	BIA: Análisis de impedancia bioeléctrica.
AdipoR: receptor de adiponectina.	BNP: péptido natriurético cerebral.
ADMA: dimetilarginina asimétrica.	BSA-FFA: seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos.
ADN: ácido desoxirribonucleico.	BSA: seroalbúmina bovina.
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.	CART: transcrito regulado por cocaína-anfetamina.
ADO: antidiabéticos orales.	CBFA2T3: proteína correspondiente al gen de translocación mieloide en el cromosoma 16.
AG1478: inhibidor de ERbB4.	CCK: colecistoquinina.
AGCL: ácidos grasos de cadena larga.	CD36: translocasa de ácidos grasos.
AgRP: péptido relacionado con agoutí.	CEA: amígdala central.
AHA: <i>American Heart Association</i> .	CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
AKT: proteína quinasa B.	ChemR23: receptor de chemerina.
AMP: adenosín monofosfato.	CMD: cardiomiopatía dilatada.
AMPc: adenosín monofosfato cíclico.	CMHTA: cardiomiopatía hipertensiva.
AMPK: quinasa dependiente de AMP.	CMHTR: cardiomiopatía hipertrófica.
ANGPTL4: proteína como angiopoyetina 4.	CMV: cardiomiopatía valvular.
ANP: péptido natriurético atrial.	CNP: péptido natriurético tipo C.
APE1: enzima multifuncional de reparación del ADN.	CPT1: carnitín palmitoil transferasa 1.
APLNR: receptor de apelina.	CREB: proteína de unión a los elementos de respuesta de AMPc.
APOP1: proteína apoptogénica 1.	CRF: corticotropina.
APS: persulfato amónico.	CRH: hormona liberadora de corticotropina.
AraC: citarabina.	CRP: proteína C reactiva.
ARAI: antagonistas del receptor de angiotensina II.	DGAT: diacilglicerol aciltransferasa.
ARC: núcleo arcuato.	DIL: cardiomiopatía dilatada.
ARN: ácido ribonucleico.	DM: diabetes mellitus.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.	DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> .
AS160: sustrato de AKT de 160 kDa.	DMV: núcleo dorsal motor del vago.
ASP: proteína estimuladora de la acilación.	DPP4: dipeptidilpeptidasa 4.
ATGL: triacilglicerol lipasa.	
ATP III: <i>Adult Treatment Panel III</i> .	
ATP: adenosín trifosfato.	

dUTP: desoxiuridina trifosfato.	HbA _{1c} : hemoglobina A glicada.
ECVs: enfermedades cardiovasculares.	HBS: tampón salino de HEPES.
EDTA: ácido etildiaminotetraacético.	HDL: lipoproteína de alta densidad.
EF: dominio de unión al calcio.	HEPES: ácido 4 (2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
EGF: factor de crecimiento epidérmico.	HL-1: línea celular de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón.
ELISA: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> .	HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.
ERbB4: receptor de neuregulina.	HO-8910: línea celular de carcinoma epitelial ovárico humano.
ERK1/2: kinasa regulada por señales extracelulares 1/2.	HRP: peroxidasa de rábano.
EW: núcleo Edinger-Westphal.	HTA: hipertensión arterial.
FBS: suero fetal bovino.	I/R: isquemia/reperfusión.
FDR: <i>False Discovery Rate</i> .	IC: insuficiencia cardiaca.
FEVI: fracción de eyección del ventrículo.	IC ₅₀ : concentración máxima inhibitoria.
FSH: hormona folículoestimulante.	IDF: <i>International Diabetes Federation</i> .
G6PT: glucosa-6-fosfatasa.	IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
GABA: ácido γ -aminobutírico.	IL: interleukina.
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	IMC: Índice de Masa Corporal.
GC: guanilato ciclasa.	INS: corteza insular.
GE: neuronas excitadas por glucosa.	INSR: receptor de insulina.
Gg: gap de glicación.	IRS: sustrato del receptor de insulina.
GH: hormona de crecimiento.	ISQ: cardiomiopatía isquémica.
GHRH: somatocrinina.	JNK: kinasa c-Jun N-terminal .
GI: neuronas inhibidas por glucosa.	KAP1: proteína 1 asociada a queratina.
GLP1: proglucacón.	KEGG: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> .
GLUT: receptor de glucosa.	KO: <i>knockout</i> .
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico.	LC: locus cerúleo.
GRB2: proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2.	LDL: lipoproteína de baja densidad.
GRLNR: receptor de grelina.	LH: hormona luteinizante.
GS: glucógeno sintasa.	LHA: área lateral hipotalámica.
GSK3: glucógeno sintasa kinasa 3.	LPL: lipoproteín lipasa.
H4928: antagonista del receptor de oxitocina.	

LPS: lipopolisacárido.	NTS: núcleo del tracto solitario.
LSC: lesión coronaria.	NUCB1: nucleobindina 1.
M199: medio M199.	NUCB2: nucleobindina 2.
MAPK: proteín quinasa activada por mitógenos.	NYHA: <i>New York Heart Association</i> .
MC3R: receptor de melanocortina 3.	OMS: Organización Mundial de la Salud.
MC4R: receptor de melanocortina 4.	PACAP: adenilato ciclasa de la pituitaria.
MCH: hormona concentradora de melanina.	PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno.
MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos.	PBK/AKT: proteín kinasa B.
MIF: factor inhibitorio de la migración.	PBS: tampón fosfato salino.
MIN6: línea de células β -pacreáticas de ratón.	PC1/3: prohormona convertasa 1/3.
MSH hormona estimulante de melanocitos.	PCA: análisis de componentes principales.
mTOR: diana de rapamicina de mamíferos.	PD98059: inhibidor de MAPK.
MTT: 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.	PDH: piruvato deshidrogenasa.
MVI: masa ventricular izquierda.	PDHK4: piruvato deshidrogenasa kinasa 4.
NB41A3: línea celular de neuroblastoma de ratón.	PDK1: proteín kinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos.
NCS: suero de ternero recién nacido.	PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxikinasa.
NF κ B: factor nuclear κ B.	PFA: área perifornical.
NO: óxido nítrico.	PGC1- α : coactivador 1 α del receptor gamma activado por el proliferador perixosomal
NPR-A: receptor del péptido natriurético atrial.	PI3K: fosfoinositol-3-fosfato kinasa.
NPR-B: receptor del péptido natriurético cerebral.	PIP2: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato.
NPY: neuropeptido Y.	PIP3: fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato.
NR1H2: subfamilia de receptores nucleares de tipo 1, grupo H, miembro 2.	PKA: proteín kinasa A.
NRG: neuregulina.	PKC: proteín kinasa C.
	PLA2: fosfolipasa 2.
	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
	POMC: proopiomelanocortina.
	PPAR- γ : receptor γ activado por el proliferador perixosomal
	PRKCA: proteín kinasa C α .

PRLH: hormona liberadora de prolactina.	SON: núcleo supraóptico.
pS6K: proteína quinasa ribosomal S6.	TAG: triacilglicerol.
PTP: poro de transición de permeabilidad.	TEMED: tetrametiletilendiamina.
PVDF: polifluoruro de vinilideno.	TGF- β : factor de crecimiento tumoral β .
PVN: núcleo paraventricular.	TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.
PYY: péptido YY 3-36.	TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
Rab: geranil-geranil transferasa β .	TRH: hormona liberadora de tirotrópina.
RBP4: proteína de unión a retinol 4.	TRPV1: receptor potencial transitorio V1 del vago.
RECAVA: Red Temática de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cardiovasculares.	UAA: unidades arbitrarias de absorbancia.
REM: <i>Rapid Eye Movement</i> .	UAD: unidades arbitrarias de densitometría.
Rn18S: subunidad 18S ribosomal.	UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.
ROS: especies reactivas de oxígeno.	UCP1: termogenina.
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.	UDG: uracil DNA glucosilasa.
SA-HRP: peroxidasa de rábano unida a estreptavidina.	USC: Universidad de Santiago de Compostela.
SDS: docecilsulfato sódico.	VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
SEM: error estándar de la media.	VFDVI: volumen fin diástole del ventrículo izquierdo.
sGC: guanilato ciclasa soluble.	VFSVI: volumen fin de sístole del ventrículo izquierdo.
SHU9119: antagonista de los receptores MC3R/4R.	VLM: médula ventrolateral.
SMet: síndrome metabólico.	
SNC: sistema nervioso central.	



INTRODUCCIÓN



1.-Obesidad y morbilidad en la sociedad actual.

Desde el punto de vista biomédico, la obesidad se define como el resultado de un desequilibrio energético donde la entrada de energía excede al gasto calórico a lo largo del tiempo, lo que conduce a un incremento de la masa corporal.¹

Durante las últimas décadas, la obesidad ha alcanzado proporciones pandémicas debido, principalmente, a un cambio global en nuestros hábitos de vida.² La ingesta de alimentos hipercalóricos ricos en grasa, sal y azúcares y de bebidas azucaradas, así como un descenso en la actividad física debido al sedentarismo causado por muchas formas de trabajo, los nuevos medios de transporte y la creciente urbanización, han provocado un rápido incremento en la prevalencia de la obesidad.^{3,4} De este modo se ha pasado de entender la obesidad desde el punto de vista del comportamiento individual a relacionarla con factores socio-económicos y ambientales, donde el comportamiento individual se ve influenciado por el entorno y del contexto social.¹ El incremento de la población obesa no solo se observa en los países desarrollados, sino también en aquellos que todavía se encuentran en vías de desarrollo.⁵

Muchos países en vías de desarrollo actualmente están afrontando una “doble carga” de morbilidad.^{6,7} Mientras continúan lidiando con los problemas de las enfermedades infecciosas y la desnutrición, a su vez están experimentando un aumento brusco en los factores de riesgo de contraer enfermedades no transmisibles como la obesidad y el sobrepeso, en particular en los entornos urbanos.⁸ No es raro encontrar la desnutrición y la obesidad coexistiendo en un mismo país o una misma comunidad, ya que los alimentos hipercalóricos suelen ser poco costosos y accesibles.⁹

El sobrepeso y la obesidad son el quinto factor de riesgo de defunción en el mundo, y cada año fallecen sobre 2.8 millones de personas adultas como consecuencia de esta patología.⁸ La obesidad está asociada con el incremento del riesgo de padecer distintos tipos de enfermedades crónicas, como la resistencia a la insulina (definida como una respuesta defectuosa en la señalización de la insulina), diabetes tipo II, hipertensión, dislipemia, enfermedades cardiovasculares (ECVs) y algunos tipos de cáncer,^{10,11} enfermedades típicamente relacionadas con la edad que pueden aparecer también en jóvenes y niños con problemas de sobrepeso y obesidad.^{12,13}

Como es de esperar, la prevalencia de las enfermedades asociadas a la obesidad también se ha incrementado de forma paralela a la incidencia de la obesidad en la población: sobre un 80% de los adultos obesos tienen al menos una enfermedad asociada a la obesidad y el 40% entre dos o más.¹⁴ El incremento de peso en 1 kg se ha asociado con

el incremento del riesgo cardiovascular un 3.1% y del riesgo de padecer diabetes tipo II entre un 4.5-9%, mientras que la reducción de peso un 11% reduce la mortalidad por ECVs y diabetes un 25%.¹⁴

La prevalencia de la obesidad y el sobrepeso es particularmente alta en América, donde un 62% de la población tiene sobrepeso y un 26% obesidad, mientras que en el sureste asiático se encuentran las menores cifras a nivel mundial (14% con sobrepeso y 3% con obesidad).¹⁵

Concretamente en España, según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un 53.4% de la población tiene sobrepeso y un 15.6% obesidad, por lo que menos de la mitad de la población española tiene un peso normal (Fig. 1).⁸

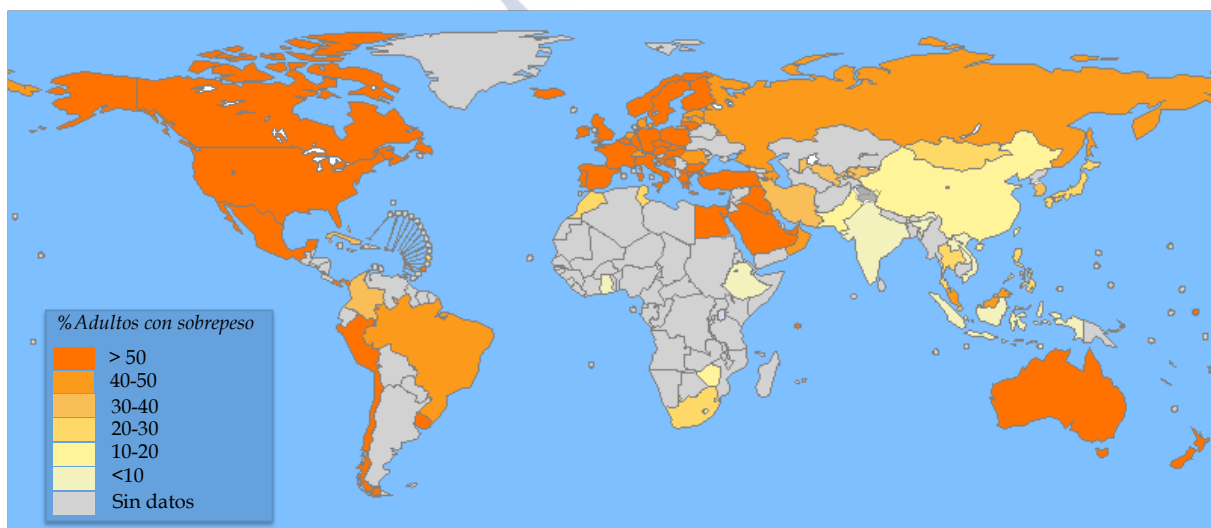


Figura 1: Representación del porcentaje de adultos con sobrepeso a nivel mundial según el informe más actualizado de la OMS.⁸

Aparte de los factores socioeconómicos y ambientales, existen también diversos factores genéticos que parecen estar implicados en la predisposición de padecer obesidad, como la deficiencia de determinadas hormonas implicadas en la regulación de la ingesta y la homeostasis energética o la deficiencia de sus receptores, aunque estos casos son los menos comunes.¹⁶⁻¹⁸

1.1-Definición de la obesidad.

La obesidad se define como un acúmulo anormal o excesivo de grasa debido, principalmente, a un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, y puede medirse utilizando el Índice de Masa Corporal (IMC), considerándose que un individuo obeso tiene un IMC igual o superior a 30 kg/m² (Tabla 1).⁸

<i>IMC (kg/m²)</i>	<i>Clasificación</i>
< 18.5	Inferior al peso normal
18.5-24.99	Normopeso
25-29.99	Sobrepeso
≥ 30	Obesidad

Tabla 1: Clasificación del IMC según la OMS.⁸

El estado de obesidad se clasifica a su vez en tres categorías: obesidad de grado I (30-34.9 kg/m²), grado II (35-39.9 kg/m²) y grado III (≥40 kg/m²).¹⁵ La Sociedad Americana del Corazón (AHA) ha propuesto subgrupos adicionales para considerar la rápida expansión de los individuos con obesidad masiva, introduciendo el grado IV (≥50 kg/m²) y el grado V (≥60 kg/m²).¹⁵

Aunque el IMC es comúnmente utilizado como una medida de adiposidad, es más bien una medida del exceso de peso corporal total.¹⁹ El sistema de clasificación de IMC se obtiene a partir de puntos de corte en la población general, y aunque se correlaciona positivamente con el porcentaje de grasa corporal total, no discrimina entre los distintos componentes corporales ni describe la distribución de la grasa.²⁰ Así, el IMC tiene algunas limitaciones a la hora de estimar el riesgo de padecer enfermedades asociadas a la obesidad en personas con poca cantidad de masa muscular y alta cantidad de grasa, y en aquellas con elevada cantidad de masa muscular y poca de grasa, donde el IMC no constituye un reflejo de la adiposidad.²¹

El exceso de grasa abdominal es un factor de riesgo independiente de padecer enfermedades asociadas a la obesidad.²² La medida de la circunferencia de la cintura es particularmente útil para determinar este riesgo en personas categorizadas como normopeso o sobrepeso utilizando el IMC, ya que en personas obesas la circunferencia de la cintura no aporta más información que el IMC en cuanto a la asociación de la obesidad con sus comorbilidades.²² Se considera que circunferencias abdominales mayores de 102 cm en varones y 88 cm en mujeres son indicadores de alto riesgo de padecer diabetes, dislipemia e hipertensión, así como ECVs asociadas.²²

Otro método empleado para medir la adiposidad es el análisis de impedancia bioeléctrica (BIA), una técnica que permite estimar la composición corporal diferenciando entre compartimentos corporales de masa magra y masa grasa.²³ Es un método sencillo, inocuo, reproducible y barato en el que se inyecta una corriente eléctrica alterna de muy baja intensidad basándose en el principio de que los tejidos biológicos se comportan como conductores de corriente eléctrica (en mayor o menor medida) y /o aislantes, en función de su composición.²³ La principal limitación de la BIA es que es una técnica muy sensible a

cambios bruscos en el contenido hídrico del organismo (retención hídrica o deshidratación), lo que puede inducir a errores importantes en la estimación de los compartimentos corporales.²³

La resonancia magnética cuantitativa es otra técnica emergente que mide diferencias en señales de emisión de átomos de hidrógeno por la grasa, la masa magra y masa libre de agua.²⁴ Esta técnica es altamente sensible ante pequeños cambios en la masa grasa en comparación con otras técnicas y sería más eficaz a la hora de cuantificar y localizar la distribución de la masa grasa.²⁴

1.2.-Obesidad y enfermedad cardiovascular.

El IMC elevado está asociado con la aparición de factores de riesgo de ECVs como la hipertensión, la dislipemia, la resistencia a la insulina y la diabetes.¹⁵ Diversos estudios han documentado que el IMC elevado se asocia significativamente, tanto en varones como en mujeres, con manifestaciones de ECVs como angina, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca o muerte súbita.²⁵

En general, la obesidad se asocia con un incremento de la tasa de mortalidad, pero deben de considerarse los distintos grados de obesidad en la estratificación del riesgo de mortalidad.²⁶ En un meta-análisis realizado recientemente donde se incluyen 2.88 millones de personas, todos los grados de obesidad combinados en uno solo se asocian con un incremento de la tasa de mortalidad.²⁶ Sin embargo, cuando se analizan por separado, la obesidad de grado I no se asocia con el incremento del riesgo de mortalidad, comparada con los individuos de peso normal.²⁶ Por el contrario, la obesidad severa (grados II y III) sí se asocia con el incremento del riesgo de mortalidad.²⁶

Además, individuos con sobrepeso y obesidad pueden mostrar distintos patrones de riesgo cardiovascular en función de la distribución de la grasa corporal.¹⁵ El exceso de tejido adiposo visceral, independientemente del IMC, se asocia con la aparición de anomalías de origen diabético y aterogénico como la resistencia a la insulina, elevación de los triglicéridos y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL).¹⁵ Por el contrario, niveles bajos de tejido adiposo visceral y la obesidad subcutánea se asocian con un riesgo bajo de padecer ECVs.¹⁵

En la actualidad, existen numerosas evidencias que apoyan la idea de que el acúmulo regional de grasa es más importante a la hora de considerar el riesgo de ECVs que el exceso de adiposidad total *per se*.¹⁵ Aunque existen distintas técnicas que nos permiten calcular de forma más precisa la cantidad y localización de la grasa corporal, como la

resonancia magnética cuantitativa, estas técnicas son caras y no están disponibles para usar a gran escala de forma rutinaria.¹⁵ De este modo, una buena alternativa es la determinación del perímetro de la cintura para discriminar el riesgo de ECVs, ya que no supone costes, es fácil de realizar y muestra una asociación razonable con la adiposidad visceral.^{27,28} La OMS ha definido los valores de riesgo de ECVs en cuanto a la circunferencia de la cintura: 94 cm en varones y 80 en mujeres implican un riesgo alto, y 102 cm en varones y 88 cm en mujeres suponen un riesgo substancialmente alto (Tabla 2).²⁹

	IMC (kg/m ²)	Riesgo de ECVs	
		Circunferencia cintura Varones ≤102 cm Mujeres ≤88 cm	Circunferencia cintura Varones >102 cm Mujeres >88 cm
Inferior al peso normal	< 18.5	---	---
Normopeso	18.5-44.9	---	---
Sobrepeso	25-29.9	Incrementado	Alto
Obesidad	30-34.9	Alto	Muy alto
Grado I	35-39.9	Muy alto	Muy alto
Grado II	≥40	Extremadamente alto	Extremadamente alto
Grado III	≥50	Extremadamente alto	Extremadamente alto

Tabla 2: Clasificación del riesgo cardiovascular en función del IMC y la circunferencia de la cintura.²⁵

El acúmulo crónico de grasa causa adaptaciones a nivel del sistema cardiovascular para intentar mantener la homeostasis corporal.¹⁵ Dos mecanismos de gran importancia en este proceso de adaptación son el incremento del gasto cardíaco (volumen de sangre/ventrículo/minuto) y la disminución de la resistencia vascular periférica.¹⁵

El volumen sistólico (volumen de sangre que sale del ventrículo izquierdo durante la contracción) es el principal determinante del incremento del gasto cardíaco, y se incrementa debido al aumento del volumen de sangre circulante en pacientes obesos para satisfacer las necesidades metabólicas en estos estados.^{15,30} Este aumento del volumen sanguíneo contribuye al incremento de la precarga cardíaca (tensión en la pared ventricular al final de la diástole), que a largo plazo induce remodelamiento cardíaco mediante el ensanchamiento de las cavidades y el incremento de tensión en las paredes, lo cual puede conducir al desarrollo de hipertrofia ventricular, principalmente del ventrículo izquierdo.^{31,32} El aumento de grosor de las paredes debido a la hipertrofia se acompaña de un descenso en la elasticidad ventricular, ligada al incremento de la presión de llenado del ventrículo y una consecuente disfunción ventricular, que en determinados casos se podría normalizar mediante la pérdida de peso y ejercicio aeróbico.^{33,34} Al principio del desarrollo de la hipertrofia ventricular, existe una adaptación al ensanchamiento de las cavidades

ventriculares y la función sistólica está preservada, en cambio, en estados avanzados de hipertrofia la función sistólica se ve alterada.²⁵ Tanto la hipertrofia ventricular como la degeneración muscular, el incremento de volumen sanguíneo y las disfunciones sistólicas y diastólicas son los principales precursores de la insuficiencia cardíaca (IC) en la obesidad.²⁵ Además, distintas comorbilidades asociadas con la obesidad pueden predisponer a los pacientes obesos a padecer IC, como la hipertensión, la apnea del sueño o la diabetes tipo II.²⁵

Dado que el sobrepeso y la obesidad tienen efectos adversos sobre la estructura cardíaca y la función ventricular, no es de extrañar que la prevalencia de la IC se incremente de forma marcada en pacientes con obesidad severa.³⁵ En el estudio Framingham, donde participaron 5.881 individuos, se demostró que por cada kg/m^2 de incremento en el IMC el riesgo de IC se incrementaba un 5% en varones y un 7% en mujeres durante un período de seguimiento de 14 años.³⁶ En otro estudio realizado en 74 pacientes con obesidad mórbida ($>40 \text{ kg}/\text{m}^2$) se observó que casi un tercio tenía evidencias clínicas de IC, y la prevalencia de IC se incrementaba rápidamente con el incremento de la duración de la obesidad mórbida.³⁷

1.3.-La paradoja de la obesidad.

A pesar de los descubrimientos anteriores, el papel de la obesidad en la mortalidad por IC es actualmente objeto de controversia, ya que se ha descrito la llamada «paradoja de la obesidad», según la cual los pacientes con sobrepeso u obesidad, a pesar de tener mayor riesgo cardiovascular, presentan mejor pronóstico ante determinadas patologías.³⁸ Aunque todavía se desconocen los mecanismos por los que mejora el pronóstico de los pacientes con obesidad, algunos estudios indican que puede tener relación con la proporción de la masa magra respecto a la masa grasa, o que la medición de distintos parámetros nutricionales podría ser más importante para determinar la relación entre la obesidad y el menor riesgo de muerte.³⁹ De forma similar, el beneficio paradójico en cuanto a la supervivencia de pacientes obesos con IC también se ha observado en pacientes con enfermedad coronaria arterial, en síndromes coronarios agudos o en insuficiencia renal crónica.⁴⁰⁻⁴³

Muchos pacientes con sobrepeso y obesidad pueden desarrollar IC de forma secundaria como resultado de anormalidades en la función ventricular asociadas a la hipertensión y al daño cardíaco.³⁵ Sin embargo, los individuos con peso normal que desarrollan IC lo hacen debido a otros mecanismos que pueden tener como resultado una peor prognosis.³⁵ Pacientes obesos con IC en edades tempranas tienen una mayor fracción

de eyección (disminución del volumen del ventrículo izquierdo en sístole con respecto a la diástole) y presión sanguínea, lo que les permite tolerar más medicación cardioprotectiva y a dosis más altas.³⁵ Estos factores, y otros, podrían conducir a una presentación de la enfermedad de forma menos severa, relacionada con una mejor prognosis en pacientes obesos con IC comparada con pacientes con normopeso.³⁵ Algunos trabajos han propuesto que la pérdida intencionada de peso debido a dieta y ejercicio es parte de la clave del beneficio paradójico de la obesidad.^{44,45}

Se sugiere que la mejor prognosis de la paradoja de la obesidad ocurre en pacientes con sobrepeso u obesidad de grado I.^{46,47} Algunos estudios apuntan que a partir de un determinado grado de obesidad se pierde el efecto protector, de forma que los pacientes con obesidad más severa tendrían el mayor índice de mortalidad,^{48,49} aunque en otros estudios no se observa este fenómeno.^{46,50}



2.-El metabolismo cardiaco.

La actividad de bombeo que desarrolla permanentemente el corazón necesita de un aporte de sustratos energéticos abundante y constante, los cuales se destinan a la generación de adenosín trifosfato (ATP) en la cadena respiratoria mitocondrial.⁵¹ Las mitocondrias ocupan un tercio del volumen celular de los cardiomiocitos, convirtiéndolos en el tipo celular con mayor contenido de mitocondrias.⁵² En el adulto normal, el corazón sintetiza diariamente alrededor de 70 veces su peso en ATP, lo cual es equivalente a unos 30 kg.⁵¹ El contenido de ATP cardiaco es relativamente bajo (5 $\mu\text{mol/g}$) y su tasa de hidrólisis muy elevada ($\sim 30 \mu\text{mol/g/min}$ en reposo), por lo que los niveles de ATP miocárdico se renuevan completamente cada 10 segundos.⁵³ De esta manera, cualquier alteración en el balance de producción/consumo de ATP puede inducir el desarrollo y progresión de diversas patologías cardiacas.⁵⁴

Aunque el aporte constante de sustratos del torrente sanguíneo es primordial para la producción de ATP mitocondrial, en los últimos años se ha reconocido que los metabolitos generados tanto a partir de rutas productoras como de las no productoras de ATP se pueden convertir en importantes reguladores de la función de los cardiomiocitos.⁵²

2.1.-Componentes del metabolismo cardiaco.

El corazón es capaz de utilizar una gran variedad de sustratos energéticos, incluyendo los carbohidratos (20%), los lípidos (70%), los aminoácidos y los cuerpos cetónicos, en función de la situación fisiológica del individuo.⁵² Los distintos sustratos energéticos, mediante sus vías catabólicas específicas, convergen en la formación de Acetil-CoA, que se incorpora en el ciclo de Krebs.⁵² El paso final de transferencia de energía se realiza mediante la fosforilación oxidativa, proporcionando más de un 95% del ATP consumido por el corazón (Fig. 2).⁵² En el corazón normal, las mitocondrias son abastecidas principalmente por Acil-CoA y piruvato, que son los metabolitos primarios de los ácidos grasos y los carbohidratos respectivamente.⁵² La entrada de Acil-CoA en la mitocondria es un proceso finamente regulado, con un paso limitante a nivel de la acción de la carnitín palmitoil transferasa 1 (CPT1), y la oxidación del piruvato está también controlada por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH), por lo que la regulación de ambas rutas metabólicas se consigue principalmente mediante la modulación de la actividad de CPT1 y PDH.⁵⁵ En cambio, otros sustratos como el lactato, los cuerpos cetónicos o los aminoácidos, pueden entrar en la mitocondria directamente para ser oxidados.⁵² El metabolismo de los cuerpos cetónicos da lugar a Acetil-CoA, mientras que el de los

aminoácidos conduce a la formación de cetóácidos, que son posteriormente metabolizados para entrar en el ciclo de Krebs⁵² (Fig. 2). La contribución de los cuerpos cetónicos y los aminoácidos al total del metabolismo oxidativo cardíaco es considerada menor debido a la baja disponibilidad de estos sustratos en condiciones fisiológicas normales.⁵²

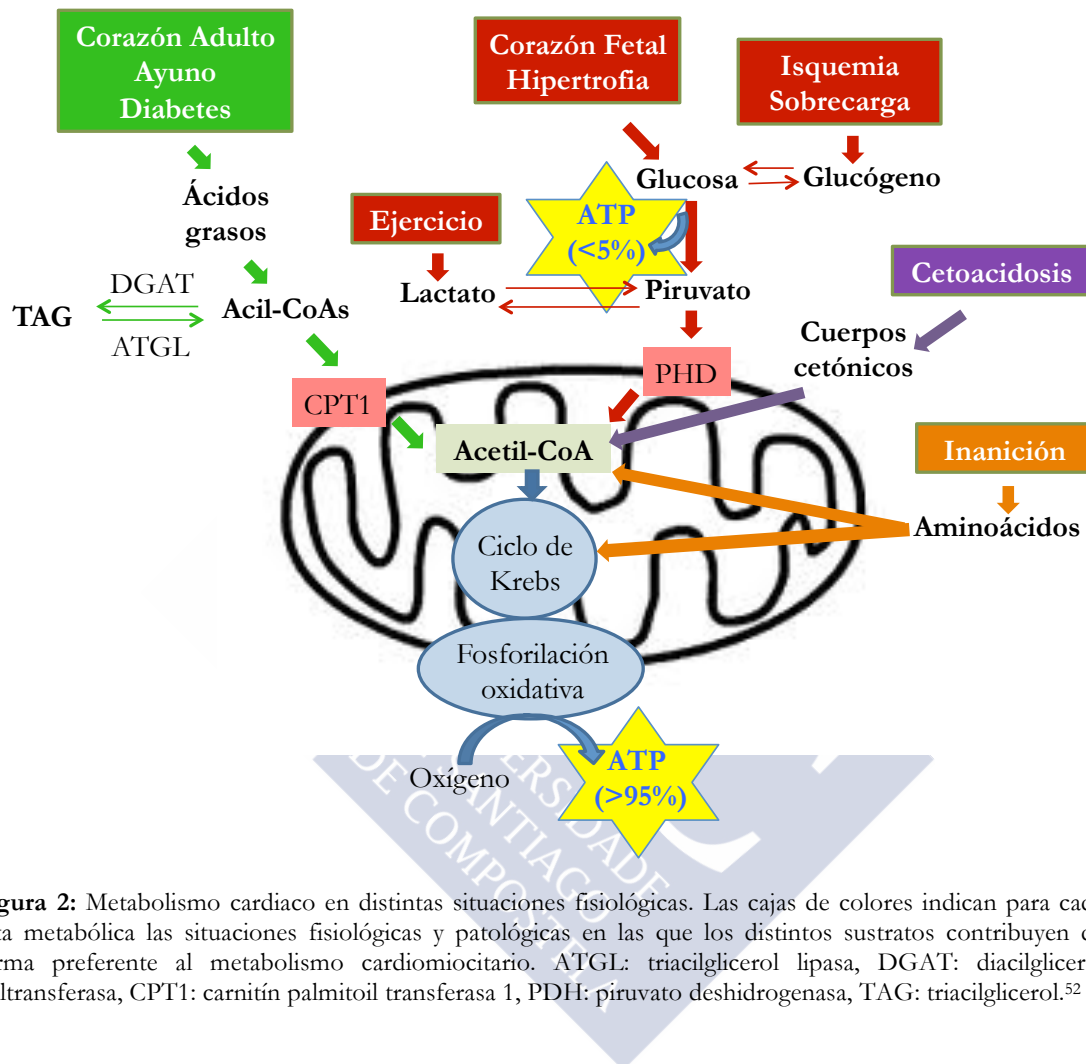


Figura 2: Metabolismo cardíaco en distintas situaciones fisiológicas. Las cajas de colores indican para cada ruta metabólica las situaciones fisiológicas y patológicas en las que los distintos sustratos contribuyen de forma preferente al metabolismo cardiomiocitario. ATGL: triacilglicerol lipasa, DGAT: diacilglicerol aciltransferasa, CPT1: carnitín palmitoil transferasa 1, PDH: piruvato deshidrogenasa, TAG: triacilglicerol.⁵²

2.2.-Cambios en la utilización de sustratos energéticos a nivel cardíaco.

Desde hace años se considera que los ácidos grasos son el sustrato energético predominante para el miocardio adulto normal, suponiendo aproximadamente un 70% del ATP producido a nivel cardíaco,⁵⁶ lo cual es razonable ya que la oxidación de ácidos grasos aporta más energía que los demás sustratos. Por ejemplo, la oxidación de una molécula de ácido palmítico produce 129 moléculas de ATP, mientras que una molécula de glucosa produce solo 36.⁵⁷ Además, el tejido adiposo es la principal forma de almacenamiento de energía albergando entre 90.000-225.000 kcal, lo que supone 100 veces más que los depósitos de carbohidratos (1.000-2.000 kcal).⁵⁷

Sin embargo, el metabolismo cardiaco es altamente flexible a la hora de utilizar otros sustratos metabólicos cuando se encuentran en abundancia.⁵² Por ejemplo, la oxidación de lactato se convierte en la ruta metabólica predominante durante la realización de ejercicio debido al incremento de la producción de lactato por el músculo esquelético.⁵⁸ El ayuno prolongado o una dieta cetogénica incrementan los niveles en sangre de cuerpos cetónicos, que son utilizados por el corazón como fuente de energía.⁵⁹ En situaciones de elevado aporte de carbohidratos, como tras la ingesta de comidas con alto contenido en carbohidratos, el ratio ácidos grasos/glucosa como sustrato energético principal se desplaza hacia la utilización de glucosa debido al incremento de la insulina postprandial, que facilita la captación y el metabolismo de la glucosa a nivel cardiaco, convirtiéndose en el principal sustrato energético alcanzando el 60-70%.⁵⁷ La insulina también induce la captación de ácidos grasos, pero al contrario que la glucosa, solo se metaboliza el 20% de los ácidos grasos captados, de modo que el exceso se almacenan en forma de lípidos.⁵⁷ Estas observaciones apoyan el concepto de flexibilidad metabólica, el cual le confiere al corazón la ventaja de poder proveerse de forma adecuada de ATP para su contracción continua ante diferentes situaciones fisiológicas.⁵²

Además de la disponibilidad de los distintos sustratos, existen mecanismos complejos de regulación del metabolismo cardiaco que contribuyen a su flexibilidad metabólica a distintos niveles, como la regulación transcripcional y las modificaciones post-traduccionales de proteínas clave relacionadas con cada ruta metabólica, así como también regulaciones alostéricas por los propios sustratos o sus metabolitos.⁵² Por ejemplo, la regulación transcripcional por parte del coactivador 1 α del receptor γ activado por el proliferador perioxosomal (PPAR- γ) (PGC1- α) de proteínas de la ruta de oxidación de los ácidos grasos es el principal mecanismo implicado en la transición de la utilización de glucosa en el corazón fetal al metabolismo oxidativo de ácidos grasos en el corazón adulto.⁶⁰ Aunque la regulación transcripcional contribuye al establecimiento de una ruta metabólica, son las modificaciones post-traduccionales las que regulan los flujos, de modo que la fosforilación e inactivación de PDH por la piruvato deshidrogenasa kinasa 4 (PDHK4) juega un papel importante en el cambio de utilización de sustrato entre la glucosa y los ácidos grasos en el corazón.⁶¹

Defectos en el metabolismo energético cardiaco.

En determinadas situaciones patológicas como la diabetes o la hipertrofia se cree que existe una situación de inflexibilidad metabólica que contribuye de forma significativa a

la etiología de la disfunción contráctil del corazón, donde existe un incremento de la captación de ácidos grasos,⁶² conduciendo a un acúmulo de lípidos tóxicos para el corazón que pueden alterar las estructuras celulares y activar cascadas de señalización que inducen cardiotoxicidad.⁶³ Así, se ha visto que el incremento de la dependencia de ácidos grasos como sustrato energético para la producción de energía induce un empeoramiento de la función contráctil, ya que requieren mayores cantidades de oxígeno para la producción de ATP en comparación con la glucosa.⁶² Recientemente se ha implicado a los ácidos grasos, el diacilglicerol y las ceramidas en la aparición de cardiotoxicidad, moléculas que podrían causar apoptosis, defectos en la señalización de la insulina o estrés del retículo endoplasmático en los cardiomiocitos.⁶³

En los últimos años se han descrito numerosos defectos del metabolismo cardíaco en situaciones patológicas como la hipertrofia ventricular izquierda,⁶⁴ la isquemia miocárdica⁶⁵ o la insuficiencia cardíaca.⁶⁶ En la hipertrofia miocárdica se produce una situación de aceleración de la glucólisis sin ningún incremento asociado en la tasa de oxidación de la glucosa, lo que conlleva un desacoplamiento entre ambos componentes del metabolismo de la glucosa y un acúmulo de protones y lactato en el miocardio.⁶⁴ En la isquemia miocárdica moderada ocurre un cambio en la utilización de ácidos grasos a glucosa, a pesar de la presencia de mayores niveles de ácidos grasos libres. Sin embargo, existe una disfunción progresiva en la oxidación del piruvato, que también da lugar a un acúmulo de protones y lactato en el corazón.⁶⁵ Finalmente, la insuficiencia cardíaca moderada está asociada con la disminución progresiva de la tasa de oxidación de ácidos grasos, correlacionándose con la severidad de la disfunción sistólica y, posteriormente, produciendo una disminución de la capacidad oxidativa de las mitocondrias. Al principio del desarrollo de la insuficiencia cardíaca se tiende a incrementar la utilización de la glucosa, pero a medida que se desarrolla se produce una inhibición de la ruta de transporte de glucosa miocárdica.⁶⁶

3.-Regulación de la ingesta.

3.1.- Homeostasis energética.

El metabolismo energético se define como el conjunto de procesos y reacciones físico-químicas implicadas en la obtención y transformación de energía a partir de la ingesta de alimentos para el mantenimiento de las funciones vitales en las células.⁶⁷ El organismo destina esta energía fundamentalmente a tres componentes: el metabolismo basal, la actividad física y la generación de calor.⁶⁷ El control del balance energético a través del apetito y de la termogénesis, así como la estabilidad de la composición corporal, se lleva a cabo con la participación del sistema nervioso y determinados neuropéptidos (como el neuropéptido Y o las melanocortinas),^{67,68} de forma que el cerebro responde ante señales circulantes que informan acerca del estado nutricional modulando el metabolismo y/o la sensibilidad a la insulina en distintos órganos, como el hígado, el músculo esquelético o el tejido adiposo, a través del sistema nervioso autónomo.⁶⁸ De esta forma el cerebro regula el balance entre la ingesta de nutrientes, el gasto energético y el acúmulo de reservas, manteniendo el peso corporal dentro de un rango estrecho y constante.⁶⁸

Tras la ingesta, la presencia de nutrientes en el aparato digestivo desencadena la secreción de péptidos como la colecistoquinina (CCK), o el péptido YY 3-36 (PYY), que activan neuronas aferentes del nervio vago y del sistema simpático para proporcionar información acerca del estado nutricional a nivel cerebral e inducir la supresión de la ingesta.^{14,69-71}

Algunos péptidos, como por ejemplo la insulina o la grelina, secretados fundamentalmente por el páncreas y el estómago respectivamente, pueden actuar también directamente a nivel cerebral activando determinadas neuronas, a través de la unión a sus receptores específicos, y ejerciendo un efecto directo sobre la regulación la ingesta^{72,73} (Fig. 3). A este mecanismo de regulación se le conoce como eje cerebro-intestinal.⁷⁴

Además de la respuesta a péptidos/hormonas circulantes que reflejan el estado energético corporal, el cerebro también es sensible ante cambios en la concentración de glucosa en sangre.⁶⁸ En 1950, la teoría glucostática de Jean Mayer postulaba la existencia de receptores de glucosa en el hipotálamo y otras regiones implicadas en el control de la ingesta, y sugería que los niveles plasmáticos de glucosa activaban dichos receptores, de forma que un incremento en el consumo de glucosa desencadenaba el inicio de la ingesta.⁶⁸ En la actualidad se ha descrito la existencia de neuronas especializadas como sensoras de glucosa en determinadas regiones del cerebro implicadas en la regulación de la homeostasis

energética, como el hipotálamo, el núcleo del tracto solitario o la amígdala.^{68,75} Las neuronas sensoras de glucosa se definen como neuronas que alteran la frecuencia de sus potenciales de acción en respuesta a cambios de los niveles de glucosa en el espacio intersticial para participar así en la regulación de la respuesta a la hipoglucemia.⁶⁸ De forma general, se clasifican como neuronas excitadas o inhibidas por glucosa, dependiendo de si sus potenciales de acción se incrementan o disminuyen respectivamente en respuesta a las concentraciones extracelulares de glucosa a nivel local.⁷⁶ El papel de las neuronas sensoras de glucosa es esencial para una correcta homeostasis de la glucosa a nivel corporal, aunque el mecanismo exacto mediante el cual realizan esta función no se conoce con claridad.⁷⁶

3.2.-Sistema de las melanocortinas/NPY.

El hipotálamo es el principal centro nervioso que controla la homeostasis energética.⁷⁷⁻⁷⁹ En el núcleo arcuato (ARC), adyacente al tercer ventrículo, existen dos grupos interconectados de neuronas directamente implicadas en el control del apetito: por un lado las neuronas que liberan neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agoutí (AgRP) (neuronas NPY/AgRP), los cuales promueven la ingesta, y por otro las neuronas que secretan proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART) (neuronas POMC/CART), con efectos anorexigénicos.^{14,80,81} El procesamiento proteolítico de POMC por prohormona convertasas da lugar a un conjunto de péptidos conocidos como melanocortinas, las cuales ejercen sus efectos a través de la familia de los receptores de melanocortinas, siendo los más importantes los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R).^{18,82-84} Entre las melanocortinas se encuentran la hormona estimulante de melanocitos α (MSH- α), MSH- β , MSH- γ y la corticotropina (ACTH).⁸²

Los axones de las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP se proyectan hasta neuronas de segundo orden localizadas en parte en el núcleo paraventricular (PVN), donde se liberan los péptidos anorexigénicos hormona liberadora de tirotrina (TRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina gracias a la acción de las melanocortinas y CART, y en parte en el área lateral hipotalámica (LHA) y el área perifornical (PFA), donde se producen los péptidos orexigénicos hormona concentradora de melanina (MCH) y orexina gracias a la acción de NPY y AgRP.^{14,80,85} Existe un mecanismo que impide que ambas vías puedan estar activadas a la vez, de forma que las neuronas NPY/AgRP secretan ácido gamma-aminobutírico (GABA), que actúa a nivel de las neuronas POMC/CART

inhibiéndolas directamente, el AgRP actúa como antagonista de los receptores de melanocortinas y CART bloquea la respuesta orexigénica producida por NPY⁸⁶⁻⁹⁰ (Fig. 3).

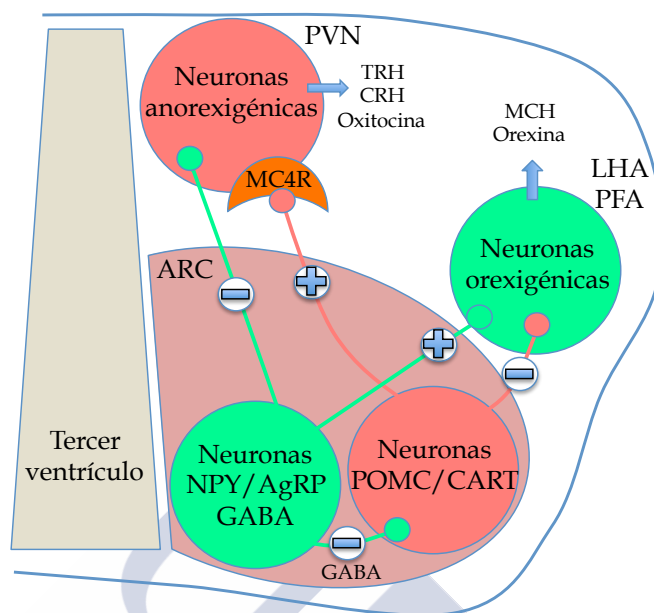


Figura 3: Esquema del sistema de las melanocortinas/NPY.^{14,91}

Además de su papel como principal mecanismo regulador de la ingesta, el sistema de las melanocortinas se ve implicado en otros procesos biológicos, como la regulación de la termogénesis,⁹²⁻⁹⁴ el gasto energético y la lipólisis,^{67,92,95,96} el control de la actividad del sistema nervioso autónomo,^{95,97,98} la liberación y sensibilidad a la insulina,^{80,97} la liberación de grelina⁹⁹ o la regulación de la presión sanguínea.¹⁰⁰⁻¹⁰²

3.3.-Papel de la insulina y la grelina en la regulación de la ingesta.

Insulina.

Tras la ingesta, los niveles de glucosa en sangre estimulan la liberación de insulina por el páncreas, la cual actúa a nivel hipotalámico regulando el control del apetito y la homeostasis energética a través de la unión a sus receptores (INSR), que se localizan en el núcleo ARC en las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART.^{73,103} La insulina estimula las neuronas POMC/CART, promoviendo la anorexia, e inhibe las neuronas NPY/AgRP, reduciendo a su vez la inhibición de las neuronas POMC/CART por el GABA y la liberación de los péptidos orexigénicos NPY y AgRP, inhibiendo la ingesta^{89,90,104} (Fig. 4).

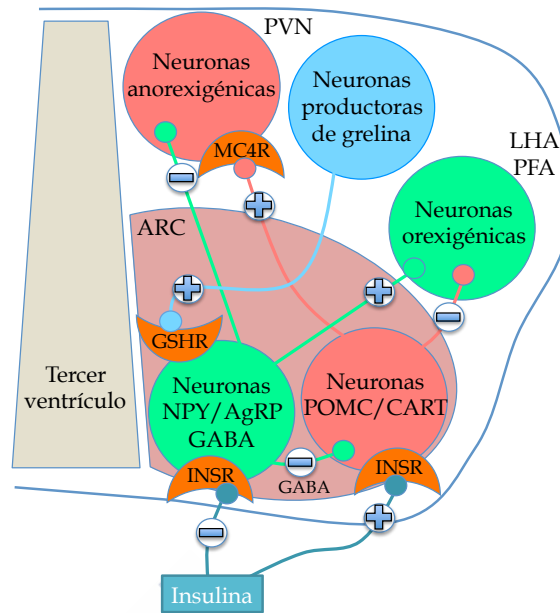


Figura 4: Acción de la insulina sobre el sistema de las melanocortinas/NPY.^{14,89,91}

La señalización intracelular de la insulina a nivel del sistema nervioso central (SNC) es comparable a la que ocurre en sus tejidos diana periféricos.¹⁰⁵ El INSR es un receptor con actividad tirosín-kinasa, de forma que su activación tras la unión de insulina no solo produce la fosforilación en tirosinas del receptor sino también en otras proteínas clave en su señalización, como el sustrato del receptor de insulina (IRS), la cual a su vez desencadena una cascada de fosforilación que activa la ruta de señalización de la fosfoinositol-3-fosfato kinasa (PI3K) y de la proteína quinasa B (PKB/AKT), promoviendo la movilización de los receptores de glucosa (GLUTs) hacia la membrana plasmática para incrementar la captación de glucosa, rutas anabólicas como la síntesis de glucógeno, y la viabilidad celular¹⁰⁵ (Fig. 5).

En circunstancias metabólicas en las que los niveles de insulina son bajos, como en los períodos de ayuno, la señalización de la insulina se ve disminuida, por lo que la ingesta y el anabolismo se ven reducidos.¹⁰⁵

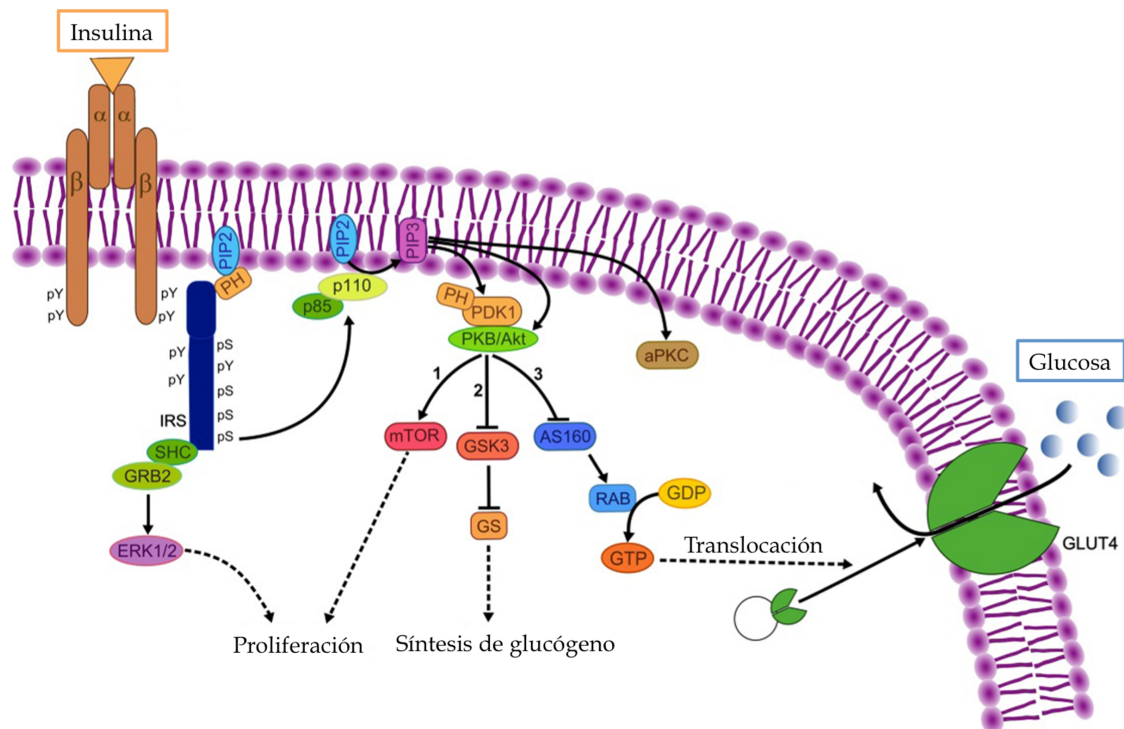


Figura 5: Ruta de señalización intracelular de la insulina. IRS: sustrato del receptor de insulina; S: serina; Y: tirosina; PH: dominio homólogo de pleckstrina del IRS; SHC: dominio homólogo 2 de Src; GRB2: proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2; ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PDK1: proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinosítido; PKB/AKT: proteína quinasa B; mTOR: diana de rapamicina de mamíferos; GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3; GS: glucógeno sintasa; AS160: sustrato de AKT de 160 kDa; Rab: geranilgeranil transferasa beta; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; aPKC: proteína quinasa C atípica.¹⁰⁶

Grelina.

La grelina fue descubierta en 1999 por Kangawa y Kojima como un péptido de 28 aminoácidos capaz de estimular la liberación de la hormona de crecimiento (GH).¹⁰⁷ Actúa como ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento, que posteriormente pasaría a llamarse receptor de grelina (GRLNR), el cual se expresa en el SNC y en órganos periféricos como la glándula pituitaria, las terminaciones aferentes del nervio vago, el páncreas, el bazo, el miocardio, el tejido adiposo, la tiroides, la glándula adrenal y las neuronas mientéricas gástricas.¹⁰⁸ Aparte de sus efectos sobre la liberación de GH, grelina también es una molécula reguladora del apetito, actuando como una hormona estimuladora de la ingesta.¹⁰⁷ La grelina se expresa y secreta principalmente en las células X/A de la glándula oxíntica del estómago y es la única molécula orexigénica producida a nivel periférico con efectos a nivel central conocida en la actualidad, transfiriendo información desde el estómago hasta el hipotálamo.^{14,108} Se ha identificado la producción de pequeñas cantidades de grelina en el intestino, el páncreas, los riñones, el sistema inmune, la placenta, los testículos, la glándula pituitaria, los pulmones y el hipotálamo.¹⁰⁹ Los niveles

circulantes de grelina se incrementan antes de las comidas y caen tras la ingesta, sugiriendo un papel significativo de la grelina en la iniciación de la ingesta.¹⁰⁷

La grelina liberada en el estómago activa las terminaciones aferentes del nervio vago, el cual, estimula la producción de grelina en determinadas neuronas a nivel hipotalámico.^{14,90} La grelina producida a nivel hipotalámico se une a sus receptores específicos en las neuronas productoras de NPY/AgRP estimulando la producción de dichos péptidos y la ruta de iniciación de la ingesta, ejerciendo un efecto opuesto al de la insulina¹⁰⁹ (Fig. 6).

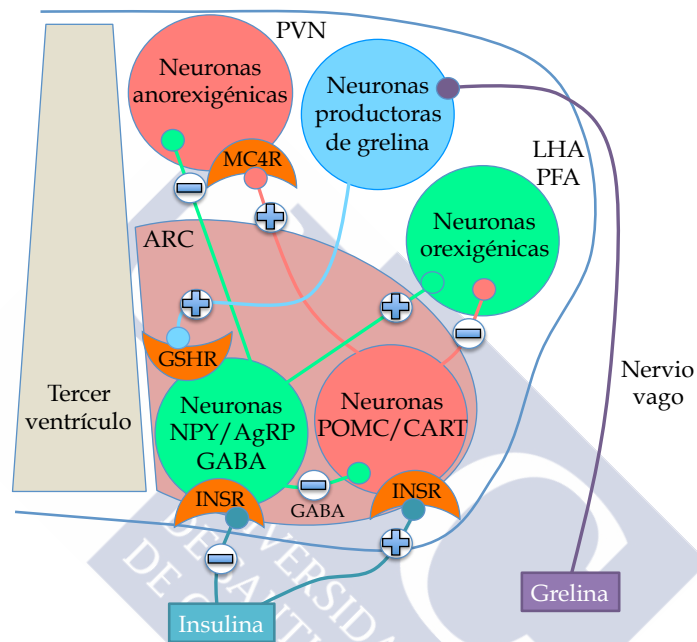


Figura 6: Acción de la grelina sobre el sistema de las melanocortinas/NPY.^{14,90,91}

También se sugiere que la grelina existente en la circulación sanguínea podría unirse directamente a sus receptores a nivel hipotalámico, pero el mecanismo por el cual la grelina cruza la barrera hematoencefálica todavía no está claro.¹⁰⁹ La unión de la grelina a su receptor desencadena una cascada de señalización intracelular que implica la fosforilación y activación de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato (AMP) (AMPK), la cual a su vez disminuye los niveles de malonil-CoA al fosforilar e inhibir la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (ACC).¹¹⁰ El descenso de los niveles intracelulares de malonil-CoA inducen la activación de la carnitín palmitoil transferasa 1 (CPT1), incrementando así el transporte de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) hacia la mitocondria para ser oxidados.¹¹⁰ Existen numerosos estudios que sugieren que el metabolismo lipídico a nivel hipotalámico es un mecanismo crucial de la regulación de la homeostasis energética,⁸¹ de modo que la síntesis de ácidos grasos en situaciones de exceso de energía causa la

inhibición de la síntesis de NPY y AgRP, mientras que estimula la síntesis de melanocortinas y CART.¹¹¹ Así, el descenso de los niveles intracelulares de AGCL por la señalización de la grelina resulta en el incremento de la ingesta al incrementar la expresión del NPY¹¹⁰ (Fig. 7).

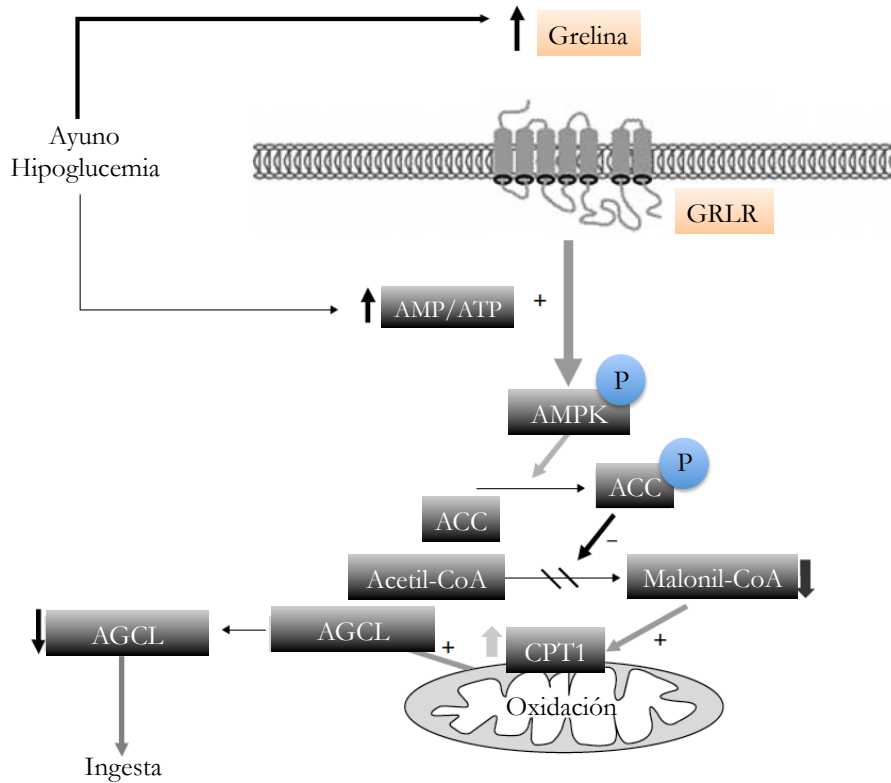


Figura 7: Cascada de señalización intracelular de la grelina.¹¹⁰

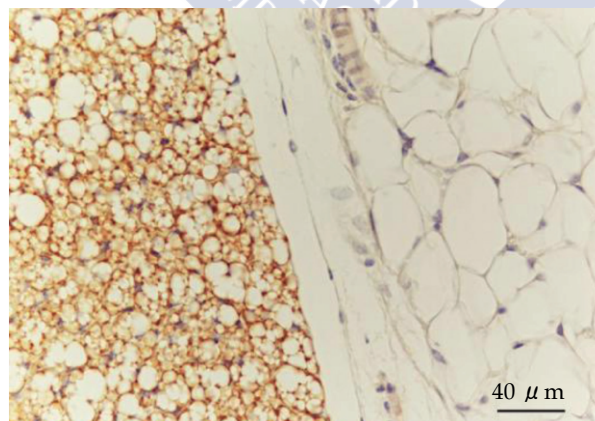
En general, AMPK estimula las rutas catabólicas, como la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos, e inhibe las rutas anabólicas, como la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y proteínas, siendo una vía contraria a señalización de la insulina.¹¹²

4.-El tejido adiposo: distribución y funciones principales.

El tejido adiposo es vital para la vida de los mamíferos.¹¹³ Constituye el principal órgano de reserva de energía y de generación de calor.¹¹⁴ Cuando existe un exceso de nutrientes, el tejido adiposo almacena energía en forma de triglicéridos, los cuales durante el período de ayuno postprandial son movilizados por lipólisis para dar lugar a la liberación de ácidos grasos libres que pueden ser utilizados por otros órganos para la generación de energía y la producción de calor.¹¹⁴ Existen dos tipos de tejido adiposo: el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco, los cuales no solo tienen diferentes funciones sino también distinta localización.¹¹⁴

Tejido adiposo pardo.

El tejido adiposo pardo es considerado principalmente un órgano termogénico, de forma que en vez de acumular lípidos como reserva energética los quema para la producción de calor y el mantenimiento de la temperatura corporal.^{115,116} Los adipocitos pardos acumulan triglicéridos en múltiples vesículas citoplasmáticas para poder consumirlos en grandes cantidades en el proceso de generación de calor.¹¹⁷ Una característica de este tejido es la expresión de la proteína termogénica (UCP1), la cual desacopla la respiración mitocondrial de la formación de ATP resultando en la disipación de energía en forma de calor, proceso conocido como termogénesis sin escalofríos.^{115,118}



Tejido adiposo pardo

Tejido adiposo blanco

Figura 8: Corte histológico de tejido adiposo pardo y blanco. Tejido adiposo subcutáneo de ratón en una zona donde ambos tipos de tejidos están muy próximos. El tejido adiposo pardo se corresponde con el marcaje positivo de UCP1, mientras que el tejido adiposo blanco es negativo.¹¹⁹

Además está altamente vascularizado e innervado, de forma que se encuentra finamente regulado por el sistema nervioso simpático para mantener la temperatura corporal, respondiendo ante situaciones de exposición al frío y al ejercicio.¹¹⁷

El tejido adiposo pardo se desarrolla durante el período de gestación, alcanzando su pico máximo en el nacimiento.¹²⁰ Se localiza en la parte de atrás del cuello, el esternón, las zonas supraclaviculares, intraescapulares, periaórticas y perirrenales.^{118,121,122} En los recién nacidos, el tejido adiposo pardo constituye aproximadamente el 5% del peso corporal y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la temperatura corporal ante el cambio de temperatura entre el ambiente uterino y el externo.¹²⁰ Aunque en el resto de mamíferos persiste, en humanos ya durante la infancia el tejido adiposo pardo es reemplazado por el tejido adiposo blanco casi por completo, de forma que hasta hace poco se creía que regulaba la temperatura y el metabolismo lipídico solo en recién nacidos.¹¹⁸ Estudios recientes han mostrado que los adultos poseen una cantidad sustancial de tejido adiposo pardo metabólicamente activo en las regiones supraclaviculares y del cuello, y también en localizaciones paravertebrales, periaórticas y perirrenales.^{121,122} Se ha visto la existencia de una correlación inversa entre el IMC y la actividad del tejido adiposo pardo en adultos, por lo que en los últimos años este tejido ha despertado un gran interés en el estudio de la obesidad.^{121,123}

Tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo blanco es el principal componente del conjunto del tejido adiposo y almacena la mayor parte de la grasa corporal total.¹¹⁴ Se localiza de forma dispersa por todo el cuerpo, siendo su principal lugar de acúmulo la zona intraabdominal o visceral y la zona subcutánea.¹¹⁴ Existen otros depósitos de tejido adiposo blanco de menor tamaño, como la grasa muscular, epicárdica, perivascular y renal,¹¹⁴ aunque también se pueden encontrar depósitos grasos en la médula ósea y en pulmón¹²⁴ (Fig. 9).

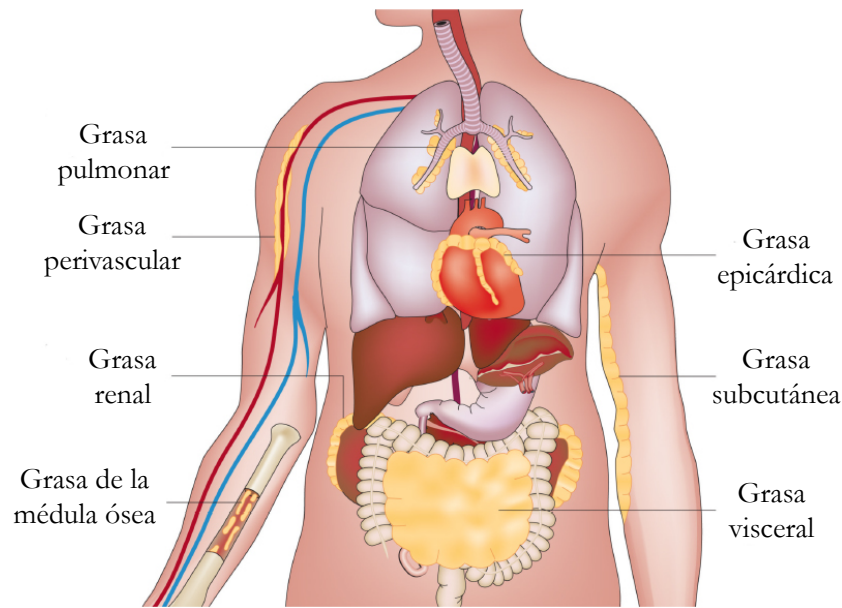


Figura 9: Distribución corporal de los principales depósitos del tejido adiposo.¹²⁵

El principal componente celular del tejido adiposo blanco son los adipocitos, que se mantienen unidos por un tejido conectivo laxo que está adecuadamente vascularizado e innervado.¹²⁶ Pero además contiene macrófagos, linfocitos, fibroblastos, células progenitoras y células endoteliales^{125,126} (Fig. 10).

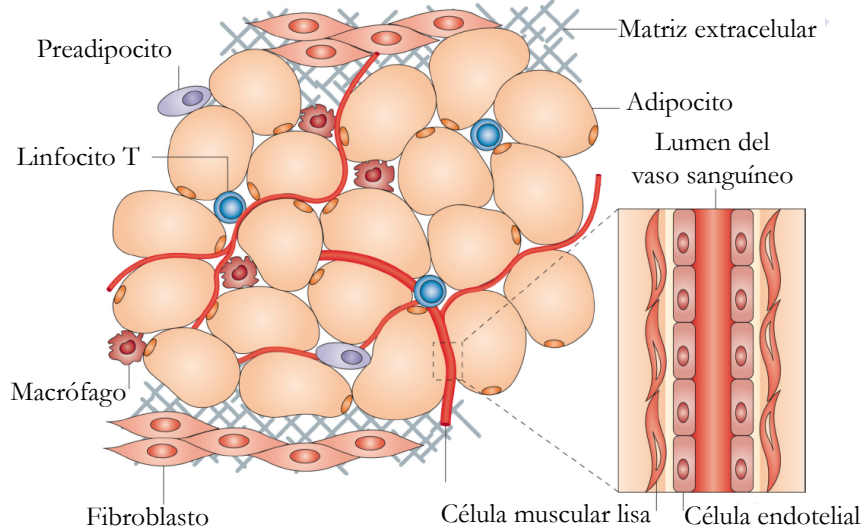


Figura 10: Componentes del tejido adiposo blanco.¹²⁵

Funciona como un almacén energético que se incrementa cuando existe un exceso de energía, incrementando no solo el tamaño sino también el número de adipocitos, y se reduce cuando la energía es limitada, jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la temperatura corporal y en la regulación de la homeostasis energética a

nivel sistémico.^{116,127,128} El incremento de los niveles de insulina, glucosa y lípidos durante las comidas estimulan la formación de triglicéridos y su almacenaje en el hígado y el tejido graso.¹²⁸ Por el contrario, el descenso de la insulina en períodos de ayuno estimula la rotura de glucógeno y la lipólisis, a través de la activación del sistema nervioso simpático y del incremento de la síntesis de glucagón, catecolaminas y glucocorticoides.¹²⁸ De esta forma, la rotura de glucógeno durante el ayuno mantiene un aporte de glucosa suficiente para el funcionamiento del cerebro y los órganos vitales, mientras que los ácidos grasos liberados por lipólisis durante el ayuno son parcialmente oxidados por el músculo esquelético y el hígado, generando cuerpos cetónicos que sirven como sustrato energético alternativo cuando los niveles de glucosa son bajos.¹²⁸

4.1.-El tejido adiposo blanco como órgano endocrino.

El almacén de energía en exceso a largo plazo puede conducir al desarrollo de obesidad y a la aparición de enfermedades asociadas, como la resistencia a la insulina o inflamación subclínica crónica, debido a una función patológica del tejido adiposo.¹²⁷ En concreto, los macrófagos parecen contribuir de forma importante en la aparición de la resistencia a la insulina, ya que el tejido adiposo en situaciones de obesidad presenta una mayor infiltración de macrófagos, los cuales secretan distintos tipos de citoquinas proinflamatorias que interfieren en la ruta de señalización de la insulina, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleukina 6 (IL-6) o la interleukina 1 (IL-1), entre otras.¹²⁹ De este modo, la visión tradicional del tejido adiposo como únicamente un reservorio pasivo de energía ya no es válida.¹³⁰

En la actualidad sabemos que tanto los propios adipocitos como el resto de los componentes celulares del tejido adiposo (principalmente los macrófagos) secretan una gran variedad de proteínas y factores de secreción conocidos comúnmente como adipokinas, las cuales actúan tanto a nivel local de forma autocrina/paracrina, como a nivel sistémico de forma endocrina, regulando una gran variedad de procesos biológicos.¹³¹⁻¹³⁴ Las adipokinas juegan un papel importante en la regulación del apetito, la distribución de la grasa corporal, la sensibilidad y secreción de la insulina, el gasto energético, la inflamación, la presión sanguínea o la función endotelial.¹³⁵ Asimismo, tienen importantes efectos a nivel sistémico en órganos diana como el cerebro, el hígado, el músculo, la vasculatura, el corazón o el páncreas,¹³⁵ de forma que su patrón de secreción refleja la función del tejido adiposo y parece ser importante para determinar el riesgo individual de desarrollar comorbilidades metabólicas y cardiovasculares asociadas a la obesidad.¹³⁶⁻¹³⁸

En la obesidad se produce una situación de disfunción y de inflamación crónica del tejido adiposo, debida principalmente a la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos,^{113,125} que altera la red de producción/señalización de las adipocinas, originando un patrón de secreción alterado que conlleva importantes consecuencias a nivel metabólico y que va a contribuir a la aparición de condiciones patológicas como son la diabetes, los procesos inflamatorios y la aterosclerosis^{113,139} (Fig. 11).

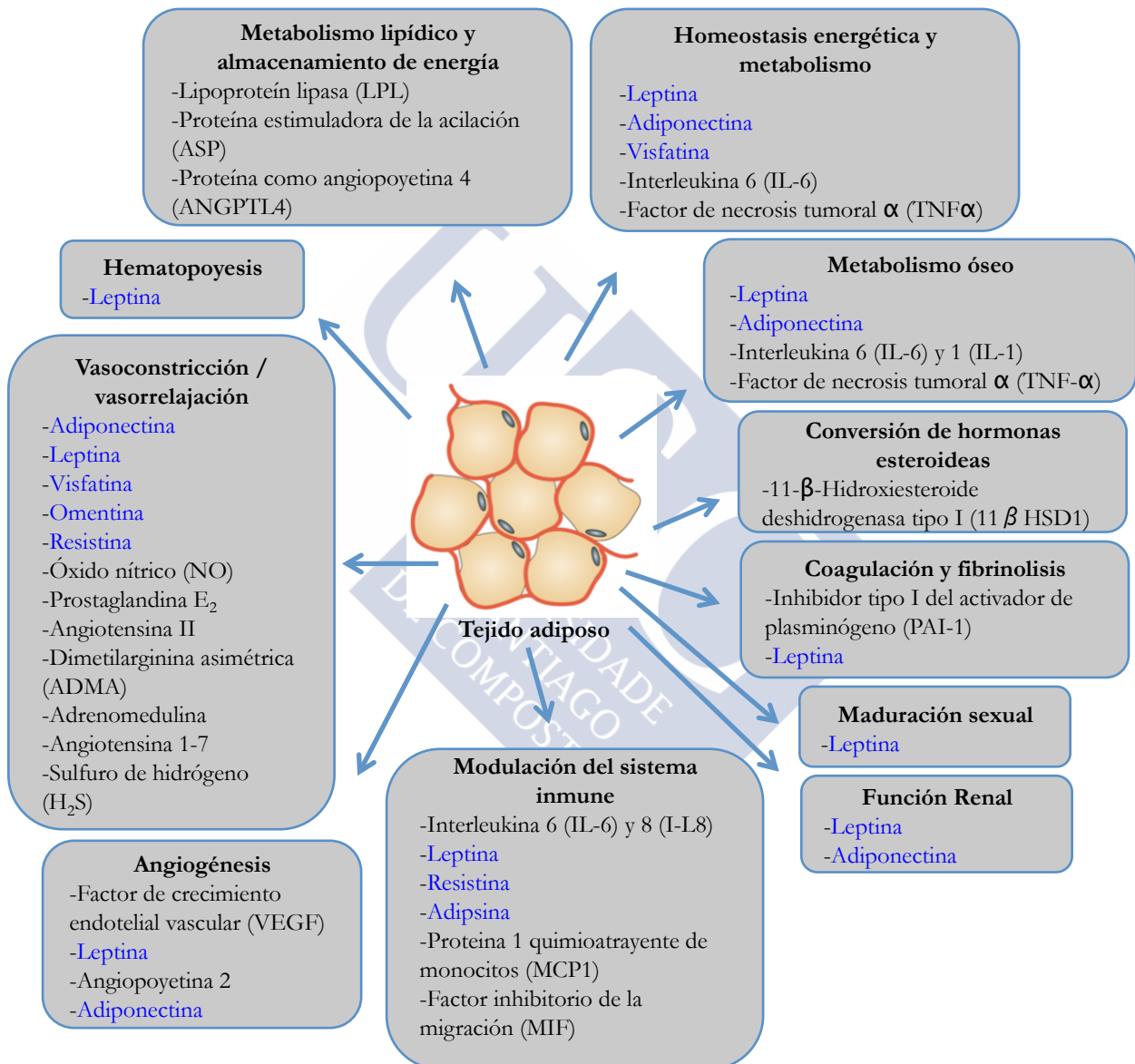


Figura 11: Algunas de las funciones biológicas de las principales adipocinas y otros productos de secreción del tejido adiposo.^{116,140}

El tejido adiposo blanco se distribuye a través de distintos tipos de depósitos grasos en el cuerpo que de forma general se pueden clasificar como depósitos de grasa subcutánea y depósitos de grasa visceral,¹⁴¹ que son diferentes en cuanto a su composición celular, su

micro-vasculatura, su inervación, sus características metabólicas, su matriz extracelular y sus productos de secreción.¹⁴² Diversos estudios han mostrado diferencias de expresión génica en cultivos de adipocitos procedentes de distintas localizaciones,^{143,144} sugiriendo que los adipocitos de los distintos depósitos grasos son diferentes y que su patrón de expresión génica puede contribuir a las diferencias observadas entre las distintas distribuciones del tejido graso, a los distintos tipos de obesidad o al desarrollo de desórdenes metabólicos.¹⁴⁵ Aunque estas diferencias de expresión génica son sutiles, los distintos depósitos grasos varían de forma marcada en cuanto a su estructura, composición, metabolismo e impacto sobre los órganos vecinos, sugiriendo que cada subdepósito de tejido adiposo se podría considerar como un mini-órgano que actuaría de forma única en sus localizaciones específicas.¹⁴⁶

Tejido adiposo visceral y subcutáneo.

El acúmulo de grasa visceral supone hasta un 10-20% de la grasa total en varones, y sobre un 5-8% en mujeres, incrementándose con la edad en ambos sexos.¹⁴⁷ El tejido adiposo visceral se encuentra recubriendo el abdomen, envolviendo al intestino y al estómago, e incluye la grasa mesentérica, omental y retroperitoneal, mientras que el tejido adiposo subcutáneo se encuentra debajo de la piel, principalmente en la zona de los glúteos, caderas y piernas.¹⁴¹ Debido a su localización, la sangre venosa del tejido adiposo visceral se drena directamente hasta el hígado a través de la vena porta, mientras que el tejido subcutáneo lo hace a través de venas sistémicas.¹⁴¹ El drenaje portal proporciona al hígado acceso directo a ácidos grasos libres y adipokinas secretadas por la grasa visceral, las cuales activan mecanismos de inmunidad a nivel hepático con la producción de mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva (CRP).^{148,149} La proporción y función de los principales componentes celulares también es distinta entre ambos tejidos.¹⁴¹ El tejido adiposo visceral contiene un mayor número de adipocitos que el tejido subcutáneo y de mayor tamaño.^{149,150} A medida que los adipocitos se hacen más grandes, se vuelven disfuncionales, incrementando su capacidad lipolítica con el consecuente incremento de ácidos grasos libres en sangre, y adquiriendo resistencia frente al efecto antilipolítico de la insulina, lo que finalmente induce la proliferación de células musculares lisas, la alteración de los niveles circulantes de LDL y HDL y disfunción endotelial.^{78,122,123} En el tejido adiposo visceral existe además una mayor infiltración de macrófagos y linfocitos T, lo que produce un desequilibrio del patrón de producción de adipokinas y participando en el desarrollo de la resistencia a la insulina.^{113,126,153-155}

El incremento de los depósitos grasos ocurre debido al mayor acúmulo de lípidos y al aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia), así como también al aumento del número de adipocitos (hiperplasia).¹⁵⁶ Estudios realizados en animales muestran que la hiperplasia ocurre en dos pasos: un incremento del número de pre-adipocitos y la diferenciación a adipocitos maduros.¹⁵⁶ La inducción de la hipertrofia o la hiperplasia debido al desequilibrio energético varía en función del depósito graso. Por ejemplo, mujeres con mayor cantidad de grasa subcutánea presentan tanto hipertrofia como hiperplasia en esta localización, mientras que el incremento de la grasa visceral es debido principalmente a la hipertrofia.¹⁵⁷ Los cambios asociados a la hipertrofia parecen ser los responsables del inicio de la disfunción adipocitaria, relacionándose con el incremento de la secreción de adipokinas proinflamatorias¹⁵⁸ e incrementando el riesgo de desarrollar patologías como la diabetes tipo II.¹⁵⁹ Los distintos depósitos grasos difieren en la distribución del tamaño de sus adipocitos, sugiriendo que esa diferencia podría ser debida en parte a las diferencias funcionales entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo.¹⁶⁰ De este modo, se ha visto que la hipertrofia en el tejido adiposo visceral, pero no en el subcutáneo, se asocia con un mayor perfil lipídico aterogénico,¹⁶¹ así como también se ha visto que numerosos aspectos funcionales de la actividad de los adipocitos se relacionan con el tamaño de los mismos.^{158,160}

Tejido adiposo epicárdico y perivascular.

El tejido adiposo epicárdico es un depósito de grasa visceral localizado entre el pericardio (membrana que rodea el corazón) y el miocardio (tejido muscular cardíaco) sin ninguna estructura que lo separe del miocardio. Se trata de un tejido con propiedades especiales que lo distinguen de otros depósitos de grasa visceral, ya que comparte el suministro sanguíneo con el miocardio al no existir ninguna estructura que lo separe ni de este tejido ni de las arterias coronarias¹⁶², de modo que puede permitir la infiltración de los adipocitos hacia el miocardio, o incluso la infiltración de triglicéridos en los miocitos.¹⁶³ Su papel en la fisiología cardíaca todavía no se conoce con exactitud, pero se ha sugerido su implicación en procesos como la protección contra la torsión ocasionada por la presión sanguínea en las arterias y la contracción cardíaca,¹⁶⁴ la regulación de la homeostasis de los ácidos grasos en la microcirculación coronaria¹⁶⁵ y la neuroprotección de ganglios y nervios autónomos cardíacos.¹⁶² Se ha visto que la obesidad conlleva un incremento en el contenido de grasa epicárdica, y varios estudios sugieren que el incremento de este depósito graso se asocia con un mayor riesgo de padecer isquemia miocárdica,¹⁶² hipertrofia

cardíaca,¹⁶⁴ fibrilación auricular¹⁶⁶ y disfunción sistólica.¹⁶⁷ Además, la infiltración de grasa en el tejido cardíaco puede causar daños que darían lugar al desarrollo de insuficiencia cardíaca, y se ha sugerido que el acúmulo progresivo de grasa entre las fibras musculares causan la degeneración de los miocitos.¹⁵

A pesar de que este tejido tiene un tamaño pequeño comparado con otros depósitos grasos, la estrecha relación anatómica que tiene con el corazón sugiere que la liberación de adipokinas podría participar en la regulación de sus funciones.¹⁶⁸⁻¹⁷¹ De hecho, se ha visto que la expresión de adiponectina en el tejido adiposo epicárdico se encuentra disminuida en pacientes con hipertensión¹⁷² y alteraciones metabólicas.¹⁷⁰

Las arterias coronarias, y prácticamente todas las arterias, se encuentran rodeadas por una cantidad significativa de tejido adiposo, constituyendo el tejido adiposo perivascular, que actúa como soporte mecánico atenuando la tensión y torsión vascular, y participando en el remodelamiento de los vasos sanguíneos.¹⁶⁴ La grasa perivascular actúa como una fuente de adipokinas y factores de secreción que actúan de forma paracrina y/o vasocrina.¹⁶⁴ La grasa perivascular puede actuar de forma local como una fuente de energía y también como un amortiguador contra los niveles tóxicos de ácidos grasos libres en la circulación arterial,¹⁶⁵ y se ha visto que, por ejemplo, la adiponectina y otros factores de secreción adipocitarios pueden ser secretados por la grasa perivascular para disminuir la respuesta contráctil frente a agentes vasoconstrictores, ejerciendo por tanto un efecto protector antihipertensivo mediante mecanismos dependientes e independientes de la contracción del endotelio vascular.^{173,174}

En resumen, se ha propuesto que la existencia de tejido adiposo a nivel epicárdico podría tener un papel cardíaco protector, sin embargo, el aumento de volumen de este tejido (a menudo presente en estados de obesidad) se ha asociado también al desarrollo de obstrucción coronaria.¹⁶⁴

4.2.-Principales adipokinas y hormonas metabólicas.

Leptina: En los años 50, Doug Coleman inició los estudios sobre la leptina mientras trabajaba en los laboratorios Jackson (Mount Desert Island, Maine, EEUU)¹⁷⁵ con dos líneas de ratones que presentaban mutaciones espontáneas autosómicas recesivas.^{176,177} Estos ratones desarrollaban obesidad severa y diabetes: ratones ob/ob y ratones db/db respectivamente, que posteriormente serían preciados modelos animales para el estudio de ambas patologías.¹⁷⁸ En sus estudios, Coleman identificó un factor circulante que regulaba la homeostasis energética y de la glucosa, y que estaba ausente en los ratones ob/ob.⁷³ Por

otro lado, dicho factor aparecía en exceso en los ratones db/db, aunque eran resistentes debido a la ausencia de su receptor o al mal funcionamiento de su ruta de señalización.⁷³

La leptina fue identificada en 1994 como producto del gen ob,¹⁷⁹ y al año siguiente se identificó su receptor,¹⁸⁰ de forma que los ratones ob/ob carecen de leptina y los db/db de su receptor.¹⁸⁰ Los ratones ob/ob no tenían sensación de saciedad, mientras que los ratones db/db no tenían la posibilidad de transmitir la señal de la leptina circulante.¹⁷⁸

La leptina se expresa y secreta principalmente por los adipocitos del tejido adiposo blanco, siendo la grasa subcutánea su principal fuente de producción.^{154,181} Los niveles plasmáticos de leptina se correlacionan positivamente con el nivel de adiposidad, de forma que la obesidad se asocia con un estado de resistencia a la leptina.^{107,182} Su función biológica fundamental es la reducción de la ingesta y el incremento del gasto energético actuando a través de sus receptores, los cuales se encuentran en varios núcleos hipotalámicos y en distintos órganos periféricos como el hígado, el riñón, el músculo esquelético, el páncreas, los ovarios o el propio tejido adiposo, reforzando así la función autocrina/paracrina y endocrina de la leptina.^{140,182-186} A nivel hipotalámico, los receptores de leptina, al igual que los de la insulina, se localizan en el núcleo arcuato en las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP, de forma que la unión de la leptina a su receptor induce la secreción de melanocortinas y CART e inhibe la liberación NPY y AgRP, conduciendo a supresión de la ingesta.⁹⁰

Aparte de su función como molécula reguladora del balance energético, la leptina se ve implicada en los procesos de inflamación, de forma que se ha visto que puede activar monocitos y macrófagos para producir las moléculas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12, y por otro lado, señales inflamatorias como TNF- α o el lipopolisacárido (LPS) estimulan la expresión tanto de leptina como de su receptor.¹⁸⁷ A nivel patológico, se ha visto que la leptina participa en el desarrollo de artritis¹⁰⁹ y de la resistencia a la insulina,¹⁵⁶ y que actúa como un regulador importante de la maduración sexual, la función ovárica y la reproducción.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰

Adiponectina: Adipokina de 30 kDa descubierta entre los años 1995 y 1996 de forma independiente por distintos laboratorios, de ahí sus múltiples nombres: Acrp30, apM1, adipoQ y GBP28.^{185,191,192} Circula en niveles plasmáticos altos ($\mu\text{g}/\text{mL}$), en contraste con la leptina y otras hormonas (ng/mL),¹⁹² en forma de monómeros, que se unen dando lugar desde a trímeros hasta a dodecámeros, y que son los que ejercen la actividad biológica de adiponectina.^{128,192} Al contrario que leptina, los niveles plasmáticos de adiponectina

disminuyen en la obesidad y están inversamente correlacionados con el IMC, la glucosa y la insulina, existiendo también una correlación inversa con el riesgo de padecer obesidad, diabetes y ECVs.^{128,185,192} De hecho, la eliminación del gen de la adiponectina en ratones produce resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia, incremento de la susceptibilidad al daño vascular y aterosclerosis.¹⁹²

La adiponectina ejerce sus acciones al unirse a sus receptores 1 y 2 (AdipoR1 y R2).¹⁹² AdipoR1 es abundante en músculo esquelético y AdipoR2 en hígado, y ambos desencadenan la ruta de señalización de AMPK.¹⁹² A nivel central, los receptores de adiponectina se colocan con los de leptina, y regulan el gasto energético a través de un mecanismo de señalización dependiente de AMPK, sin producir ningún efecto sobre la ingesta.¹²⁸ A nivel periférico, las principales funciones de adiponectina son la mejora de la sensibilidad a la insulina y la prevención de la formación de placas de ateroma.¹²⁸

Resistina: Es una proteína de 12.5 kDa con una estructura molecular similar a la adiponectina.^{193,194} En sus estudios iniciales se demostró que la expresión génica de resistina estaba incrementada en la obesidad, sin embargo su papel fisiológico no está demasiado claro en la actualidad.¹²⁸ Por ejemplo, los niveles de ARNm y proteína no se correlacionan bien y en muchos casos parecen tener una correlación inversa.¹²⁸ Además, resistina tiene efectos claros en ratón pero convertidos en humanos, de forma que en ratón es producida principalmente por los adipocitos, mientras que en humano la producen los macrófagos y los preadipocitos, decayendo su producción drásticamente en los adipocitos maduros.^{128,193,194} En ratón tiene un efecto claro sobre la homeostasis de la glucosa, actuando como un mediador de la aparición de la resistencia a la insulina.¹⁹⁵ En ratones *knockout* (KO) para el gen de la resistina se observó un descenso en los niveles de glucosa en ayuno y una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, de forma que la ausencia del gen de la resistina permite la activación de AMPK y reduce la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis.¹⁹⁵ En este caso, la actividad de la resistina difiere de la de adiponectina y leptina, ambas implicadas en el incremento del gasto energético a través de la activación de AMPK.¹⁹⁵

En humano la resistina parece tener un papel más relacionado con la inflamación que con la regulación del metabolismo de la glucosa, lo cual es coherente con su producción por macrófagos del tejido adiposo.¹⁹³

Visfatina: Fue identificada en 2005 por Fukuhara y col. (2005)¹⁹⁶ como una nueva adipokina de 52 kDa altamente expresada en la grasa visceral, tanto en humanos como en ratón, con propiedades antidiabéticas y cuyos niveles plasmáticos se incrementan durante el desarrollo de la obesidad. Visfatina actúa de forma similar a la insulina, de hecho se une al receptor de insulina, en un lugar de unión distinto, e induce la fosforilación en residuos de tirosina de ISR1 y activa la ruta de señalización de PI3K/AKT, produciendo hipoglucemia al reducir la liberación de glucosa por el hígado y al estimular la utilización de glucosa por adipocitos y miocitos.^{195,197}

Pero estos resultados no han podido confirmarse en humano. En algunos estudios se relacionan los niveles de expresión y plasmáticos de visfatina con el IMC, diabetes y obesidad, pero en otros no, por lo que el papel de visfatina en humanos como molécula antidiabética parece controvertido.^{194,195,198}

Apelina: Adipokina derivada del procesamiento proteolítico de su prepro péptido de 77 aminoácidos, que da lugar a cuatro isoformas activas: apelina-12, 13, 17 y 36, cada una con diferente afinidad de unión a su receptor, siendo apelina-13 la de mayor abundancia y actividad.^{198,199} Apelina ejerce sus funciones mediante la unión a su receptor (APLNR), iniciando la cascada de señalización de PI3K/AKT y de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs).¹⁹⁸ Aparte de en el tejido adiposo, apelina se expresa en otros tejidos como el cerebro, el corazón, los pulmones y los riñones.¹⁹⁸ Mientras que la insulina estimula la expresión de apelina en el tejido adiposo, apelina inhibe la secreción de insulina por el páncreas, existiendo así una interacción interesante entre ambos sistemas, de forma que la resistencia a la insulina producida en obesidad podría estar ligada a la función de apelina.¹⁹⁸

Se ha visto que apelina tiene efectos beneficiosos en ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa, mejorando la tolerancia a la glucosa e incrementando la utilización de la glucosa tanto en ratones normales como con resistencia a la insulina activando las rutas de señalización de AMPK y AKT.¹⁹⁸ Además, la inyección intraperitoneal de apelina en ratones normales y obesos reduce los niveles de adiposidad sin alterar la ingesta ni los niveles de insulina, leptina ni triglicéridos, mientras que induce un incremento de los niveles de adiponectina.¹⁹⁸

Chemerina: Adipokina de 18 kDa que ejerce sus funciones mediante la unión a un receptor acoplado a proteínas G, llamado ChemR23.²⁰⁰ Inicialmente fue descubierta como

un péptido quimiotáctico que dirigía a los macrófagos y células dendríticas que expresaban su receptor hasta sitios de inflamación, estando implicada en la respuesta inmune adaptativa e innata.²⁰⁰ Posteriormente, se vio que chemerina actúa como una proteína pleiotrópica, de forma que también la expresan células endoteliales, donde su síntesis se incrementa por citocinas proinflamatorias, resultando en la inducción de la angiogénesis y remodelamiento vascular.²⁰⁰

El interés en el estudio de chemerina en el ámbito de la obesidad ha crecido en los últimos años tras su descubrimiento como nueva adipokina secretada por los adipocitos, los cuales también expresan ChemR23.²⁰⁰ La expresión génica de chemerina se ve incrementada por la estimulación de IL-1 β , y sus niveles plasmáticos están incrementados en pacientes obesos, por lo que chemerina podría ser un mecanismo de unión entre la inflamación crónica en la obesidad y desordenes asociados a la obesidad como la diabetes o ECVs.²⁰⁰ De hecho, en individuos con obesidad mórbida se han visto niveles plasmáticos de chemerina incrementados con respecto a individuos con normopeso, con un descenso significativo tras cirugía bariátrica.²⁰¹

Omentina: Es una proteína de secreción altamente expresada en grasa visceral con respecto a la grasa subcutánea.²⁰⁰ Se ha identificado su producción por otros tejidos como el intestino y el endotelio, pero con menor expresión.²⁰⁰ La omentina se relaciona con el incremento de la señalización de la insulina mediante la activación de la ruta PI3K/AKT y la captación de glucosa en adipocitos humanos.²⁰⁰ Además, los niveles plasmáticos y la expresión génica de omentina en tejido adiposo están disminuidos en obesidad, correlacionando positivamente con los niveles plasmáticos de adiponectina y HDL, y negativamente con el perímetro abdominal, el IMC y la resistencia a la insulina.²⁰² De este modo, omentina podría tener un papel a nivel paracrino y/o endocrino en la regulación de la sensibilidad a la insulina y el metabolismo energético.²⁰⁰

Otras adipokinas.

La búsqueda de nuevas adipokinas y de su caracterización representa una de las principales actividades en la investigación de la fisiopatología de la obesidad. Sin embargo, resulta complicado identificar la función, el modo de acción y las moléculas diana para el creciente número de nuevas adipokinas identificadas.¹³⁵ Por ejemplo, solo en 2012 se identificaron 44 nuevas adipokinas a partir del secretoma de adipocitos humanos,^{203,204} y entre las más de 600 moléculas sugeridas como posibles adipokinas¹³⁴ se encuentran las

interleukinas 1, 6, 8 y 10, TNF- α , el factor de crecimiento tumoral β (TGF β), el interferón γ , la proteína C reactiva (CRP), el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI1), la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP4), la vaspina, la fetuina-A, la progranulina, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1) o la nesfatina-1 (de la que hablaremos en detalle más adelante y objetivo de estudio en este trabajo de tesis) todas ellas estudiadas en mayor o menor medida, entre otras, como posibles biomarcadores de determinadas enfermedades o incluso como posibles dianas terapéuticas.¹³⁵



5.-Hormonas metabólicas y sistema cardiovascular.

5.1.-Síndrome metabólico.

El síndrome metabólico (SMet) constituye una combinación de condiciones patológicas que incluyen la obesidad (concretamente el acúmulo de grasa visceral), la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la dislipemia, el hígado graso y la hipertensión, y que se utiliza como índice predictor de la aparición de ECVs.^{205,206} El SMet ha incrementado rápidamente su prevalencia a nivel mundial en los últimos años, correlacionándose con el incremento de la obesidad y teniendo un impacto considerable en la incidencia de la diabetes tipo II y de ECVs como, por ejemplo, la enfermedad arterial coronaria.^{207,208}

Distintos comités científicos han descrito los requisitos para considerar la aparición del SMet, aunque existe controversia en cuanto a la terminología y los criterios de diagnóstico.²⁰⁵ La primera definición formal de SMet la realizó la OMS en 1999,²⁰⁹ y destacaba la resistencia a la insulina como principal factor desencadenante de SMet.²⁰⁵ En esta propuesta se consideraban los cinco criterios siguientes:¹⁵³

- *Obesidad central:* ratio circunferencia abdomen/cadera ≥ 0.9 en varones y ≥ 0.85 en mujeres; IMC > 30 kg/m².
- *Hipertensión:* presión sanguínea $\geq 140/90$ mmHg.
- *Dislipemia:* triglicéridos ≥ 1.7 mmol/L; HDL < 0.9 mmol/L en varones y < 1.0 mmol/L en mujeres.
- *Hiper glucemia:* glucosa en ayunas ≥ 6.1 mmol/L.
- *Resistencia a la insulina.*

Otra de las principales definiciones de SMet se realizó en 2002 en el tercer programa educacional de adultos para el tratamiento del colesterol en Estados Unidos (ATP III),²¹⁰ donde la obesidad abdominal se estima con la circunferencia de la cadera en lugar del IMC, y mantiene los criterios de niveles de triglicéridos altos y bajos de colesterol HDL, hipertensión e hiper glucemia, aunque no requiere la obesidad abdominal como un componente esencial.²⁰⁵

En 2005, la Federación Internacional de Diabetes (IDF)²¹¹ intentó reconciliar las diferentes definiciones clínicas de SMet e hizo necesaria la presencia de la obesidad abdominal como factor esencial en el diagnóstico, con particular énfasis en la medida de la circunferencia abdominal.²⁰⁵ Los restantes factores de riesgo fueron los mismos que en el ATP III.²⁰⁵ De este modo, los criterios que definen el SMet en la actualidad son:

- *Obesidad central* (definido como circunferencia de cintura ≥ 94 cm para varones caucásicos y ≥ 80 cm para mujeres caucásicas, con valores étnicos específicos para otros grupos).

En conjunto con la presencia de dos de los siguientes cuatro factores:

- *Nivel de triglicéridos elevados*: ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L), o tratamiento específico para esta anormalidad lipídica.
- *Colesterol HDL reducido*: < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) en varones y < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres, o tratamiento específico para esta anormalidad lipídica.
- *Hipertensión*: tensión arterial sistólica ≥ 130 o tensión arterial diastólica ≥ 85 mmHg, o tratamiento de hipertensión previamente diagnosticada.
- *Glucosa plasmática en ayunas elevada*: ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L), o diabetes tipo II previamente diagnosticada. Si la glucosa en ayunas es > 5.6 mmol/L o 100 mg/dL, la prueba de tolerancia oral a la glucosa es fuertemente recomendada pero no es necesaria para definir la presencia del síndrome.

Aunque en la definición de SMet no se recoge, en los últimos años se le está dando cada vez más importancia al valor de la hemoglobina A glicada (HbA_{1c}) como una medida predictora de la mortalidad por ECVs.²¹² La HbA_{1c} se utiliza de forma rutinaria como una medida que refleja los niveles de glucosa plasmáticos durante los 2-3 meses anteriores al análisis, permitiendo así conocer si el control que se realiza sobre la glucemia en los casos de diabetes es adecuado y ofreciendo un valor más real de los valores de glucosa en sangre, ya que en situaciones de ejercicio, estrés, medicación o la ingesta de determinados alimentos sus valores en sangre pueden verse modificados.^{213,214} La HbA_{1c} se encuentra al doble de concentración plasmática en pacientes con diabetes tipo II con respecto a individuos sanos²¹⁵ y se correlaciona positivamente con los valores de glucosa en sangre.²¹³

En los primeros estudios acerca del valor predictivo de la HbA_{1c} sobre la glucemia se observó que en algunos casos los valores de HbA_{1c} observados eran mayores o menores de lo esperado con respecto a los niveles de glucosa en sangre, definiendo a estos pacientes como “altos o bajos glicadores” respectivamente.²¹⁶ En esta línea, el grupo de Mcarter y col. (2004)²¹⁷ intentó cuantificar estas tendencias de la HbA_{1c} creando el “índice de glicosilación de la hemoglobina”, calculado como la diferencia entre la HbA_{1c} medida en sangre y la esperada predicha mediante una regresión de la HbA_{1c} con la media de los niveles de glucosa en sangre de la muestra de estudio. Actualmente se considera más fiable utilizar los niveles de fructosamina plasmáticos en lugar de los niveles de glucosa para

estimar la HbA_{1c}, dando lugar así a un nuevo índice denominado “gap de glicación”, calculado como la diferencia entre la HbA_{1c} observada y la predicha mediante una recta de regresión que utiliza los valores de fructosamina en plasma, y donde aquellos pacientes con un gap de glicación <-1 se consideran bajos glicadores, entre -1 y 1 glicadores medios, y >+1 altos glicadores,^{218,219} de modo que el gap de glicación puede utilizarse como un indicador de riesgo de padecer complicaciones derivadas de la diabetes de manera independiente a los niveles de glucosa plasmáticos.^{218–220}

Por tanto, la obesidad a nivel central, la glucemia y la resistencia a la insulina son factores clave en el desarrollo del síndrome metabólico y ECVs asociadas.¹⁵³ Desde hace más de 60 años se reconoce que el riesgo cardiovascular producido por el sobrepeso y la obesidad se relaciona más con la distribución del tejido adiposo que con la cantidad total de grasa corporal,¹⁴¹ de forma que los depósitos de grasa visceral y subcutánea tienen distintas consecuencias sobre el desarrollo de ECVs debido a diferencias anatómicas, celulares y moleculares entre ambas localizaciones.^{141,221} En conjunto, estas diferencias muestran que la obesidad de tipo subcutáneo, más frecuente en mujeres, no se asocia a un mayor riesgo de sufrir patologías cardiovasculares asociadas.^{141,221} Sin embargo, la obesidad central o abdominal es más frecuente en varones y se relaciona con un mayor riesgo de padecer enfermedades como la resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo II e hipertensión, aumentando considerablemente la aparición del síndrome metabólico y el riesgo cardiovascular,^{126,222–225} de manera que en los últimos años, cada vez más trabajos resaltan la relación entre el estado de inflamación a nivel sistémico que ocurre en la obesidad con el desarrollo de ECVs, con la consecuente participación de las adipokinas en este proceso^{131,155,226} (Fig. 12).

Es importante distinguir la grasa visceral de la subcutánea en cuanto a su patrón de expresión de adipokinas y a su implicación en el desarrollo del síndrome metabólico.²²⁷ La grasa visceral juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, ya que expresa muchos componentes estrechamente relacionados con factores de riesgo cardiovascular, como IL-6, PAI, y glucocorticoides, mientras que la grasa subcutánea produce principalmente factores protectores como la leptina o la adiponectina, y es menos sensible a la acción lipolítica de los glucocorticoides.¹⁴⁷ Además, las adipokinas liberadas por el tejido adiposo visceral tienen acceso directo al hígado a través de la vena porta, por lo que producen un gran impacto a nivel inflamatorio sobre el hígado.²²⁷ Los principales mecanismos de acción de las adipokinas producidas por el tejido adiposo se pueden clasificar en función de su localización anatómica, por lo que las adipokinas secretadas por la grasa visceral ejercen un efecto mayor sobre el metabolismo de los

carbohidratos y lípidos a nivel hepático, a parte de poder ejercer efectos autocrinos/paracrinos en el propio tejido adiposo visceral.²²⁷

5.2.-Papel de las adipokinas y hormonas metabólicas en la función cardiovascular.

La obesidad tiene numerosas consecuencias en el sistema cardiovascular.²²⁸ Los depósitos de grasa epicárdica se distribuyen sobre la superficie del corazón, cerca de las arterias coronarias, de forma que en individuos obesos se produce un mayor acúmulo de este tejido, correlacionándose positivamente con el acúmulo de grasa visceral.²²⁹ Esta proximidad con las arterias coronarias podría estar implicada en el desarrollo de aterosclerosis, y aunque la posible relación entre el acúmulo de grasa epicárdica y el riesgo de padecer ECVs no se conoce con claridad, la grasa epicárdica parece tener la capacidad de producir adipokinas proinflamatorias y citokinas que podrían estar implicadas en el desarrollo de ECVs^{15,169-171} (Fig. 12).

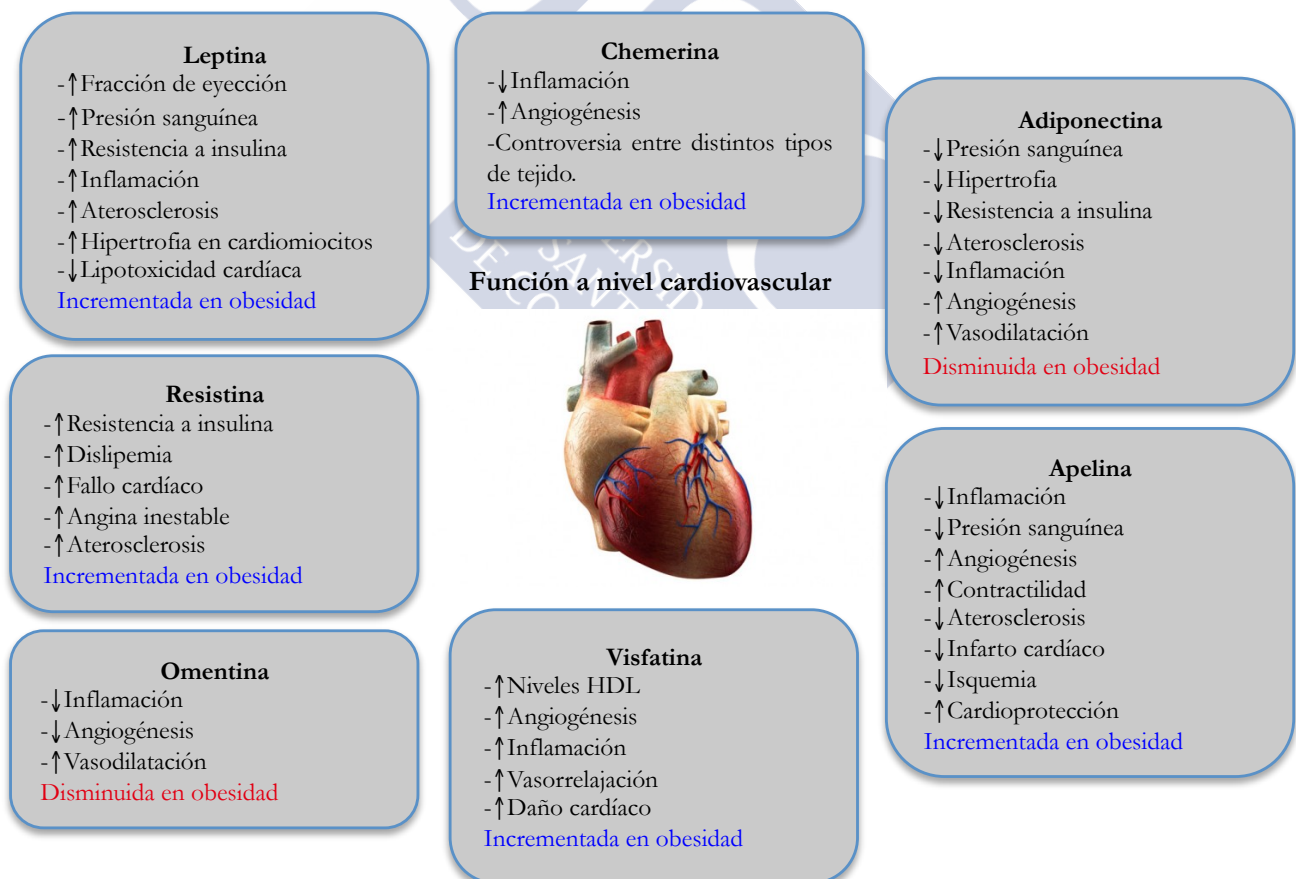


Figura 12: Función de distintas adipokinas a nivel cardiovascular y variación de sus niveles de producción en obesidad.^{140,230,231}

Uno de los principales efectos a nivel cardiovascular de las adipokinas es la regulación de la función endotelial.^{140,230,231} El endotelio vascular está formado por una monocapa de células endoteliales que constituyen una barrera entre la circulación sanguínea y la pared de los vasos sanguíneos.²³² Las células endoteliales controlan el tono vascular y el flujo sanguíneo mediante la liberación de factores que controlan la contractilidad como el óxido nítrico (NO), metabolitos del ácido araquidónico, especies reactivas de oxígeno (ROS) y diversos péptidos como la urotensina o la endotelina.²³² La disfunción endotelial ocurre debido a un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción o al incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis.²³³ Diversos estímulos protrombóticos, inflamatorios o lipídicos, como la trombina, el lipopolisacárido (LPS) o las lipoproteínas, producen cambios significativos en la permeabilidad endotelial iniciando el proceso de disfunción endotelial, de forma que la pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas hacia el interior de la pared permite un mayor depósito de moléculas circulantes, como el fibrinógeno y las lipoproteínas de baja densidad (LDL).²³³ Como consecuencia, se produce el reclutamiento de leucocitos, plaquetas, monocitos y macrófagos, contribuyendo a la formación de placas de ateroma²²⁶ (Fig. 13).

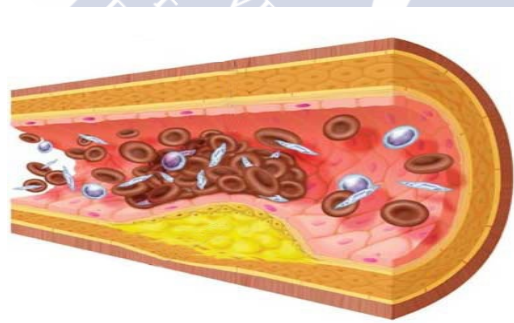


Figura 13: Formación de la placa de ateroma.

Leptina.

La leptina desempeña un papel muy importante en los primeros estadios de desarrollo de la aterosclerosis, iniciando el reclutamiento de leucocitos y macrófagos hacia la pared endotelial.²³⁴ Estudios *in vivo* han mostrado que los ratones db/db y ob/ob son resistentes a la aterosclerosis, apoyando el papel patológico de leptina en el desarrollo de esta enfermedad.²³⁵ La leptina incrementa la actividad plaquetaria, promoviendo la

formación de las placas de ateroma e induce la producción de factores que median la inflamación vascular, como TNF- α , IL-2, IL-6 o ROS, causando disfunción endotelial mediante la inducción de estrés oxidativo.²³⁶ Varios estudios han mostrado una correlación positiva entre los niveles de leptina en sangre y la presión sanguínea, sugiriendo una posible inducción de la hipertensión por parte de la leptina.²³¹ Sin embargo, la leptina aparece como un potente vasodilatador en pacientes con enfermedad coronaria, y varios estudios con animales han confirmado el papel vasodilatador de leptina.²³¹ Una posible explicación podría ser un efecto diferencial sobre la vasculatura en función de niveles crónicos o agudos de leptina.²³¹ La infusión crónica de leptina incrementa la frecuencia cardíaca y la presión arterial mediante la activación del sistema nervioso simpático y la liberación de catecolaminas.²³¹ Además, los niveles altos de leptina en suero en humanos se asocian con un incremento del riesgo de infarto de miocardio de forma independiente al estado de obesidad y factores de riesgo cardiovasculares.²³⁷

Por otro lado, la leptina protege frente al daño por isquemia/reperfusión reduciendo el tamaño de la zona infartada y protegiendo a los cardiomiocitos del daño causado por la hipoxia.²³¹

La leptina no tiene un perfil particularmente bueno en cuanto a sus efectos sobre el sistema cardiovascular.²³¹ De hecho sus efectos beneficiosos se reducen a la protección frente a isquemia/reperfusión.²³¹ En general, se considera una adipokina “mala”, ya que induce la resistencia a la insulina, incrementa la presión sanguínea, promueve la aterosclerosis y el riesgo de infarto de miocardio, la inflamación vascular, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial.²³¹

Adiponectina.

Adiponectina actúa como una molécula antiaterogénica al reducir la expresión de TNF- α por las moléculas de adhesión endotelial y atenuar la producción de ROS por las células endoteliales.²²⁶ También estimula la migración de las células endoteliales y la vascularización, y previene la apoptosis.²²⁶ Ratones KO para el gen de adiponectina presentan una disfunción en la vasodilatación de la aorta mientras que, por el contrario, la administración de adiponectina recombinante en ratas con obesidad inducida por la dieta incrementa la producción de NO y la relajación de las paredes de la aorta.^{238,239} La hipoadiponectinemia está asociada con la disfunción endotelial en pacientes diabéticos,^{240,241} y también con el desarrollo de hipertensión a través de varios mecanismos,

entre los que se incluyen el sistema de la renina-angiotensina y la hiperactividad del sistema nervioso simpático, la disfunción endotelial y la disfunción de la natriuresis renal.²⁴²

Adiponectina también participa en el proceso de remodelamiento cardíaco limitando la extensión de la hipertrofia miocárdica, observándose también una protección frente al daño por isquemia/reperfusión, al igual que leptina.²³¹ En un estudio realizado en ratones, se ha observado que adiponectina protege frente a la disfunción sistólica tras un infarto de miocardio, y en humanos los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionan negativamente con la resistencia a la insulina y la severidad de enfermedad coronaria arterial.²³¹ En varones, los niveles plasmáticos incrementados de adiponectina se correlacionan con la reducción del riesgo de sufrir infarto de miocardio y en pacientes diabéticos se correlaciona también negativamente con el daño coronario.²³¹

Adiponectina es considerada una adipokina “buena” debido a sus propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas, antidiabéticas y cardioprotectivas, y a su contribución al buen funcionamiento del endotelio.²³¹ Reduce el riesgo de padecer enfermedades coronarias arteriales y protege frente al daño post-infarto, así como también promueve la angiogénesis y reduce la resistencia a la insulina.²³¹

Resistina.

La resistina ejerce sus funciones a nivel cardiovascular, en cierto modo, a través de la interconexión con otras adipokinas.²³¹ Parece existir un efecto directo y recíproco entre la resistina y la adiponectina con respecto a la inflamación vascular de las células endoteliales.²³¹ Resistina induce la expresión de moléculas de adhesión, mientras que la adiponectina inhibe las acciones de resistina.²³¹ También existe una relación funcional entre resistina y leptina, de forma que la administración de leptina suprime la expresión de ARNm y proteína de resistina en ratones ob/ob con niveles reducidos de glucosa e insulina.²³¹

La resistina humana parece estar implicada en el desarrollo de procesos proinflamatorios que producen disfunción endotelial, y sus niveles plasmáticos se consideran predictivos sobre la aparición de aterosclerosis.¹⁹³ Los niveles plasmáticos elevados de resistina se correlacionan positivamente con marcadores inflamatorios proaterogénicos, con el incremento del riesgo cardiovascular y con el desarrollo de angina inestable, con enfermedad coronaria arterial y con el desarrollo de SMet.²³¹

Con todo ello, resistina, al igual que la leptina, no se considera una adipokina beneficiosa a nivel del sistema cardiovascular.²³¹

Visfatina.

Visfatina es otra adipokina implicada en la disfunción endotelial que induce la expresión de moléculas de adhesión, estrés oxidativo y citokinas proinflamatorias.²³¹ Sin embargo, concentraciones elevadas de visfatina incrementan la expresión de adipokinas antiinflamatorias²⁴³ y se ha visto que estimula la proliferación endotelial y la formación de capilares.²⁴⁴ Existe una correlación positiva entre los niveles de visfatina y de HDL, siendo un efecto positivo en cuanto al depósito de colesterol en las placas de ateroma, pero en cambio, su expresión está incrementada en los macrófagos de la placa de ateroma en pacientes con aterosclerosis inestable, sugiriendo un papel de visfatina en la inflamación y desestabilización de la placa de ateroma.^{245,246} Por otro lado, se ha visto que la visfatina induce directamente la vasorrelajación del endotelio a través de la producción de NO, reduciendo la presión arterial, y que tiene efectos cardioprotectivos frente al daño por isquemia/reperfusión, reduciendo el tamaño de la zona infartada.^{231,247}

Apelina.

En pacientes con dislipemia los niveles plasmáticos de apelina se encuentran reducidos, y la reducción terapéutica de los niveles de LDL (mediante tratamiento con estatinas o hábitos saludables) en pacientes con hipercolesterolemia produce un incremento en los niveles circulantes de apelina.²⁴⁸ En modelos animales hiperlipémicos, apelina tiene un efecto antiaterogénico, y se ha visto que previene la formación de aneurismas aórticos mediante la limitación de la inflamación producida por los macrófagos.²⁴⁹ Apelina induce vasodilatación mediada por las células endoteliales mediante el incremento de la producción de NO, con la consecuente reducción de la presión arterial²³¹ y promueve la angiogénesis.¹⁹⁹

En pacientes con fibrilación auricular e insuficiencia cardíaca crónica se observan niveles disminuidos de apelina en plasma, mientras que en situaciones de hipoxia se estimula la síntesis de apelina en el tejido cardíaco.²³¹ Esto se podría explicar como un mecanismo compensatorio del corazón para intentar mantener su función normal mediante el incremento de apelina, la cual protege frente al daño por isquemia/reperfusión.²³¹

Apelina podría considerarse una adipokina “buena” en cuanto a sus efectos sobre el sistema cardiovascular, ya que reduce la aterogénesis, la inflamación, la presión arterial, la contractilidad cardiomiocitaria, la fibrilación atrial y la insuficiencia cardíaca, así como el tamaño del infarto en situaciones de isquemia.²³¹

Chemerina.

La chemerina es una adipokina relativamente nueva y todavía no existen muchos estudios acerca de su función a nivel cardiovascular.²³¹ Parece estar implicada en la reducción de la inflamación endotelial y la aterogénesis, por lo que por el momento podría considerarse una adipokina protectora.²³¹

Omentina.

La omentina actúa como una molécula vasodilatadora, inhibiendo la vasoconstricción por las catecolaminas e incrementando la síntesis de NO para inducir la vasodilatación de las células endoteliales.²³¹ También está implicada en la inhibición de la inflamación vascular, reduciendo la disfunción endotelial.²³¹

Al igual que la chemerina, la omentina es una adipokina relativamente nueva, por lo que seguramente en futuros estudios se esclarezca algo más su papel en el sistema cardiovascular, aunque parece ser una adipokina con efectos protectores.²³¹

Grelina.

Aunque la grelina no es una hormona producida por el tejido adiposo, nos referimos a ella como hormona metabólica con un importante papel en la regulación de la ingesta y la homeostasis energética¹¹⁰ y en la fisiopatología de las ECVs.²⁵⁰

En los últimos años se ha visto que la grelina tiene importantes efectos sobre el sistema cardiovascular, actuando como un agente antihipertensivo, tanto en individuos sanos²⁵¹ como en ratas normotensas e hipertensas,²⁵² y participando en el incremento de la diuresis.²⁵³ En voluntarios sanos y en pacientes con infarto congestivo crónico la grelina reduce la resistencia vascular periférica, resultando en un incremento del volumen sistólico.²⁵⁴ La grelina también mejora el remodelamiento ventricular,²⁵⁵ disminuye el daño cardíaco inducido por isquemia/reperfusión,²⁵⁶ reduce el tamaño de las zonas infartadas²⁵⁷ y mejora la función ventricular y la caquexia en ratas con insuficiencia cardíaca.²⁵⁸ En un estudio reciente se ha sugerido que la grelina plasmática podría utilizarse como un marcador de resistencia a la insulina en pacientes con infarto agudo de miocardio, de forma que un incremento del 4% en los niveles circulantes de grelina se asocian con un incremento del riesgo de resistencia a la insulina en un 78%.²⁵⁹

5.3.-Producción de adipokinas y hormonas metabólicas por otros tejidos.

En los últimos años se ha demostrado que las adipokinas no se expresan exclusivamente en el tejido adiposo, sino que diferentes tejidos pueden expresar determinadas adipokinas que podrían estar formando parte de una red reguladora de distintos procesos biológicos, tanto a nivel local en el propio tejido de producción, como a nivel sistémico.^{113,133,260,261} Así, por ejemplo, se ha visto que aunque el principal tejido de producción de adiponectina es el tejido adiposo blanco,²⁶² también se ha demostrado su expresión en el tejido adiposo pardo,²⁶³ en la retina,²⁶⁴ en las células intersticiales renales,²⁶⁵ en el ovario,²⁶⁶ en la placenta,²⁶⁷ en el endometrio,²⁶⁸ en las células epiteliales tubulares renales,²⁶⁹ en la glándula pituitaria,²⁷⁰ en la médula ósea,²⁷¹ en los linfocitos B,²⁷² en las células madre hematopoyéticas,²⁷³ en el músculo esquelético²⁷⁴ o en el pulmón.²⁷⁵

En el caso de leptina, también se ha visto su expresión por otros tejidos aparte del tejido adiposo, como por ejemplo el epitelio gástrico,²⁷⁶ el intestino grueso,²⁷⁷ el ovario,²⁶⁶ la placenta,²⁷⁸ el endometrio,²⁷⁹ el músculo esquelético,²⁸⁰ el pulmón,²⁸¹ el hueso subcondral,²⁸² el hígado,²⁸³ el riñón,²⁸⁴ la médula ósea²⁸⁵ o el epitelio mamario.²⁸⁶

La expresión de la visfatina se ha identificado también en los linfocitos B,²⁸⁷ en la médula ósea,²⁸⁸ en el músculo esquelético,²⁸⁹ en el hígado,²⁹⁰ en el endometrio,²⁹¹ en las células periodontales,²⁹² en el ovario,²⁹³ en las células mononucleares,²⁹⁴ en los macrófagos,²⁴⁵ en el tejido mamario,²⁹⁵ en el tejido sinovial,²⁹⁶ en células tumorales tiroideas²⁹⁷ o en el páncreas.²⁹⁸

La apelina se produce en adenomas y adenocarcinomas de colon,²⁹⁹ en el intestino delgado,³⁰⁰ en la placenta,³⁰¹ en el endometrio,³⁰² en la retina,³⁰³ en el pulmón,³⁰⁴ en el riñón,³⁰⁵ en el estómago,³⁰⁶ en el páncreas,³⁰⁷ en el músculo esquelético³⁰⁸ o en condrocitos.³⁰⁹

Finalmente, por poner solo algunos ejemplos de adipokinas y hormonas metabólicas, la grelina se produce también en otros tejidos distintos del estómago (su principal fuente de producción), como en el hipotálamo, la hipófisis, las glándulas salivares, la tiroides, el intestino delgado, los riñones, el páncreas, el sistema nervioso central, los pulmones, la placenta, las gónadas, las mamas o los dientes.³¹⁰

Producción de hormonas metabólicas por tejidos cardiovasculares.

Los principales tejidos que conforman el sistema cardiovascular también producen y secretan distintos tipos de adipokinas y hormonas metabólicas, que pueden participar en la regulación de procesos como la aterosclerosis,^{311,312} la disfunción endotelial³¹³ o la

angiogénesis.³¹⁴ Se ha observado que las células endoteliales expresan adipokinas como leptina,^{312,315} adiponectina,^{316,317} chemerina,³¹⁵ visfatina,³¹⁸ apelina,³¹⁹ VEGF,²⁴⁴ MCP-1,³²⁰ IL-6,³²⁰ IL-8³¹⁴ o grelina,³²¹ y las células musculares lisas vasculares pueden producir adiponectina,³²² resistina,³¹¹ IL-6,³²³ IL-8³²³ o TNF- α .³²⁴

En cuanto a las células cardíacas, los cardiomiocitos son capaces de sintetizar leptina,³²⁵ adiponectina,²⁶¹ apelina,³²⁶ visfatina³²⁷ o resistina,³²⁸ que junto con las adipokinas derivadas del tejido adiposo epicárdico, podrían tener un importante papel regulador a nivel local de forma autocrina/paracrina.¹⁶³ En esta línea, se ha visto, por ejemplo, que la adiponectina participa en la reducción del estrés del retículo endoplásmico,³²⁹ la inflamación³²⁹ o la hipertrofia,³³⁰ que mejora el daño por isquemia/reperfusión³³¹ y que incrementa la captación de ácidos grasos y glucosa por parte de los cardiomiocitos.²⁶¹ Asimismo, se ha demostrado que la leptina promueve la hipertrofia,³³² modifica las corrientes de potasio³³³ e induce apoptosis y generación de ROS³³⁴ en cardiomiocitos. También se ha visto que tanto la grelina como sus receptores se expresan a nivel cardíaco en cardiomiocitos de la línea celular de ratón HL-1³³⁵ y en cardiomiocitos auriculares humanos,^{335,336} donde esta hormona previene la apoptosis inducida por citarabina.³³⁵

De este modo, la función cardiovascular y el desarrollo de ECVs podría verse influenciada no solo por la señalización endocrina de las adipokinas secretadas por los distintos depósitos de tejido adiposo, principalmente el visceral,²³⁰ sino también por su propia producción a nivel local en el tejido cardiovascular, pudiendo participar en la patogénesis o en la prevención de la aparición de ECVs.^{163,261,325-328}

5.4.-Productos endocrinos del corazón y regulación del metabolismo energético.

Cada vez son más los trabajos que sugieren una clara relación entre el corazón y el tejido adiposo, en cuanto a que la producción de determinadas adipokinas tienen importantes efectos sobre el desarrollo de ECVs, ya sean protectores o perjudiciales, y a su vez, el corazón tiene la capacidad de producir determinados péptidos, como los péptidos natriuréticos y algunas hormonas, implicados en la regulación del gasto energético y el metabolismo.^{337,338}

Desde hace años se conoce que el corazón secreta los péptidos natriuréticos (atrial (ANP), cerebral (BNP) y el tipo C (CNP)),³³⁷ que fueron originalmente identificados como importantes reguladores del control de la presión sanguínea pero que recientemente se han relacionado también con la regulación del metabolismo energético.³³⁸ Así, se ha visto que el ANP puede afectar directamente a la función del tejido adiposo induciendo la estimulación

de la lipólisis mediante una ruta paralela a la de las catecolaminas en adipocitos humanos en cultivo.³³⁹ Diversos estudios clínicos han mostrado asimismo que los niveles circulantes de ácidos grasos libres se ven incrementados en respuesta al ANP, induciendo un incremento del gasto energético postprandial.³⁴⁰⁻³⁴² Los efectos de los péptidos natriuréticos sobre el metabolismo energético no solo afectan al tejido adiposo, sino que por ejemplo en miocitos del músculo esquelético humano en cultivo se ha visto que tanto el ANP como el BNP estimulan la fosforilación oxidativa e incrementan la oxidación de ácidos grasos.³⁴³ Un trabajo reciente realizado en ratones sugiere además que los péptidos natriuréticos podrían estimular el gasto energético a nivel sistémico.³⁴⁴

Por otro lado, en distintos trabajos se han relacionado los péptidos natriuréticos con la disminución del vaciado gástrico,³⁴⁵ el incremento de la secreción de insulina³⁴⁶ y la inhibición de la ingesta³⁴⁷ en ratones, resaltado así la existencia de un eje cardiaco-digestivo-cerebral.³⁴⁸ En adipocitos humanos en cultivo, los péptidos natriuréticos estimulan la secreción de la hormona antidiabética adiponectina,³⁴⁹ y recientemente se ha visto que la infusión aguda de BNP en pacientes reduce la glucemia en sangre tras sobrecarga oral de glucosa.³⁵⁰ Todos estos datos sugieren un papel regulador de los péptidos natriuréticos en la homeostasis de la glucosa, probablemente actuando como agentes antidiabéticos y formando parte del complejo sistema regulador del metabolismo energético.³⁴⁸

En los últimos años, tal y como hemos explicado anteriormente, se ha demostrado que el corazón, además de ser un órgano de producción de factores endocrinos clásicos como los péptidos natriuréticos, es una fuente de hormonas metabólicas que podrían actuar a nivel autocrino, paracrino y/o endocrino regulando procesos metabólicos tanto a nivel del tejido cardiaco como quizás a nivel sistémico o en otros tejidos. Un gran número de estudios experimentales y de ensayos clínicos apoyan la hipótesis de que el corazón es un componente importante de una compleja red reguladora que incluiría también al sistema endocrino, al sistema nervioso y al sistema inmune.³⁵¹ En particular, existen en la actualidad distintas líneas de investigación cuyo objetivo es elucidar las complejas interrelaciones existentes entre la función endocrina cardiaca y el sexo, las hormonas esteroideas y el sistema de las adipokinas.³⁵¹

6.-Nesfatina-1: una nueva hormona relacionada con el control de la ingesta y el peso corporal.

Los primeros estudios que sugieren la implicación del hipotálamo como un importante regulador del peso corporal y de la patogénesis de la obesidad y la diabetes se realizaron ya entre los años 1930 y 1960.³⁵²⁻³⁵⁴ Basándose en estos y en estudios posteriores, hoy en día sabemos que el hipotálamo es la principal región cerebral en el control de la ingesta y el gasto energético.^{77,81,355-359}

Muchas de las moléculas reguladoras del control del apetito a nivel cerebral y/o sus receptores se expresan tanto en el tejido adiposo como en el hipotálamo (como es el caso de la leptina), de forma que se sugiere una asociación entre ambos tejidos conocida como el eje adiposo-cerebral, donde dichas moléculas también se encuentran en el torrente sanguíneo como moléculas de secreción y regulan tanto los procesos neuroendocrinos del control de la ingesta como el número y tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo^{360,361} (Fig. 14).

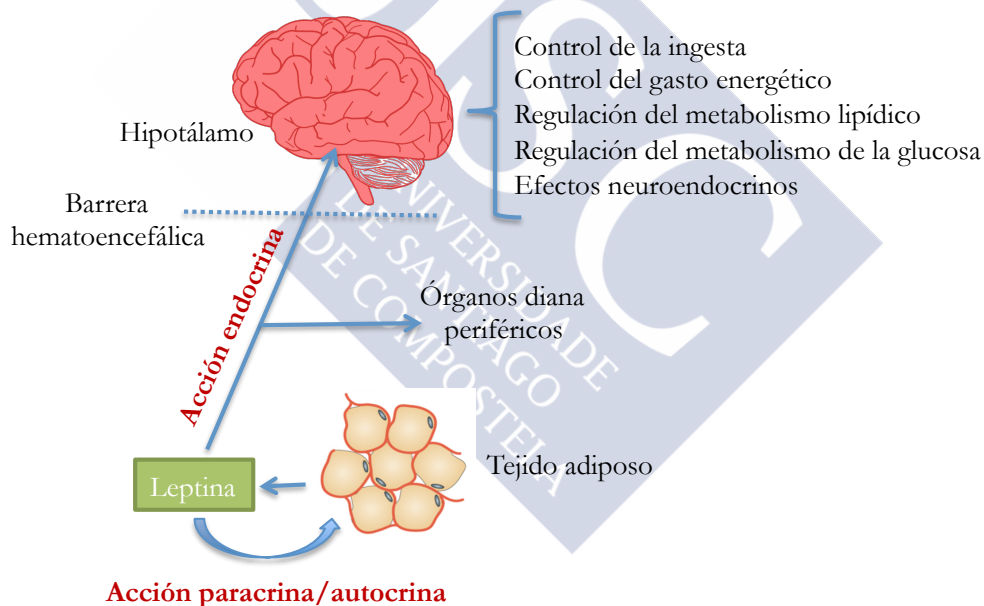


Figura 14: Ejemplo de la leptina como molécula integrante del eje adiposo-cerebral en el control de la ingesta.³⁶²

6.1.-Descubrimiento de la nesfatina-1.

La nesfatina-1 fue descubierta en el año 2006 por Oh-I y col.,³⁶³ en un estudio realizado en ratas en el que se buscaban nuevos genes relacionados con el control de la ingesta. El estudio consistía en intentar encontrar nuevas moléculas reguladoras del apetito, con expresión tanto a nivel hipotalámico como en el tejido adiposo, que pudiesen estar formando parte del eje adiposo-cerebral.³⁶³ Para ello se centraron en el estudio de genes

estimulados por el tratamiento con troglitazona, un medicamento utilizado como antidiabético oral que incrementa la sensibilidad a la insulina y reduce los niveles de glucosa en sangre.^{363,364} La troglitazona actúa como un agonista de PPAR- γ , el cual regula la transcripción de numerosos genes implicados en la diferenciación y metabolismo adipocitario, la sensibilidad a la insulina, la glucemia, la inflamación, la aterosclerosis y algunos tipos de cáncer.^{364,365} De esta manera identificaron a la nesfatina-1 como una nueva hormona cuya expresión génica a nivel hipotalámico se incrementa drásticamente tras el tratamiento con troglitazona, y que presenta efectos sobre la reducción de la ingesta y del peso corporal, disminuyendo la cantidad de grasa subcutánea, epididimal y mesentérica.³⁶³ Posteriormente, Yamada y col. (2010),³⁶⁴ demostraron que la troglitazona no solo incrementa los niveles de expresión de ARNm de nesfatina-1, sino que también contribuye a su estabilización mediante la activación de la ruta de señalización de ERK1/2, kinasas implicadas en la regulación de múltiples funciones biológicas, entre las que se incluyen la proliferación y la diferenciación celular,³⁶⁶⁻³⁶⁸ la adipogénesis,^{369,370} la señalización de la insulina,³⁷¹⁻³⁷³ la función de las células β -pancreáticas y la secreción de insulina³⁷⁴⁻³⁷⁶ o la captación de glucosa por células musculares y adipocitos.³⁷⁷⁻³⁸⁰

6.2.-Nucleobindina 2: proteína precursora de nesfatina-1.

La nesfatina-1 es un péptido derivado por procesamiento proteolítico de su proteína precursora: la nucleobindina 2 (NUCB2), también conocida como Prepronesfatina, AI607786, CALNUC o NEFA.³⁸¹ Las nucleobindinas son una clase de proteínas multidominio de unión al calcio que pueden interactuar con los ácidos nucleicos y con proteínas reguladoras jugando, por tanto, un papel importante en distintas rutas de señalización.³⁸¹ Inicialmente, las nucleobindinas se identificaron como un factor de transcripción debido a su capacidad de unión al ADN.³⁸² Hasta la fecha, se han identificado dos tipos de nucleobindinas: NUCB1 y NUCB2.^{382,383} Ambas proteínas pertenecen a una familia de genes homólogos que, aunque se codifican por dos genes independientes, presentan una alta homología (comparten el 62% de sus secuencias) y tienen la característica común de presentar múltiples dominios funcionales, incluyendo un péptido señal, una región rica en leucinas (L) e isoleucinas (I), una señal de localización nuclear, dos dominios de unión al calcio de tipo *EF-hand* y una cremallera de leucinas, lo que sugiere que ambos genes provienen de un único gen ancestral.^{384,385} NUCB1 y NUCB2 presentan numerosas funciones derivadas de sus dominios *EF*, reguladas por la presencia de lugares de corte por caspasas.³⁸⁴ Aunque comparten una gran similitud en la estructura de sus

dominios funcionales, existen sin embargo divergencias en sus regiones amino y carboxi-terminales, así como en la cremallera de leucinas.³⁸⁴

NUCB1 se expresa de forma abundante en el aparato de Golgi en una gran variedad de tejidos y se sugiere su participación en la homeostasis del calcio en la red de cisternas del cis-Golgi,³⁸⁴ además de poseer características de factor de transcripción³⁸² y de interactuar con distintas proteínas de unión a través de su dominio de unión al calcio, como G_{α3}, G_{α2} (subunidades de receptores acoplados a proteínas G) o ciclooxigenasas.^{386,387}

Comparada con NUCB1, NUCB2 tiene 40 aminoácidos menos y es una proteína de aproximadamente 50 kDa en humanos y roedores.^{384,388} También se expresa en el aparato de Golgi, aunque presenta un motivo de retención en su extremo N-terminal, siendo una proteína de secreción que tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas de forma calcio-dependiente.^{388,389}

Estructura proteica de NUCB2.

La estructura proteica de NUCB2 está formada por 420 aminoácidos, y su procesamiento proteolítico puede ser llevado a cabo por caspasas³⁸⁹ o también por prohormona convertasas,³⁶³ de forma que los lugares de corte de estas últimas se encuentran flanqueados por lisina (K)-arginina (R) o R-R, siendo el sitio K83-R84 el de mayor potencial de corte y el mejor conservado entre distintas especies^{363,385,390} (Fig. 15). La existencia de los sitios de corte por prohormona convertasas, típicas del procesamiento de prohormonas,^{391,392} como por ejemplo la proinsulina o POMC, sugiere que NUCB2 es una proteína precursora que podría dar lugar a tres péptidos: nesfatina-1 (residuos 1-82), nesfatina-2 (residuos 85-163) y nesfatina-3 (residuos 166-396).³⁶³ Las estructuras proteicas de nesfatina-2 y nesfatina-3 se caracterizan por poseer sitios putativos de unión al ADN y la cremallera de leucinas, que actúa como sitio de unión al ADN nucleosomal, mientras que la nesfatina-1 no presenta ninguno de estos sitios.³⁶³

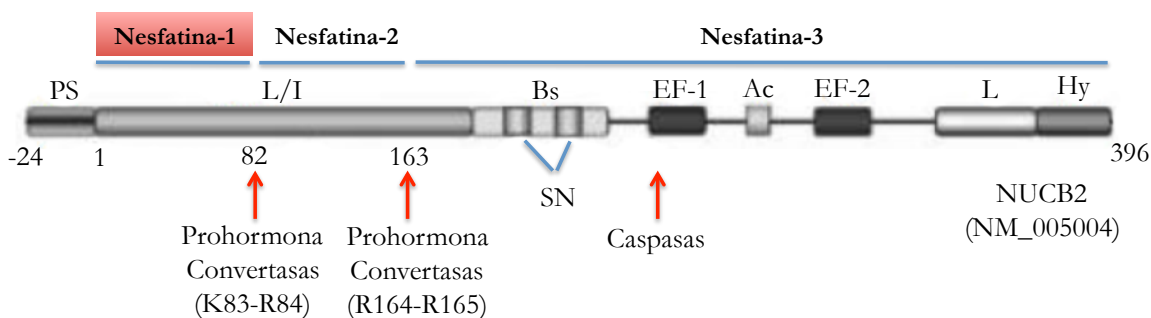


Figura 15: Estructura proteica de NUCB2. PS: péptido señal, L/I: región rica en leucinas e isoleucinas, Bs: aminoácidos básicos, SN: señal de localización nuclear, Ac: aminoácidos ácidos, EF-1 y 2: dominios de unión a calcio, L: cremallera de leucinas, Hy: porción hidrofóbica. Aparecen representados también los puntos de corte por prohomona convertasas y caspasas.^{363,389,393}

Lugares de producción y principales funciones de NUCB2.

Se ha demostrado la expresión de NUCB2 en algunos núcleos hipotalámicos clave en el control de la homeostasis energética, así como también en distintos tejidos periféricos, entre los que se incluyen el estómago^{394,395} y el tracto gastrointestinal,³⁹⁵ el páncreas,³⁹⁶⁻³⁹⁸ los testículos,³⁹⁹ los ovarios,⁴⁰⁰ la glándula pituitaria,³⁹⁸ el tejido adiposo⁴⁰¹ y el corazón.^{398,402}

Su función y mecanismo de acción todavía no se conocen con exactitud, aunque algunos estudios sugieren su participación en los procesos de mineralización del hueso, en la producción de anticuerpos o en la respuesta inflamatoria.^{381,389} En los últimos años se han identificado nuevas funciones de NUCB2, que en realidad parecen depender de la actividad biológica de nesfatina-1, como el crecimiento y la inhibición de la diferenciación de los adipocitos mediante la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la cascada de señalización de ERKs,⁴⁰³ la diferenciación y mineralización de osteoblastos, la inhibición de la diferenciación de los osteoclastos⁴⁰⁴ o el incremento de la sensibilidad a la insulina en ratas diabéticas,⁴⁰⁵ así como también se ha visto que la interrupción de la ruta de señalización de NUCB2 a nivel hipotalámico produce hiperfagia en ratones diabéticos obesos.⁴⁰⁶ Además, se sugiere su participación en algunos procesos de tumorigénesis y particularmente en el desarrollo de cáncer de mama y próstata.^{407,408}

6.3.-Nesfatina-1: una nueva molécula anorexigénica.

Oh-I y col. (2006),³⁶³ identifican a NUCB2 (47.5 kDa) como una proteína reguladora del apetito con propiedades anorexigénicas que se expresa en los principales centros hipotalámicos del control de la ingesta en rata: núcleos ARC, PVC, supraóptico (SON), LHA, núcleo del tracto solitario (NTS) y zona incierta.³⁶³ La descripción inicial del

efecto biológico de la nesfatina-1 fue la reducción de la fase oscura de la ingesta en ratas tras su inyección en el tercer ventrículo cerebral.³⁶³ Posteriormente a este trabajo, numerosos estudios han confirmado la función anorexigénica y de reducción del peso corporal de nesfatina-1,^{393,409-416} demostrando que la inyección de nesfatina-1 en el ventrículo lateral cerebral también reduce la fase oscura de la ingesta produciendo una disminución de la cantidad de comida y agua ingerida e incrementando los intervalos entre comidas en rata, ratón y pez zebra.^{411,412,417,418} Además de su efecto anorexigénico tras inyección en prosencéfalo (tercer ventrículo y ventrículo lateral), donde el PVN se ha identificado como un sitio de respuesta a nesfatina-1, la nesfatina-1 inyectada en el mesencéfalo o en la cisterna magna del cuarto ventrículo también reduce la fase oscura de la ingesta en ratas.⁴¹² En cuanto a otras especies, se ha sugerido también un papel anorexigénico de nesfatina-1 en cerdo^{419,420} y en Ya-fish.⁴²¹

Por otro lado, en humanos, Albayrak y col. (2013)⁴²² han realizado recientemente un estudio acerca del papel de la nesfatina-1 sobre la pérdida de apetito en pacientes con quemaduras con infección donde sugieren la participación de la nesfatina-1 a nivel central sobre la reducción de la ingesta.

Nesfatina-1 como molécula efectora de NUCB2.

En el trabajo inicial de Oh-I y col. (2006)³⁶³ se demostró que tanto NUCB2 como nesfatina-1 se colocan en el citoplasma de neuronas hipotálamicas junto con las prohormonas convertidasas 1/3 y 2, sugiriendo el procesamiento proteolítico de NUCB2 por estas proteínas.³⁶³ Además, la presencia de la forma procesada de nesfatina-1 (9.5 kDa) en el líquido cefalorraquídeo confirmaba tanto su procesamiento proteolítico como su posible secreción.³⁶³ Para determinar si la función anorexigénica de NUCB2 residía en la proteína completa o en alguno de sus fragmentos proteolíticos, Oh-I y col. (2006)³⁶³ sintetizaron nesfatina-1, nesfatina-2 y nesfatina-3 y observaron que la inyección intracerebral de nesfatina-1 induce anorexia de forma dosis dependiente, que se prolonga durante 6 horas,³⁶³ mientras que nesfatina-2 y nesfatina-3 no tienen ningún efecto sobre el apetito.³⁶³ De este modo se demostró que la función anorexigénica de NUCB2 está contenida en el péptido nesfatina-1, cuya secuencia aminoacídica se encuentra altamente conservada en humano, ratón y rata (87.4% rata-humano y 95.7% rata-ratón),^{363,393} lo que sugiere que tiene un papel biológico de gran relevancia (Fig. 16).

Secuencia aminoacídica de nesfatina-1

	1	42
<i>Humano</i>	VPIDIDKTKVQNIHPVESAKIEPPDTGLYYDEYLKQVIDVLE	
<i>Rata</i>	VPIDVDKTKVHNVDPVESARIEPPDTGLYYDEYLKQVIEVLE	
<i>Ratón</i>	VPIDVDKTKVHNTEPVENARIEPPDTGLYYDEYLKQVIEVLEE	
	43	82
<i>Humano</i>	-TDKHFREKLOKADIEEIKSGRLSKELDLVSHHVRTKLDEL	
<i>Rata</i>	-TDRHFREKLOKADIEEIRSGRLSQELDLVSHKVRTRLDEL	
<i>Ratón</i>	-TDRHFREKLOKADIEEIRSGRLSQELDLVSHKVRTRLDEL	

Figura 16: Secuencia aminoacídica de nesfatina-1 en humano, rata y ratón.⁴²³

Asimismo, Oh-I y col. (2006)³⁶³ demostraron que la inyección de una forma intermediaria (residuos 1–223), con el sitio de corte para nesfatina-1 K83-R84, tiene el mismo efecto que la nesfatina-1 sobre la reducción de la ingesta, pero si se inyecta la misma forma intermedia con los sitios de corte para nesfatina-1 mutados con alanina (A83-A84) se pierde este efecto, lo que sugiere que para que NUCB2 pueda ejercer su efecto anorexigénico debe de ser procesada proteolíticamente para dar lugar a nesfatina-1.³⁶³

Función anorexigénica de nesfatina-1 a nivel cerebral.

Para descartar que el efecto de nesfatina-1 en la reducción de la ingesta y del peso corporal estuviera relacionado con la ruta de señalización de otras hormonas directamente implicadas en la inducción de anorexia, como la leptina o la MSH- α , Oh-I y col. (2006)³⁶³ estudiaron el efecto de nesfatina-1 en ratas Zucker, cuya característica principal es una mutación en el receptor de leptina que las hace ser obesas y diabéticas,⁴²⁴ y observaron de nuevo una reducción significativa de la ingesta que indicaba un posible mecanismo de acción de la nesfatina-1 a nivel hipotalámico independiente de la señalización de la leptina.³⁶³ Por otro lado, la inyección intracerebral de MSH- α estimulaba la expresión génica de NUCB2 en el PVN, y la inyección previa de SHU9119 (antagonista específico de los receptores MC3R/MC4R)⁴²⁵ abolía los efectos de nesfatina-1 sobre la inducción de la saciedad,³⁶³ sin embargo, la inyección de nesfatina-1 no afectaba a la expresión génica de POMC, AgRP, NPY o CRH en los núcleos ARC y PVN.³⁶³ Como los receptores de melanocortinas se distribuyen ampliamente en distintas regiones cerebrales involucradas en el control de la ingesta,^{89,426} Oh-I y col. (2006)³⁶³ sugieren que los mecanismos de inducción de anorexia de nesfatina-1 podrían estar regulados a través de otras sustancias neuronales

de forma independiente de la leptina, pero reguladas a través de la señalización de los MC3R/MC4R.³⁶³

Tras el trabajo de Oh-I y col. (2006),³⁶³ distintos grupos han demostrado que la nesfatina-1 se expresa en los principales centros hipotalámicos del control de la homeostasis energética,²⁶³⁻²⁶⁶ coexpresándose con péptidos directamente implicados en el control de la ingesta como POMC,⁴³¹ CART,^{427,432} MHC,^{427,433} MSH- α ,^{427,434} CRH^{427,435}, TRH,^{427,435} NPY,⁴³¹ oxitocina^{427,429,430} o vasopresina.^{427,429,430}

En el año 2007, dos grupos independientes demostraron que la nesfatina-1 podía cruzar la barrera hematoencefálica en ambos sentidos sin saturación,^{436,437} sugiriendo la posibilidad de que tanto la nesfatina-1 producida de forma endógena como la administrada periféricamente podrían ejercer sus acciones a nivel cerebral, y lanzando la posibilidad de la producción de nesfatina-1 por tejidos periféricos.³⁹³

Basándose en las observaciones anteriores, Shimizu y col. (2009)³⁹³ plantean un mecanismo de acción de nesfatina-1 a nivel hipotalámico de inducción de anorexia independiente de la leptina, pero dependiente del sistema de las melanocortinas.³⁹³ De esta forma, postulan que nesfatina-1 estaría ejerciendo su efecto anorexigénico al actuar a través de los receptores de melanocortina,^{410,431} y estimulando también las neuronas productoras de oxitocina⁴³⁸ y vasopresina,^{430,435} ambas relacionadas con el control de la ingesta⁴³⁹⁻⁴⁴¹ (Fig. 17).

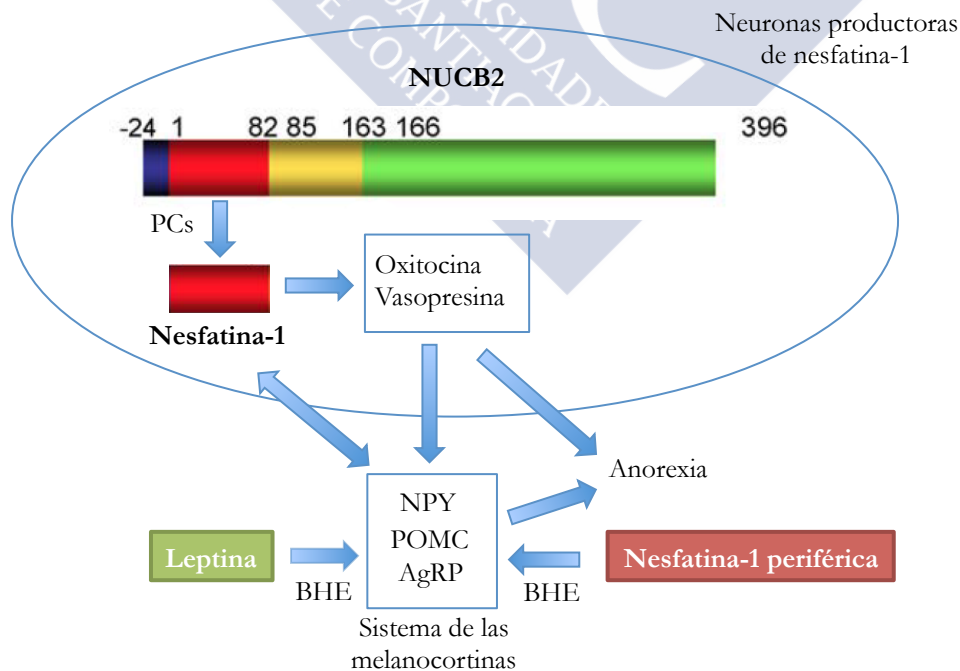


Figura 17: Posible mecanismo de inducción de anorexia por nesfatina-1 a nivel cerebral. BHE: barrera hematoencefálica.³⁹³

Siguiendo la pista de un posible mecanismo de actuación de la nesfatina-1 a través del sistema de las melanocortinas, Maeijima y col. (2009)⁴³⁸ demuestran que por un lado la administración central de nesfatina-1 estimula la activación de las neuronas productoras de oxitocina, y que por otro, la ingesta activa las neuronas productoras de nesfatina-1 en el PVN, de forma que estas últimas estimulan a su vez a las neuronas productoras de oxitocina. Este proceso desencadena la activación del sistema de señalización a través de oxitocina, que actúa estimulando las neuronas productoras de POMC para inducir anorexia de forma independiente a la señalización de la leptina, y cuyo efecto se bloquea por el antagonista de los receptores MC3R/MC4R (SHU9199), identificando a nesfatina-1 como un regulador *upstream* del sistema de las melanocortinas a través de la señalización de la oxitocina.⁴³⁸ También observaron que los efectos de la administración central de nesfatina-1 sobre la estimulación de las neuronas productoras de oxitocina se bloqueaban por un antagonista del receptor de oxitocina (H4928),⁴⁴² sugiriendo que la presencia de estos receptores son necesarios para la señalización de nesfatina-1,⁴³⁸ lo cual se corrobora posteriormente con el trabajo realizado por Yosten y col. (2010).⁴¹⁸

Identificación del dominio funcional de nesfatina-1.

Shimizu y col. (2009)⁴³¹ estudiaron los efectos de nesfatina-1 tras su administración a nivel periférico en ratones, observando que tanto la nesfatina-1 procedente de rata como la de humano producían una reducción significativa de la ingesta, con una concentración máxima inhibitoria del 50% (IC₅₀) similar a la de la MSH- α o la leptina.⁴³¹ A su vez, se plantearon averiguar cuál era el dominio funcional de nesfatina-1 y, basándose en su estructura secundaria, la dividieron en tres segmentos: un segmento N-terminal de 23 aminoácidos (residuos 1–23), un segmento intermedio de 30 aminoácidos (residuos 24–53) y un segmento C-terminal de 29 aminoácidos (residuos 54–82)⁴³¹ (Fig. 18), aunque todavía no existen evidencias de que este procesamiento se pueda realizar *in vivo*.⁴⁴³ Observaron que solo la inyección periférica del segmento intermedio (M30) inducía anorexia, con un IC₅₀ similar al de la forma completa tanto en ratones normales como en ratones obesos con resistencia a la leptina (ob/ob, db/db y ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa); y que a su vez este segmento estimulaba la expresión de los péptidos anorexigénicos POMC y CART a nivel hipotalámico.⁴³¹ Dado que la secuencia aminoacídica del segmento M30 es idéntica entre rata y ratón y solo difiere en dos aminoácidos con respecto a la humana, también observaron que la inyección periférica del segmento M30 de humano produce un descenso significativo de la ingesta en ratas.⁴³¹

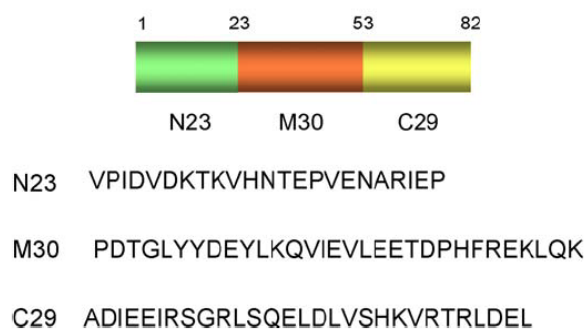


Figura 18: Secuencia aminoacídica de nesfatina-1 dividida en un fragmento N-terminal, un fragmento intermedio, y un fragmento C-terminal.³⁹³

Para identificar los lugares esenciales de acción del segmento M30, Shimizu y col. (2009)⁴³¹ realizaron una búsqueda de secuencias aminoacídicas homólogas entre la nesfatina-1 humana y otras moléculas implicadas en la regulación del apetito, encontrando que en la región C-terminal de este segmento existe una secuencia (HFR) que era idéntica a la de MSH- α , caracterizada por tener un motivo de unión a los receptores MC3R y MC4R. Además, la región central del segmento M30 contenía la secuencia aminoacídica LKQVIDV, que presenta un 85.7% de similitud con otra presente en el AgRP, responsable del efecto de este péptido en el incremento del gasto energético, y que es indispensable para la función anorexigénica de nesfatina-1.⁴³¹

6.4.-Distribución y lugares de producción de nesfatina-1 en murinos y humanos.

La identificación de la distribución de nesfatina-1 en los distintos tejidos, tipos celulares y fluidos corporales se ha realizado en la mayoría de los estudios por medio de anticuerpos específicos (western blot, inmunohistoquímica o ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA)), por lo cual se debe siempre de considerar que el anticuerpo para nesfatina-1 también reconoce a NUCB2.⁴⁴⁴ Tsuchiya y col. (2010)⁴⁴⁵ demostraron con un kit desarrollado por su grupo, que un ELISA de tipo sándwich con anticuerpos específicos para los extremos amino y carboxi-terminal de nesfatina-1 no reconoce ni NUCB2 ni las formas nesfatina-2 y 3, siendo el único sistema específico para la detección de nesfatina-1,⁴⁴⁵ junto con la identificación por western blot de la banda de nesfatina-1 correspondiente a 9.5 kDa.

Utilizando la técnica de inmunohistoquímica, se ha visto que NUCB2/nesfatina-1 se expresa ampliamente a nivel proteico en el cerebro de rata, fundamentalmente en el tronco encefálico y en el hipotálamo, y en concreto, en el citoplasma de neuronas de la corteza insular (INS),⁴⁴⁶ del PVN,³⁶³ del ARC,³⁶³ del SON,³⁶³ del LHA,³⁶³ de la amígdala

central (CEA),⁴⁴⁶ del área hipotalámica tuberal,⁴³³ del núcleo hipotalámico dorsomedial,⁴²⁸ del núcleo Edinger–Westphal (EW),⁴²⁷ de los núcleos del rafe,⁴³⁰ de la médula ventrolateral (VLM),⁴⁴⁶ del locus cerúleo (LC),⁴⁴⁷ del DMV,⁴³⁰ del NTS,⁴²⁷ del núcleo ambíguo^{411,447} y de neuronas preganglionares simpáticas y parasimpáticas de la columna vertebral,⁴²⁷ así como también en la médula espinal lumbar,⁴⁴⁶ con una distribución muy parecida en el cerebro de ratón.⁴⁴⁸

Además, se ha visto también mediante inmunohistoquímica que la nesfatina-1 se colocaliza en el cerebro de rata con numerosos neuropéptidos implicados no solo en el control de la ingesta sino también en otros procesos biológicos, como por ejemplo POMC,⁴³¹ CART,^{427,432} MHC,^{427,433} MSH- α ,^{427,434} CRH,^{427,435} TRH,^{427,435} NPY,⁴³¹ oxitocina,^{427,429,430,435} vasopresina,^{427,429,430,435} urocortina-1,⁴⁴⁹ somatocrina (GHRH),⁴²⁷ histamina neuronal,⁴⁵⁰ somatostatina⁴²⁷ o la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR).⁴³⁴

Aunque existe numerosa bibliografía sobre la expresión proteica de NUCB2/nesfatina-1 a nivel cerebral en rata, se ha detectado la proteína también en otros órganos de esta especie,⁴⁴⁸ como el esófago,³⁹⁵ el hígado³⁹⁵ y el intestino delgado,³⁹⁵ aunque a niveles más bajos. Otros estudios han identificado la producción de nesfatina-1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en el tejido adiposo en rata^{363,401,413} y humano,³⁵¹ y en diversos tejidos del aparato digestivo, como en los islotes pancreáticos en rata^{395–398,451} y humano,³⁹⁶ en el duodeno⁴⁵¹ de rata y en las células endocrinas de la mucosa estomacal (cuya expresión es 10 veces superior a la expresión en el hipotálamo)^{395,398,451} de rata, así como también se ha encontrado en los testículos en rata,^{398,399} ratón³⁴⁹ y humano,³⁴⁹ en el cartílago articular en humano,^{452,453} y en la glándula pituitaria,³⁹⁸ los pulmones⁴⁰² y el corazón^{398,402} en rata.

En particular, en las células endocrinas estomacales, la nesfatina-1 se coexpresa a nivel proteico de forma clara con la grelina, aunque se localizan en distintas vesículas de secreción,³⁹⁸ y en menor proporción con la somatostatina.³⁹⁸ En las células β -pancreáticas se colocaliza de forma abundante con la proinsulina y la insulina, sugiriendo un papel local de la nesfatina-1 implicado en el funcionamiento del páncreas endocrino.^{397,454}

También se ha observado la presencia de la proteína NUCB2/nesfatina-1 en líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo en rata,³⁶³ el plasma en rata^{455,456} y humano,^{457,458} o el líquido sinovial,⁴⁵² la saliva⁴⁵⁹ y la leche materna⁴⁶⁰ en humano, confirmando que se trata de una proteína de secreción que podría ejercer sus efectos a nivel autocrino/paracrino en el propio órgano de producción, aparte de poder ser transportada por el torrente sanguíneo para actuar de forma endocrina a nivel sistémico.⁴³¹

Es importante destacar que la forma madura de 82 aminoácidos correspondiente a la nesfatina-1 procesada por las prohormonas convertidas solo se ha descrito en el líquido cefalorraquídeo³⁶³ y en el corazón de rata⁴⁰² por western blot, y en plasma humano utilizando el kit de ELISA específico para nesfatina-1 desarrollado por Tsuchiya y col. (2010).⁴⁴⁵ En el resto de los estudios, y debido a la metodología utilizada, no es posible distinguir la detección de la proteína completa NUCB2 de la forma procesada nesfatina-1.⁴⁴⁴ Además, se ha sugerido que el procesamiento de NUCB2 no tiene por qué ocurrir necesariamente en su lugar de producción, pudiendo ser procesada en los distintos tejidos diana.⁴⁴⁴

Algunos investigadores como Oh-I y col. (2006),³⁶³ consideran que la nesfatina-1 actúa como una molécula integrante del eje adiposo-cerebral, y tras confirmarse la producción de NUCB2/nesfatina-1 por órganos periféricos implicados en la señalización del eje gastrointestinal-cerebral, como son el estómago o el páncreas, se ha sugerido que la nesfatina-1 podría estar participando en un eje adiposo-gastrointestinal-cerebral que controlaría la ingesta y la homeostasis energética a nivel central.⁴⁶¹⁻⁴⁶³

Distribución de nesfatina-1 en otras especies.

Aunque la mayor parte de los estudios sobre la distribución y función de nesfatina-1 se han realizado en rata, ratón y humano, existen también estudios en otras especies animales.

Especies de la clase mamíferos:

En un estudio realizado en perros se ha demostrado, utilizando la técnica de inmunofluorescencia, la presencia de proteína de nesfatina-1 a lo largo del tracto gastrointestinal, concretamente en el estómago, el duodeno, el yeyuno y el colon descendente.⁴⁶⁴

En cerdos, se ha identificado la presencia de nesfatina-1 en neuronas de los principales núcleos hipotalámicos (PVN, VLM, DMV, ARC y SON),⁴¹⁹ en la grasa subcutánea y perirrenal,⁴²⁰ y en diversos tejidos del tracto gastrointestinal, como el estómago, el duodeno, el yeyuno, el íleon, el colon o el ciego.⁴⁶⁵

En vacas se ha descrito la presencia de nesfatina-1 en la leche, el suero de la leche y en plasma.⁴⁶⁶

Especies de la clase teleósteos:

En la carpa dorada (*Carassius auratus*) se ha visto una amplia distribución de nesfatina-1, identificándose su expresión a nivel de ARNm en el hígado, la glándula

pituitaria, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el telencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo, con menores niveles de expresión en el tejido adiposo, los ovarios, los ojos, los riñones y el intestino medio.⁴⁶⁷ Los niveles más bajos de expresión de ARNm de nesfatina-1 se encontraron en el músculo y en las branquias.⁴⁶⁷ A nivel de proteína, se ha observado por inmunofluorescencia la distribución de nesfatina-1 en la carpa dorada en el hipotálamo,^{400,467,468} en la pituitaria,⁴⁰⁰ en el ovario⁴⁰⁰ y en las microvellosidades intestinales,^{467,468} colocalizándose con la grelina en el hipotálamo y en el intestino,⁴⁶⁸ y con la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo.⁴⁰⁰

En Ya-fish (*Schizothorax prenanti*) se ha descrito la presencia de nesfatina-1 a nivel de ARNm en el cerebro, la pituitaria, los ojos, el corazón, las branquias, el intestino, el hepatopáncreas, el músculo, el riñón, la piel, el bazo, los testículos y los ovarios, con mayor expresión en el hipotálamo, el hepatopáncreas, los ovarios y el intestino.⁴²¹

En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se ha observado la presencia de nesfatina-1 en plasma,⁴⁶⁹ y en pez zebra (*Danio rerio*) en los ovarios.⁴⁰⁰

Especies de la clase anfibios:

En rana (*Microhyla ornata*) se ha visto una amplia distribución cerebral de nesfatina-1 a nivel proteico.⁴⁷⁰

La amplia distribución de nesfatina-1 y su presencia conservada en distintos tejidos, tanto de mamíferos como de otras clases, sugiere una función biológica de nesfatina-1 de gran relevancia.

6.5.-Mecanismos de señalización intracelular de la nesfatina-1 en distintos tejidos.

Hasta la fecha, los trabajos acerca del estudio del mecanismo de señalización intracelular de nesfatina-1 se han realizado en los principales tejidos implicados en la regulación de la homeostasis energética: el sistema nervioso central, el páncreas y el estómago.

Señalización en el sistema nervioso.

Hoy en día todavía no se conocen con exactitud los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por nesfatina-1, así como tampoco se conoce el posible receptor específico para nesfatina-1 a través del cual pueda ejercer sus funciones.⁴⁷¹ Brailoui y col. (2007),⁴³⁰ en un trabajo realizado en neuronas hipotalámicas de rata, sugieren un mecanismo de acción de nesfatina-1 a través de la interacción con un receptor acoplado a

proteínas G (todavía sin identificar), que daría lugar a la apertura de canales de calcio promoviendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, con el consecuente incremento en la cantidad de AMPc y la activación de la adenilato ciclasa/proteín kinasa A (PKA)⁴³⁰ (Fig. 19), implicada en procesos de exocitosis a nivel neuroendocrino.⁴⁷²

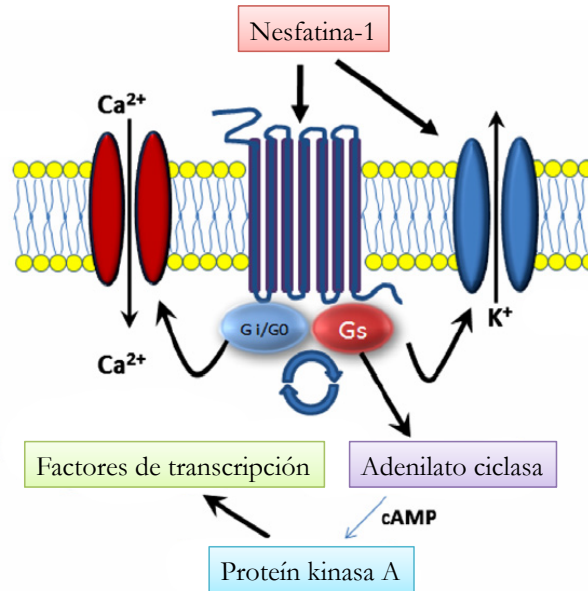


Figura 19: Representación de la hipotética interacción de nesfatina-1 con su posible receptor acoplado a proteínas G y sus efectos a nivel intracelular⁴⁴⁸.

Posteriormente, Ishida y col. (2012)⁴⁷³ demostraron en una línea celular de neuroblastoma de ratón (NB41A3) que tanto nesfatina-1 como el segmento M30 inducen la fosforilación y activación de la proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB, responsable de la inducción de la expresión génica derivada de la señalización de PKA) de un modo dependiente de los receptores MC3R/MC4R y de la secuencia homóloga a AgRP presente en el M30. Observaron también que este efecto era revertido tanto por un antagonista de los canales de calcio tipo L (nimodipina) como por un inhibidor de MAPK (PD98059) sugiriendo que el incremento de la concentración de calcio intracelular y/o la señalización de MAPK median la activación de pCREB.⁴⁷³ De este modo plantean un nuevo sistema de inducción de anorexia por nesfatina-1 a través de la señalización de pCREB.⁴⁷³

Por otro lado, Price y col. (2008)⁴⁷⁴ demostraron que la nesfatina-1 es capaz de afectar al potencial de membrana de una gran variedad de subpoblaciones neuronales en el hipotálamo de rata, produciendo tanto hiperpolarizaciones como despolarizaciones y mostrándose como un importante regulador de la función endocrina hipotalámica.⁴⁷⁴ Observaron que la nesfatina-1 produce la hiperpolarización de las neuronas productoras de NPY en el núcleo ARC mediante la activación de canales de potasio dependientes de ATP

(Fig. 19) induciendo su inhibición,⁴⁷⁵ un efecto que también fue demostrado por Mímee y col. (2012)⁴⁷⁶ en neuronas del NTS. Las neuronas productoras de NPY son uno de los principales sitios diana en el ARC a través de los cuales actúan muchas hormonas y factores indicadores del estado energético y del control de la ingesta, de forma que su inhibición promueve la anorexia inducida por el sistema de las melanocortinas.⁴⁷⁵ De este modo, el efecto de nesfatina-1 sobre la inhibición de las neuronas NPY es consistente con los trabajos descritos anteriormente donde se sugiere una señalización de nesfatina-1 dependiente del sistema de las melanocortinas.^{363,418,431,438}

Se ha visto también que la nesfatina-1 es capaz de inducir la estimulación y el incremento de la concentración de calcio intracelular en neuronas del ganglio nodoso del nervio vago⁴⁷⁷ (implicado en la señalización hacia el NTS de señales aferentes del nervio vago procedentes del corazón, los pulmones, la laringe, la faringe o el aparato digestivo⁴⁷⁸), el cual está también implicado en el control de la ingesta⁶⁹ y es estimulado por la CCK para inducir anorexia,^{479,480} y sugiriendo así una señalización a nivel cerebral por parte de la nesfatina-1 en respuesta a señales periféricas a través de la interacción con las fibras aferentes del nervio vago.⁴⁷⁷

En otro estudio realizado por Chen y col. (2012),⁴⁸¹ se demostró que la nesfatina-1 inyectada a nivel central en ratas altera los potenciales de acción de membrana de las neuronas sensoras de glucosa en el PVN, el LHA y el núcleo ventromedial (VMN), induciendo la excitación de las neuronas sensoras de glucosa GI (inhibidas por la glucosa del espacio extracelular) y la inhibición de las GE (excitadas por glucosa), sugiriendo que la nesfatina-1 podría ejercer sus efectos sobre el control de la ingesta mediante la regulación de la excitabilidad de las neuronas sensoras de glucosa.⁴⁸¹ Posteriormente, Bonnet y col. (2013),⁴⁸² demostraron que la red de neuronas productoras de nesfatina-1 participan en la regulación de la respuesta ante hipoglucemia en los núcleos cerebrales implicados en la señalización del nervio vago, entre los que se incluyen el ARC, el PVN, el LHA, el NTS y el núcleo dorsal motor del vago (DMV), esenciales para la función digestiva,⁴⁸³ al activarse tras la inyección periférica de insulina o ante una situación de glucopenia a nivel intracelular.⁴⁸² Además, las neuronas productoras de nesfatina del DMV se activaban tras la señalización de hipoglucemia a nivel estomacal o pancreático, sugiriendo así que la subpoblación de neuronas nesfatinérgicas pertenecen a la red central de neuronas activadas por hipoglucemia, y que además participa en el inicio de la respuesta fisiológica y hormonal observada en este mecanismo regulatorio.⁴⁸²

Finalmente, Li y col. (2013)⁴⁸⁴ demostraron que la nesfatina-1 presenta un efecto inhibitorio directo sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (área cerebral

encargada principalmente de los procesos de aprendizaje), mediante la hiperpolarización de su membrana plasmática, al igual que ocurría con la inhibición de las neuronas productoras de NPY en el ARC en el trabajo realizado por Price y col. (2008).⁴⁷⁵

Señalización en el páncreas.

Diversos estudios sugieren un papel activo de nesfatina-1 en la regulación de la secreción por parte del páncreas de insulina y glucagón,^{454,485-487} hormonas clave en la regulación del metabolismo energético.^{78,103} Por un lado, González y col. (2011),⁴⁵⁴ y por otro Unniappan y col. (2011),⁴⁸⁶ demostraron que la nesfatina-1 es capaz de incrementar la liberación de insulina estimulada por glucosa tanto en islotes pancreáticos de ratón como en la línea celular MIN6 (línea celular de células β -pancreáticas de ratón), así como los niveles de ARNm de la preproinsulina, sugiriendo un posible papel de nesfatina-1 como hormona insulínica capaz de influenciar la síntesis de insulina.^{454,486} Riva y col. (2011)⁴⁸⁷ demostraron también que la nesfatina-1 es capaz de incrementar no solo la liberación de insulina sino también del glucagón por islotes pancreáticos de ratón.⁴⁸⁷

En las células secretoras, los niveles de calcio intracelular y de AMPc son una señal importante de regulación de la producción de neurotransmisores, hormonas y factores de secreción a través de la señalización de PKA.⁴⁷² En esta línea, Nakata y col. (2011)⁴⁸⁵ demostraron que la inducción de la secreción de insulina por la nesfatina-1 se producía mediante un incremento de la concentración de calcio intracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (de larga duración), mecanismo previamente descrito para la liberación de otros péptidos como el proglucagón (GLP-1) y el polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP).⁴⁸⁸⁻⁴⁹⁰ En cambio, aunque el mecanismo de secreción de la insulina por el páncreas está ligado al incremento de las concentraciones de AMPc y la actividad de la PKA,⁴⁹¹ Nakata y col. (2011)⁴⁸⁵ observaron que el incremento en la concentración de calcio intracelular inducido por nesfatina-1 era independiente de la activación PKA, o incluso de fosfolipasa A2 (PLA2), sugerida como segundo mensajero en la secreción de insulina,⁴⁹² apuntando hacia la existencia de mecanismos alternativos mediante los cuales nesfatina-1 estimula la liberación de insulina.⁴⁸⁵

Señalización en el estómago.

Szlachcic y col. (2013)⁴⁹³ han sugerido que la nesfatina-1 participa en la protección frente al daño gástrico causado por estrés que produce erosiones hemorrágicas y microsangrados en ratas y humanos.⁴⁹⁴ Postulan que la administración de nesfatina-1, tanto

a nivel periférico como central, induce un mecanismo de protección en ratas a través del incremento de la síntesis de NO y prostaglandinas a nivel estomacal, moléculas con actividad vasodilatadora y protectora frente al daño gástrico.⁴⁹³ A su vez, el incremento de la síntesis de prostaglandinas induce la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, actúa como un potente vasodilatador) por neuronas aferentes estomacales, y que es el neurotransmisor predominante de los nervios aferentes en el estómago de rata,^{495,496} actuando como agonista del receptor potencial transitorio V1 (TRPV1) del nervio vago.⁴⁹³ La inactivación de TRPV1 con capsacepina (antagonista competitivo del receptor TRPV1 que bloquea el voltaje activado por la entrada de calcio⁴⁹⁷) suprime el efecto protector de nesfatina-1, sugiriendo que la activación de TRPV1 podría ser bien de forma directa a través de la unión de nesfatina-1 al receptor, o bien de forma indirecta a través de la liberación de CGRP inducida por nesfatina-1,⁴⁹³ indicando la posible participación de las fibras nerviosas aferentes del nervio vago en la señalización periférica de nesfatina-1 hacia el cerebro.⁴⁹³

6.6.-Regulación de la expresión de nesfatina-1 en los distintos tejidos.

Hasta el momento, numerosos estudios se han centrado en el estudio de la regulación de la expresión de nesfatina-1 en los distintos tejidos, tanto a nivel de ARNm como de proteína, y se ha demostrado que los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 se ven afectados por distintas condiciones metabólicas en los distintos tejidos, siendo los más estudiados el cerebro, el páncreas y el estómago.

Regulación en cerebro.

Los niveles de expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 en el PVN disminuyen significativamente tras 24 horas de ayuno en ratas, resultando en la disminución de los niveles proteicos de nesfatina-1.³⁶³ En el SON se observa el mismo efecto en la reducción de los niveles de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 tras el ayuno, los cuales se recuperan tras la ingesta,⁴³⁵ sugiriendo un posible papel de dichas neuronas en el mecanismo de saciedad inducido por nesfatina-1.⁴¹² Se ha sugerido también un incremento en la expresión del ARNm de NUCB2/nesfatina-1 en el hipotálamo debido a la acción de compuestos anorexigénicos como la m-clorofenilpiperazina (agonista del receptor de serotonina 1B/2C (5-HT_{1B/2C}))⁴⁹⁸ o la MSH- α .³⁶³ A su vez, la CCK inyectada de forma periférica activa las neuronas productoras de nesfatina-1 en el PVN y el NTS en ratas,^{412,499} apuntando hacia un posible papel a nivel central de la nesfatina-1 en la mediación de la señalización de péptidos

producidos por el aparato digestivo implicados en los procesos de la regulación de la ingesta.⁵⁰⁰

Por otro lado, Bonnet y col. (2013)⁴⁸³ han demostrado que las neuronas productoras de NUCB2/nesfatina-1 en el NTS se activan tras la inducción de la distensión estomacal en ratas, sugiriendo que este mecanismo podría contribuir a la señalización de la saciedad producida por la nesfatina-1.⁴⁸³

Regulación en páncreas.

A nivel pancreático, González y col. (2011)⁴⁵⁴ han demostrado la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por células β -pancreáticas de ratón MIN6 y que en presencia de niveles altos de glucosa (16.7 mM) sus niveles de secreción se ven incrementados, un resultado también observado por Foo y col. (2010)³⁹⁶ en otro estudio realizado en células β -pancreáticas de rata y humano. Todo ello sugiere que la nesfatina-1 podría actuar como un factor de respuesta ante la ingesta a nivel pancreático regulando la síntesis y secreción de insulina.⁴⁵⁴ Foo y col. (2010)³⁹⁶ observan que el ayuno y la inyección periférica de glucosa en rata disminuyen e incrementan respectivamente los niveles de NUCB2/nesfatina-1 en sangre, apoyando la teoría de que la nesfatina-1 se puede comportar como una hormona de respuesta ante la ingesta.⁴⁵⁴ Goebel y col. (2009)⁴⁴⁶ observan el mismo efecto del ayuno en rata sobre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1, pero además observan que la ingesta restaura los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 a sus valores normales, sugiriendo de nuevo que los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 se regulan por el estado nutricional y la respuesta al ayuno.⁴⁵⁴

Regulación en estómago.

En estómago, Stengel y col. (2009)³⁹⁸ han visto que los niveles de expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 en las células endocrinas se reducen tras 24 horas de ayuno en rata, las cuales además presentaban menores niveles de nesfatina-1 en plasma, sugiriendo que la producción por tejidos periféricos de nesfatina-1 podría influir en las concentraciones plasmáticas de esta hormona.⁴⁵⁴

Finalmente, Li y col. (2012)⁵⁰¹ sugieren un mecanismo de regulación a nivel estomacal de los niveles ARNm y proteína de NUCB2/nesfatina-1 a través de la ruta de señalización de mTOR, que se ve alterado por cambios en el estado energético como el ayuno o la obesidad. La señalización de mTOR afecta a la expresión y secreción de la grelina, de forma que la activación de la ruta de señalización de mTOR inhibe la expresión

de la grelina, favoreciendo la anorexia.⁵⁰² En el estudio de Li y col. (2012),⁵⁰¹ realizado en ratones, observaron que la principal molécula implicada en la señalización de mTOR, pS6K (proteín kinasa ribosomal S6), se colocaliza en las células endocrinas gástricas con NUCB2/nesfatina-1 y que, por un lado, la activación de esta ruta incrementa los niveles de NUCB2/nesfatina-1, mientras que por otro, su inhibición induce un descenso de los niveles de expresión gástricos de NUCB2/nesfatina-1, sugiriendo que la actividad de mTOR media la producción gástrica de NUCB2/nesfatina-1.⁵⁰¹

6.7.-Nesfatina-1 y la homeostasis de la glucosa: posible papel de la nesfatina-1 en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes.

Numerosos estudios sugieren que la nesfatina-1 podría tener un papel regulador de la ingesta y del peso corporal, así como de la homeostasis energética, por lo que cada vez son más los investigadores interesados en el estudio del papel de la nesfatina-1 en la fisiopatología de la obesidad y la diabetes. Sin embargo, existen resultados contradictorios en cuanto a los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 a nivel plasmático en estas patologías. Estas discrepancias podrían deberse a la variabilidad entre los distintos estudios en cuanto a diferencias de género, las metodologías utilizadas, el rango del peso corporal estudiado, la edad o incluso diferencias individuales entre los sujetos de estudio.^{457,503}

Efectos pancreáticos de nesfatina-1 sobre la síntesis de insulina.

Aunque en la actualidad no se conocen con exactitud cuales son los mecanismos implicados en la regulación de la producción de insulina y glucagón en células endocrinas pancreáticas por parte de nesfatina-1, su alta expresión pancreática y su clara colocalización con la insulina sugieren un posible papel de esta hormona sobre la funcionalidad del páncreas endocrino, así como una posible implicación en la homeostasis de la glucosa a nivel sistémico,^{454,485,486} posiblemente como un nuevo coadyuvante de la insulina.⁵⁰⁴

En ratas Goto-Kakizaki con diabetes tipo II, Foo y col. (2010)³⁹⁶ observaron que los niveles de nesfatina-1 en los islotes pancreáticos eran menores que en ratas Wistar, y los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 en las ratas diabéticas mostraban una correlación negativa con los niveles circulantes de glucosa tras el test de tolerancia a la glucosa. En esta línea, González y col. (2011)⁴⁵⁴ observaron que la tanto la expresión génica de NUCB2 como la colocalización de nesfatina-1 con la insulina en las células β -pancreáticas se encontraban también significativamente disminuidos en la diabetes tipo I.

Efectos a nivel cerebral de nesfatina-1 sobre la homeostasis de la glucosa.

A nivel cerebral, se ha visto que nesfatina-1 induce la excitabilidad de las neuronas sensibles a glucosa en rata, y que además las neuronas productoras de nesfatina-1 se activan ante situaciones de hipoglucemia.^{481,482,505,506}

Recientemente, Wu y col. (2014)⁵⁰⁷ han utilizado un modelo de pérdida de función de la señalización de NUCB2/nesfatina-1 en hipotálamo de rata para demostrar que dicha inhibición incrementa de forma marcada la ingesta y el flujo de glucosa hepático, mientras que disminuye la captación de glucosa en tejidos periféricos. El cambio en el flujo de glucosa hepático está acompañado por un incremento en los niveles de glucosa-6-fosfatasa (G6PT) y fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK), y por una disminución en la fosforilación de INSR, el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) y de AKT.⁵⁰⁷ De esta forma, la inhibición de la señalización intracelular inducida por nesfatina-1 a nivel hipotalámico estimula la gluconeogénesis a nivel hepático, lo que además se correlaciona con la inhibición de la ruta de señalización de mTOR.⁵⁰⁷

Efectos de nesfatina-1 sobre la glucemia en plasma.

Su y col. (2010),⁵⁰⁴ en un estudio realizado en ratones db/db hiperglucémicos, observaron que la administración intravenosa de nesfatina-1 reduce los niveles de glucosa en sangre mediante un mecanismo dependiente de la señalización de la insulina, siendo mayor su efecto antihiperglucémico cuando se administra en conjunto con la insulina.⁵⁰⁴ Aunque los efectos sobre la reducción de la ingesta de nesfatina-1 ocurren a nivel central, en este estudio se demostró que los efectos antihiperglucémicos de nesfatina-1 se producían solo tras su inyección a nivel periférico, de forma que la inyección intracerebroventricular de nesfatina-1 en estos ratones reducía la ingesta pero no la glucemia.⁵⁰⁴ Por otro lado, Li y col. (2013)⁵⁰⁸ demostraron que la inyección periférica de nesfatina-1 en ratones alimentados tanto con dieta alta en grasa como con una dieta normal, mejora la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina mediante la fosforilación y activación de AKT y la movilización de los transportadores de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática en músculo, tejido adiposo e hígado.⁵⁰⁸

En cuanto a los efectos de nesfatina-1 sobre la homeostasis de la glucosa en humanos se ha visto, por un lado, que en individuos de origen asiático sanos (13 varones y 7 mujeres) la administración oral de una solución de glucosa incrementa los niveles sanguíneos de nesfatina-1,⁴⁵⁷ y por otro que en pacientes con anorexia nerviosa (7 mujeres)

los niveles plasmáticos de nesfatina-1 son menores con respecto al grupo control (8 mujeres),⁵⁰⁹ lo que sugiere que en humanos también existe una regulación de los niveles de nesfatina-1 circulante en función del estado nutricional y el ayuno.⁴⁵⁴

Nesfatina-1 en la obesidad.

Recientemente se ha sugerido una posible asociación entre los niveles de nesfatina-1 en plasma y condiciones patológicas como la obesidad y la diabetes tipo II.^{445,457,510-515} Diversos grupos han investigado la posible asociación entre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y el peso corporal.⁴⁴³ Los primeros estudios realizados en este sentido sugerían la existencia de una correlación negativa entre la nesfatina-1 y el IMC, aunque no incluían individuos con obesidad.^{445,459}

Basar y col. (2012)⁵¹⁶ observaron en pacientes europeos con hígado graso no alcohólico menores niveles séricos de NUCB2/nesfatina-1 con respecto a pacientes control, sin encontrar diferencias entre sexos. Considerando todos los pacientes en conjunto (40 controles y 30 afectados por hígado graso no alcohólico) observaron también una correlación negativa entre los niveles séricos de NUCB2/nesfatina-1 y el IMC.⁵¹⁶ Además, en los pacientes con obesidad (IMC >30 kg/m², 29 individuos) los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 eran menores con respecto al grupo de no obesos (IMC <30 kg/m² 41 individuos),⁵¹⁶ sugiriendo que la disminución de los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 en la obesidad podría deberse al déficit de prohormona convertasas demostrado en este estado.^{517,518} En esta línea, Abaci y col. (2013)⁵¹² observaron menores niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina en niños obesos, también europeos, (IMC >percentil 95, 17 niños y 20 niñas) con respecto a los no obesos (IMC <percentil 85, 10 niños y 11 niñas), los cuales se correlacionan negativamente con el valor de la desviación típica del IMC (utilizado para medir el IMC en niños) en este grupo.

Tan y col. (2011)⁵¹⁴ observaron también una correlación negativa entre el ratio fluido cerebroespinal/plasma de NUCB2/nesfatina-1 con el IMC en un estudio realizado en 18 varones y 20 mujeres de origen europeo (Alemania) de los cuales 14 individuos tenían normopeso, 14 sobrepeso y 10 obesidad. Ogiso y col. (2011)⁵⁰⁹ observaron de nuevo una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y el IMC en pacientes japonesas con anorexia nerviosa (7 mujeres, IMC=13.02±0.3) con respecto a controles (8 mujeres, IMC=21.57±0.48), con niveles plasmáticos menores en la anorexia nerviosa, indicando que los niveles de nesfatina-1 circulante podrían responder ante cambios sustanciales en la masa del tejido adiposo, disminuyendo así su producción en

pacientes con anorexia.⁴⁴³ Finalmente, Ozkan y col. (2013)⁵¹⁹ han observado en un grupo de pacientes (Turquía) con normopeso (28 individuos), sobrepeso (31 individuos) y obesidad (60 individuos) que los pacientes obesos presentan menores niveles plasmáticos de esta hormona con respecto a los otros grupos.

Por el contrario, Shaldanha y col (2012)⁵²⁰ han descrito una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y el porcentaje de grasa corporal en un grupo de pacientes formado por 15 varones y 10 mujeres sometidos a hemodiálisis, y 10 varones y 5 mujeres sanas (Brasil), de los cuales el 92% presentaba valores de porcentaje de grasa corporal superiores a los normales. Ramanjaneya y col. (2010)⁴⁰¹ encontraron también una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y el IMC en una muestra de 9 varones y 11 mujeres (Reino Unido) con IMC comprendidos entre 21.39-38.10 kg/m², y observaron asimismo que los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 eran mayores en ratones con obesidad inducida por la dieta. Anwar y col. (2013)⁵²¹ han visto en niños y adolescentes obesos (Egipto) con una media de edad de 9.18±2.84 años (22 niños y 18 niñas, IMC=30.45±5.93) que presentan mayores niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 con respecto a los controles (24 niños y 16 niñas sanas, IMC=16.82±3.17), observando además una correlación positiva de los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 con el score de la desviación típica del IMC (al contrario que Abaci y col. (2013)⁵¹²), los niveles de glucosa e insulina en sangre, la presión sanguínea y el colesterol en los individuos obesos. Finalmente, Liu y col. (2014)⁵²² han descrito recientemente una correlación negativa de los niveles plasmáticos de nesfatina-1 con el IMC en pacientes de origen asiático (30 con diabetes tipo II, 25 con disminución de la tolerancia a la glucosa y 30 controles sanos).

Además, se ha sugerido también la asociación de distintos polimorfismos del gen de la nesfatina-1 (NUCB2) con la predisposición a padecer obesidad en adultos.⁵²³ Así, Zegers y col. (2011)⁵²³ encontraron en una población de pacientes obesos (Bélgica) compuesta por 491 varones (IMC=38.6±0.3) y 558 mujeres (IMC=37.8±0.3) tres polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) asociados a la obesidad solo en varones (rs1330, rs214101 y rs757081), aunque en el estudio se sugirió la posible existencia de otros tres SNPs (rs10741725, rs2521999, rs214091) mediante la utilización del test multi-marcador para SNPs. Posteriormente en el 2012 Zegers y col.⁵¹¹ encontraron dos mutaciones en el gen de NUCB2 en dos niñas adolescentes con obesidad severa (Bélgica), correspondientes a la mutación contrasentido L125H y la mutación sinsentido K178X, aunque en este trabajo no han podido establecer conclusiones claras acerca del papel de esta hormona sobre la predisposición a padecer obesidad debido a las limitaciones del estudio.

Nesfatina-1 en la diabetes tipo II.

Li y col. (2010)⁴⁵⁷ observaron en un estudio realizado en 57 pacientes de origen asiático (China) (29 varones y 28 mujeres) con diabetes que los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 estaban disminuidos significativamente en aquellos pacientes con diabetes tipo II (47 individuos) con respecto a los que padecían diabetes tipo I (10 individuos) y a los no diabéticos (13 varones y 7 mujeres). Deniz y col. (2012)⁵¹⁰ encontraron también niveles menores de NUCB2/nesfatina-1 circulantes en mujeres europeas (Turquía) embarazadas con diabetes gestacional, que además se correlacionaban positivamente con los niveles de nesfatina-1 en la sangre del cordón umbilical del feto.

En el estudio ya mencionado de Basar y col. (2012)⁵¹⁶ realizado en pacientes europeos (Turquía) con hígado graso no alcohólico se observó una correlación negativa entre los niveles séricos de NUCB2/nesfatina-1 y los niveles de glucosa en sangre al considerar el conjunto de los pacientes (controles y afectados de hígado graso). Además, en los pacientes con resistencia a la insulina los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 eran menores con respecto al grupo de los sensibles a la insulina, al igual que ocurría con el IMC. Asimismo, en el estudio de Liu y col. (2014)⁵²² se observó que pacientes asiáticos con diabetes tipo II presentan menores niveles plasmáticos de nesfatina-1, y que al considerar el conjunto de pacientes del grupo de estudio (30 con diabetes tipo II, 25 con disminución de la tolerancia a la glucosa y 30 controles sanos) dichos niveles de nesfatina-1 se correlacionan negativamente con la HbA_{1c}.

Sin embargo, Zhang y col. (2012)⁵¹³ observaron en 220 pacientes de origen asiático (China) categorizados en 3 grupos (74 pacientes con diabetes tipo II, 73 pacientes con intolerancia a la glucosa y 73 controles sanos) que en la diabetes de tipo II de reciente diagnóstico los niveles plasmáticos de nesfatina-1 aparecen incrementados. Asimismo, Dong y col. (2013)⁵²⁴ observaron en un estudio realizado en ratas con diabetes tipo II inducida por dieta alta en grasa y pequeñas dosis de estreptozotocina, que las ratas diabéticas presentaban mayores niveles de NUCB2/nesfatina-1 en plasma mientras que la expresión de nesfatina-1 en el hipotálamo estaba disminuida con respecto al grupo control. La administración de nesfatina-1 durante 6 días en estas ratas producía una normalización en el peso y en los niveles de ácidos grasos en sangre (sugiriendo una mejora de la dislipemia previa), y una disminución de los niveles de glucosa y de resistencia a la insulina en sangre.⁵²⁴ Además, los niveles de fosforilación de AMPK y ACC en el músculo esquelético de las ratas diabéticas se incrementaba con la administración de nesfatina-1,

sugiriendo la participación de esta hormona en la oxidación de los ácidos grasos por parte del músculo.⁵²⁴

En resumen, los datos aportados por los estudios realizados hasta el momento muestran que existen resultados contradictorios en cuanto a los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 circulantes en condiciones patológicas de obesidad y/o diabetes tipo II.

6.8.-Nesfatina-1 como hormona pleiotrópica.

Los primeros trabajos dedicados a elucidar las funciones biológicas de nesfatina-1 se centraron principalmente en su papel anorexigénico a nivel hipotalámico.^{363,430,433,435} En este sentido, gracias a diferentes estudios pudimos conocer la implicación de nesfatina-1 no solo en la reducción de la ingesta,^{363,411,412} sino también en la reducción del consumo de agua^{417,418} y del peso corporal.^{363,445}

Pero el hipotálamo no solo está implicado en el control de la ingesta y la homeostasis energética, sino que también interviene en la regulación de numerosos procesos biológicos imprescindibles para la vida^{190,525-541} (Tabla 3).

<i>Regulación hipotalámica</i>	<i>Bibliografía</i>
Ritmos circadianos	525,526
Sistema nervioso autónomo	527,528
Sueño y vigilia	529,530
Comportamiento e interacción social	531,532
Ansiedad y miedo	533,534
Respuesta frente a situaciones de estrés	535,536
Ingesta de agua y diuresis	537,538
Termorregulación	539,540
Reproducción	190,541

Tabla 3: Clasificación de las principales funciones biológicas reguladas por el hipotálamo.

Nesfatina-1 presenta una amplia distribución a nivel cerebral en zonas que no solo están implicadas en la regulación del apetito, lo que sugiere que podría tener otras funciones biológicas aparte de su papel inicial como nueva adipokina anorexigénica.^{411,427,428,430,433,446,447}

A su vez, diversos estudios han mostrado la colocación a nivel cerebral de NUCB2/nesfatina-1 con diversos péptidos y neurotransmisores relacionados tanto con el control de la ingesta como con otros procesos biológicos, aparte de los vistos anteriormente, como la urocortina-1,⁴⁴⁹ la hormona concentradora de melanina (MCH),⁴³³

la vasopresina,⁴³⁵ la oxitocina,⁴³⁵ la somatocrina (GHRH),⁴²⁷ el factor liberador de corticotropina (CRF),⁴³⁵ la hormona liberadora de tirotrina (TRH),⁴³⁵ la histamina neuronal⁴⁵⁰ y la somatostatina,⁴²⁷ lo que apoyaría la existencia de posibles funciones pleiotrópicas de nesfatina-1 a nivel cerebral.⁵⁰³

Nesfatina-1 y función gástrica.

Diversos estudios muestran que la nesfatina-1 tiene una elevada expresión en el estómago,^{395,398,451} por lo que recientemente ha crecido el interés del estudio de los posibles efectos de nesfatina-1 sobre la función gástrica. De este modo, se ha visto que la administración intracerebral de nesfatina-1 en ratas inhibe la secreción de ácidos gástricos estimulada por señales nerviosas vagales,⁵⁴² reduce el vaciado gástrico⁴¹² y protege frente al daño gástrico inducido por estrés⁴⁹³ y por indometacina⁵⁴³ (antiinflamatorio no esteroideo), aunque en pacientes diabéticos se ha observado que la protección gástrica de nesfatina-1 se encuentra alterada en este tipo de pacientes.⁵⁴⁴ También se ha visto que la administración central de nesfatina-1 estimula la excitabilidad de las neuronas responsables de la distensión gástrica de respuesta a grelina en el núcleo ARC y reduce la motilidad gástrica en ratas, sugiriendo que la nesfatina-1 podría actuar como un factor inhibitorio en el ARC para regular la motilidad gástrica mediante el sistema de las melanocortinas.⁵⁴⁵ Por otro lado, se ha visto que la distensión gástrica activa las neuronas productoras de NUCB2 en el NTS, sugiriendo su posible participación en la función anorexigénica de nesfatina-1.⁴⁸³

Nesfatina-1 y termorregulación.

Como adipokina reguladora de la ingesta, nesfatina-1 forma parte del sistema de regulación de la homeostasis energética.⁴⁷¹ Dos de sus componentes principales son el balance nutricional y la termorregulación, de forma que ambos contribuyen al incremento y al gasto de energía respectivamente y son regulados a nivel hipotalámico por los péptidos del sistema de las melanocortinas,⁵⁴⁶ y otros como CRF,⁵⁴⁷ TRH,⁹² MCH,⁵⁴⁸ oxitocina⁵⁴⁹ y vasopresina.^{549,550} Todos estos péptidos se colocalizan con nesfatina-1 a nivel hipotalámico, y recientemente se ha demostrado que nesfatina-1, aparte de su efecto en la reducción de la ingesta, produce un incremento en la temperatura corporal, actuando a través de los receptores de melanocortina MC3R/MC4R.⁴¹⁰ De esta forma, nesfatina-1 tendría un papel activo en los procesos de termorregulación.⁴¹⁰

Nesfatina-1 y respuesta al estrés.

Muchos de los péptidos orexigénicos y anorexigénicos se ven implicados a nivel hipotalámico en rutas de señalización relacionadas con la respuesta al estrés vitales para la regulación de la homeostasis energética y la adaptación al medio ambiente.^{551,552}

Numerosos estudios relacionan alteraciones en la ingesta con la exposición a factores que causan estrés.^{553,554} Se ha demostrado que los estados de ayuno o saciedad,⁵⁵³ así como el tipo de dieta consumida (alta o baja en grasa), influyen en la respuesta del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, principal regulador de la respuesta al estrés.³⁵⁶ Como hemos dicho anteriormente, muchos de los péptidos relacionados con el control de la ingesta están regulando ambos procesos, y se ha visto que nesfatina-1 tiene también un papel importante en la respuesta al estrés.⁴⁴⁷ Las neuronas productoras de nesfatina-1 se activan frente a estímulos inflamatorios periféricos como el LPS,⁴²⁹ y se ha demostrado su papel protector a nivel gástrico frente al daño producido por estrés.⁴⁹³

Nesfatina-1 y ansiedad/miedo.

En diversos estudios con pacientes y animales, se ha visto una asociación clara de la señalización de nesfatina-1 con el incremento de la ansiedad y el miedo,^{493,555-558} y parece estar implicada en el desarrollo de enfermedades mentales como la depresión,⁵⁵⁹ la epilepsia,^{459,560} la anorexia nerviosa⁵⁰⁹ y episodios maníacos.⁵⁶¹

Nesfatina-1 y regulación del sueño.

Muchos de los desórdenes del sueño se ven asociados con episodios de depresión y anomalías en la fase REM (movimiento rápido de los ojos).⁵⁶² Durante el sueño, la zona lateral hipotalámica que expresa MCH está activa, y se ha sugerido la participación de MCH en la regulación del sueño.⁵⁶³ Nesfatina-1 y MCH colocalizan en el hipotálamo y ambas están relacionadas con el control de la ingesta y también con la depresión.^{556,559,564} Basándose en estos datos, dos grupos independientes demostraron la implicación de nesfatina-1 en la regulación del control del sueño en rata,^{562,565} de forma que la abolición de la fase REM disminuye los niveles de ARNm y proteína de NUCB2/nesfatina-1 en el núcleo hipotalámico dorsomedial (implicado en el control de la ingesta, depresión y procesos de alerta), mientras que la recuperación de la fase REM restaura sus niveles²⁷⁰. Además, nesfatina-1 parece estar implicada en la disminución del tiempo de duración de la fase REM.^{562,565}

Nesfatina-1 y función reproductora.

A lo largo de los años, numerosos estudios han demostrado que muchas de las rutas centrales y las señales periféricas responsables de la homeostasis energética participan también en el control de funciones biológicas influenciadas por el estado metabólico del organismo.⁵⁶⁶ El inicio de la pubertad y la fertilidad son procesos muy sensibles a la magnitud de las reservas energéticas corporales y se regulan por factores clave del control del apetito, como por ejemplo la leptina.⁵⁶⁶

En distintos estudios se ha sugerido que nesfatina-1 es necesaria para un desarrollo normal de la pubertad y para una adecuada función reproductiva,^{399,400,420,566-569} de forma que se ha visto que la nesfatina-1 estimula la liberación de oxitocina a nivel hipotalámico en rata, la cual es también un regulador positivo de la maduración en la pubertad femenina.⁵⁶⁷

En estudios realizados en ratas hembra, se sugiere la participación de nesfatina-1 en el control positivo del eje gonadotrópico en la pubertad, de forma que la inyección intracerebral aguda de nesfatina-1 induce una elevación pequeña pero detectable de los niveles circulantes de hormona luteinizante (LH) y hormona folículoestimulante (FSH) en ratas alimentadas *ad libitum*, mientras que en ratas en ayuno los niveles de estas gonadotropinas se ven incrementados de forma drástica.⁵⁶⁷ Por tanto, en condiciones metabólicas normales, la respuesta a la nesfatina-1 exógena es modesta, pero se agudiza tras el ayuno, fenómeno previamente descrito para otros factores secretagogos de gonadotropinas.⁵⁶⁷ Al contrario que en las hembras en pubertad, la administración exógena de nesfatina-1 en ratas adultas en periodo fértil no causa ninguna variación en los niveles circulantes de LH y FSH.⁵⁶⁷ Sin embargo, otro estudio sugiere que dosis más altas de nesfatina-1 sí incrementan los niveles de LH y FSH en machos adultos, lo cual indica que el eje gonadotrópico en adultos también es sensible a las acciones de la nesfatina-1, aunque hay que tener en cuenta las diferencias sexuales entre ambos estudios.⁵⁶⁶

Nesfatina-1 se expresa tanto en ovarios como en testículos en humanos, rata y ratón.⁵⁶⁶ En testículos, nesfatina-1 es producida por las células de Leydig (productoras de testosterona), y se sugiere su participación en el proceso de secreción de testosterona.³⁹⁹ En ovarios, se ha visto que mujeres con síndrome de ovario poliquístico (caracterizado por obesidad, resistencia a la insulina, hiperandrogenemia e hirsutismo) tienen menores niveles plasmáticos de nesfatina-1 que las mujeres sanas.⁵⁶⁸

Anwar y col. (2013)⁵²¹ han visto en niños y adolescentes (Egipto) que los niveles séricos de nesfatina-1 se incrementan a medida que avanza el desarrollo de la pubertad en

un grupo de 40 individuos (20 obesos y 20 controles), aunque solo observan diferencias significativas en el grupo de los controles.

Nesfatina-1 y regulación de la viabilidad celular.

Dos estudios independientes sugieren que la nesfatina-1 podría actuar como una molécula antiapoptótica y antiinflamatoria en casos de daño cerebral.^{570,571} Özsavcı y col. (2011)⁴³⁰ observaron que tras la inducción de hemorragia subaracnoidea en ratas el pretratamiento con nesfatina-1 mejoraba el daño neurológico y el estrés oxidativo, así como también mejoraba los cambios morfológicos producidos en las arterias basílicas.⁴³⁰ A su vez, observaron una disminución en la actividad de la caspasa 3 y en la presencia de citoquinas proinflamatorias en plasma.⁴³⁰ Siguiendo esta línea, Tang y col. (2012)⁴³¹ realizaron otro estudio evaluando el papel de nesfatina-1 sobre la protección frente al daño cerebral por traumatismo, demostrando que la administración de nesfatina-1 30 minutos antes del mismo suprime la expresión génica del factor nuclear κ B (NF κ B) y disminuye las concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6.⁴³¹ A su vez, observaron una disminución en la actividad de la caspasa 3 y del número de células neuronales apoptóticas. Además, la administración de nesfatina-1 tras 2-8 horas posteriores al traumatismo también suprimía de forma significativa los procesos inflamatorios y la apoptosis celular.⁴³¹

Sin embargo, Xu y col. (2013)⁵⁷² observaron un papel proapoptótico de nesfatina-1 en la línea celular humana derivada de carcinoma epitelial ovárico HO-8910, induciendo un arresto de la fase G1 del ciclo celular e incrementando la actividad de las caspasas 3/7.

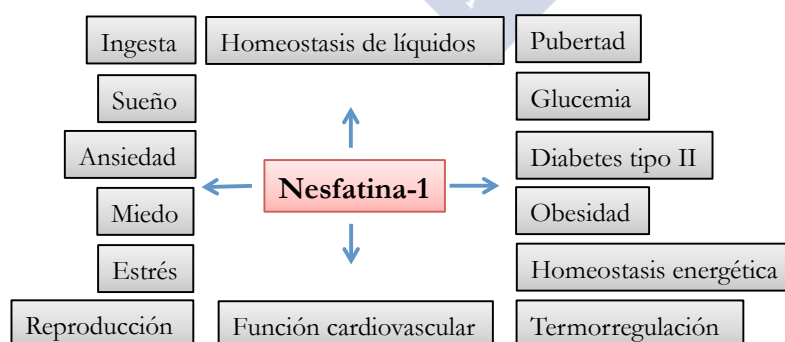


Figura 20: Esquema representativo de las acciones pleiotrópicas de nesfatina-1.

7.-Nesfatina-1 y sistema cardiovascular.

La nesfatina-1 es una hormona secretada por diversos tejidos, entre los que se incluyen el tejido adiposo^{363,401,413,351} y, recientemente, el corazón,⁴⁰² con importantes efectos a nivel metabólico. Aunque al inicio de este trabajo de tesis solo se conocía el efecto anorexigénico de nesfatina-1 y su distribución a nivel cerebral, en los últimos años se ha visto que nesfatina-1 presenta importantes efectos a nivel cardiovascular, y concretamente en el corazón.

7.1.-Nesfatina-1 y el síndrome metabólico.

La asociación entre el síndrome metabólico (SMet) y las enfermedades cardiovasculares se debe al papel del SMet en la desregulación de la homeostasis de importantes factores relacionados con la inflamación, el estrés y la producción de adipocinas y hormonas metabólicas por el tejido adiposo.⁵⁷³

El único estudio realizado hasta la fecha acerca del estudio de los niveles de nesfatina-1 en el síndrome metabólico es el de Catak y col. (2014)⁵⁷⁴, donde observan que los niveles plasmáticos de nesfatina-1 se incrementan significativamente en ratas con síndrome metabólico inducido por dieta alta en fructosa, independientemente del sexo. Asimismo, los niveles de nesfatina-1 en los principales tejidos del aparato reproductor también aparecen incrementados al inducir síndrome metabólico.

7.2.-Efectos de nesfatina-1 a nivel cerebral sobre la función cardiovascular.

La nesfatina-1 se expresa en neuronas de distintos núcleos cerebrales conocidos como importantes reguladores de la función cardiovascular, como el ARC, el PVN, el DMV o el NTS,^{101,575-577} coexpresándose con distintos neuropéptidos y neurotransmisores no solo implicados en el control del apetito, sino también en la regulación de la homeostasis de los líquidos corporales y el sistema nervioso autónomo, como la urocortina, la MSH, el NPY, el CRH, la oxitocina o la vasopresina,^{450,476,575,577-580} todos ellos con importantes funciones a nivel cardiovascular.^{89,101,575,579,581}

Basándose en estos datos, Yosten y col. (2009)⁵⁸⁰ se propusieron determinar los efectos de la administración central de nesfatina-1 sobre el sistema cardiovascular en ratas, observando que la nesfatina-1 induce un incremento significativo de la presión arterial. Aunque este incremento no era muy elevado, su magnitud se correspondía con la de otros neuropéptidos implicados con el control de la ingesta, como la hormona liberadora de

prolactina (PRLH) o la orexina.⁵⁸⁰ La inyección central de nesfatina-1, aunque incrementaba la presión arterial, no implicaba un aumento de la frecuencia cardíaca, posiblemente debido a los múltiples factores que controlan este proceso. Además, observaron que el efecto de la nesfatina-1 sobre el incremento de la presión arterial podía ser revertido por el inhibidor de los receptores de melanocortinas SHU9119 y también por un antagonista adrenérgico no selectivo (pentolamina), sugiriendo que la nesfatina-1 podría actuar a través de los receptores de las melanocortinas sobre las neuronas que los expresan para activar centros preautonómicos, como por ejemplo el NTS, resultando en el incremento de la actividad del sistema nervioso simpático y la elevación de la presión arterial.⁵⁸⁰ La participación del sistema de las melanocortinas sobre el control de la ingesta está bien documentada, pero se ha sugerido también su papel a nivel cardiovascular.⁵⁸⁰ La inyección de MSH- α a nivel cerebral en conejos induce el incremento tanto de la presión arterial como de la actividad simpática, un efecto que se suprime tras la administración de AgRP, agonista endógeno de MC3/4R.⁵⁸² En ratas, agonistas de MSH- α incrementan de forma aguda la presión arterial y alteran los niveles basales de tensión cuando se administran de forma crónica.^{583,584} Además, el sistema de las melanocortinas potencia el aumento de la actividad simpática y la presión arterial inducida por otras adipokinas, como la leptina.⁴⁴² Todo ello sugiere que el efecto de nesfatina-1 en el incremento de la presión sanguínea podría tener lugar a través de un mecanismo dependiente de los receptores MC3/4R, como ya se ha visto que ocurre en la función de nesfatina-1 sobre el control de la ingesta.⁵⁸⁰

Posteriormente, Yosten y col. (2010)⁴¹⁸ se centraron en el estudio de la posible implicación de nesfatina-1 sobre la ruta de señalización de la oxitocina, neuropéptido implicado en diversas funciones biológicas, como en la contracción uterina, el comportamiento sexual y materno o la ingesta, así como también en el control de la función cardiovascular,^{585,586} basándose en que ambos péptidos se colocan a nivel hipotalámico en el PVN⁴²⁷ y en que la nesfatina-1 tiene efectos directos sobre la despolarización de las neuronas productoras de oxitocina.⁴⁷⁴ En este estudio observaron que la nesfatina-1 inducía un incremento de la tensión arterial, que era revertido por un antagonista del receptor de oxitocina, el cual pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G,⁵⁸⁷ sugiriendo que la presencia de receptores de oxitocina funcionales son necesarios para que nesfatina-1 pueda ejercer sus funciones a nivel cerebral, y que el sistema de la oxitocina podría ser así un mediador *downstream* de las funciones tanto anorexigénicas como antihipertensivas de la nesfatina-1.⁴¹⁸

Mimee y col. (2012),⁴⁷⁶ en un estudio realizado en ratas, sugieren la participación de nesfatina-1 tanto en la hiperpolarización como en la despolarización de la membrana plasmática de neuronas del PVN y ARC, atribuyendo este efecto opuesto a un mecanismo regulatorio a nivel funcional de nesfatina-1 sobre estas neuronas, que en último lugar conduce a una regulación del sistema cardiovascular y la homeostasis energética.⁴⁷⁶ La nesfatina-1 producía despolarizaciones solo en las neuronas productoras de NUCB2, sugiriendo la existencia de un sistema de retroalimentación positivo en la propia señalización de la nesfatina-1.⁴⁷⁶ En este estudio se observó un incremento de la presión arterial tras la administración de nesfatina-1, aunque sin consecuencias sobre el ritmo de la frecuencia cardíaca.⁴⁷⁶

Brailoiu y col. (2013),⁵⁸⁸ demostraron que el tratamiento con nesfatina-1 de neuronas cardíacas vagales, implicadas en la regulación de la frecuencia cardíaca,⁵⁸⁹ induce un incremento rápido dosis-dependiente en la concentración de Ca^{2+} intracelular en neuronas preganglionares del núcleo ambiguo.⁵⁸⁸ Este sistema de actuación de nesfatina-1 a través del incremento de la concentración de calcio celular, al igual que ocurría en neuronas hipotalámicas,⁴³⁰ podría sugerir la interacción de nesfatina-1 con un receptor acoplado a proteínas G.⁵⁸⁸ El tratamiento con antagonistas tanto de MC3/4R como de oxitocina no afecta al incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular dependiente de nesfatina-1 en las neuronas del núcleo ambiguo, sugiriendo en este caso un modo de actuación de nesfatina-1 independiente del sistema de las melanocortinas.⁵⁸⁸ La estimulación de las neuronas cardíacas parasimpáticas induce la liberación de acetilcolina en el corazón y la consecuente bradicardia, y la inyección de nesfatina-1 en el núcleo ambiguo produce bradicardia sin observarse cambios en la presión sanguínea.⁵⁸⁸ Aunque en los estudios anteriores se observa un incremento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca tras la inyección central de nesfatina-1, este resultado sugiere la existencia de múltiples sitios de acción de nesfatina-1 sobre el control del sistema nervioso autónomo a nivel cardiovascular, modulando tanto los nervios simpáticos como los parasimpáticos, al igual que ocurre con otros péptidos implicados en el control de la ingesta, como la orexina.⁵⁸⁸

La red neuronal simpática que inerva los riñones participa en la regulación de la presión sanguínea a través del sistema de la renina-angiotensina.⁵⁹⁰ Se ha visto, también, que la inyección central de algunos neuropéptidos anorexigénicos como la orexina,⁵⁹¹ el NPY⁵⁹² o la PACAP,⁵⁹³ alteran la actividad nerviosa renal simpática, con la consecuente implicación sobre la presión arterial.⁵⁹⁴ Tanida y col. (2011)⁵⁹⁴ demostraron que la inyección cerebral de nesfatina-1 estimula de forma dosis-dependiente la actividad simpática renal y el incremento de la tensión arterial, efecto inhibido por SHU9119, sugiriendo que nesfatina-1

actúa en este caso a través del sistema de las melanocortinas modulando a nivel central la regulación del sistema cardiovascular mediante la señalización de los nervios autónomos.⁵⁹⁴ En este estudio tampoco se observa ningún efecto de la nesfatina-1 sobre la frecuencia cardíaca.⁵⁹⁴

7.3.-Efectos de nesfatina-1 a nivel vascular.

Cada vez existen más evidencias que indican que las adipokinas pueden afectar a la capacidad de contracción de los vasos sanguíneos periféricos y participar así en el control de la presión sanguínea.⁵⁹⁵⁻⁵⁹⁷ Yamawaki y col. (2012)⁵⁹⁸ se propusieron estudiar los posibles efectos de nesfatina-1 sobre la regulación de la presión sanguínea a través de la función endotelial en rata. Para ello utilizaron nitroprusiato, un potente vasodilatador arterial y venoso empleado en el tratamiento agudo hospitalario de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva,⁵⁹⁹ que actúa como un donante de NO para inducir la relajación del músculo liso al estimular la producción de GMPc mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC).⁶⁰⁰ El GMPc causa la relajación del músculo liso mediante varios mecanismos, entre los que se incluyen el descenso de la concentración citosólica de Ca^{2+} y/o la sensibilidad al Ca^{2+} de proteínas de contracción mediante la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG).^{601,602} Por otro lado, las fosfodiesterasas (PDEs) son enzimas que hidrolizan el GMPc, por lo que los niveles de GMPc endoteliales se regulan por el balance entre la actividad de las sGC y las PDEs.⁵⁹⁸ Yamawaki y col. (2012)⁵⁹⁸ observaron que la administración de nesfatina-1 en la arteria mesentérica de rata en cultivo inhibe la inducción de la producción de GMPc producida por SNP en presencia de un inhibidor de PDEs, por lo que sugieren que el efecto inhibitorio de nesfatina-1 sobre la producción de GMPc estaría mediada principalmente a través de la inhibición de la sGC en vez de por la activación de las PDEs.⁵⁹⁸ Para estudiar el significado a nivel sistémico de este efecto, Yamawaki y col. (2012)⁵⁹⁸ administraron de forma intravenosa nesfatina-1 y nitroprusiato en ratas, observando un incremento y un descenso de la presión arterial respectivamente, de forma que el pretratamiento con nesfatina-1 suprime el efecto de nitroprusiato sobre el descenso de la presión arterial. De este modo sugieren un mecanismo de regulación a nivel periférico aparte del ya descrito a nivel central,⁵⁹⁴ con lo cual la nesfatina-1 podría estar participando a través de los dos mecanismos independientes para regular la presión arterial.⁵⁹⁸

7.4.-Efectos de nesfatina-1 a nivel cardiaco.

El único trabajo publicado hasta la fecha acerca de los efectos directos de nesfatina-1 sobre el funcionamiento del corazón es el de Angelone y col. (2013).⁴⁰² En primer lugar, demostraron que la nesfatina-1 se expresa tanto a nivel de ARNm como de proteína en el ventrículo de rata, en niveles comparables a los del cerebro o el estómago, sugiriendo que el corazón podría ser un órgano productor de nesfatina-1.⁴⁰² A continuación observaron que, en corazones de rata perfundidos, la exposición ante concentraciones crecientes de nesfatina-1 tiene un efecto cardiodepresor al inducir el incremento de la presión ventricular izquierda, la tasa máxima de contracción del ventrículo izquierdo, el tiempo de relajación medio y los índices de contracción y relajación, aunque no produce ningún efecto sobre la presión coronaria.⁴⁰² A nivel intracelular, intentaron dilucidar los mecanismos de acción de nesfatina-1, observando que la administración de un inhibidor de los receptores acoplados a proteínas G_{i/o} no inhibe los efectos inotrópicos y lusitrópicos de nesfatina-1, descartando la posibilidad de que los efectos a nivel cardiaco de nesfatina-1 estén mediados por este tipo de receptores.⁴⁰² Se sabe que el corazón en mamíferos expresa un tipo de receptores acoplados a guanilato ciclasa (GC), denominados receptores de los péptidos natriuréticos tipo A (NPR-A) y B (NPR-B), cuya activación por los péptidos natriuréticos produce una modulación cardiaca negativa.⁶⁰³ Para estudiar si los receptores acoplados a GC contribuían a los efectos inotrópicos y lusitrópicos de nesfatina-1, inhibieron el NPR-A, observando la desaparición del efecto cardiodepresor de nesfatina-1 y sugiriendo la participación de NPR-A en la mediación de sus efectos.⁶⁰³ Esta posibilidad estaba apoyada por el incremento de los niveles de GMPc en extractos cardiacos tras la exposición a nesfatina-1, y por la coprecipitación de membranas para nesfatina-1 y NPR-A.⁶⁰³ A continuación, trataron de identificar posibles rutas de señalización intracelular desencadenadas por nesfatina-1, y para ello perfundieron los corazones con inhibidores selectivos de ERK1/2, PKG y AKT, observando que los tres inhibidores suprimen los efectos de nesfatina-1.⁶⁰³ Mediante la técnica de western blot, observaron que nesfatina-1 induce la fosforilación de ERK1/2, aunque no observaron ningún cambio en la fosforilación de AKT.⁶⁰³ Asimismo, observaron que los efectos a nivel cardiaco de nesfatina-1 eran independientes de la producción de NO.⁶⁰³

Dado que muchos péptidos con propiedades cardiodepresoras tienen efectos protectores sobre el daño causado por isquemia/reperfusión (I/R),^{604,605} Angelone y col. (2013)⁴⁰² realizaron ensayos de I/R en corazones de rata y observaron que en I/R existen menores niveles de expresión de NUCB2. Además, la nesfatina-1 induce una protección

significativa frente al daño por I/R, produciendo una reducción de la zona infartada y una marcada mejora de la función contráctil post-isquemia.⁴⁰² El análisis fisiológico de los mecanismos de acción cardioprotectores de nesfatina-1 muestra la implicación de canales de K^+ dependientes de ATP mitocondriales y la activación de la PKC ϵ ,⁴⁰² lo que sugiere que actúa a nivel mitocondrial regulando la supervivencia celular mediante la reducción tanto de la necrosis como de la apoptosis.^{606,607} De este modo, Angelone y col. (2013)⁴⁰² sugieren con este trabajo que la nesfatina-1 ejerce un efecto directo sobre el corazón mediante la disminución de la contractilidad y la relajación a través de la ruta del GMPc, y mediante la inducción de cardioprotección frente al daño por I/R.

En cuanto a los efectos de nesfatina-1 a nivel cardiovascular en humanos, Dai y col. (2013)⁴⁵⁸ estudiaron la posible variación de niveles plasmáticos de nesfatina-1 debido al infarto agudo de miocardio. Estudios previos han demostrado que determinados péptidos reguladores del apetito, como por ejemplo la leptina o la grelina, presentan un amplio abanico de efectos sobre el sistema cardiovascular, jugando un papel importante en la patogénesis de la enfermedad coronaria arterial y el infarto agudo de miocardio.^{608,609} De este modo, Dai y col. (2013)⁴⁵⁸ observaron en un estudio realizado en 156 sujetos, divididos en pacientes con infarto agudo de miocardio (48), angina de pecho estable (74) o en pacientes con sospecha de enfermedad coronaria arterial pero sin lesiones (34), que los niveles de nesfatina-1 plasmáticos eran significativamente menores en pacientes con infarto agudo de miocardio con respecto a los otros grupos.

Finalmente, en un estudio realizado por Celik y col. (2013)⁶¹⁰ recientemente, se ha visto que en pacientes con taquicardia supraventricular los niveles de nesfatina-1 en plasma están más elevados que en pacientes control. Los autores explican este hallazgo basándose en el efecto inhibitorio que tiene nesfatina-1 sobre NPY y el efecto estimulador que tiene sobre oxitocina.⁶¹⁰



OBJETIVOS



El objetivo principal de este trabajo de tesis ha sido determinar la expresión y función biológica de nesfatina-1 a nivel cardiomiocitario, así como la posible implicación de esta hormona en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Para ello se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

1.-Determinar la expresión de nesfatina-1 a nivel de ARNm y proteína tanto en cardiomiocitos en cultivo como en tejido cardiaco.

2.-Estudiar el papel de la nesfatina-1 sobre la viabilidad y proliferación celular en cardiomiocitos.

3.-Estudiar el posible mecanismo de acción de nesfatina-1 en cardiomiocitos mediante el estudio de la activación de cascadas de señalización intracelular.

4.-Estudiar el posible papel regulador de nesfatina-1 sobre la incorporación de glucosa y ácidos grasos por parte de cardiomiocitos en cultivo.

5.-Estudiar la regulación de los niveles de expresión de nesfatina-1 a nivel cardiaco por la dieta y en la obesidad de origen genético.

6.-Estudiar la regulación de la expresión de nesfatina-1 por mediadores inflamatorios e insulina.

7.-Estudiar la expresión génica de nesfatina-1 en tejido cardiaco auricular de pacientes sometidos a cirugía cardiaca.

8.-Estudiar la expresión génica de nesfatina-1 en tejido ventricular de corazones trasplantados en la fase final de la cardiomiopatía dilatada.

9.-Estudiar los niveles plasmáticos de nesfatina-1 en pacientes con insuficiencia cardiaca.





MATERIAL Y MÉTODOS



Todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich (USA) salvo que se indique lo contrario.

1.-Ética

Todas las adquisiciones de tejidos humanos se realizaron previo consentimiento informado de los pacientes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2008 y la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y, en caso necesario, con la Convención Europea de los Derechos Humanos y Biomedicina (ETS 164) y la Ley de Tejidos Humanos de 2004 (Reino Unido), tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de la Xunta de Galicia.

Para los experimentos *in vivo* con ratas, se utilizaron las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), siguiendo los principios de Helsinki, las regulaciones del Comité Bioético de la USC y las directrices de la directiva 2010/63 de la Unión Europea. Los experimentos se realizaron según la normativa legal vigente de experimentación animal y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, modificada por la Ley 6/2013 de 11 de junio y el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos.

2.-Tejidos humanos.

Las muestras de aurícula cardiaca humana se obtuvieron de pacientes procedentes del Servicio de Cardiología-Cirugía Cardiaca de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela, sometidos a cirugía cardiaca con *bypass* cardiopulmonar. En dicha cirugía, y para introducir el catéter necesario, se escinde un trozo de apéndice auricular que normalmente se desecha y que nosotros recogemos para experimentación. Los análisis bioquímicos de las muestras de pacientes se realizaron como parte del protocolo médico en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela, y todas las pruebas funcionales y seguimiento de los pacientes tuvieron lugar en el Servicio de Cardiología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 4.

Las muestras de ventrículo izquierdo cardiaco humano fueron una donación del Dr Miguel Rivera, Jefe de la Unidad de Cardiocirculatorio del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Se obtuvieron a partir de corazones explantados de 29 pacientes con cardiomiopatía isquémica (ISQ) y 19 pacientes con cardiomiopatía dilatada

(DIL), todos no diabéticos y en la fase final de la insuficiencia cardíaca, sometidos a trasplante de corazón (Tabla 5). Como controles se utilizaron 6 donantes no enfermos en parada cardioplégica durante 2.5 horas, descartados para trasplante debido a incompatibilidad sanguínea o de tamaño (Tabla 6).

Las muestras de mucosa estomacal se obtuvieron del Departamento de Patología Digestiva del Hospital Clínico Universitario de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela.

Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes de la Red Nacional de Investigación en Insuficiencia Cardíaca (REDINSCOR) (Instituto de Salud Carlos III) pertenecientes a la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago (Tabla 7).

<i>Tejido auricular humano</i>	<i>Varones (178)</i>	<i>Mujeres (90)</i>
<i>Datos demográficos</i>		
Edad (años) (media)	69.07	69.77
IMC (kg/m ²) (media)	28.41	29.1
Peso normal (18.5–24.9 kg/m ²) (n)	29 (16.3%)	17 (18.8%)
Sobrepeso (25–29.9 kg/m ²) (n)	95 (53.3%)	34 (37.7%)
Obesidad (30 kg/m ²) (n)	49 (27.5%)	37 (41.1%)
HTA (n)	129 (72.4%)	67 (74.4%)
Diabetes tipo I (n)	2 (1.12%)	1 (1.11%)
Diabetes tipo II (n)	51 (28.6%)	22 (24.4%)
Hiperlipemia	93 (52.2%)	52 (57.7%)
<i>Laboratorio</i>		
Triglicéridos (mg/dL) (media)	109.6	124.76
Colesterol (mg/dL) (media)	167.93	189.75
Glucosa (mg/dL) (media)	114.85	114.73
<i>Tratamiento</i>		
Antiagregantes (n)	64 (35.9%)	29 (32.2%)
Anticoagulantes (n)	35 (19.6%)	20 (22.2%)
IECAs (n)	53 (29.7%)	22 (24.4%)
ARAII (n)	37 (20.7%)	20 (22.2%)
β-bloqueantes (n)	54 (30.3%)	28 (31.1%)
Calcioantagonistas (n)	39 (21.9%)	11 (12.2%)
Diuréticos (n)	95 (53.3%)	41 (45.5%)
Antidiabéticos Orales (n)	35 (19.6%)	14 (15.5%)
Insulina (n)	13 (7.3%)	7 (7.7%)
<i>Patologías cardiovasculares</i>		
Lesión coronaria (n)	96	27

Tabla 4: Características de los pacientes de cirugía cardíaca. IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión arterial, IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ARAII: antagonistas del receptor de angiotensina II.

<i>Tejido ventricular humano</i>	<i>ISQ (n=29)</i>	<i>DIL (n=19)</i>
Edad (años) (media)	53.6	46.5
Sexo (varones)	16	17
Escala NYHA (media)	3.61	3.44
IMC (kg/m ²) (media)	25.5	25.1
FEVI (%) (media)	23.2	19.6
VFSVI (mm) (media)	53.4	69.8
VFDVI (mm) (media)	61.7	78.3
MVI (g) (media)	258.7	390.8
Duración de la enfermedad (meses) (media)	37.8	69.5

Tabla 5: Características de los pacientes con insuficiencia cardíaca. NYHA: *New York Heart Association*, IMC: índice de masa corporal, FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo, VFSVI: volumen fin de sístole del ventrículo izquierdo, VFDVI: volumen fin diástole del ventrículo izquierdo, MVI: masa ventricular izquierda. Duración de la enfermedad: meses transcurridos desde el diagnóstico hasta el trasplante.

<i>Donante</i>	<i>Edad</i>	<i>Género</i>	<i>Causa de la muerte</i>	<i>FEVI</i>
1	16	Mujer	Accidente Tráfico	>50
2	56	Hombre	Accidente Tráfico	>50
3	56	Hombre	Accidente cerebrovascular	>50
4	51	Hombre	Desconocida	>50

Tabla 6: Características de los pacientes utilizados como controles en los estudios de ventrículo humano.

<i>Plasma humano (RECAVA)</i>	<i>Varones (62)</i>	<i>Mujeres (22)</i>
<i>Datos demográficos</i>		
Edad (años) (media)	64.59	72.09
IMC (kg/m ²) (media)	28.34	27.98
Peso normal (18.5–24.9 kg/m ²) (n)	9 (15.78%)	5 (26.31%)
Sobrepeso (25–29.9 kg/m ²) (n)	30 (52.63%)	10 (52.46%)
Obesidad (30 kg/m ²) (n)	17 (28.82%)	4 (21.05%)
HTA (n)	38 (61.29%)	14 (63.63%)
Diabetes tipo II (n)	29 (46.77%)	11 (50%)
Hiperlipemia (n)	35(56.45%)	12 (54.54%)
Cardiopatía dilatada (n)	21 (50%)	8 (36.4%)
Cardiopatía valvular (n)	1 (1.6%)	2 (9.1%)
Cardiopatía hipertrófica (n)	3 (4.8%)	6 (27.3%)
Cardiopatía hipertensiva (n)	15 (24.2)	6 (27.3%)
Reducción de la tolerancia al ejercicio (n)	4 (7.14 %)	3 (13.63%)
<i>Laboratorio</i>		
Triglicéridos (mg/dL) (media)	136.79	129.66
Colesterol (mg/dL) (media)	179.67	194.38
Glucosa (mg/dL) (media)	139.84	137.8

Tabla 7: Características de los pacientes pertenecientes a la red de insuficiencia cardíaca REDINSCOR. IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión arterial.

3.-Animales.

Para la determinación de los niveles de expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 a nivel tisular se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas o ratones BALB/C alimentados *ad libitum* con dieta estándar del animalario (2.9 kcal/g, 3.10% de grasa, 16.1% de proteína) (Scientific Animal Food & Engineering, FR) que fueron sacrificadas por decapitación.

Para los estudios del efecto de la dieta alta en grasa sobre la expresión cardiaca de nesfatina-1 se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 18 semanas con dieta normal (3.85 kcal/g, 10% de grasa, 20% de proteína, 70% de hidratos de carbono) (Research Diets, Inc. USA) o dieta alta en grasa (4.73 kcal/g, 45% de grasa, 20% de proteína, 35% de hidratos de carbono) (Research Diets, Inc. USA) que fueron sacrificadas a las 21 semanas de vida por decapitación. Los corazones fueron una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino, del grupo de Investigación de Fisiopatología Endocrina del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

Para los estudios sobre el efecto del ayuno sobre la expresión cardiaca de nesfatina-1 se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 18 semanas con dieta estándar del animalario (2.9 kcal/g, 3.10% de grasa, 16.1% de proteína) (Scientific Animal Food & Engineering, FR) y se mantuvieron 36 horas en ayuno antes de su sacrificio por decapitación. Los corazones fueron de nuevo una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino.

Las ratas Zucker se obtuvieron de Charles River Laboratories International, Inc (USA). Se alimentaron *ad libitum* con dieta estándar del animalario (2.9 kcal/g, 3.10% de grasa, 16.1% de proteína) (Scientific Animal Food & Engineering, FR) y se sacrificaron tras 6 o 21 semanas de vida por decapitación. Justo antes del sacrificio se realizó un análisis de la composición corporal mediante resonancia magnética nuclear (EchoMRI, Echomedical Systems Houston, USA). Los corazones fueron una donación de los Dres. Felipe Casanueva y Ana Belén Crujeiras, del grupo de Investigación de Endocrinología Molecular del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

Los neonatos de rata Sprague-Dawley de hasta 72 horas de vida se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los corazones extraídos se utilizaron para realizar cultivos primarios (ver a continuación).

Salvo que se indique lo contrario, se utilizaron machos adultos para la realización de los experimentos.

En todos los casos, los tejidos (corazón y estómago) se extrajeron y se congelaron inmediatamente a -80°C.

4.-Cultivos Celulares.

Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos.

Se utilizaron dos tipos de cardiomiocitos adultos humanos:

- Cardiomiocitos adultos humanos (PromoCell GmbH, Alemania), cultivados según las instrucciones del fabricante.
- Cardiomiocitos adultos atriales humanos de pacientes sometidos a cirugía cardiaca con bypass cardiopulmonar se cultivaron según el siguiente protocolo:

Se lavó el apéndice atrial en tampón fosfato salino (PBS) (NaCl a 137 mM, KCl a 2.7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, CaCl+2H₂O 1 mM y MgCl₂+ 6H₂O a 0.5 mM, a pH 7.4) y se cortó en trozos muy pequeños lo más rápido posible. La digestión del apéndice atrial se realizó en solución enzimática (0.25% de tripsina, 0.15% de colagenasa tipo II y 0.02% de glucosa en PBS) durante 5 minutos y en agitación a 37°C. La primera digestión se descartó y se recogieron las cuatro siguientes. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS (suero de ternero recién nacido) y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (10% de suero fetal bovino (FBS) (Life Technologies, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Cámbrex, USA) y 89% de Iscove's Modified Dubelcco's Medium (Merck Millipore, Alemania)) y se sembró en placas previamente tratadas durante 24 horas con matriz extracelular (1% de fibronectina en gelatina al 0.02% (BD, USA)). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas.

Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

Para realizar el cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata se utilizaron neonatos de rata Sprague Dawley de hasta 72 horas de vida como máximo. Los cardiomiocitos presentan un número fijo de divisiones durante el desarrollo embrionario y fetal tras el cual entran en estado postmitótico.⁶¹¹ Durante las primeras 48 horas de vida de los neonatos, los cardiomiocitos todavía conservan en parte la capacidad de proliferar,⁶¹¹ por lo que tras la siembra se pueden dividir una o dos veces.

Los corazones extraídos se trocearon en tres o cuatro porciones y se mantuvieron en tampón ADS (6.8 g/L de NaCl, 4.76 g/L de HEPES, 0.12 g/L de NaH₂PO₄, 1.0 g/L de glucosa, 0.4 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄ y 0.02 g/L de rojo fenol, a pH 7.4) hasta su digestión. Las digestiones se realizaron en la siguiente solución enzimática: 80 unidades/mL de colagenasa tipo Ia y 0.6 mg/mL de pancreatina. Se realizaron 5

digestiones a 37°C en agitación. La primera de 30 minutos se desechó, mientras que las cuatro siguientes se recogieron y se incubaron durante 20 minutos. El volumen utilizado de solución enzimática se ajustó según el número de neonatos, manteniendo la proporción de 6 mL/digestión por cada 14 corazones. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (66% de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Suiza), 17% de medio M199, 10% de FBS (Life Technologies, USA), 5% de NCS (Merck Millipore, Alemania), 1% de penicilina/estreptomina (Cámbrex, USA) y 1% de L-glutamina)) y se realizó una siembra diferencial durante 2-3 horas sobre superficies de cultivo no tratadas con matriz extracelular, con el fin de aumentar la pureza del cultivo dejando sedimentar los fibroblastos para posteriormente desecharlos. Se recogió la suspensión celular de cardiomiocitos y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Las células obtenidas se sembraron con una densidad de 50.000 células/cm² en placas previamente tratadas durante 24 horas con matriz extracelular de fibronectina. El medio de cultivo se suplementó con arabinósido de citosina (AraC) (farmacia hospitalaria) a una dosis de 10 µM para inhibir la proliferación de los fibroblastos. El medio se renovó cada 24 horas. Con esta técnica conseguimos un grado de pureza de cardiomiocitos del 90-99% (se comprueba utilizando la técnica de inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina), con un rendimiento de aproximadamente 10⁷ células por cada 40 neonatos.

Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1.

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 fue donada por el Dr. William C. Claycomb (Louisiana S.U., Medical Centre, New Orleans, USA) y deriva de la línea celular AT-1 de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón pertenecientes a la cepa C57BL/6J.⁶¹² Las características de esta línea hacen que sea un buen modelo para el estudio del funcionamiento de los cardiomiocitos a nivel celular y molecular, ya que son capaces de multiplicarse conservando el fenotipo específico de las células cardíacas adultas: expresión de la cadena pesada de miosina, de α -actina cardíaca y de conexina 43, y mantenimiento de la actividad contráctil.⁶¹²

El cultivo de esta línea celular se realizó sobre superficies de cultivo previamente tratadas con matriz extracelular de fibronectina durante 24 horas. Se sembraron a una densidad de 50.000 células/cm². Las células se mantuvieron en medio Claycomb

suplementado con 10% de dFBS, 1% de penicilina/estreptomina (Lonza, Suiza) y 1% de L-glutamina (Lonza, Suiza). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas. Para el mantenimiento de la línea, cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se incubaron con tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37 °C. La tripsina se inactivó con DMEM con un 10% de FBS y las células se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo y se realizó un pase 1:3.

Para realizar los experimentos se retiró previamente el suero del medio de cultivo (2-12 horas).

5.-Extracción de proteínas.

Se lavaron las células con PBS y se les añadió 6.7 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tampón de lisis (5% de Tris-Base a 1 M con pH 7.5, 5% de NaCl a 5 M, 30% de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7+10\text{H}_2\text{O}$, 1% de EDTA a 0.5 M, 20% de NaF a 5 M, 10% de Triton X-100 al 10%, 1% de Na_3VO_4 a 0.1 M, 1% de PMSF a 0.1 M, 1% de aprotinina, 1% de leupeptina y 25% agua miliQ). Se lisaron las células con ayuda de un raspador. Se mezcló el lisado utilizando un agitador tipo vórtex y tras 30 minutos de reposo en hielo se centrifugó a 13.000 g durante 16 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -20 °C.

6.-Cuantificación de proteínas: Método de Bradford.

Para determinar la concentración de proteínas en solución se utilizó el método de Bradford, utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA). El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 y las proteínas, de forma que el complejo proteína-colorante causa el cambio del máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. El colorante Coomassie se une principalmente a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina. La cantidad de absorción es proporcional a la cantidad de proteínas.

Para calcular la concentración proteica de las muestras, se utilizó una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA) comprendida entre 2.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua miliQ y un 20% de Bio-Rad Protein Assay. Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1:200 en agua miliQ. La absorbancia se midió tras 5 minutos de incubación a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro Ultrospec 1100 pro (GE Healthcare Life Sciences, USA). Para calcular la concentración proteica se extrapolaron los valores obtenidos de absorbancia de las muestras en la recta patrón de BSA utilizando una recta de regresión lineal.

7.-Western blot.

Utilizamos la técnica de western blot para estudiar la expresión y activación de determinadas proteínas de interés. Mediante una electroforesis en gel de acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, BioRad, USA), se separan las proteínas en función de su tamaño. En general, se utilizaron geles al 5% de acrilamida para proteínas de 60-200 kDa, geles al 10% para proteínas de 16-70 kDa y geles del 15% para proteínas de 12-45 kDa, con Tris-Base a 1.5 M con pH 8.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED. Se preparó un gel concentrador sobre el gel separador, que tiene un tamaño de poro más grande. Para el gel concentrador se utilizó un 4% de acrilamida, Tris-Base a 1.5 M con pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED a distintas cantidades en función del volumen final de preparación.

Se diluyeron las proteínas en tampón de carga (25% de Tris-Base a 0.5M + 0.4% de SDS con pH 6.8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0.2% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. Se utilizó como marcador de peso molecular el High Range Rainbow (GE Healthcare Life Sciences, USA). La electroforesis se realizó a 80 V constantes durante 3 horas en frío en tampón de electroforesis (3 g/L de Tris-Base, 14.4 g/L de glicina y 0.96 g/L de SDS), utilizando el sistema Mini-PROTEAN® Precast Gels (BioRad, USA).

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF (Amersham Hybond™, GE Healthcare Life Sciences, USA), previamente activada según las instrucciones del fabricante, durante 1 hora a un amperaje constante de 0.28 A en tampón de transferencia (5.81 g/L de Tris-Base, 2.93 g/L de glicina, 0.375 g/L de SDS y 5% de metanol), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, USA). La membrana se bloqueó utilizando BSA o leche desnatada en polvo al 5% durante 1 hora, y se incubó con los siguientes anticuerpos durante toda la noche (Tabla 8).

La membrana se reveló utilizando el kit Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, Alemania) en el sistema de revelado UVP EC3 Imaging System (UVP, USA).

Para cuantificar los niveles de proteína se densitometraron utilizando el programa libre ImageJ.⁶¹³

<i>Anticuerpo</i>	<i>Concentración</i>
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (pERK1/2) pThr202/Tyr204, Clone: B.742.5 (Thermo Scientific, USA)	1:1000
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), Clone: K.913.4 (Thermo Scientific, USA)	1:1000
Phospho-AKT (Ser473) Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:1000
AKT Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:1000
Phospho-AS160 (Thr642) Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:1000
AS160 Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:500
Phospho-AMPK (Thr172) Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:1000
AMPK α Antibody (Cell Signalling Technology, USA)	1:1000
Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Antibody	1:500
Acetyl-CoA Carboxylase Antibody	1:500
Anti-GAPDH Monoclonal Antibody (6C5) (Thermo Scientific, USA)	1:1000
Monoclonal Anti- β -Actin, clone AC-74 (Sigma-Aldrich, USA)	1:1000
Nesfatin-1 (1-82) (Rat) Antibody (Phoenix Pharmaceuticals, USA).	1:1000

Tabla 8: Listado de anticuerpos y diluciones utilizadas.

8.-Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN se utilizó como tampón de lisis el reactivo comercial TRIzol[®] (Life Technologies, USA) seguido del sistema de microcentrifugaciones en columna RNeasy Mini Kit (Quiagen, Alemania).⁶¹⁴

El TRIzol[®] es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, que se recupera por precipitación con etanol. A continuación utilizamos el sistema de microcentrifugaciones de RNeasy[®] Mini kit (Quiagen, Alemania). Este sistema representa una tecnología bien estabilizada para la purificación del ARN. Este método combina las propiedades de unión selectivas de membranas basadas en gel de sílice con microcentrifugaciones, de forma que gracias a una solución tampón específica de alta concentración salina permite retener en la membrana hasta 100 μ g de ARN de más de 200 pares de bases. El etanol proporciona las condiciones de unión adecuadas del ARN a la columna, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eluyen de forma eficiente mediante distintos lavados.

Para ello, se lavaron con PBS las células o tejido y se añadió TRIzol[®] en función de la cantidad de tejido o tamaño del plato de cultivo (500-1000 μ L). Se le añadió cloroformo en proporción TRIzol:cloroformo 5:1 y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa y se repitió el proceso. A continuación, se recogió la fase acuosa y se

mezcló con un volumen de etanol de 70°. A partir de este paso se continuó la extracción utilizando las columnas del RNeasy® Mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó en el Nano-drop® ND-1.000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

9.-RT-PCR.

Para determinar la expresión génica de determinados genes de interés se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) mediante los siguientes métodos:

- RT-PCR en un solo paso con SYBR® Green: la reacción de RT-PCR se realizó a partir de 2.5 ng de ARN, cebadores OligodT (Agilent Technologies, USA) y el sistema Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, USA) en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al siguiente patrón térmico: 1 ciclo de 10 minutos a 50°C, 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C. Como control de ADN genómico se realiza un punto sin retrotranscriptasa, y como control negativo se realiza un punto sin ARN. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (Costoya, España):

<i>Cebadores</i>	<i>Secuencia</i>	<i>GenBank</i>	<i>Pares de bases</i>
CD36 de rata	Sentido: GCGACATGATTAATGGCACA	NM031561.2	92
	Antisentido: CCTGCAAATGTCAGAGGAAA		
GAPDH de rata	Sentido: GTCATGACCACAGTCCATG	NM 017008.4	224
	Antisentido: GGCATGTCAGATCCACAAC		

Tabla 9: Cebadores sintéticos utilizados para el método de Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, USA).

- RT-PCR en dos pasos con SYBR® Green: partiendo de 1 µg ARN se sintetizó ADNc utilizando cebadores OligodT (SABiosciences, USA) y el RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA) según las instrucciones del fabricante en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. La reacción de RT-PCR se realizó con el

RT² Real-Time™ SYBR® Green/Rox PCR master mix (SABiosciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (SABiosciences):

<i>Cebadores</i>	<i>Nº Catalogo</i>	<i>Pares de bases</i>	<i>GenBank</i>
NUCB2 de rata	PPR49435A	145	NM_021663.2
GAPDH de rata	PPR06557A	172	NM_017008.3
NUCB2 de humano	PPH19934A	126	NM_005013.2
GAPDH de humano	PPH00150E	175	NM_002046.3
NUCB2 de ratón	PPM25549A	95	NM_016773.3
GADPH de ratón	PPM02946E	140	NM_008084.2
NR1H2 de rata	PPR42314A	110	NM_031626.1
AVPR de rata	PPR06795B	157	NM_053019.2
HMGCR de rata	PPR44338A	93	NM_013134.2

Tabla 10: Cebadores comerciales utilizados para el método RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA) y RT² Real-Time™ SYBR Green/Rox PCR master mix (SABiosciences, USA).

- RT-PCR en dos pasos con Taqman®: partiendo de 1 µg ARN se sintetizó ADNc utilizando cebadores OligodT (Roche Diagnostics, CH), hexámeros aleatorios (Roche Diagnostics, CH) y el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, CH), según las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 10 minutos a 25°C y 30 minutos a 55°C. La reacción de RT-PCR se realiza con la FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostics, CH), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA), con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (Roche Diagnostics, CH):

<i>Cebadores</i>	<i>Nº Ensayo</i>	<i>Pares de bases</i>	<i>GenBank</i>
NUCB2 de rata	505912	77	NM_021663
Rn18S de rata	502300	78	NC_005113.3
APOP1 de rata	505898	114	NM_001037769

Tabla 11: Cebadores comerciales utilizados para el método TaqMan (Roche Diagnostics, CH).

En los casos necesarios, se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe[®] (Life Technologies, USA) para ver el producto de amplificación, utilizando el UVP EC3 Imaging System (UVP, USA) como sistema de revelado.

10.-Array de expresión de genoma completo: Genechip[®] de Affymetrix[®].

El análisis de expresión génica fue realizado por Progenika Biopharma S.L. (ES) utilizando la tecnología GeneChip[®] de Affymetrix[®], mediante el array de expresión de genoma completo RatGene 1.0 ST. Tanto el procesamiento de las muestras como la hibridación, revelado, escaneado de los chips y análisis de los resultados se realizaron siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por Affymetrix Inc (USA).

Para realizar el ensayo, se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata, previamente deprivados de suero durante 12 horas y tratados durante 6 horas con el péptido comercial nesfatina-1 de rata a una concentración de 1 μ M (Phoenix Pharmaceuticals, USA). Se realizó la extracción de ARN y se cuantificó en el Nano-drop[®] ND-1.000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

A partir del ARN total obtenido, se estimó la calidad y cantidad del mismo mediante el chequeo de una alícuota en el Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) y su medida espectrofotométrica utilizando el Nano-drop[®] ND-1.000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). A partir de 200 ng de cada una de las muestras, se sintetizó ADNc con el WT Expression kit de Ambion, siguiendo el protocolo de The Ambion WT Expression kit for Affymetrix GeneChip Whole Transcript (WT) Expression Arrays. El proceso consiste básicamente en la síntesis de ADNc utilizando cebadores aleatorios y en la transcripción in vitro de este ADNc para generar un ARNc a partir del cual sintetizar de nuevo ADNc en el que se incorpora dUTP. El ADNc así sintetizado se fragmenta utilizando UDG (uracil DNA glucosilasa) y APE1 (enzima multifuncional de reparación del ADN). El ADNc fragmentado se marca con transferasa terminal utilizando el Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling kit siguiendo el protocolo GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization User Manual, for use with the Ambion WT. La cantidad de ADNc se cuantificó mediante medida espectrofotométrica en Nano-drop[®] ND-1.000 Spectrophotometer. La síntesis de ADNc y la correcta fragmentación de los ADNcs se comprobó mediante medida de una alícuota en Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). A continuación se preparó la mezcla de hibridación para el chip RatGene 1.0 ST. El programa utilizado para el procesamiento de los chips fue el Affymetrix[®] GeneChip[®] Command Console[®] (AGCC 1.1, Affymetrix[®]) y el Expression Console[™] (EC 1.1, Affymetrix[®]).

11.-Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY®.

El ensayo de captación de ácidos grasos permite medir la capacidad celular para incorporar ácidos grasos de cadena larga. El BODIPY®, acrónimo de boro-dipirometano, es un fluoróforo compuesto por el dipirometano unido a un átomo de Boro, el cual está sustituido por una unidad BF₂. El nombre de la IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) para el BODIPY® es 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene. Este fluoróforo es lipofílico, por lo que sondas que incorporen este compuesto presentan propiedades similares a los lípidos naturales, permitiendo mimetizar el transporte y metabolismo de ácidos grasos en la célula.

Se utilizaron células de cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata, previamente deprivadas de suero durante 12 horas, tratadas con nesfatina-1 de rata a concentraciones de 0.01-1 µM durante 30 minutos (Phoenix Pharmaceuticals, USA), utilizando como control positivo insulina 100 nM. Terminado el tratamiento, se lavaron las células con PBS a temperatura ambiente y se le añadió BODIPY® 500/510 C₁, C₁₂ (Life Technologies, USA) 10 µM y seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA-FFA) 20 µM en PBS durante 30 segundos, tras lo cual, se lavó rápidamente con BSA-FFA al 0.1% en PBS frío para eliminar el BODIPY® que queda fuera de las células. Se añadió tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37°C para recoger las células y se inactivó con PBS frío. Se centrifugaron las células 2000 g durante 5 minutos y se resuspendió el *pellet* en yoduro de propidio 1 µM en PBS para marcar y descartar las células muertas de la determinación de la incorporación de BODIPY®. Se incubaron las células con el yoduro durante 15 minutos en oscuridad y se midió la fluorescencia de la muestra mediante citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton & Dickinson, USA) y el programa CellQuest (Becton & Dickinson, USA).

12.-Citometría de flujo.

Utilizamos este método para ver el posible efecto de nesfatina-1 sobre el ciclo celular.

Se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL1, previamente deprivados de suero durante 12 horas, tratados con nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) a concentraciones de 0.001-1 µM durante 24 horas. Terminado el tiempo de tratamiento, se lavaron las células con PBS y se les añadió tripsina-EDTA durante 3-5 min a 37°C. Para inactivar la tripsina, utilizamos PBS frío y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Se resuspendió el *pellet* celular en paraformaldehído al 0.1% en

PBS, dejándolas reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para su permeabilización y fijación. Se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El *pellet* celular se resuspendió en etanol al 70% y se conservaron a -20°C durante 12 horas para su fijación. Se volvieron a realizar dos lavados con PBS y se resuspendió el *pellet* celular en 1 mg/mL de ribonucleasa A y 40 µg/mL de yoduro de propidio en PBS. El yoduro de propidio se intercala en el ADN, lo que nos permite determinar la cantidad de ADN presente en la célula y clasificar las fases del ciclo celular y el número de células muertas. Es necesario incubar las células con el yoduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación se analizaron las células por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton & Dickinson, USA) y se utilizó el programa CellQuest (Becton & Dickinson, USA).

13.-Tinción vital Hoechst 33258.

El Hoechst es un marcador fluorescente con permeabilidad celular que se une al ADN de doble cadena. Se trata de un agente colorante conocido como bisbenzidina, que se intercala en el ADN entre las bases adenina-timina, y que presenta una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 450 nm. Se utiliza para diferenciar las células vivas de las células apoptóticas, cuyos núcleos brillan más con la tinción Hoechst debido a la condensación de la cromatina.

Se realizó esta técnica para estudiar el posible papel de nesfatina-1 en la apoptosis cardiomiocitaria. Se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL1, previamente deprivados de suero durante 12 horas, tratados con nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) a concentraciones de 0.001-1 µM durante 6-24 horas. Tras el tratamiento, se retiró el medio y se añadió Hoechst 33258 0.5 µM con HEPES 20 mM en DMEM. Se incubó durante 40 minutos en un incubador de células y se realizó el conteo de las células apoptóticas *in vivo* en el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Olympus Optical, Alemania). En cada punto de tratamiento (por duplicado) se contaron 10 campos y en cada campo 20 células, evitando contar los bordes y el centro del pocillo, lugares donde de por sí se produce más apoptosis.

14.-Ensayo de actividad mitocondrial: MTT.

El 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) es un sistema simple, preciso y reproducible para medir la actividad de células vivas a través de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. El MTT es una sal que disuelta en medios de cultivo sin rojo fenol o en soluciones tampón es de color amarillo. Las células vivas son

capaces de captar este compuesto del medio y metabolizarlo en las mitocondrias. Las deshidrogenasas mitocondriales eliminan el anillo de tetrazolio, haciendo que el compuesto cambie de color amarillo a púrpura. Este cambio de color puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm, de forma que un aumento en el número de células vivas supone un aumento en la cantidad de MTT metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales.

Se utilizó esta técnica para comprobar si la nesfatina-1 afecta a la actividad mitocondrial de los cardiomiocitos en cultivo. Se utilizaron cardiomiocitos neonatales de rata y la línea celular HL1, previamente deprivados de suero durante 12 horas, tratados con nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) 0.1-1 μM durante 24 horas, utilizando como control positivo medio de cultivo completo. Cuatro horas antes de finalizar el tratamiento se añadió MTT (Life Technologies, USA) a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para estimar la cantidad de MTT metabolizado se lisaron las células con un volumen de agente solubilizante (0.0837% de HCl al 37% en SDS al 10%) y se determinó la absorbancia a 550 nm tras 6-24 horas en el lector de ELISA Multiskan[®]EX (Thermo Scientific, USA).

15.-Inmunohistoquímica.

Utilizamos la técnica de inmunohistoquímica para determinar la localización de nesfatina-1 en tejido auricular derecho humano, en cardiomiocitos en cultivo obtenidos del tejido auricular derecho humano y en cardiomiocitos neonatales de rata.

Se utilizó el Autostainer Link 48 (Dako, Agilent Technologies, USA) para realizar las tinciones de los cultivos primarios de cardiomiocitos humanos y neonatales de rata previamente fijados en alcohol de 96°, así como de los cortes de tejido cardiaco auricular derecho humano de 0.4 μm previamente fijado con formol y embebido en parafina, con el correspondiente desparafinado antes de realizar la inmunohistoquímica. La tinción se realizó utilizando los anticuerpos primarios FLEX anti-desmina (clone D33, Agilent Technologies, USA) como control positivo de cardiomiocitos, y anti-nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA), ambos a la concentración de 1:200, seguido del EnVision FLEX/HRP (Dako, Agilent Technologies, USA) para su detección. Como control negativo se utilizó suero de cabra o el anticuerpo anti-nesfatina-1 pre-adsorbido con el péptido de nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) a una concentración de 5 μM durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la determinación de nesfatina-1 en los cultivos celulares, se sembraron las células en portaobjetos especiales para esta técnica, denominados FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Agilent Technologies, USA),

utilizando un lápiz de parafina para delimitar el área de cultivo. En el caso de los apéndices auriculares derechos, se realizaron cortes de 0.4 μm y se montaron en el mismo tipo de portaobjetos.

16.-Microscopía confocal.

Utilizamos la técnica de microscopía confocal para determinar la localización de nesfatina-1 en cardiomiocitos de apéndices auriculares derechos humanos en cultivo, en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo, y en cortes de 0.4 μm de tejido cardiaco auricular derecho humano previamente fijados en formol y embebidos en parafina, así como también para estudiar la posible movilización de los transportadores de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática tras el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo con nesfatina-1. Para realizar tanto la identificación de nesfatina-1 como la movilización de GLUT-4 en los cultivos celulares, se sembraron las células en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro, previamente tratados con fibronectina, mientras que los tejidos se montaron sobre los portaobjetos FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Agilent Technologies, USA) y se le añadió el cubreobjetos al final del proceso.

En el caso de la determinación de la movilización de GLUT-4 hacia la membrana plasmática, los cardiomiocitos neonatales de rata se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) con dosis comprendidas entre 0.01-1 μM durante 5-30 minutos, utilizando insulina a una dosis de 100 nM como control positivo. Para la determinación de la localización celular de nesfatina-1 en cardiomiocitos en cultivo se realizó esta técnica en condiciones basales, con el medio de crecimiento normal y sin ningún tipo de privación. De este modo, tras 48 horas de cultivo de las células en estado basal, o tras el tiempo de tratamiento, se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4% (Thermo Scientific, USA) en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Como el tejido cardiaco auricular derecho humano ya estaba previamente fijado y desparafinado, se comenzó el protocolo en el siguiente paso. Tras otros 3 lavados con PBS, se bloqueó y permeabilizó la membrana celular con un 2% de Triton X-100, 2% de Tween-20, 5% de suero de cabra y un 0.2% de BSA (PBT-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBT-T: anti-nesfatina-1 de rata (Phoenix Pharmaceuticals, USA) a concentración 1:500, anti-PC1/3 (Santa Cruz Biotechnology, USA) a concentración 1:100 y anti-GLUT-4 (Abcam, Inglaterra) a concentración 1:100, y se incubaron según las instrucciones del fabricante. Se lavaron 3 veces las muestras con PBS durante 20 minutos y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente en PBT-T, utilizando goat anti-rabbit IgG

(H+L) Dy-Light 550 conjugated (Thermo Scientific, USA) o goat anti-mouse IgG (H+L) Dy-Light 488 conjugated (Thermo Scientific, USA) durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Se repitieron los lavados de PBS y se realizó una incubación con TO-PRO 3 (Life Technologies, USA) a una concentración de 1:500 en PBT-T durante 10 minutos en oscuridad. El TO-PRO 3 es un colorante fluorescente que entra de forma pasiva en las células y se intercala entre el ADN de doble cadena marcando así los núcleos celulares. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos y se montaron sobre portaobjetos FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Agilent Technologies, USA) utilizando Mowiol, que presenta el mismo índice de refracción que el aceite de inmersión y protege frente a la pérdida de fluorescencia de la muestra. Tras 12 horas a 4°C se analizaron las muestras utilizando el microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems, Alemania). El análisis y cuantificación de las imágenes se realizó con el programa libre ImageJ⁶¹³ utilizando una proyección en Z y representando la fluorescencia media.

Los controles de la técnica utilizados fueron los siguientes:

- Control de autofluorescencia de las células: se procesó solo con PBT-T.
- Control de inespecificidad del anticuerpo primario para nesfatina-1: se preincubó el anticuerpo con nesfatina-1 a una concentración de 10 μ M durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear su sitios de unión. Se diluyó en PBT-T y se incubaron las células con esta solución de la misma forma que el anticuerpo primario.
- Control de inespecificidad del anticuerpo secundario: se procesó con PBT-T sin anticuerpo primario, y se le añadió solo el anticuerpo secundario y el marcador de núcleos TO-PRO3.

Para la cuantificación de la movilización del transportador de glucosa GLUT-4, se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron un total de 216 células, de forma que para cada punto de tratamiento (en duplicados) se seleccionaron 6 campos visuales elegidos de forma aleatoria y se realizaron seis contajes en cada campo visual. Se determinaron regiones de interés de un tamaño fijo para cuantificar la fluorescencia de las regiones citoplasmáticas perinucleares y las regiones citoplasmáticas periféricas cercanas a la membrana plasmática dentro de cada célula, seleccionando las células de forma aleatoria dentro del campo visual y evitando cuantificar las células atípicamente largas o demasiado pequeñas, las células que no estén en contacto con al menos otra célula o las células con bordes citoplasmáticos atípicos o no diferenciados de las células vecinas. Las medidas de fluorescencia se representaron como el ratio entre la región citoplasmática periférica y la región perinuclear.

17.-Ensayo de captación de glucosa.

El ensayo de captación de glucosa se realiza comúnmente para medir el transporte y la actividad metabólica celular de la glucosa. Para ello se utiliza un análogo de la glucosa, la 2-desoxi-D-glucosa, marcada con un radioisótopo, en nuestro caso de tritio (^3H). La 2-desoxi-D-glucosa es un derivado de la glucosa que tiene el radical 2-hidroxilo sustituido por un hidrógeno, por lo que no es capaz de entrar en la ruta de la glucólisis. De este modo, una vez que entra en la célula se fosforila y no puede ser posteriormente metabolizada, por lo que permanece en el interior de las células, siendo un buen método para cuantificar la incorporación de glucosa por las mismas.

Se utilizó este ensayo para determinar si la nesfatina-1 estimula la incorporación de glucosa por cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo y la línea celular HL-1. Las células se privaron de suero durante 2 horas y se realizaron tratamientos con nesfatina-1 de rata a dosis de 0.01-1 μM durante 2.5 horas, utilizando como control positivo insulina 100 nM durante 1 hora. Las células se lavaron con tampón salino HEPES (HBS: NaCl a 140 mM, KCl a 5 mM, MgSO_4 a 2.5 mM, CaCl_2 a 1 mM y HEPES a 20 mM, ajustado a pH 7.4) y se incubaron con 2-desoxi-D-glucosa 10 μM y 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de 2-desoxi-D- ^3H -glucosa (Perkin Elmer, USA) en HBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con NaCl al 0.9% y se lisaron con 250 μL de NaOH 0.05 N. Se recogieron 50 μL para cuantificar la proteína por el método Bradford (se utilizaron 20 μL), y el resto se transfirió a tubos específicos para contar la radiactividad en un contador de centelleo líquido, añadiendo a cada muestra 2 mL de líquido de centelleo Ecoscint H (National Diagnostics, USA). La lectura se realizó en el contador de centelleo líquido Tricarb[®] (Perkin Elmer, USA), con un tiempo de lectura por muestra de 5 minutos.

La captación no específica se determinó añadiendo a un punto sin tratamiento citocalasina B (que inhibe la incorporación de glucosa) a una concentración de 10 μM . Los valores obtenidos en este punto se restaron de todos los demás puntos de tratamiento, considerándose ruido de fondo. Los valores de glucosa captada se expresan en cpm/mg de proteína/minutos de exposición con la glucosa marcada.

18.-ELISA de nesfatina-1 de rata y humano.

Para determinar tanto la secreción de nesfatina-1 por cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo como los niveles plasmáticos de nesfatina-1 en rata y humano se utilizaron los kits comerciales Nesfatin-1 (1-82) (Rat) EIA Kit-Extraction Free (Phoenix

Pharmaceuticals, USA) y el Nesfatin-1 (1-82) (Human)-ELISA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso del kit para rata, se basa en un ensayo de tipo competitivo. En este tipo de kits el fondo del pocillo está pretratado con el anticuerpo secundario con los sitios de unión no específica bloqueados. A continuación se añade de forma simultánea el anticuerpo primario, la nesfatina-1 unida a biotina y la muestra. El anticuerpo secundario se une a la región Fc del anticuerpo primario, cuya región Fab se une de forma competitiva tanto a la nesfatina-1 biotinilada como a la nesfatina-1 de las muestras. El péptido biotinilado interacciona con la peroxidasa de rábano unida a estreptavidina (SA-HRP), la cual cataliza la solución sustrato compuesta por 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) y peróxido de hidrógeno para producir una solución de color azul. La reacción enzima-sustrato se detiene con HCl, de modo que la solución se vuelve de color amarillo. La intensidad del color amarillo se relaciona de forma directamente proporcional con la cantidad del complejo formado por la nesfatina-1 biotinilada y la SA-HRP, pero de forma inversamente proporcional a la cantidad de nesfatina-1 en la recta patrón o las muestras. Esto es debido a la unión competitiva entre el péptido biotinilado y el péptido de las muestras al anticuerpo primario. La cantidad de nesfatina-1 en las muestras se extrapola a partir de una curva estándar con concentraciones conocidas de péptido (Fig. 21).

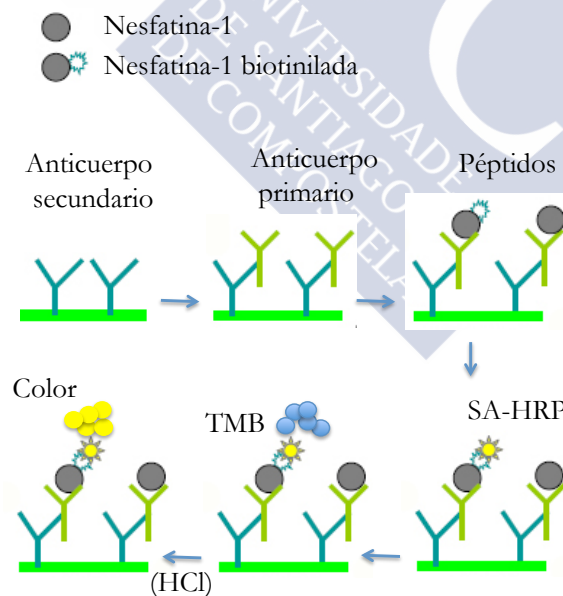


Figura 21: ELISA de tipo competitivo.

En el caso del kit para humano, el fondo del pocillo está pretratado con el anticuerpo primario para nesfatina-1 con los sitios de unión no específica bloqueados. La nesfatina-1 de la muestra se une al anticuerpo primario inmovilizado en el fondo de los

pocillos. Luego se añade otro anticuerpo primario para nesfatina-1, pero en este caso unido a biotina, que se une a la nesfatina-1 atrapada por el anticuerpo primario sin biotina. A continuación se añade SA-HRP para catalizar la solución sustrato (TMB y peróxido de hidrógeno). La reacción se detiene con una solución de parada compuesta por HCl, que cambia el color de los pocillos de azul a amarillo. En este caso, la intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la cantidad de nesfatina-1 en la muestra o en el estándar. La cantidad de péptido en las muestras se extrapola a partir de una curva estándar con concentraciones conocidas de nesfatina-1 (Fig. 22).

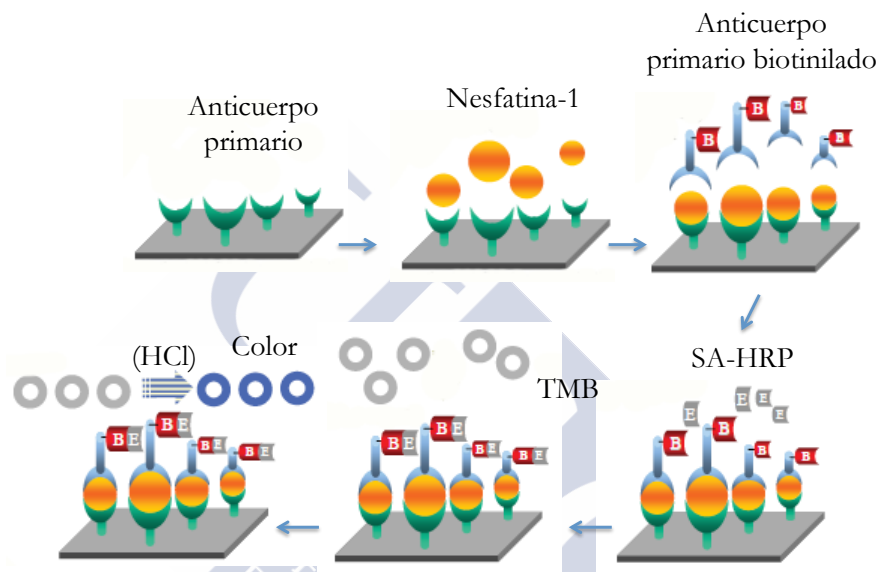


Figura 22: ELISA de tipo sándwich.

20.-Análisis estadístico.

En el caso de muestras con distribución normal se aplicó el test paramétrico t de Student.

En el caso de muestras que no siguen una distribución normal se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney para comparar entre grupos o el test de los rangos con signo de Wilcoxon para estudiar incrementos con respecto al control.

En el estudio de correlaciones bivariadas se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (ρ).

Los datos se representaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (error estándar de la media) o mediana [rango intercuartílico], según se indique.

En todos los casos, se realizaron como mínimo 3 experimentos y se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$.

El análisis estadístico del array de expresión de genoma completo de rata fue realizado por Progenika Biopharma S.L. (ES) de la siguiente manera:

Para la identificación de cambios de expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizó un modelo de regresión lineal teniendo en cuenta el factor condición:

$$Y_i = \text{condición} + \varepsilon$$

donde Y_i es la intensidad Y para cada secuencia i , “condición” se refiere al efecto de la nesfatina-1 en la intensidad observada y ε es el error no medible que reúne la parte no predicha del resto de variables.

Además, con objeto de agrupar todo el conjunto de las muestras, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de los datos) y un cluster jerárquico bidimensional a partir de la lista de genes significativos obtenidos. Los resultados se presentan con un p-valor asociado a cada secuencia tras el test FDR (*False Discovery Rate*) utilizando el software Partek y el valor de cambio de expresión con respecto al control.







RESULTADOS



1.-Expresión génica de NUCB2 en cardiomiocitos humanos y murinos.

La expresión de NUCB2 en cardiomiocitos en cultivo y en tejido cardíaco humano (Fig. 23), de rata (Fig. 24) y de ratón (Fig. 25) se analizó mediante la técnica RT-PCR. Se demostró la expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardíaco humano (aurícula y ventrículo) y en cardiomiocitos ventriculares adultos humanos en cultivo (PromoCell GmbH, Alemania), observándose los mayores niveles de expresión de NUCB2 en tejido auricular cardíaco, siendo estos niveles similares a los de estómago (control positivo) (Fig. 23). También se observó la expresión de NUCB2 en tejido cardíaco de rata y en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo, observando también los mayores niveles en aurícula (Fig. 24); y en corazón de ratón y en la línea celular de cardiomiocitos adultos de ratón HL-1 (Fig. 25). Como gen normalizador se utilizó GAPDH y se realizaron los correspondientes controles de posibles contaminaciones con ADN genómico utilizando agua en lugar de la enzima de retrotranscripción.

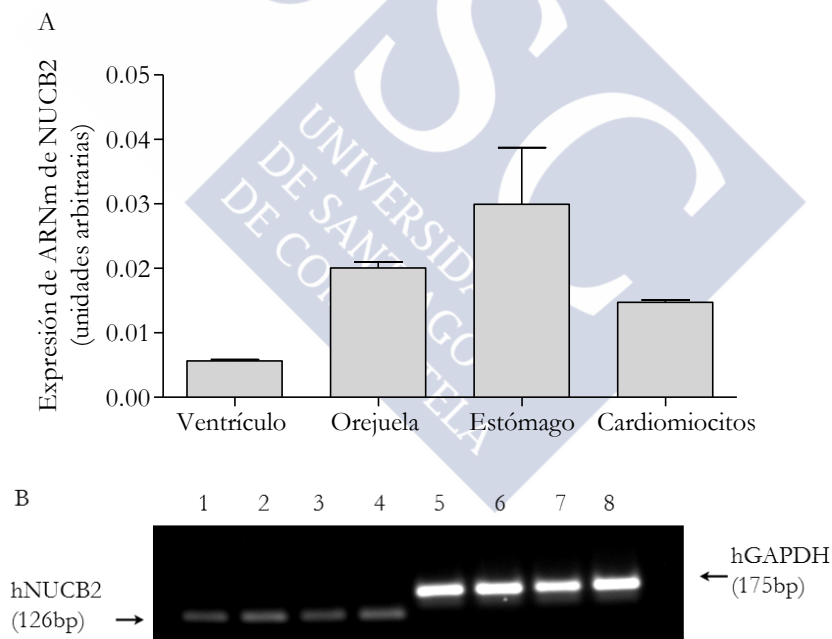


Figura 23: Expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardíaco y cardiomiocitos humanos. **Panel A:** Niveles de expresión de ARNm de NUCB2 (n=3). **Panel B:** Gel de agarosa representativo de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR. Líneas 1 y 5: ventrículo; líneas 2 y 6: aurícula; líneas 3 y 7: estómago; líneas 4 y 8: cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares humanos. Bp: pares de bases.

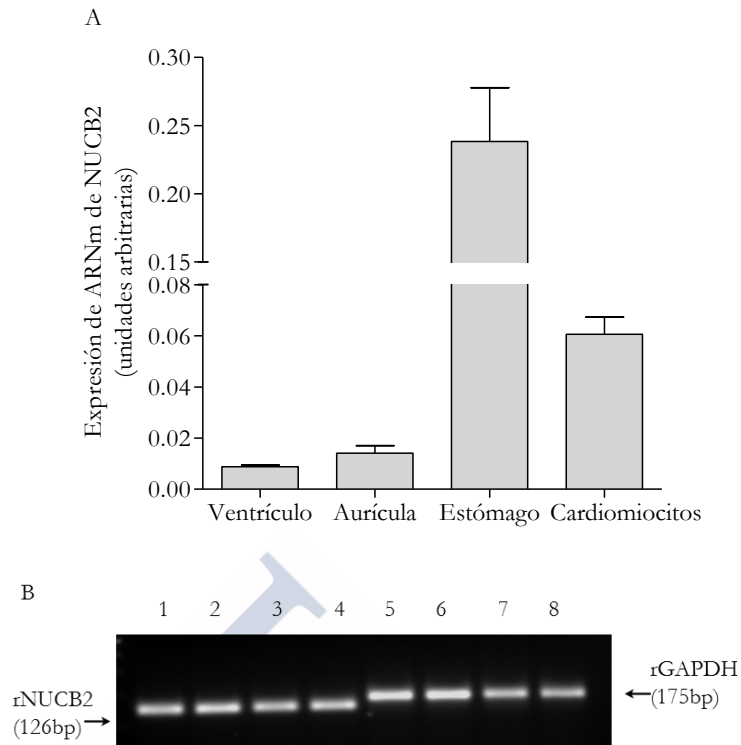


Figura 24: Expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardíaco y cardiomiocitos de rata. **Panel A:** Niveles de expresión de ARNm de NUCB2 (n=3). **Panel B:** Gel de agarosa representativo de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR. Líneas 1 y 5: ventrículo; líneas 2 y 6: aurícula; líneas 3 y 7: estómago; líneas 4 y 8: cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Bp: pares de bases.

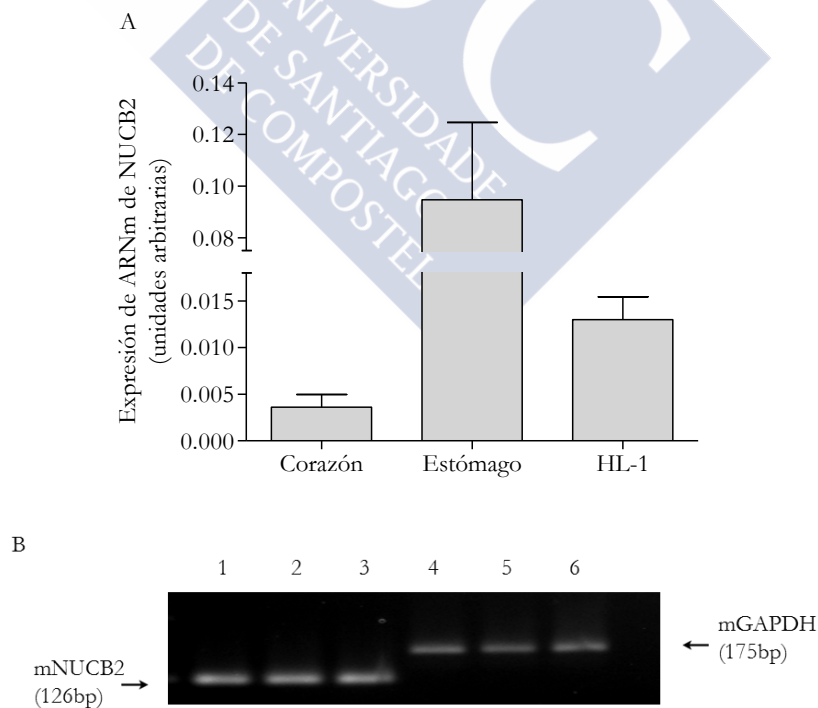


Figura 25: Expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardíaco y cardiomiocitos de ratón. **Panel A:** Niveles de expresión de ARNm de NUCB2 (n=3). **Panel B:** Gel de agarosa representativo de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR. Líneas 1 y 4: corazón; líneas 2 y 5: estómago; líneas 3 y 6: cultivo de la línea celular de cardiomiocitos atriales de ratón HL-1. Bp: pares de bases.

2.-Síntesis de nesfatina-1 por cardiomiocitos humanos y murinos.

Utilizando la técnica de western blot, se demostró la producción de nesfatina-1, con un peso molecular correspondiente a 9.5 kDa, en tejido cardíaco y cardiomiocitos en cultivo en humano (PromoCell GmbH, Alemania) (Fig. 26.A), rata (Fig. 26.B) y ratón (Fig. 26.C), utilizando el péptido comercial de nesfatina-1 como control de peso molecular.

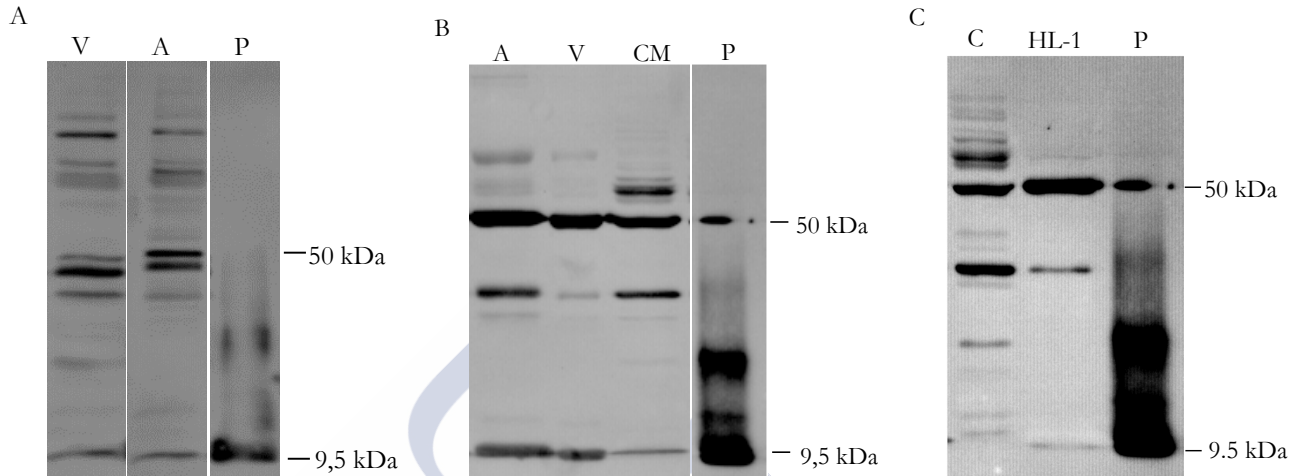


Figura 26: Western blot representativo de los niveles de expresión proteica de nesfatina-1. **Panel A:** Humano. **Panel B:** Rata. **Panel C:** Ratón. V: tejido ventricular, A: tejido auricular, CM: cardiomiocitos, P: péptido comercial de nesfatina-1.

Utilizando las técnicas de microscopía confocal (Fig. 27.A) e inmunohistoquímica (Fig. 27.B), se determinó la localización celular de nesfatina-1 en tejido auricular cardíaco humano y en cardiomiocitos auriculares humanos en cultivo (obtenidos del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela), observando una localización citoplasmática perinuclear de nesfatina-1 en cardiomiocitos en cultivo. Se observó que el citoplasma de la mayoría de las fibras musculares en los cortes de tejido auricular humano también es inmunoreactivo para el anticuerpo contra nesfatina-1 y contra la prohormona convertasa 1/3 (Fig. 27.A). Para comprobar la pureza del cultivo de los cardiomiocitos humanos se utilizó desmina⁶¹⁵ (Fig. 27.B).

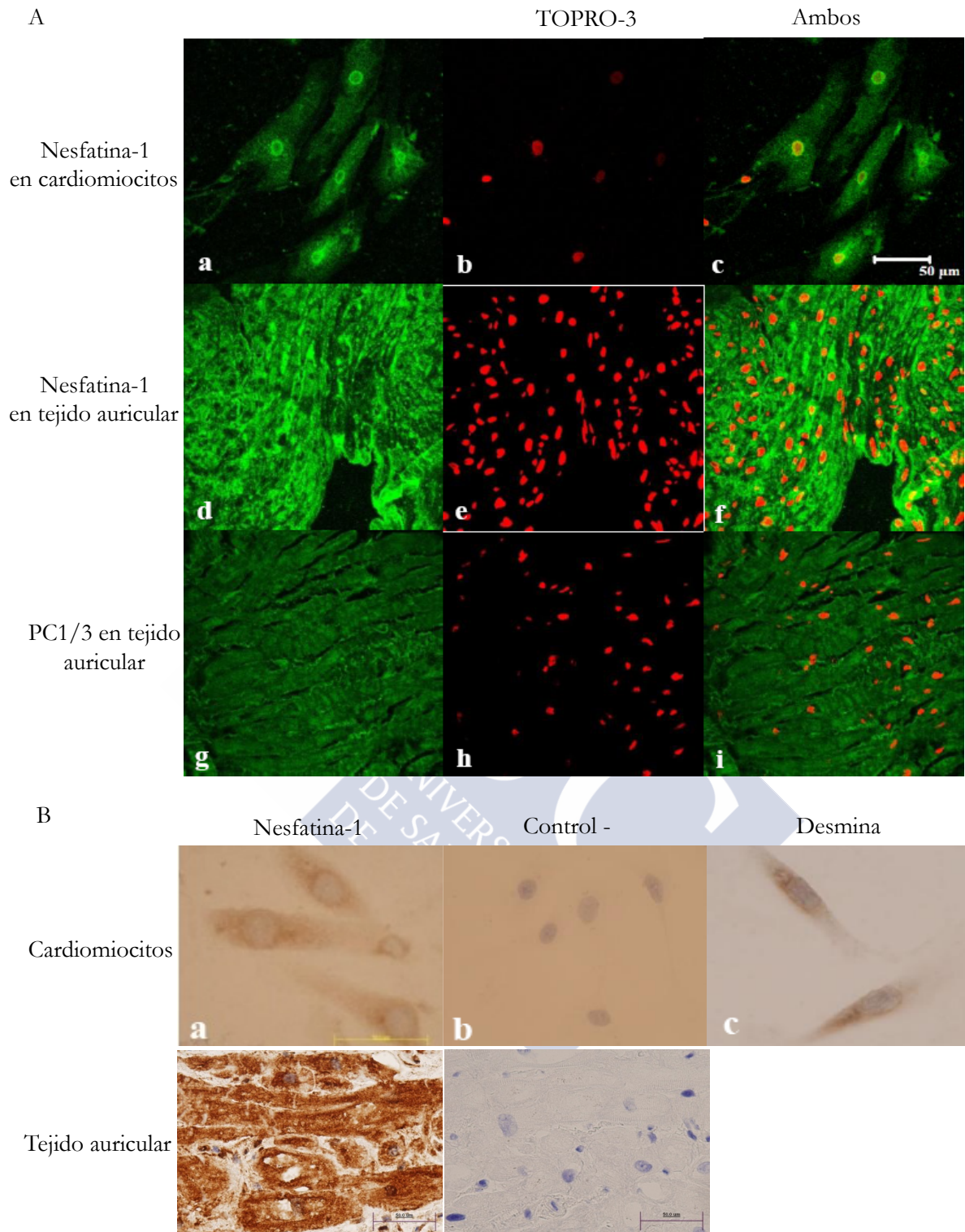


Figura 27: Expresión de nesfatina-1 en cardiomiocitos auriculares y en tejido auricular humano. **Panel A:** Localización de nesfatina-1 y PC1/3 utilizando la técnica de microscopía confocal. **Panel B:** Localización de nesfatina-1 mediante inmunohistoquímica, utilizando desmina como un marcador de cardiomiocitos. Escala: 50 µM.

Asimismo, se determinó la localización de nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo mediante la técnica de microscopía confocal (Fig. 28.A) e

inmunohistoquímica (Fig. 28.B), observándose en ambos casos la misma distribución citoplasmática perinuclear que se observaba en el caso de los cardiomiocitos humanos.

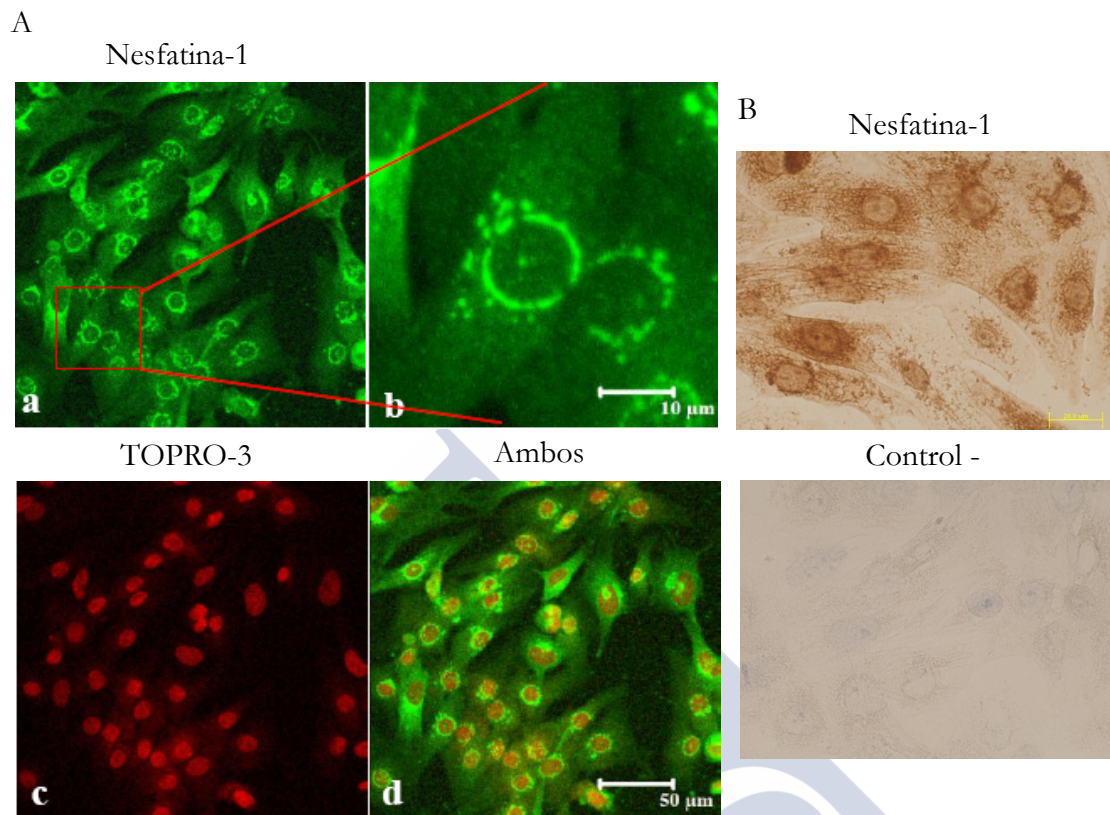


Figura 28: Expresión de nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Localización de nesfatina-1 mediante microscopía confocal. Escala A.b: 10 μ M, escala A.d: 50 μ M. **Panel B:** Localización de nesfatina-1 utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Escala: 20 μ M.

3.-Secreción de NUCB2/nesfatina-1 por cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo.

Se demostró la secreción de NUCB2/nesfatina-1 al medio de cultivo por cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo mediante la técnica de ELISA, observando concentraciones de 4.55 ± 0.52 ng/mg de proteína (n=21).

Debido al número reducido de cardiomiocitos humanos en cultivo que se obtiene, no se realizó la determinación de la secreción de NUCB2/nesfatina-1 en estas células.

4.-Efecto del tratamiento con nesfatina-1 sobre la movilización de GLUT-4.

Mediante la técnica de microscopía confocal se estudió la movilización del transportador de glucosa GLUT-4 (media \pm SEM) en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo (n=216) desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular (Fig. 29). Se demostró que el tratamiento durante 30 minutos con nesfatina-1 induce una

movilización de GLUT-4 desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular a dosis de 0.1 μM (1.12 ± 0.023 ; $p: 0.0366$) y 1 μM (1.25 ± 0.030 ; $p < 0.0001$), con niveles a dosis de 1 μM incluso superiores a la insulina (1.14 ± 0.021 ; $p: 0.0076$), utilizada como control positivo, con respecto al control (1.038 ± 0.031) (Fig. 30.A). Además, se demostró que el tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 1 μM induce una movilización del transportador GLUT-4 de forma tiempo-dependiente, incrementando dicha movilización de forma significativa a tiempos de 5 minutos (1.02 ± 0.018 ; $p: 0.012$), 10 minutos (1.07 ± 0.02 ; $p < 0.0001$) y 30 minutos (1.004 ± 0.015 ; $p: 0.0492$) con respecto al control (0.95 ± 0.01) (Fig. 30.B).

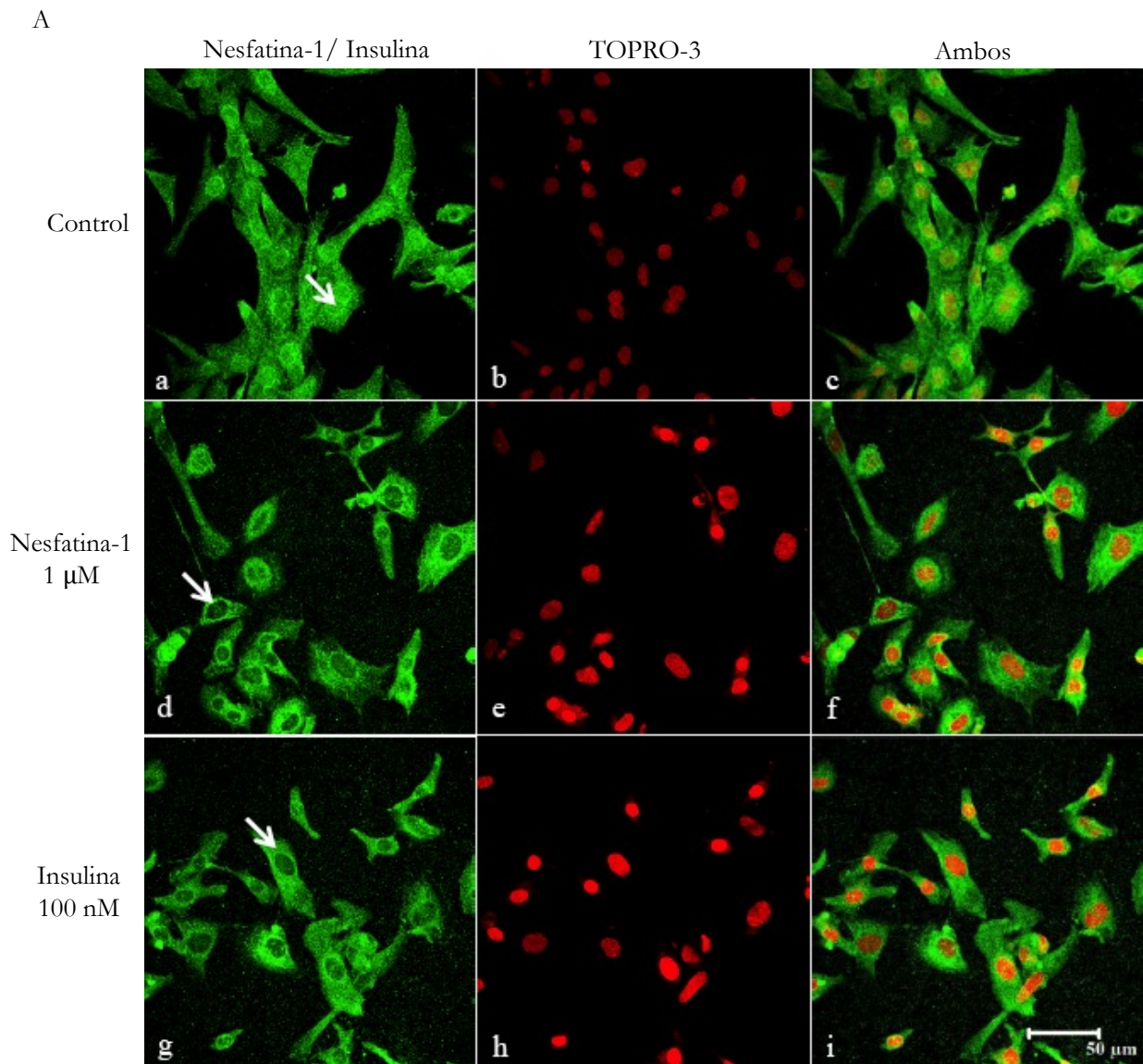


Figura 29: Estudio por microscopía confocal sobre la translocación del transportador de glucosa GLUT-4. Microfotografías mostrando la movilización del transportador GLUT-4 hacia la periferia celular en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo (flechas). Escala: 50 μm .

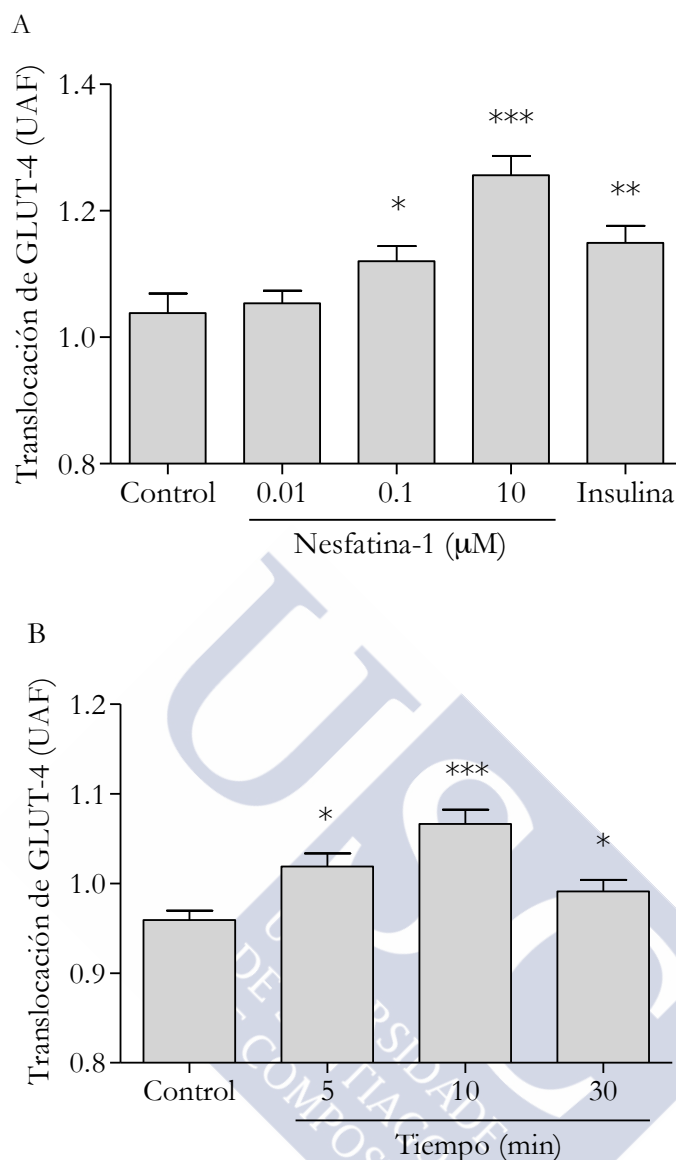


Figura 30: Translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la periferia celular en cardiomiocitos neonatales de rata. Análisis estadístico del ratio entre la fluorescencia correspondiente a GLUT-4 entre la periferia celular y las regiones citoplasmáticas perinucleares tras el tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 0.01-1 μM durante 30 minutos (**Panel A**), y a dosis de 1 μM durante 5-30 minutos (**Panel B**), utilizando insulina 100 nM como control positivo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

5.-Efecto de nesfatina-1 sobre la captación de glucosa por cardiomiocitos murinos.

Se demostró que el tratamiento con nesfatina-1 durante 2.5 horas de la línea celular HL-1 incrementa significativamente la captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa ($n=11$) en un $12.5 \pm 3.9\%$ a dosis de 0.1 nM ($p: 0.012$); en un $11.9 \pm 4\%$ a dosis de 1 nM ($p: 0.012$) y en un $26 \pm 5.4\%$ a dosis de 100 nM ($p: 0.0010$), mientras que el tratamiento con insulina (control positivo) durante 1 hora a dosis de 100 nM incrementa la captación de 2-desoxi-D- H^3 -

glucosa en un $44.3 \pm 8.8\%$ ($p < 0.0001$) (Fig. 31.A).

El tratamiento con nesfatina-1 de cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo también incrementa de forma significativa la captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa ($n=8$) en un $14.8 \pm 3.3\%$ a dosis de 10 nM ($p: 0.009$) y en un $23 \pm 5.5\%$ a dosis de 100 nM ($p: 0.009$), mientras que el tratamiento con insulina 100 nM durante 1 hora incrementa la captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa en un $35.2 \pm 6.2\%$ ($p: 0.009$) (Fig. 31.B).

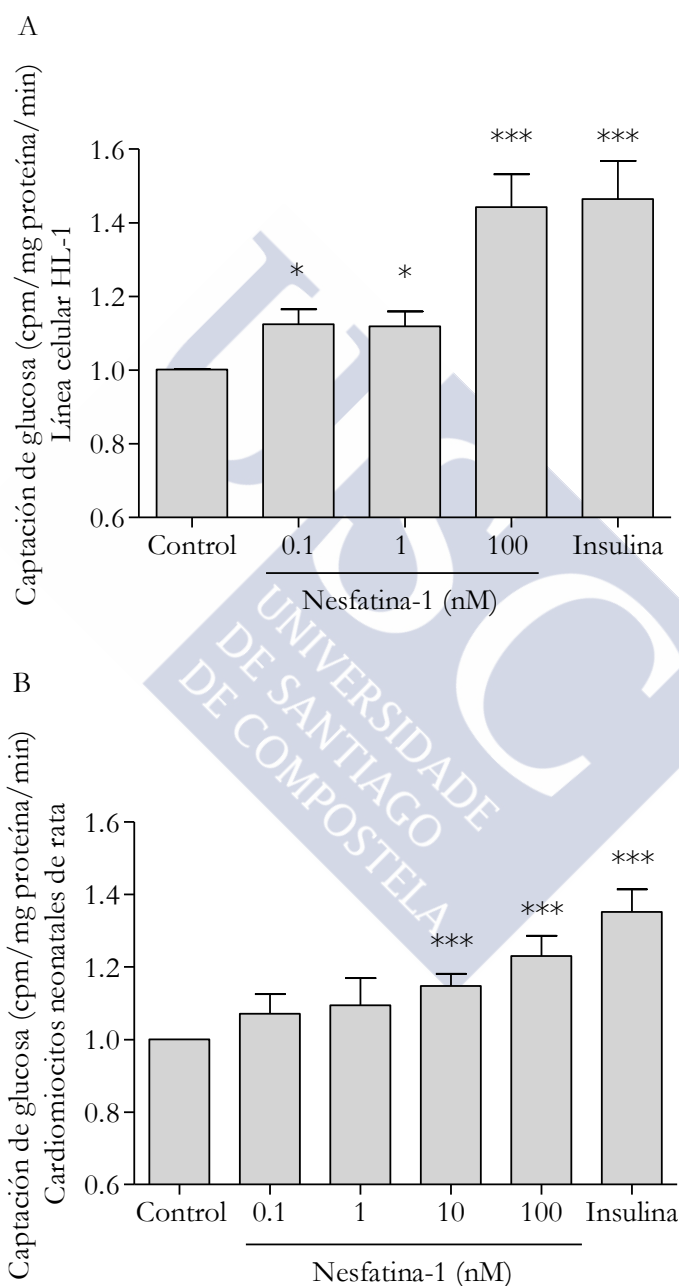


Figura 31: Captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa por cardiomiocitos tras el tratamiento con nesfatina-1. **Panel A:** Representación gráfica de la captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa por la línea celular HL-1 tras el tratamiento con nesfatina-1 durante 2.5 horas. **Panel B:** Análisis estadístico de la captación de 2-desoxi-D- H^3 -glucosa por cardiomiocitos neonatales de rata tras el tratamiento con nesfatina-1 durante 2.5 horas. Se utilizó insulina 100 nM durante 1 hora como control positivo. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

6.-Efecto de nesfatina-1 sobre la activación de AKT, AS160 y ERK1/2.

ERK1/2, AKT y AS160 son kinasas relacionadas con la estimulación de la translocación de GLUT-4 y la captación de glucosa en el músculo esquelético y en el corazón,^{616,617} por lo que estudiamos su posible fosforilación ante el tratamiento con nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo. Se demostró que el tratamiento con nesfatina-1 induce un incremento dosis/tiempo dependiente en la fosforilación de estas kinasas (Fig. 32-34).

El tratamiento con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.01-1 μM durante 10 minutos induce un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2 a dosis de 0.1 μM de un $56 \pm 0.21\%$ (p: 0.046) y a dosis de 1 μM de un $213 \pm 0.61\%$ (p: 0.015) (n=7) (Fig. 32.A). El tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 1 μM durante 5-30 minutos induce un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2 de un $109 \pm 0.34\%$ (p: 0.031) (n=6) a 10 minutos de tratamiento (Fig. 32.B).

Asimismo, el tratamiento con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.01-1 μM durante 10 minutos induce un incremento significativo de la fosforilación de AKT a dosis de 0.01 μM de un $92 \pm 0.35\%$ (p: 0.039), a dosis de 0.1 μM de un $192 \pm 0.66\%$ (p: 0.023) y a dosis de 1 μM de un $258 \pm 0.83\%$ (p: 0.007) (n=8) (Fig. 33.A); y el tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 1 μM durante 5-30 minutos induce un incremento significativo de la fosforilación de AKT a 10 minutos de un $50 \pm 0.18\%$ (p: 0.039) (n=8) (Fig. 33.B).

Finalmente, el tratamiento con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.01-1 μM induce un incremento significativo de la fosforilación de AS160 de un $25 \pm 0.08\%$ a 5 minutos (p: 0.031), de un $42 \pm 0.11\%$ a 10 minutos (p: 0.031) y de un $50 \pm 0.10\%$ a 30 minutos (p: 0.031) (n=6) (Fig. 34).

Debido al papel de la nesfatina-1 sobre el metabolismo energético, decidimos estudiar su posible papel sobre la fosforilación de AMPK y ACC, ambas kinasas implicadas en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos respectivamente.^{618,619} Sin embargo, no hemos podido demostrar que nesfatina-1 induzca la activación ni de AMPK ni de ACC en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo.

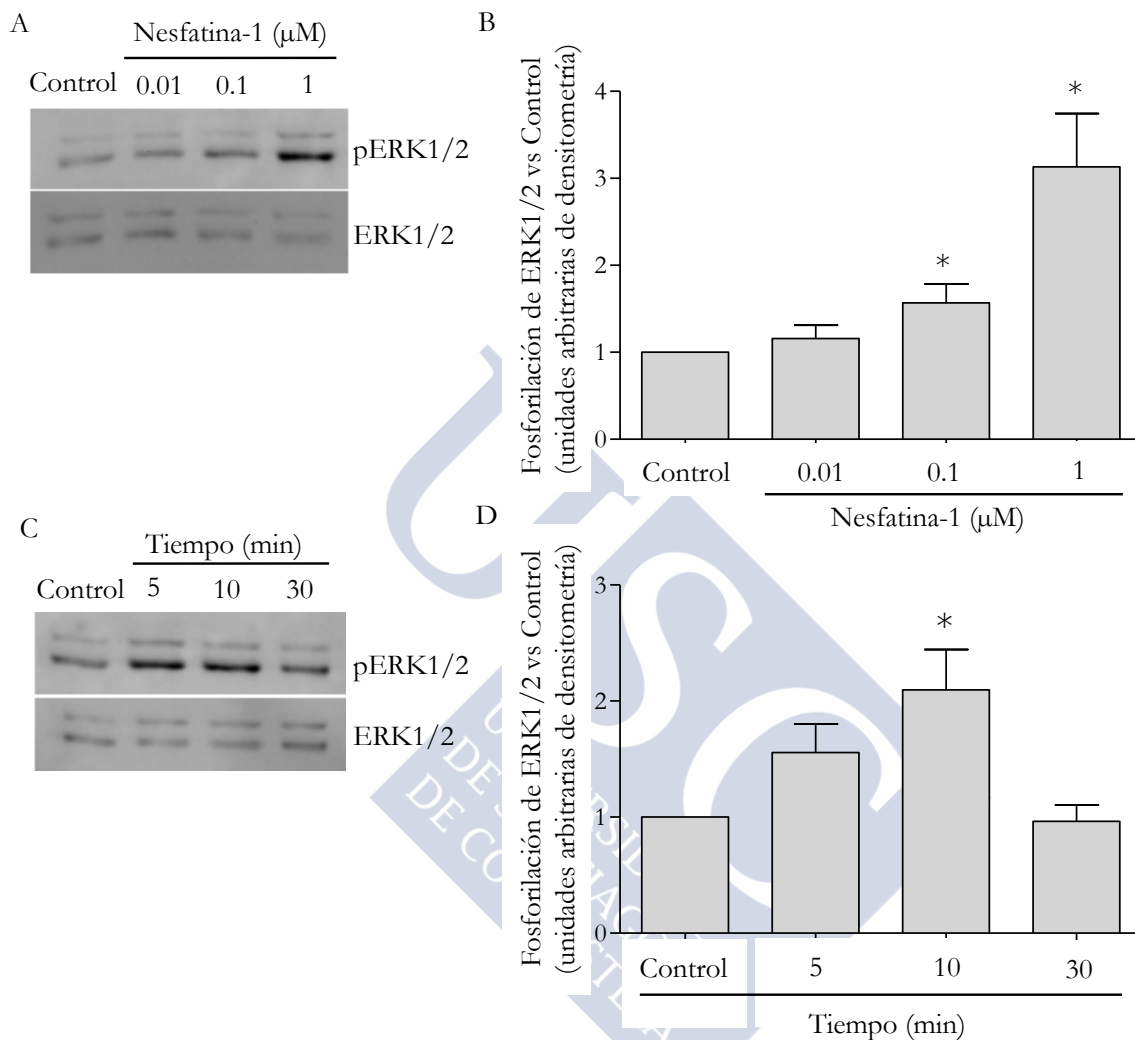


Figura 32: Efecto de nesfatina-1 sobre la activación de ERK1/2 en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Western blot representativo del efecto de nesfatina-1 sobre la fosforilación de ERK1/2 tras 10 minutos de tratamiento. **Panel B:** Análisis estadístico de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con nesfatina-1 durante 10 minutos. **Panel C:** Western blot representativo del efecto de nesfatina-1 a una dosis de 1 μM sobre la fosforilación de ERK1/2. **Panel D:** Análisis estadístico de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con nesfatina-1 a una dosis de 1 μM. UAD: unidades arbitrarias de densitometría.*p<0.05, ***p<0.001.

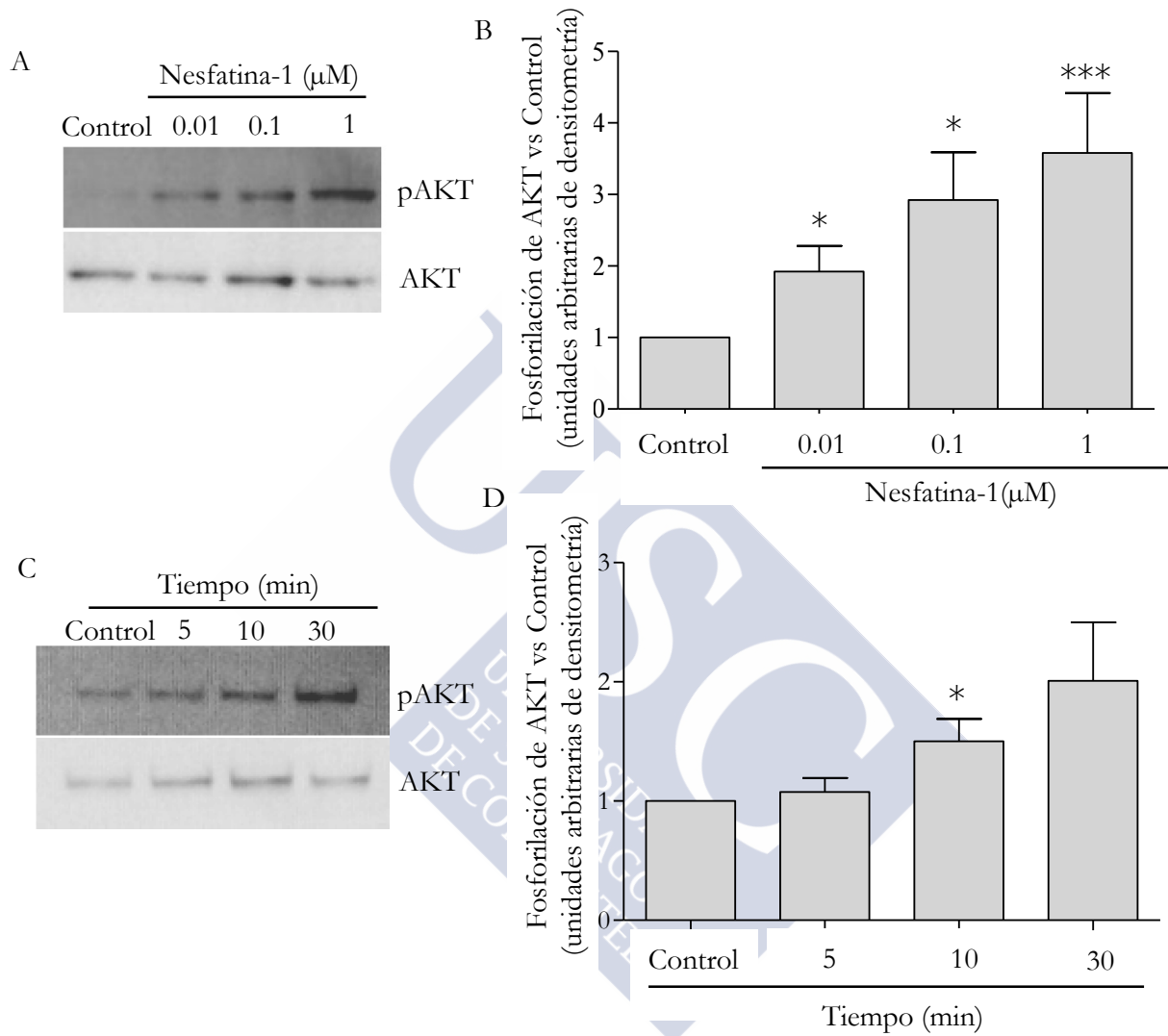


Figura 33: Efecto de nesfatina-1 sobre la activación de AKT en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Western blot representativo del efecto de nesfatina-1 sobre la fosforilación de AKT tras 10 minutos de tratamiento. **Panel B:** Análisis estadístico de la activación de AKT tras el tratamiento con nesfatina-1 durante 10 minutos. **Panel C:** Western blot representativo del efecto de nesfatina-1 a una dosis de 1 μM sobre la fosforilación de AKT. **Panel D:** Análisis estadístico de la activación de AKT tras el tratamiento con nesfatina-1 a una dosis de 1 μM. UAD: unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

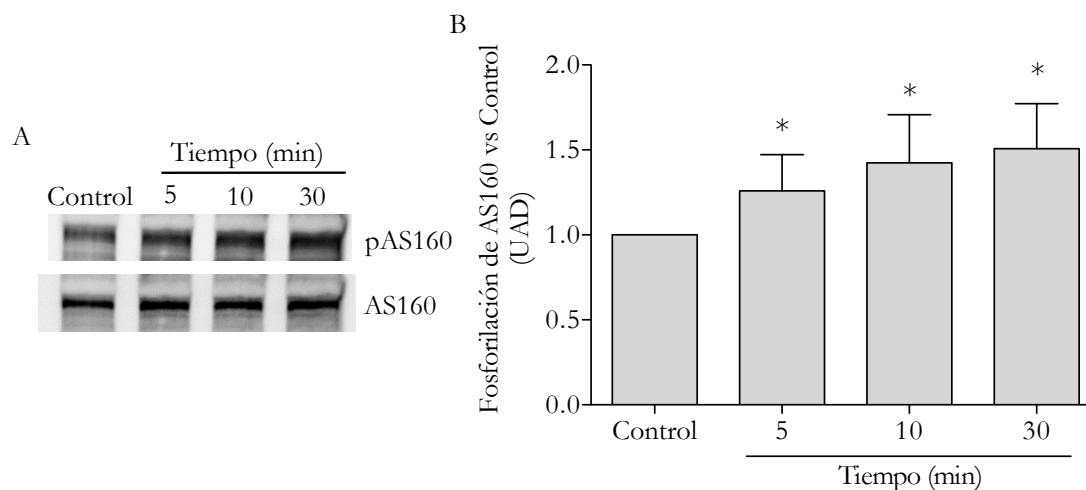


Figura 34: Efecto de nesfatina-1 sobre la activación de AS160 en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Western blot representativo del efecto de nesfatina-1 sobre la fosforilación de AS160 tras el tratamiento con nesfatina-1 a una dosis de 1 μM . **Panel B:** Análisis estadístico de la activación de AS160 tras el tratamiento con nesfatina-1 a una dosis de 1 μM . UAD: unidades arbitrarias de densitometría. * $p < 0.05$.

7.-Efecto de nesfatina-1 sobre la captación de ácidos grasos por cardiomiocitos neonatales de rata.

Para estudiar el posible efecto de nesfatina-1 sobre la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.01-1 μM durante 30 minutos. Tras el tiempo de tratamiento se incubaron las células con ácido dodecanoico marcado con Bodipy[®] durante 1 minuto y se determinó su incorporación mediante citometría de flujo. Se demostró que el tratamiento con nesfatina-1 induce un incremento en la captación de ácidos grasos a dosis de 0.1 μM de un $6.4 \pm 0.01\%$ (p : 0.0313) y a dosis de 1 μM de un $7.9 \pm 0.02\%$ (p : 0.0313) ($n=6$) (Fig. 35).

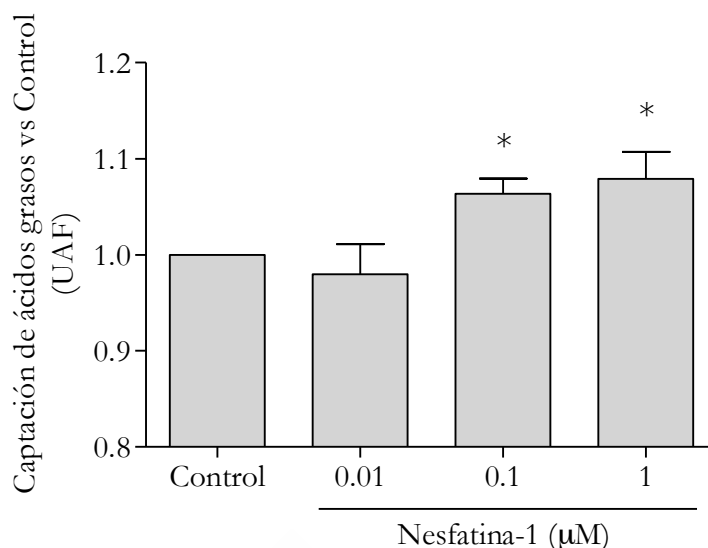


Figura 35: Análisis estadístico de la captación de ácido dodecanoico marcado con Bodipy® por cardiomiocitos neonatales de rata utilizando citometría de flujo. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia * $p < 0.05$.

8.-Regulación de los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata por estímulos proinflamatorios y antiinflamatorios.

Para estudiar el efecto de distintos reguladores de procesos inflamatorios sobre la expresión de NUCB2 en cardiomiocitos, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata durante 24 horas con $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β y dexametasona. Tras el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$ a dosis de 0.1-20 ng/mL, se observó un incremento de la expresión de ARNm de NUCB2 de un $11.3 \pm 0.04\%$ (p : 0.039, $n=8$) a dosis de 20 ng/mL (Fig. 36.A). El tratamiento con dexametasona a dosis de 0.1-100 nM induce un incremento estadísticamente significativo en la expresión de ARNm de NUCB2 de un $82 \pm 0.15\%$ (p : 0.007) a dosis de 10 nM y de un $124 \pm 0.27\%$ (p : 0.007) ($n=8$) a dosis de 100 nM (Fig. 36.B). El tratamiento tanto con IL-6 como con IL-1 β a dosis de 0.1-20 ng/mL no induce ningún cambio significativo en la expresión del ARNm de NUCB2 ($n=4$) (Fig. 36 C-D).

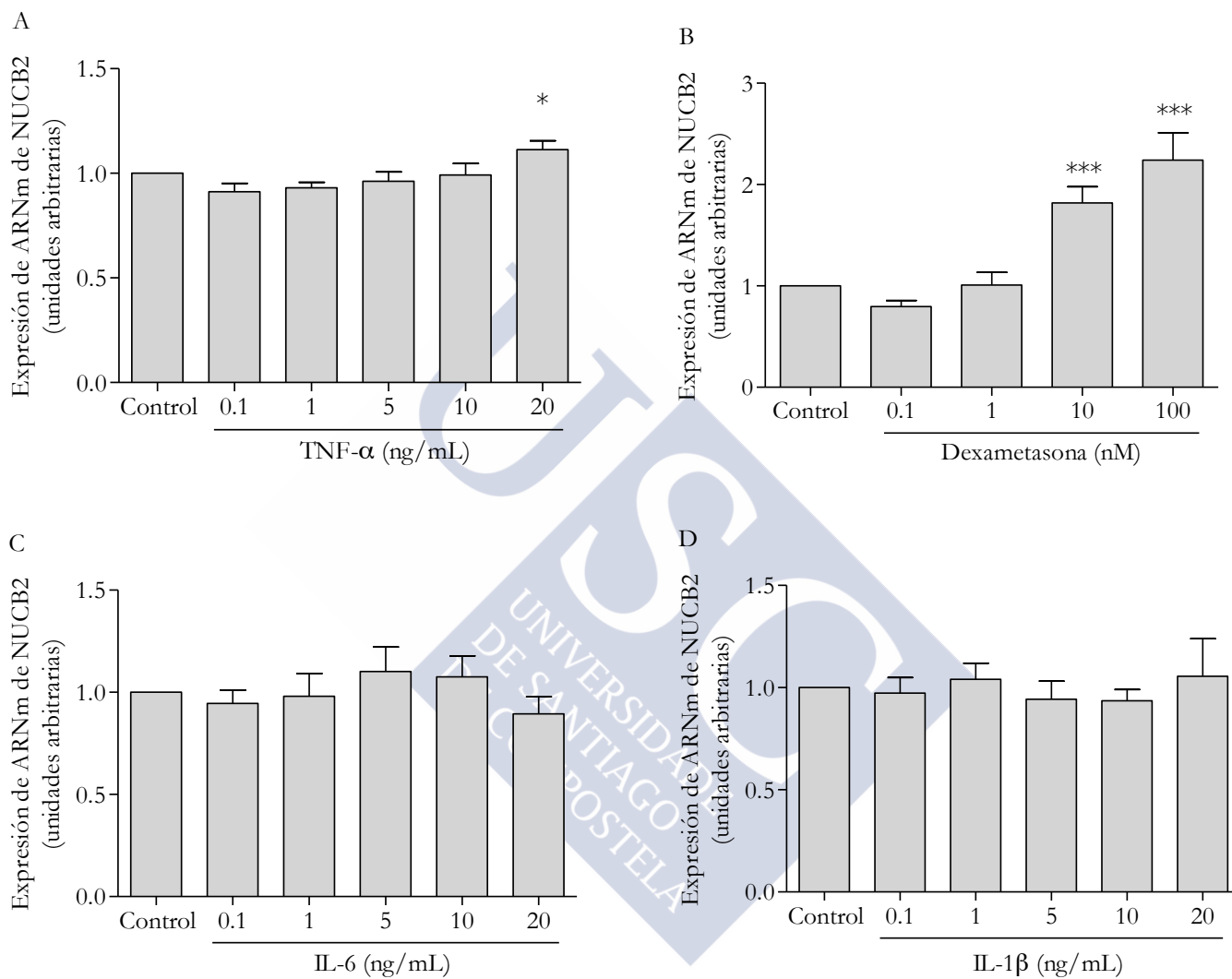


Figura 36: Efecto del tratamiento con reguladores inflamatorios sobre la expresión del ARNm de NUCB2 en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Tratamiento con TNF- α durante 24 horas. **Panel B:** Tratamiento con dexametasona durante 24 horas. **Panel C:** Tratamiento con IL-6 durante 24 horas. **Panel D:** Tratamiento con IL-1 β durante 24 horas. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

9.-Regulación de los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata por la insulina.

Debido al papel de nesfatina-1 como coadyuvante de la insulina, se estudió el posible efecto del tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo con insulina durante 24 horas sobre la expresión génica de NUCB2/nesfatina-1. Se demostró que el tratamiento con insulina a dosis de 0.1-100 nM produce un descenso de la expresión de ARNm de NUCB2 a dosis de 10 nM de un $23\pm 0.05\%$ ($p: 0.031$) y a dosis de 100 nM de un $30\pm 0.06\%$ ($p: 0.03$, $n=6$) (Fig. 37).

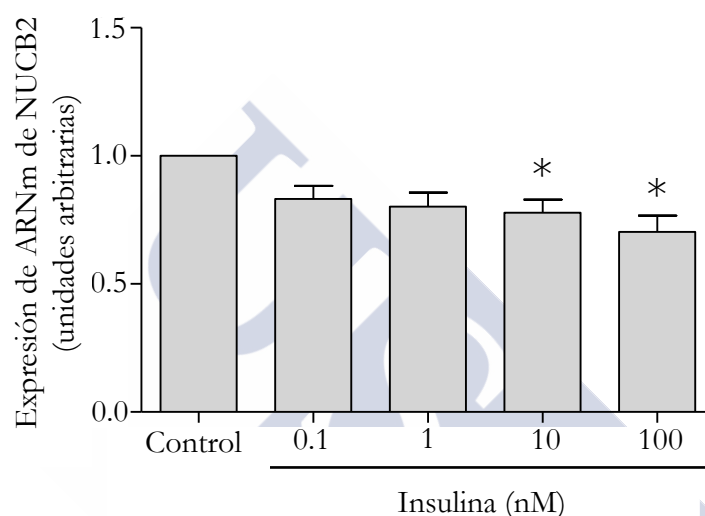


Figura 37: Efecto del tratamiento con insulina sobre la expresión del ARNm de NUCB2 en cardiomiocitos neonatales de rata. ** $p < 0.01$.

10.-Regulación de los niveles de expresión cardiacos de nesfatina-1 en rata por la dieta, el ayuno, la obesidad inducida genéticamente y el retraso en el destete.

Dieta alta en grasa.

En ratas alimentadas con dieta alta en grasa durante 18 semanas se demostró un incremento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido auricular cardíaco (0.029 ± 0.002 ; $p: 0.007$) con respecto a las alimentadas con dieta estándar (0.017 ± 0.002) ($n=8$), mientras que en el tejido ventricular no se observó ninguna diferencia (Fig. 38.A). A nivel proteico también se observó una mayor expresión de nesfatina-1 en tejido auricular de ratas alimentadas con dieta alta en grasa con respecto a las ratas control (Fig. 38.B).

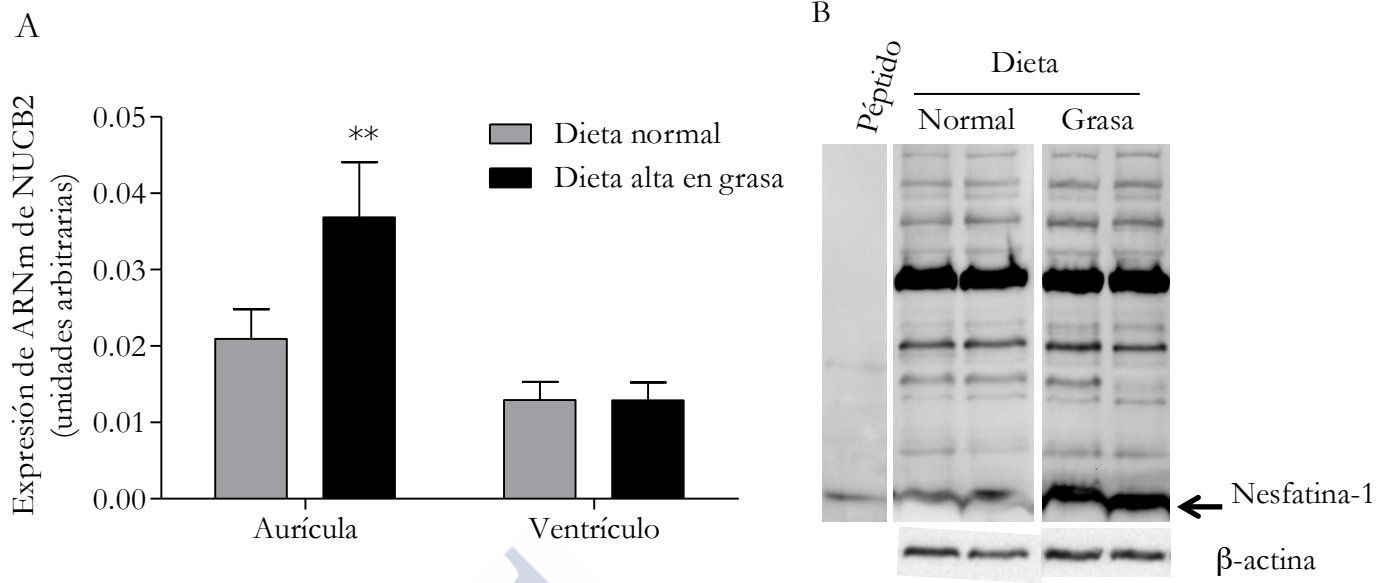


Figura 38: Influencia de la dieta en los niveles de expresión de nesfatina-1 en tejido cardiaco de ratas. **Panel A:** Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en aurícula y ventrículo en ratas alimentadas con dieta alta en grasa o dieta normal. **Panel B:** Western blot representativo de los niveles de expresión de nesfatina-1 en tejido auricular en función de la dieta. **p<0.01.

Como cabría esperar debido al diseño del experimento, las ratas alimentadas con dieta alta en grasa tienen un porcentaje de grasa corporal mayor que las ratas alimentadas con dieta normal (Fig. 39.A). Teniendo en cuenta todas las ratas independientemente del tipo de dieta, se demostró una correlación positiva entre los niveles auriculares de ARNm de NUCB2 y el porcentaje de grasa corporal ($p: 0.001$) ($n=16$) (Fig. 39.B), así como también entre los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 auriculares y los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 ($p: 0.006$) ($n=10$) (Fig. 39.C). Los niveles de nesfatina-1 en plasma se correlacionan con el porcentaje de grasa corporal ($p: 0.006$) (Fig. 39.D).

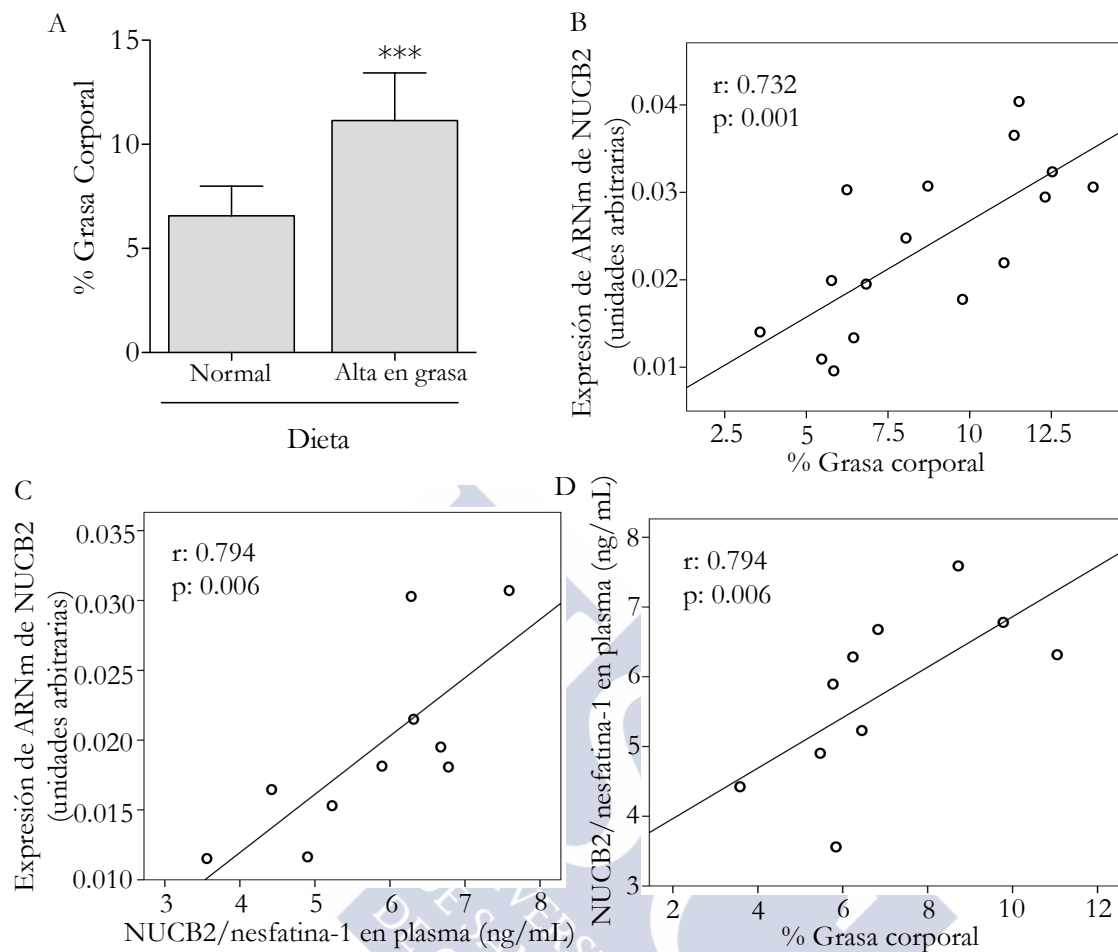


Figura 39: Correlación entre los niveles de expresión de NUCB2 con el porcentaje de grasa corporal. **Panel A:** Representación del porcentaje de grasa corporal en función de la dieta. **Panel B:** Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en aurícula con el porcentaje de grasa corporal. **Panel C:** Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en aurícula con los niveles de nesfatina-1 en plasma. **Panel D:** Correlación entre los niveles de nesfatina-1 en plasma y el porcentaje de grasa corporal. r : rho de Spearman. $***p < 0.001$.

La expresión génica del principal transportador de ácidos grasos a nivel cardiaco (CD36),⁶¹⁶ en tejido auricular fue similar entre las ratas alimentadas con dieta estándar y las alimentadas con dieta alta en grasa. No se encontró ninguna correlación entre los niveles de expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 y CD36, así como tampoco entre los niveles de expresión de ARNm de CD36 y el porcentaje de grasa corporal ($n=8$) (Fig. 40).

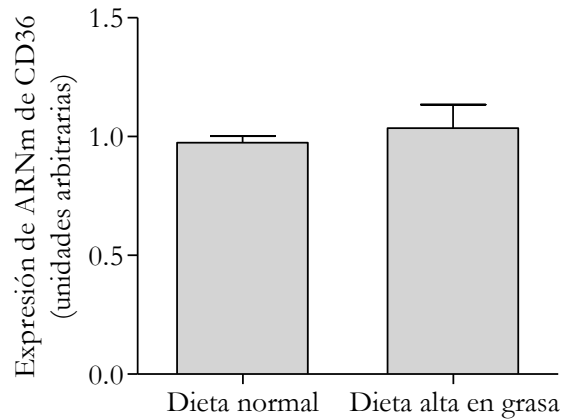


Figura 40: Niveles de expresión de ARNm del transportador de ácidos grasos CD36 en tejido auricular de ratas alimentadas con dieta normal o con dieta alta en grasa durante 18 semanas.

Ayuno.

Estudiamos la influencia del ayuno sobre los niveles de expresión auriculares cardíacos de NUCB2, observando que no existen diferencias significativas entre las ratas en ayuno durante 36 horas y las alimentadas *ad libitum* (n=6) (Fig. 41). En este caso, al existir diferencias en los niveles de expresión de GAPDH, utilizamos como gen normalizador la subunidad 18S del ARN ribosómico.

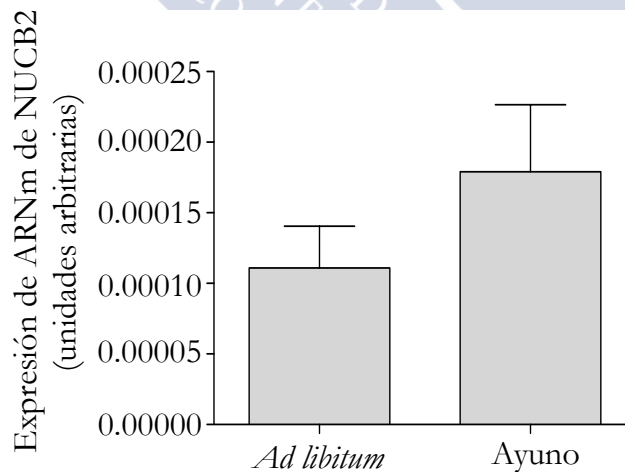


Figura 41: Niveles de expresión de NUCB2 en tejido auricular cardíaco de ratas alimentadas *ad libitum* o en ayuno durante 36 horas.

Obesidad de origen genético.

En ratas Zucker, ratas con una mutación en el receptor de leptina que las hace genéticamente obesas (Fa/Fa),⁴²⁴ observamos que los niveles de expresión auricular cardíacos de NUCB2 se incrementan de forma significativa tras 21 semanas de vida con alimentación *ad libitum*, tanto en los controles heterocigotos ($p < 0.0001$) como en las ratas homocigotas obesas ($p < 0.0001$) ($n=10$) (Fig. 42.A), de forma que independientemente del genotipo se observa un mayor nivel de expresión de NUCB2 en tejido cardíaco con la edad ($n=20$, $p < 0.0001$) (Fig. 42.B).

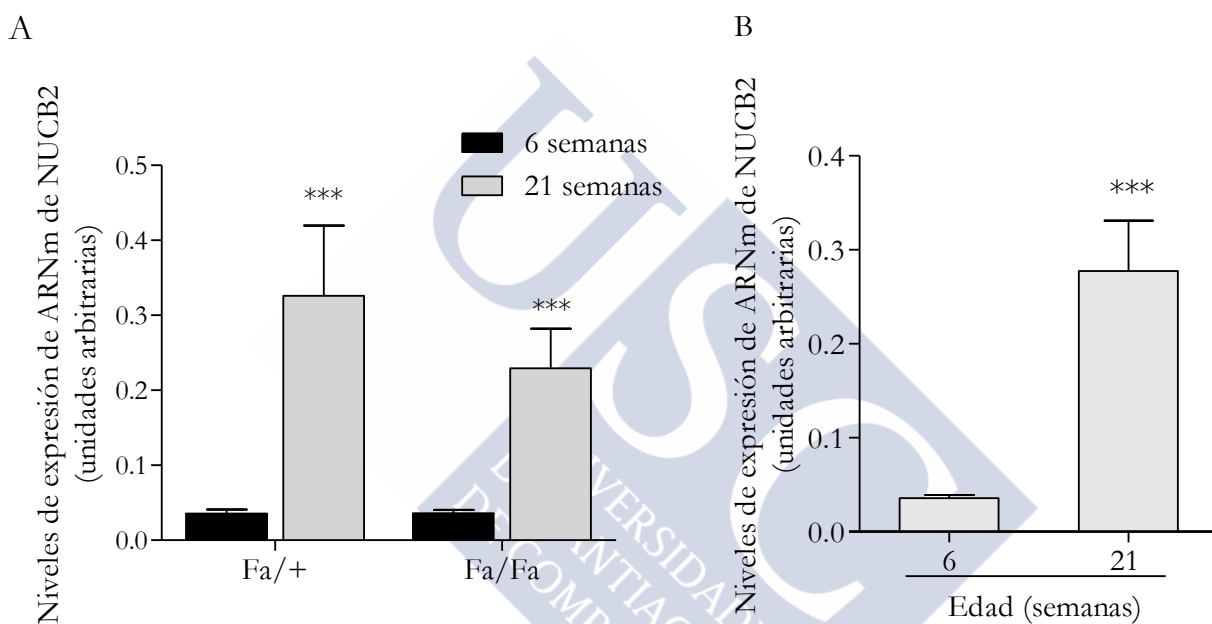


Figura 42: Niveles de expresión de NUCB2 en tejido auricular cardíaco de ratas Zucker. **Panel A:** Expresión de NUCB2 en función del genotipo a 6 y 21 semanas de vida. **Panel B:** Expresión de NUCB2 en función de la edad, independientemente del genotipo. *** $p < 0.001$.

Por otro lado, tanto a las 6 semanas de vida como a las 21 semanas se observa un incremento significativo en el porcentaje de grasa corporal en las ratas obesas con respecto a las ratas control ($p < 0.0001$), como cabría esperar debido a las características del modelo animal (Fig. 43).

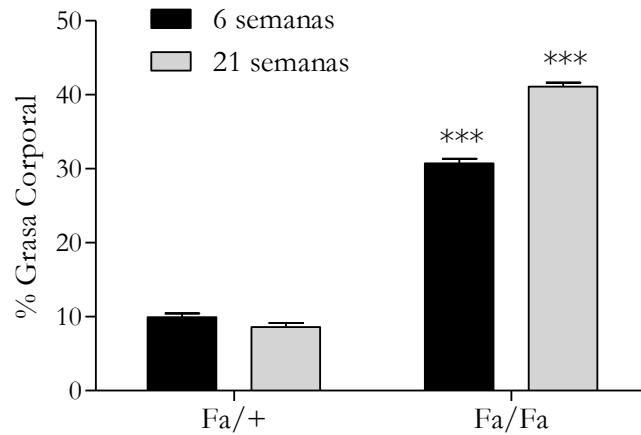


Figura 43: Porcentaje de grasa corporal en ratas genéticamente obesas tras 6 y 21 semanas de vida. *** $p < 0.001$.

Asimismo, al estudiar los gramos de masa grasa y magra, se observa un incremento en la cantidad de ambos tejidos a las 21 semanas de edad (Fig. 44).

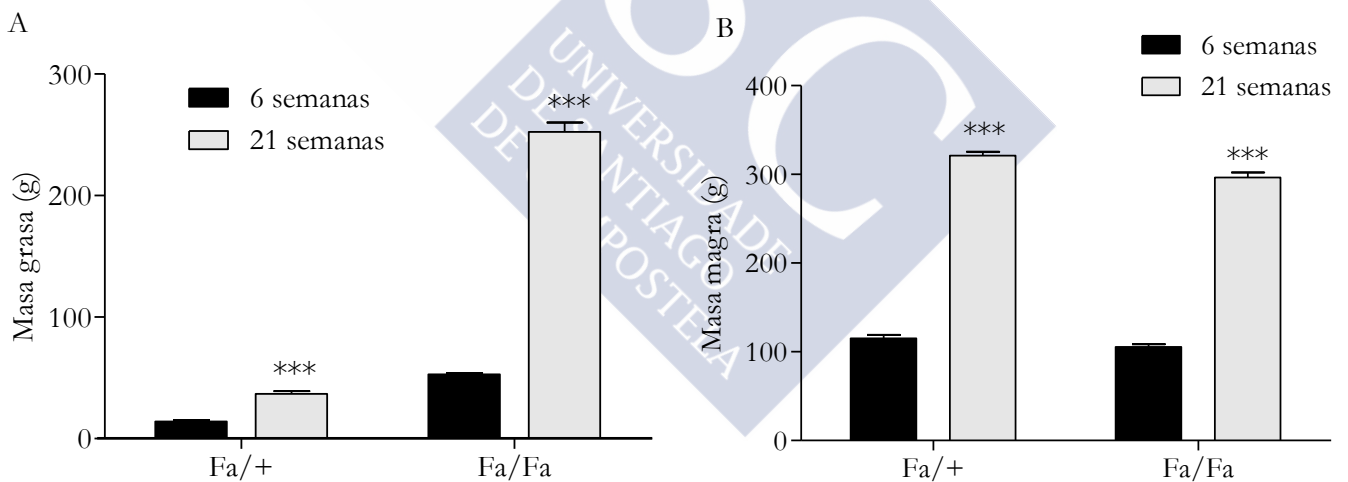


Figura 44: Gramos de masa grasa (**Panel A**) y magra (**Panel B**) total en ratas genéticamente obesas tras 6 y 21 semanas de vida. *** $p < 0.001$.

No se observa ninguna asociación entre los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 a nivel cardiaco con el porcentaje o los gramos de grasa corporal. Sin embargo, se observa una correlación estadísticamente significativa con la cantidad de masa magra ($\rho: 0.719, p < 0.0001, n=40$).

Retraso en el destete.

Estudiamos el efecto del retraso en el destete sobre la expresión de ARNm de NUCB2 en tejido auricular de rata. En este caso, se observaron variaciones en los niveles de expresión de GAPDH entre ambos grupos, por lo que utilizamos el ARNr 18S como gen normalizador. Se demostró que el destete a los 28 días induce significativamente el incremento de los niveles de expresión cardiacos de NUCB2 a nivel de ARNm y proteína con respecto al destete normal (21 días) ($n=10$, $p: 0.004$), sin observar ninguna correlación con el porcentaje de grasa corporal (Fig. 45).

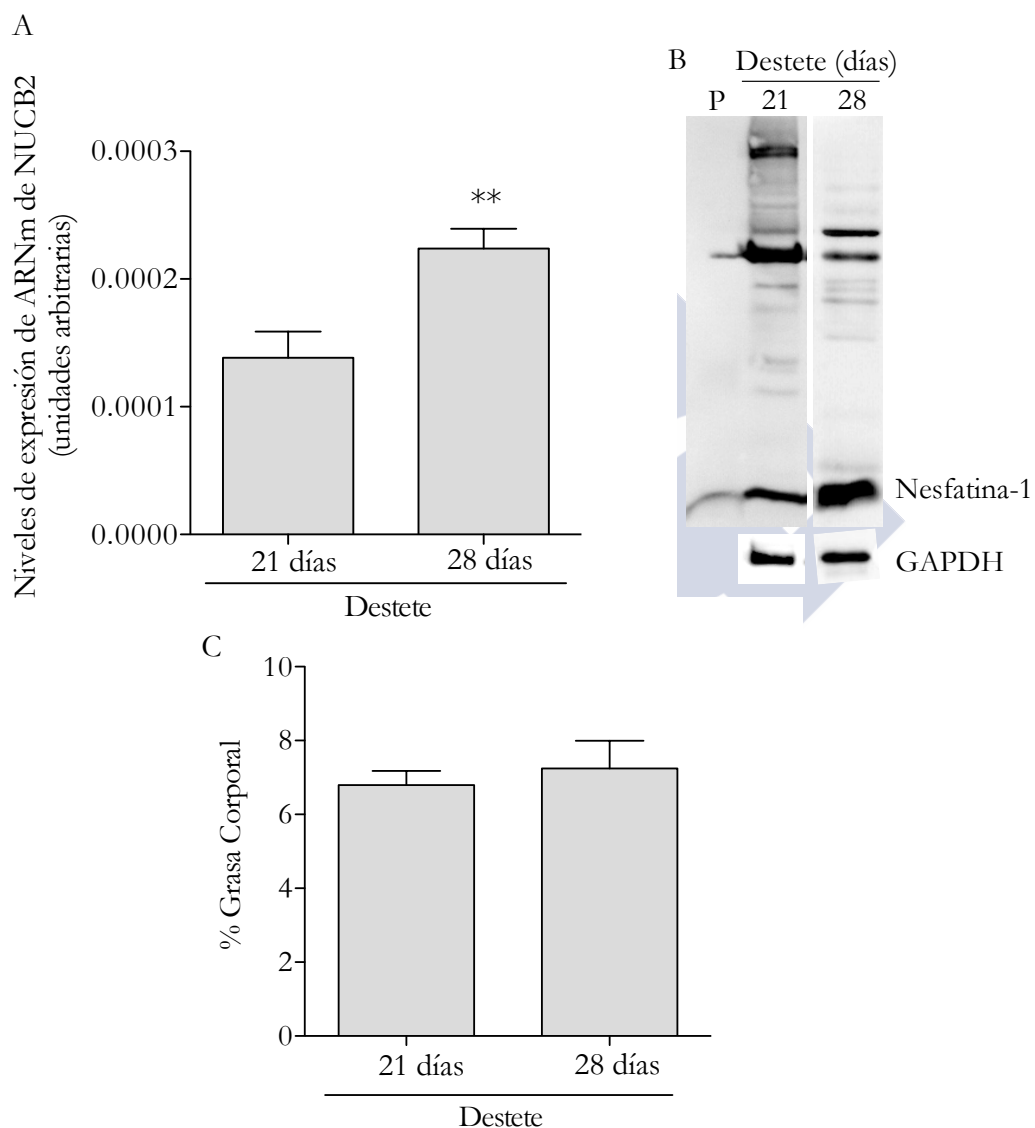


Figura 45: Efecto del retraso en el destete sobre la expresión cardíaca de NUCB2. **Panel A:** Expresión génica de NUCB2 en función del destete en rata. **Panel B:** Imagen representativa de los niveles proteicos de nesfatina-1 en función del destete. **Panel C:** Porcentaje de grasa corporal en función del destete. $**p<0.01$.

11.-Array de expresión de genoma completo de rata.

Mediante la técnica de microarray de expresión de genoma completo se demostró que el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata durante 6 horas con nesfatina-1 a una dosis de 1 μ M induce la expresión de forma significativa en 1.048 genes, la mayor parte (38%) implicados en la regulación del metabolismo según la clasificación realizada utilizando la base de datos de rutas metabólicas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Fig. 46).

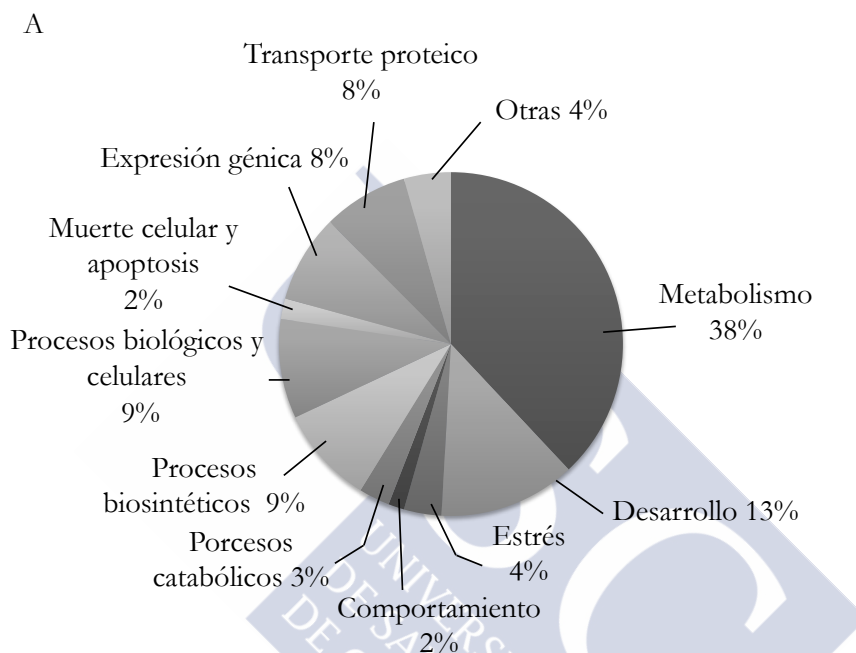


Figura 46: Efecto de nesfatina-1 sobre la expresión génica en rata. Representación del efecto de nesfatina sobre la expresión génica por procesos biológicos.

Del análisis realizado por Progenika Biopharma S.L. (ES) se obtuvo una lista de 3 rutas de señalización con expresión alterada de manera estadísticamente significativa tras el tratamiento con nesfatina-1 de acuerdo a la base de datos KEGG (Tabla 12).

Clasificación KEGG	Nº Genes	P valor	Genes
Ribosoma	15	77	RPS3, RPL13, RPL35A, RPL36, RPL13A, RPS21, RPS9, RPL29, RPS23, RPL10A, RPL18, RPL6, RPS15A.
Ruta de señalización de ErbB4	9	78	AKT3, CAMK2G, PRKCC, ERbB4, MAPK9, GSK3B, SOS1, GRB2, PRKCA.
Ruta de señalización de épsilon Fc RI	7	114	AKT3, PRKCC, MAPK9, SOS1, GRB2, PRKCE, PRKCA.

Tabla 12: Rutas metabólicas afectadas de manera estadísticamente significativa tras el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata con nesfatina-1 durante 6 horas a una dosis de 1 μ M.

Se seleccionó la ruta de señalización de ErbB4 para su posterior validación y se investigaron las posibles interacciones funcionales entre los genes afectados por el tratamiento con nesfatina-1 utilizando el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis), el cual está integrado con otras bases de datos como KEGG, Gene Ontology Database o GenBank, para el estudio de la ruta de señalización de ErbB4 ($p: 0.013$) (Fig. 47).

B

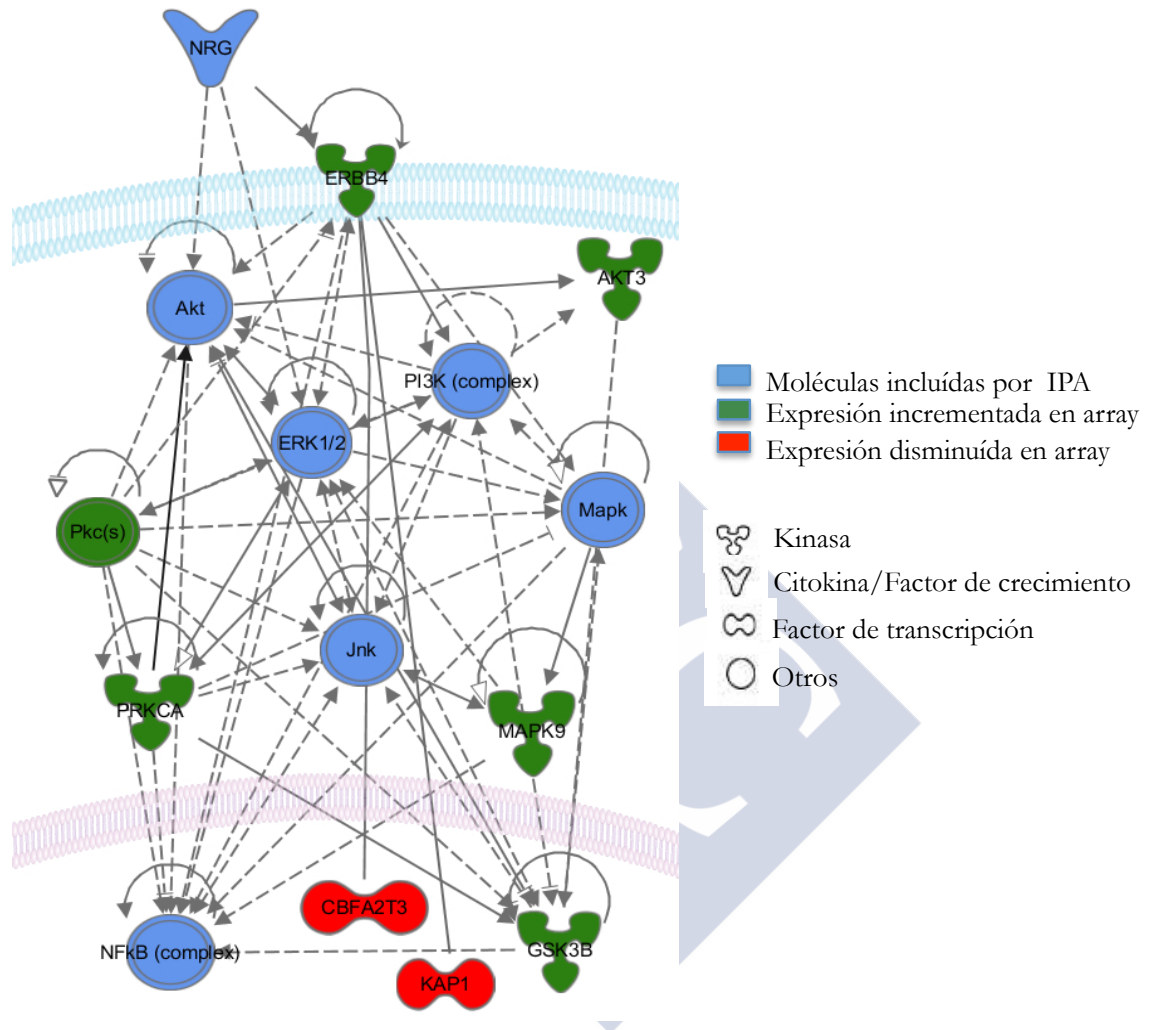


Figura 47: Esquema representativo de los genes implicados en la ruta de señalización de ErbB4 obtenido utilizando el programa IPA. NRG: neuregulina, Mapk: proteína quinasa activada por mitógenos, AKT: proteína quinasa B, ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2, PI3K: fosfoinositol-3-fosfato quinasa, Jnk: quinasa c-Jun N-terminal, PKC: proteína quinasa C, PRKCA: proteína quinasa C α , CBFA2T3: proteína correspondiente al gen de translocación mielóide en el cromosoma 16, KAP1: proteína 1 asociada a queratina, NFkB: factor nuclear kB, GSK3B: glucógeno sintasa quinasa 3 B.

Para determinar si el efecto de nesfatina-1 sobre el incremento de la fosforilación de ERK1/2 previamente observado se producía mediante el receptor ErbB4, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata con nesfatina-1 a una dosis de 1 μM durante 10 minutos en conjunto con el inhibidor de ErbB4 AG1478 a una dosis de 50 μM , con un pretratamiento previo con dicho inhibidor durante 30 minutos ($n=6$). Se demostró que el

tratamiento con AG1478 no inhibe el efecto de nesfatina-1 sobre la inducción de la fosforilación de ERK1/2, descartando así la participación de ErbB4 en el efecto de nesfatina-1 sobre la fosforilación de ERK1/2 en cardiomiocitos (Fig. 48).

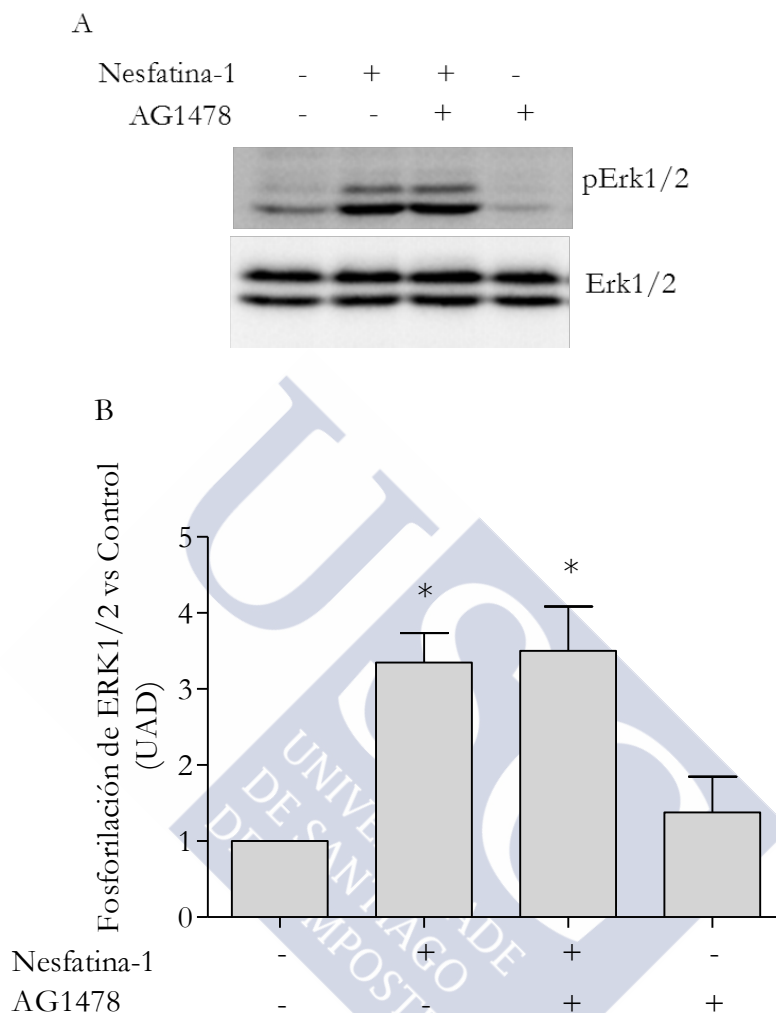


Figura 48: Efecto del inhibidor de ErbB4 AG1478 sobre la inducción de la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel A:** Western blot representativo de la fosforilación de ERK1/2. **Panel B:** Análisis estadístico de la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con nesfatina-1 y/o AG1478. UAD: unidades arbitrarias de densitometría * $p < 0.05$.

Por otro lado, de entre los 1.048 genes con expresión modificada tras el tratamiento con nesfatina-1, se seleccionaron 4 para su posterior validación en función de su p valor y su significado biológico en cardiomiocitos (Tabla 13).

Nombre	Incremento vs control	P valor
NR1H2	-1.25827	8.85603E-05
HMGCR	-1.15613	0.0418708
AVPRA	1.33286	0.000146007
APOP1	-1.31416	0.0299548

Tabla 13: Genes seleccionados del array de expresión de genoma completo de rata con expresión modificada por el tratamiento con nesfatina-1 como candidatos para ser validados mediante la técnica RT-PCR.

Para validar la modificación de la expresión génica de los genes seleccionados tras el tratamiento con nesfatina-1 se utilizó la técnica de RT-PCR, observando que solo en el caso de APOB1 se mantiene el efecto de nesfatina-1 sobre su expresión génica (Fig. 49).

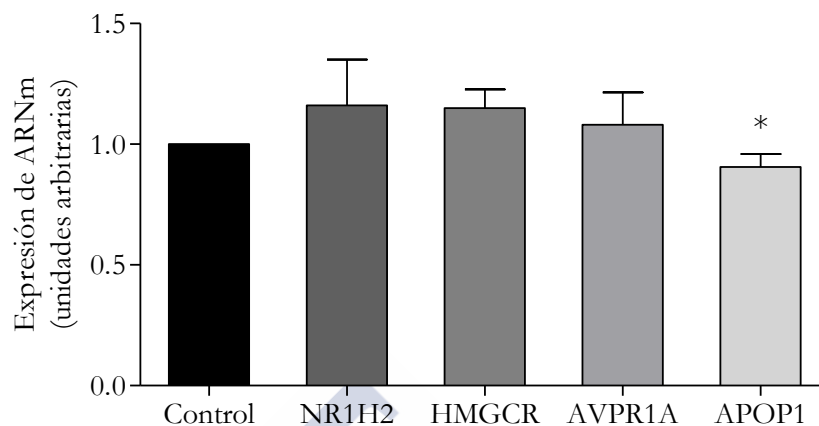


Figura 49: Expresión génica de los genes candidatos obtenidos mediante el análisis del microarray en cardiomiocitos neonatales de rata tras el tratamiento con nesfatina-1 a una dosis de 1 μ M durante 6 horas de tratamiento. n=8, *p<0.05.

Además, se estudió el efecto de nesfatina-1 sobre la expresión de Apop1 en función del tiempo, observando que a 3 y 6 horas esta hormona provoca una disminución estadísticamente significativa de la expresión de Apop1 de un 9.8% (p: 0.039) y de un 9.8% (p: 0.037) respectivamente, mientras que tras 24 horas la nesfatina-1 induce su expresión en un 22.3% (p: 0.019) (n=8) (Fig. 50).

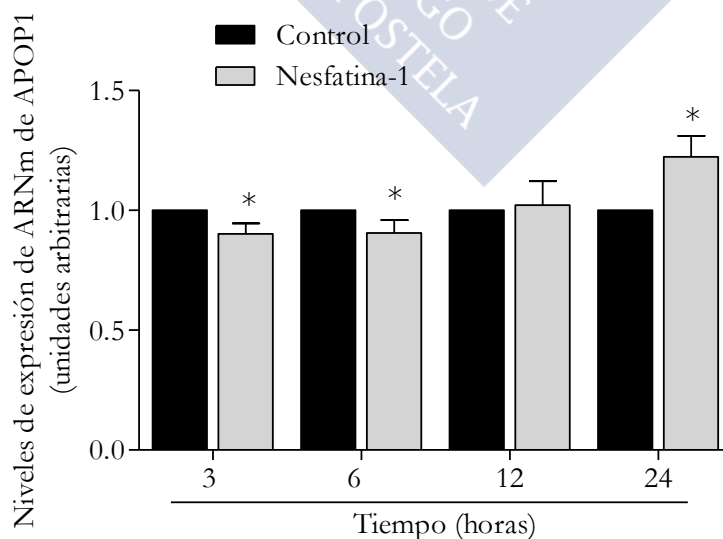


Figura 50: Efecto de nesfatina-1 sobre la expresión de APOB1 durante 3-24 horas en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo. *p<0.05.

Debido a la cantidad de información aportada por el array de expresión de genoma completo y a la complejidad de su análisis, los datos presentados en este trabajo se corresponden con resultados preliminares, de forma que en la actualidad seguimos trabajando en el estudio de otros genes candidatos para su posterior validación.

12.-Efecto de nesfatina-1 sobre la viabilidad celular.

Actividad mitocondrial.

Para estudiar el posible papel de nesfatina-1 sobre la actividad mitocondrial en cardiomiocitos, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata y de la línea celular de ratón HL-1 con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.01-1 μM durante 6-24 horas. Mediante el ensayo MTT se demostró que en la línea celular HL-1 ($n=6$) el tratamiento con nesfatina-1 induce una reducción de la actividad metabólica mitocondrial de un 23.6% a dosis de 0.1 μM (p : 0.0313) y de un 22.08% a dosis de 1 μM (p : 0.0313), sin observar diferencias significativas con respecto al control a tiempos de 6 y 12 horas de tratamiento (Fig. 51).

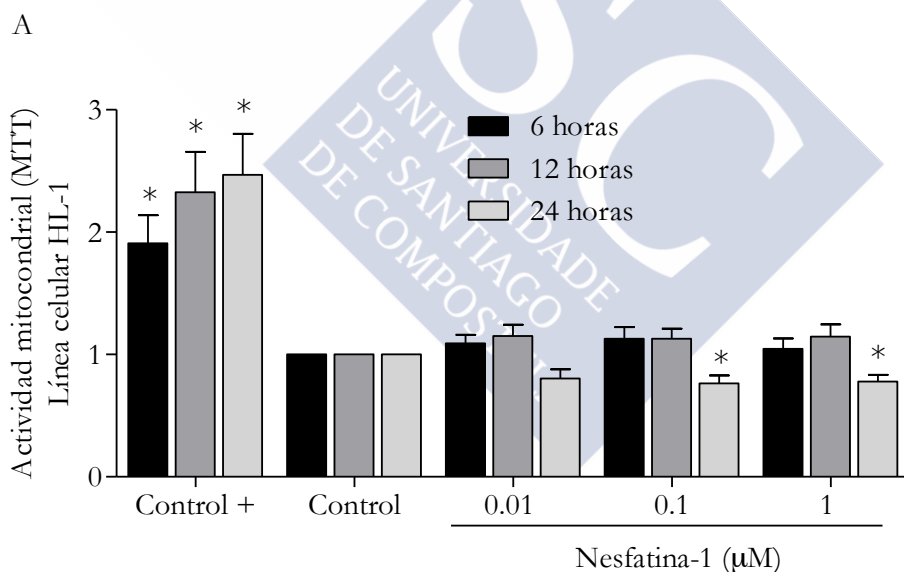


Figura 51: Análisis estadístico de la actividad metabólica mitocondrial en cardiomiocitos mediante el ensayo MTT. Efecto del tratamiento con nesfatina-1 sobre la actividad mitocondrial de la línea celular HL-1. * $p < 0.05$. UAA: unidades arbitrarias de absorbancia (550 nm).

Asimismo, en cardiomiocitos neonatales de rata ($n=9$), el tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 0.1 μM induce una reducción de la actividad metabólica mitocondrial de un 5.8% a 12 horas de tratamiento (p : 0.0078), y el tratamiento con nesfatina-1 a dosis de 1 μM reduce la actividad metabólica mitocondrial en un 8% a 6 horas de tratamiento (p : 0.0078), en un 12.6% a 12 horas de tratamiento (p : 0.0039) y en un 22.7% a 24 horas de

tratamiento (p : 0.0080) (Fig. 52). Como control positivo de actividad metabólica mitocondrial se utilizó medio de cultivo completo.

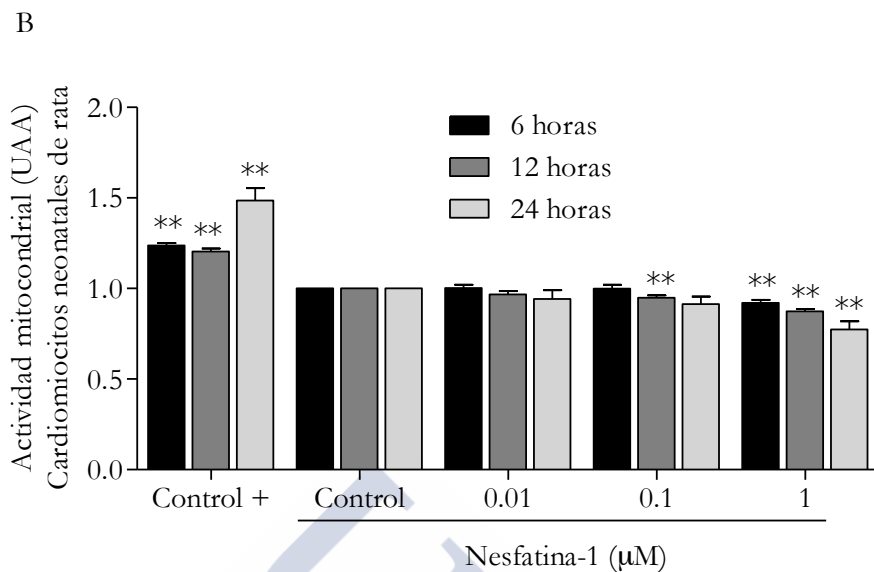


Figura 52: Análisis estadístico de la actividad metabólica mitocondrial en cardiomiocitos mediante el ensayo MTT. Efecto del tratamiento con nesfatina-1 sobre la actividad mitocondrial de cardiomiocitos neonatales de rata. ** $p < 0.01$. UAA: unidades arbitrarias de absorbancia (550nm).

Apoptosis.

Mediante la técnica de tinción vital con Hoechst se estudió el posible papel de nesfatina-1 sobre la inducción de apoptosis en la línea celular HL-1. Se trataron dichas células durante 6-24 horas con dosis de nesfatina-1 comprendidas entre 0.001-1 µM y se demostró que el tratamiento a dosis de 0.1 µM induce un incremento en el porcentaje de células apoptóticas de un 105% y de un 52.8% con respecto al control (p : 0.0313) y a dosis de 1 µM induce un incremento de un 146% y de un 52.2% (p : 0.0313) a 12 y 24 horas de tratamiento respectivamente ($n=6$). Como control positivo de apoptosis se utilizó AraC a dosis de 100 µM durante 6-12 horas (Fig. 53).

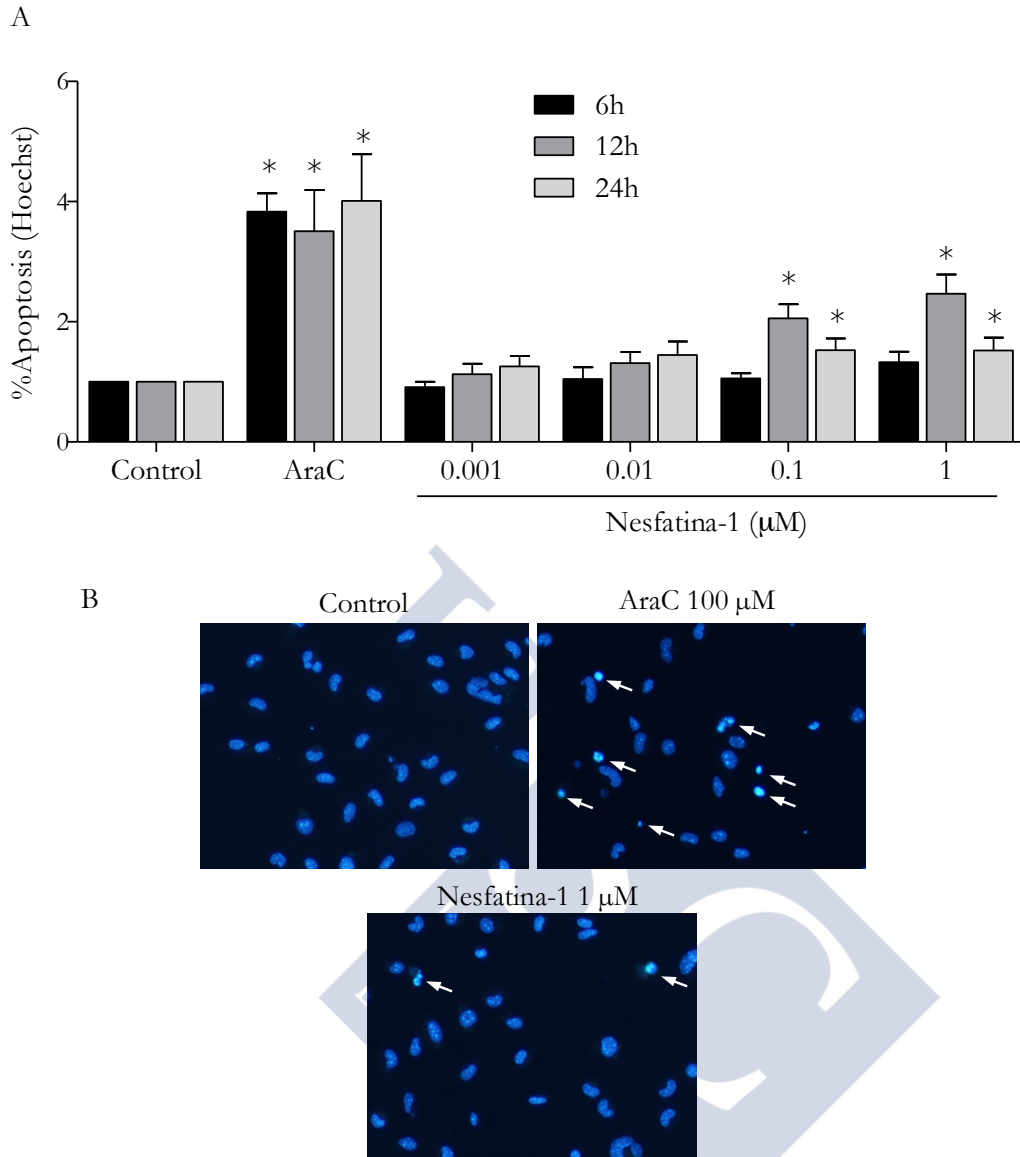


Figura 53: Efecto de nesfatina-1 sobre la inducción de apoptosis en la línea celular HL-1. **Panel A:** Análisis estadístico del porcentaje de apoptosis inducido por el tratamiento con nesfatina-1 durante 6-24 horas. **Panel B:** Imágenes representativas de los experimentos con tinción vital Hoechst a 24 horas de tratamiento. * $p < 0.05$.

Asimismo, se trataron cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo con nesfatina-1 a dosis comprendidas entre 0.001-1 μM durante 24 horas. Se demostró que la nesfatina-1, al igual que ocurre con la línea celular HL-1, induce un incremento del porcentaje de células en apoptosis del 47.9 % a dosis de 1 μM (Fig. 54).

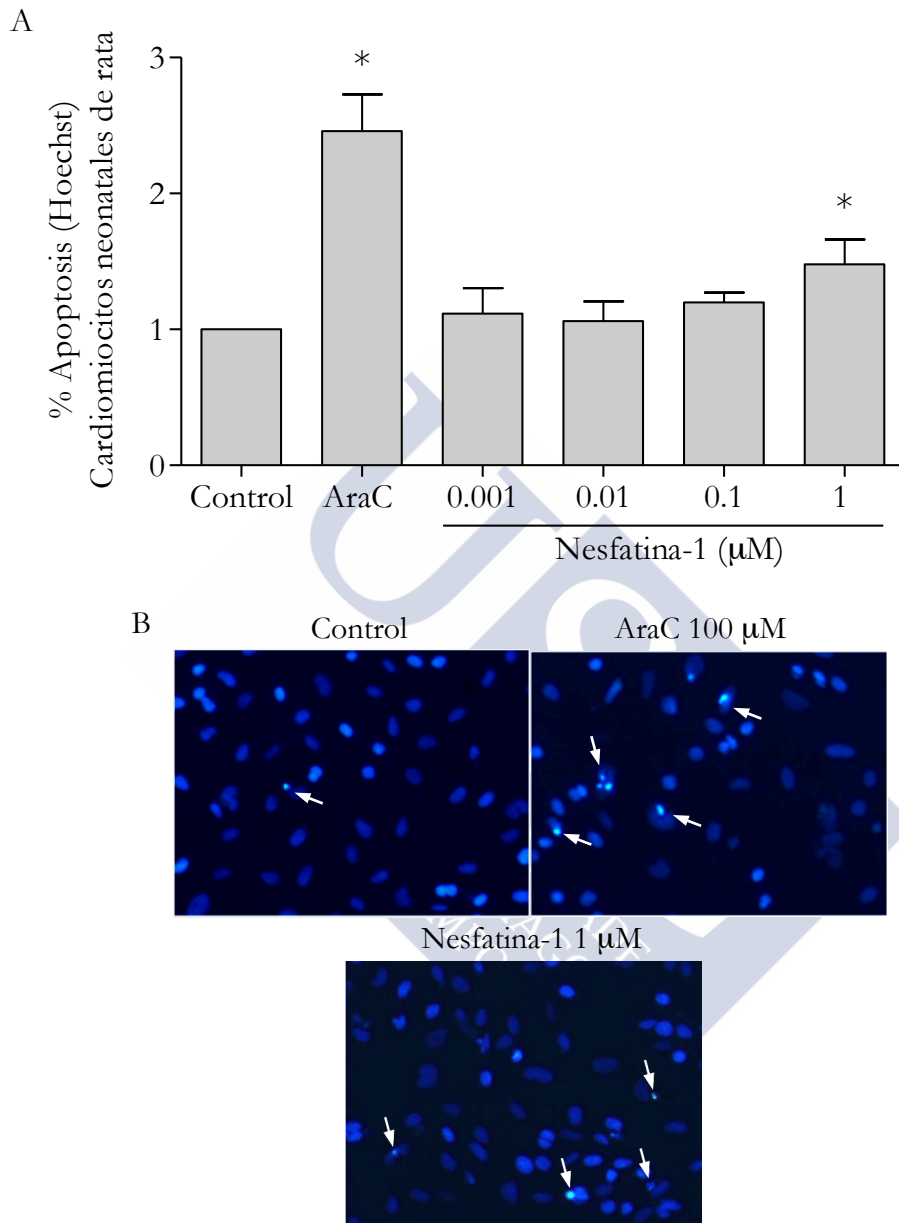


Figura 54: Efecto de nesfatina-1 sobre la inducción de apoptosis en cardiomiocitos neonatales de rata durante 24 horas de tratamiento. **Panel A:** Análisis estadístico del porcentaje de apoptosis inducido por nesfatina-1. **Panel B:** Imágenes representativas de los experimentos con tinción vital Hoechst.* $p < 0.05$.

Ciclo celular.

Mediante la técnica de citometría de flujo combinada con marcaje con yoduro de propidio, se observó que el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata y de la línea celular HL-1 con nesfatina-1 a dosis comprendidas entre 0.01-1 μM durante 24 horas no tiene efectos estadísticamente significativos sobre la viabilidad cardiomiocitaria con respecto al control (n=7) (Fig. 55).

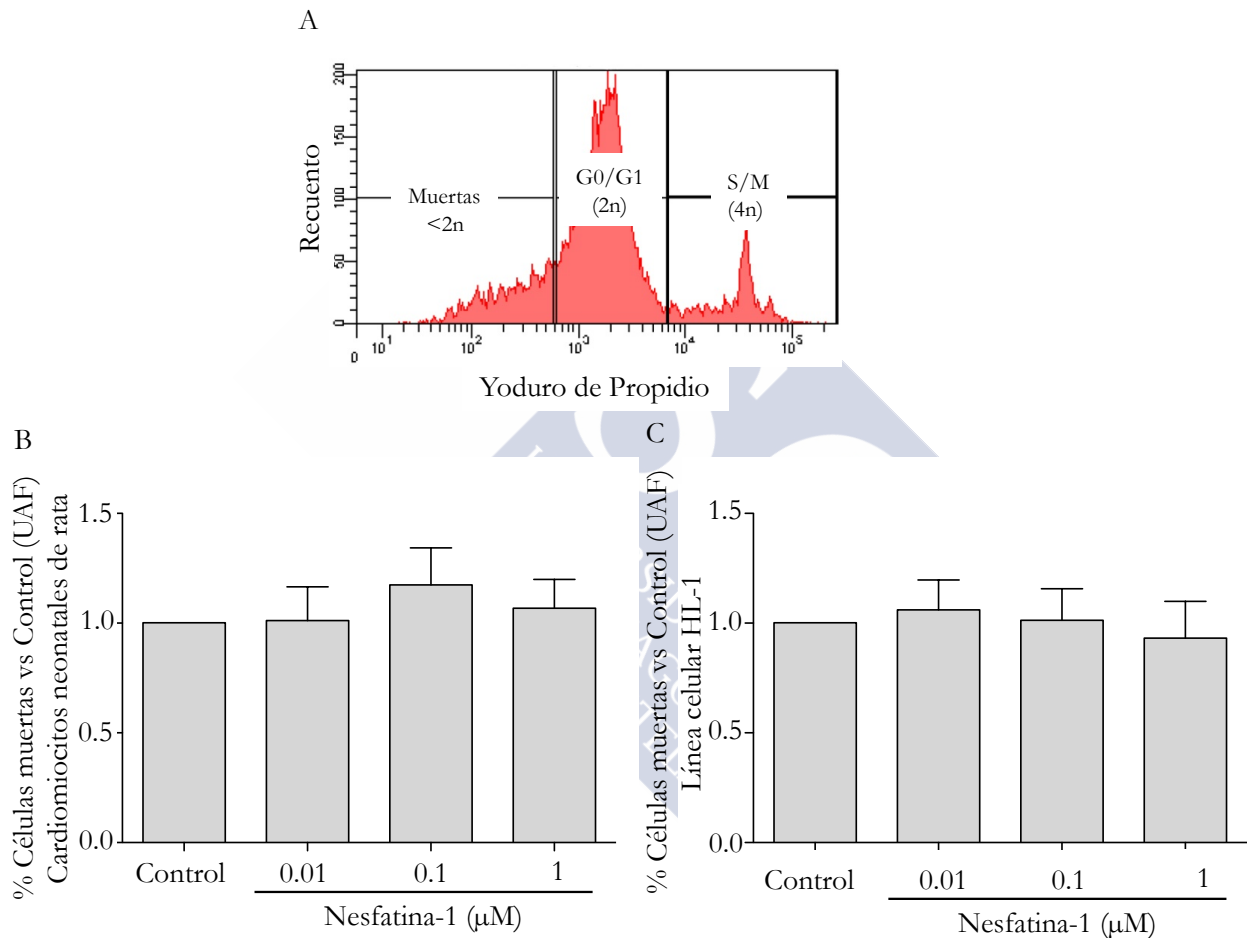


Figura 55: Efecto del tratamiento con nesfatina-1 durante 24 horas sobre la viabilidad cardiomiocitaria. **Panel A:** Análisis mediante citometría de flujo de cardiomiocitos marcados con yoduro de propidio donde se representa el número de células (recuento) frente al contenido de ADN (yoduro de propidio). Los valores se corresponden a porcentajes de células muertas (con un contenido de ADN correspondiente a menor de 2n), en fase G0/G1 (con un contenido de ADN correspondiente a 2n) o en fase S/M (con un contenido de ADN correspondiente a 4n). **Panel B:** Efecto del tratamiento con nesfatina-1 sobre la viabilidad de cardiomiocitos neonatales de rata. **Panel C:** Efecto del tratamiento con nesfatina-1 sobre la viabilidad de la línea celular HL-1. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

13.-Estudios de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en tejido humano cardiaco.

Para determinar los niveles de expresión (mediana [rango intercuartílico]) de ARNm de NUCB2 se utilizó la técnica de RT-PCR.

Expresión de NUCB2 en tejido auricular en función del sexo.

Se demostró que los niveles de expresión auriculares de NUCB2 eran significativamente mayores en las mujeres (0.043 [0.033; 0.053], n=90) que en los varones (0.037 [0.029, 0.047], n=178) (p : 0.002) (Fig. 56.A).

Las mujeres sin lesión coronaria (LSC) (0.045 [0.036; 0.055], n=62) tenían mayores niveles de expresión auriculares de NUCB2 que aquellas con LSC (0.039 [0.030, 0.047], n=27) (p : 0.001) y, además, las mujeres sin LSC tenían también mayores niveles de expresión de NUCB2 que los varones independientemente de LSC o no. No se observó ninguna diferencia sobre los niveles de NUCB2 en los varones en cuanto a padecer LSC o no (Fig. 56.B).

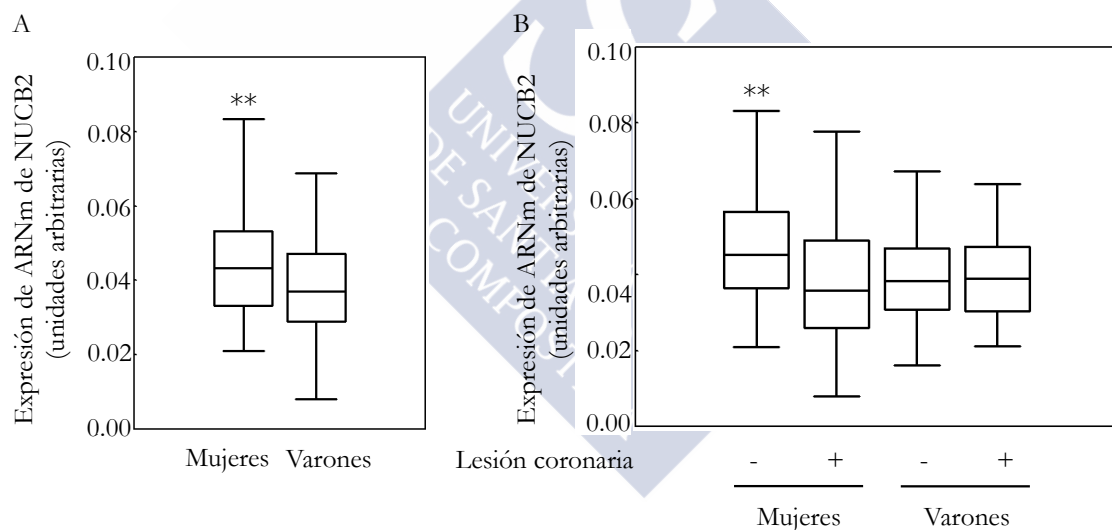


Figura 56: Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardiaco auricular humano de pacientes sometidos a cirugía cardiaca. **Panel A:** Niveles de expresión de NUCB2 en función del género. **Panel B:** Niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardiaco auricular humano de pacientes con o sin lesión coronaria. ** p <0.01.

Expresión de NUCB2 en tejido auricular en pacientes a tratamiento con IECAs.

En los varones, se observó que los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 eran significativamente menores en aquellos a tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) (0.034 [0.027; 0.040], n=53) con respecto a los no

tratados (0.038 [0.029, 0.051], n=116) (p: 0.018) (Fig. 57.A). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre los niveles de expresión de NUCB2 y la hipertensión arterial o la administración de otros medicamentos antihipertensivos, así como tampoco entre la administración o no de IECAs en mujeres. En cuanto a los varones con HTA, se observó que aquellos a tratamiento con IECAs (n=46) presentaban menores niveles de expresión de NUCB2 en tejido auricular cardiaco con respecto a los no tratados (n=75) (p: 0.02) (Fig. 57.B).

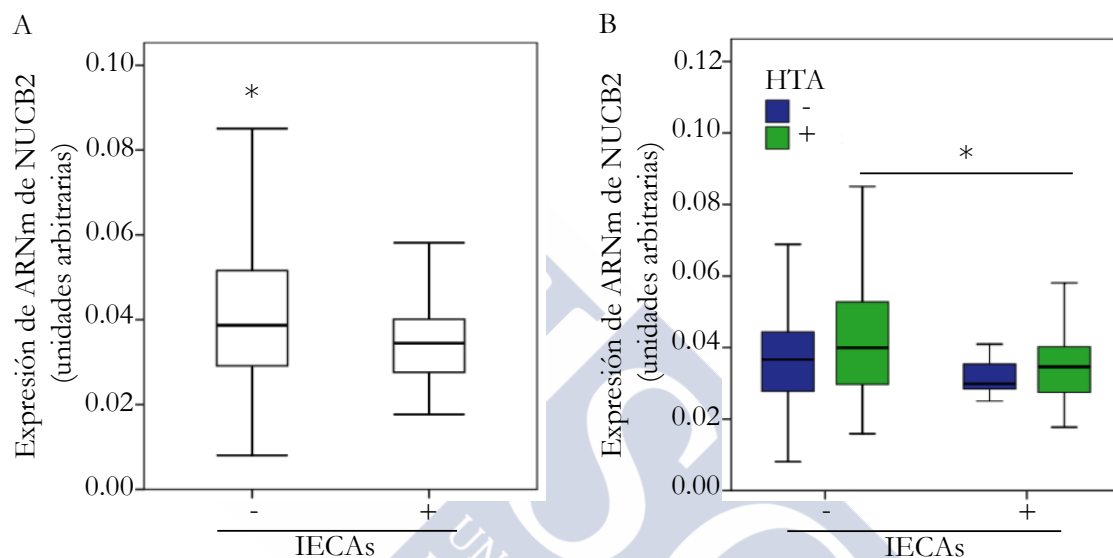


Figura 57: Efecto de los IECAs sobre la expresión de NUCB2 en tejido cardiaco auricular humano en varones sometidos a cirugía cardiaca. **Panel A:** Análisis estadístico de los niveles auriculares de nesfatina-1 en pacientes a tratamiento o no con IECAs. **Panel B:** Estratificación de los pacientes en función de la presencia o no de hipertensión arterial. IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. HTA: hipertensión arterial. *p<0.05.

Expresión de NUCB2 en tejido auricular en pacientes a tratamiento con antidiabéticos orales.

En varones, se demostró que los niveles de expresión auriculares de NUCB2 eran significativamente mayores en aquellos a tratamiento con antidiabéticos orales (ADO) (0.0388, [0.0347; 0.0561], n=35) con respecto a los no tratados con ADO (0.0356 [0.0277; 0.04629], n=138) (p: 0.033) (Fig. 58.A). No se encontró ninguna asociación entre los niveles de expresión de NUCB2 y la diabetes tipo I o la diabetes tipo II (Fig. 58.B), así como tampoco entre la administración o no de ADO o la presencia de diabetes en mujeres.

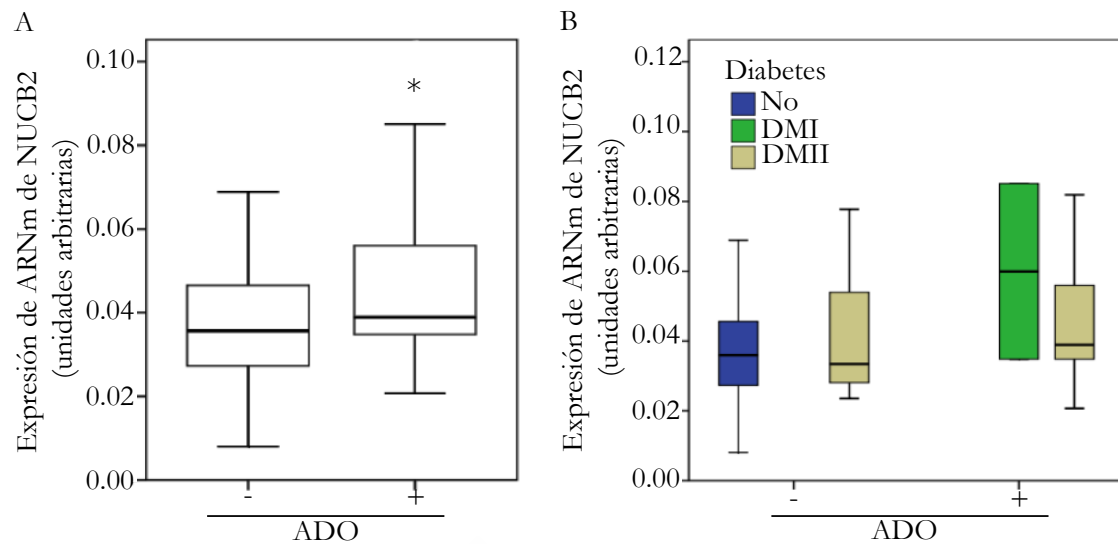


Figura 58: Efecto de los antidiabéticos orales sobre la expresión de NUCB2 en tejido auricular cardiaco en varones sometidos a cirugía cardiaca. **Panel A:** Análisis estadístico de los niveles auriculares de nesfatina-1 en pacientes a tratamiento o no con antidiabéticos orales. **Panel B:** Estratificación de los pacientes en función de la presencia y el tipo de diabetes. * $p < 0.05$.

Sin embargo, al agrupar los varones diabéticos sin diferenciar entre padecer diabetes tipo I o diabetes tipo II se observa que los diabéticos (0.038 [0.031; 0.055], $n=53$) presentan mayores niveles cardiacos de NUCB2/nesfatina-1 con respecto a los no diabéticos (0.035 [0.027; 0.045], $n=125$) ($p: 0.046$) (Fig. 59), sin observar ninguna diferencia en las mujeres.

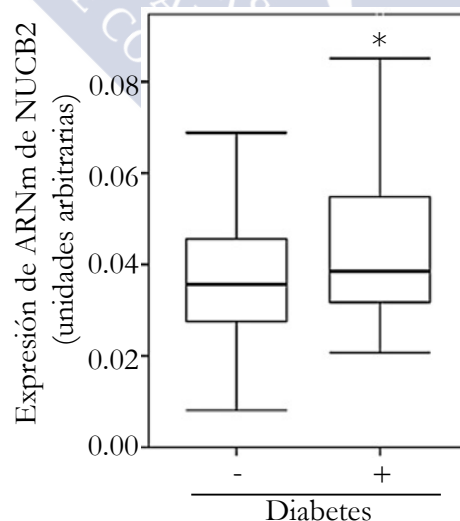


Figura 59: Efecto de la diabetes sobre la expresión cardiaca de NUCB2 en tejido cardiaco auricular humano en varones sometidos a cirugía cardiaca. * $p < 0.05$.

Expresión de NUCB2 en tejido auricular en función del gap de glicación.

Se utilizó el gap de glicación (Gg) para estimar el control glucémico y el riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares derivadas de la diabetes.²¹⁹ El Gg se obtuvo a partir de la diferencia entre la HbA_{1c} medida en plasma y la HbA_{1c} calculada según la siguiente recta de regresión, adecuada para los pacientes del área sanitaria de Santiago de Compostela,²¹⁸ donde se utilizan los niveles de fructosamina plasmáticos como un indicador de la glucemia: HbA_{1c} calculada=0.012*Fructosamina+3.16. Se consideraron bajos glicadores aquellos pacientes con un Gg<-1 (n=8), glicadores medios los que tenían un Gg entre 1 y 1 (n=58), y altos glicadores los que presentaban un Gg>1 (n=8).²¹⁹

Como cabía esperar, existen mayores niveles de glucosa y HbA_{1c} plasmáticos en los pacientes consideramos altos glicadores (Fig. 60).

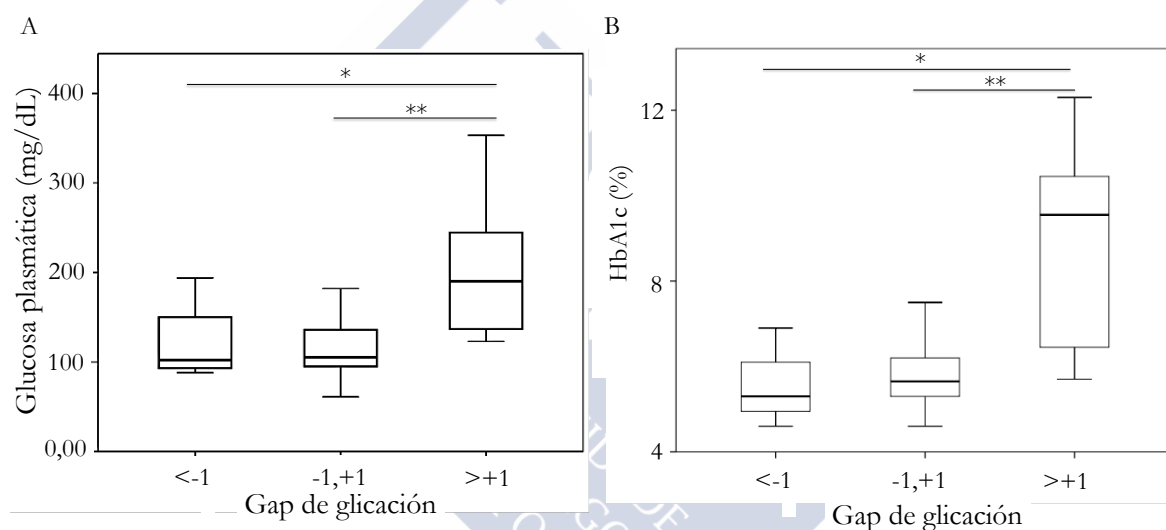


Figura 60: Caracterización de los niveles de plasmáticos de glucosa (**Panel A**) y de HbA_{1c} (**Panel B**) en función del gap de glicación en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. *p<0.05, **p<0.01.

Se demostró que los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardíaco auricular humano no varían de manera estadísticamente significativa en función del Gg (Fig. 61.A-B), independientemente de padecer o no diabetes (Fig. 61.C)

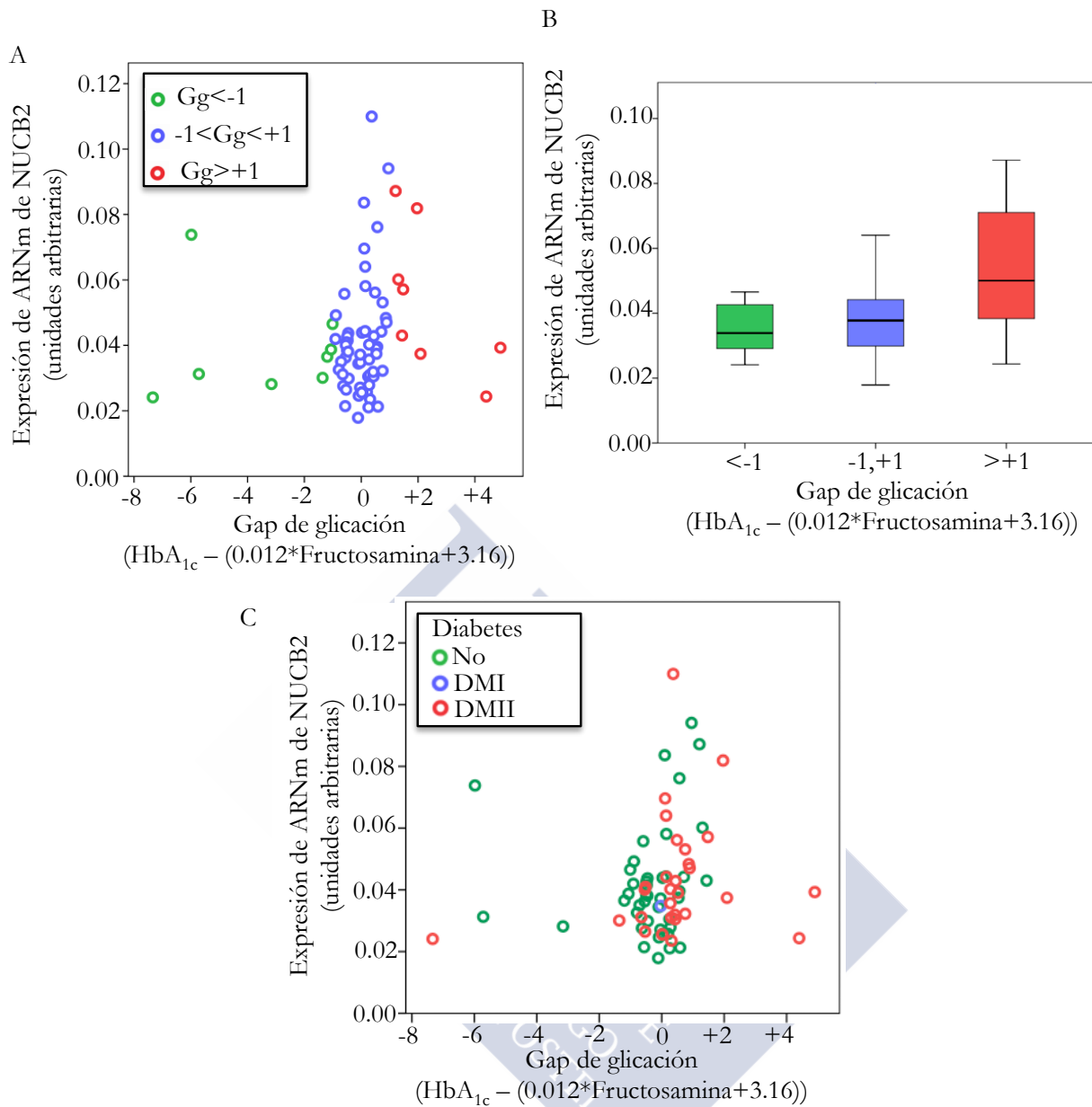


Figura 61: Niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido cardiaco auricular de pacientes sometidos a cirugía cardiaca en función del gap de glicación. **Paneles A-B:** Distribución de los niveles de NUCB2 en función del gap de glicación. **Panel C:** Distribución de los niveles de NUCB2 en función del gap de glicación y de la presencia de diabetes. Gg: gap de glicación. DM: diabetes mellitus.

Finalmente, se observó una correlación negativa entre los niveles de expresión auriculares de NUCB2 y los niveles plasmáticos de glucosa en los pacientes considerados bajos glicadores ($r: -0.881$, $p: 0.004$) (Fig. 62.A), que se vuelve positiva en los glicadores normales ($r: 0.285$, $p: 0.031$) (Fig. 62.B) y se pierde en los altos glicadores. Sin embargo, en los altos glicadores se observa una correlación negativa entre los niveles de expresión de NUCB2 auriculares y el Gg ($r: -0.762$, $p: 0.028$) (Fig. 62.C).

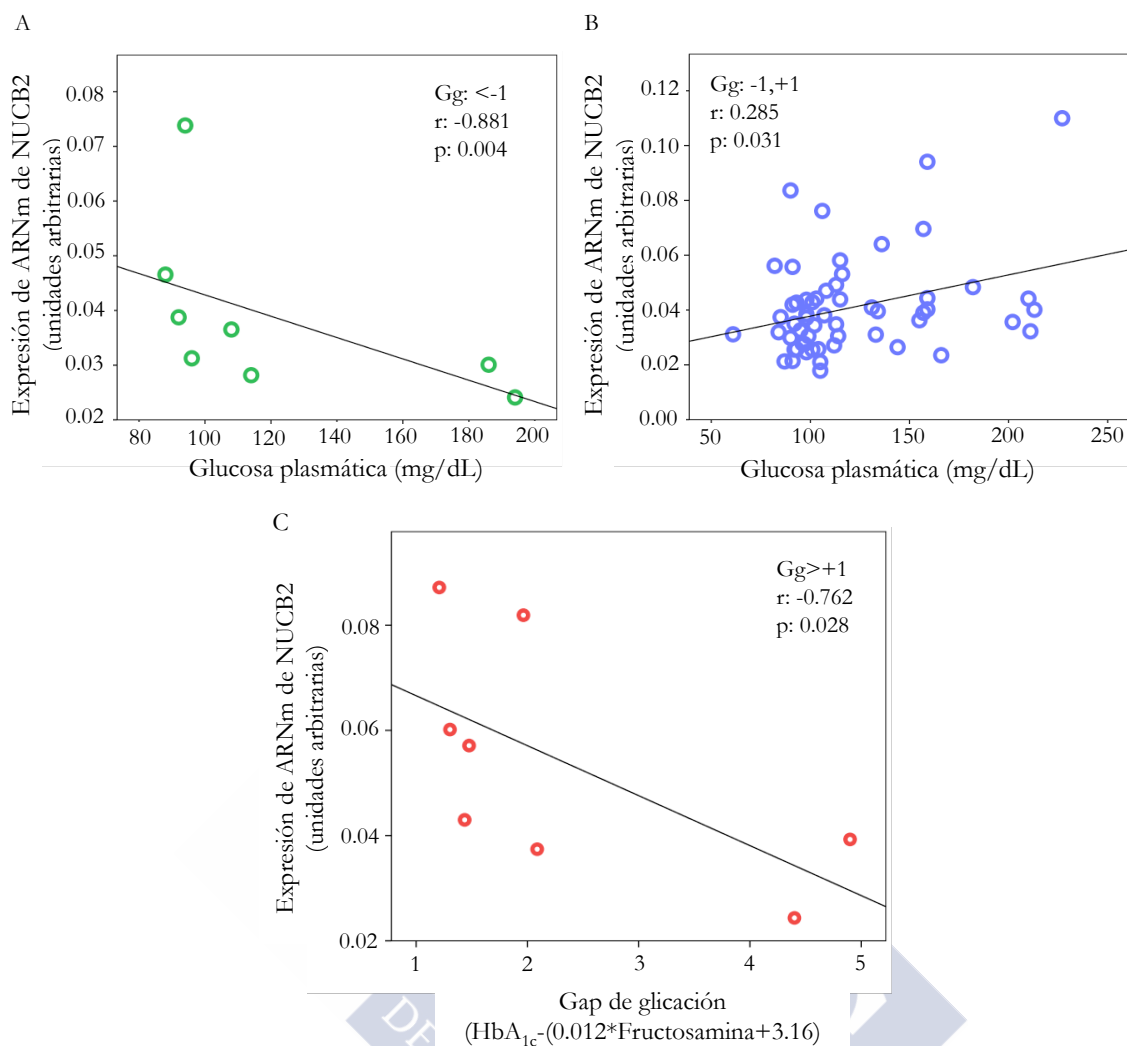


Figura 62: Correlación entre los niveles de expresión auriculares cardiacos de ARNm de NUCB2 y la glucosa en pacientes sometidos a cirugía cardiaca clasificados como bajos glicadores (**Panel A**) y glicadores medios (**Panel B**). **Panel C:** Correlación entre los niveles de NUCB2 y el gap de glicación en pacientes clasificados como altos glicadores. R: rho de Spearman.

Expresión de NUCB2 en tejido ventricular de pacientes en la fase final de la insuficiencia cardiaca.

Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en ventrículo izquierdo de corazones explantados de pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) sometidos a trasplante de corazón, de los cuales 29 tenían IC de origen isquémico (ISQ) y 19 pacientes tenían IC cuya etiología era la cardiomiopatía dilatada (DIL), todos no diabéticos y en la fase final de la enfermedad, utilizando como controles 4 donantes no enfermos (CON).

Mediante la técnica RT-PCR se demostró que los niveles de expresión de NUCB2 en tejido ventricular humano eran significativamente mayores en aquellos pacientes con IC

de etiología esquémica con respecto a los pacientes control (p : 0.0152), no observando ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con IC de etiología dilatada y los controles (Fig. 63) o comparando los pacientes de ambas etiologías.

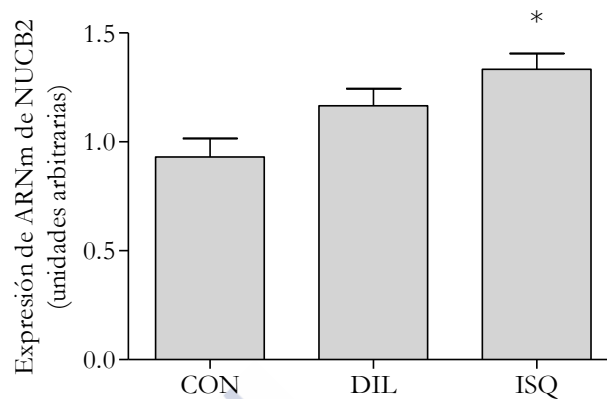


Figura 63: Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en ventrículo izquierdo humano de pacientes en la fase final de insuficiencia cardíaca de etiología isquémica (ISQ) o dilatada (DIL). * $p < 0.05$.

14.-Niveles plasmáticos de nesfatina-1 en pacientes con insuficiencia cardíaca.

En los pacientes reclutados a través de la Red Nacional de Investigación en Insuficiencia Cardíaca (REDINSCOR), se demostró que los niveles plasmáticos de nesfatina-1 medidos utilizando la técnica de ELISA ($n=71$) son mayores en aquellos pacientes que presentan reducción de la tolerancia al ejercicio ($n=7$, p : 0.006), de los cuales seis presentaban cardiomiopatía dilatada y uno cardiomiopatía valvular (Fig. 64).

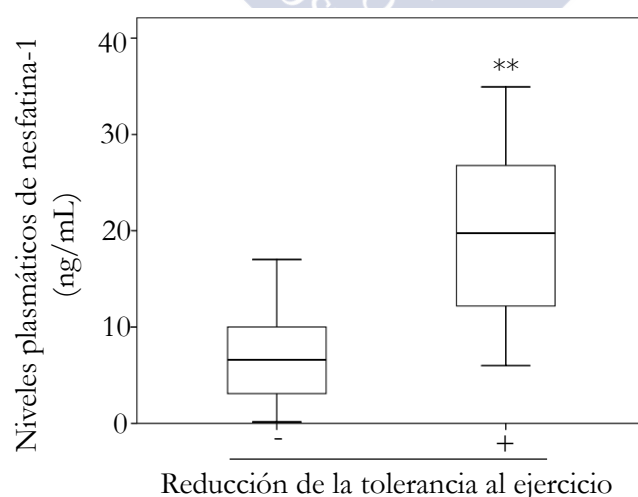


Figura 64: Niveles plasmáticos de nesfatina-1 en función de la tolerancia al ejercicio en pacientes con insuficiencia cardíaca. ** $p < 0.01$.

A su vez, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con reducción de la tolerancia al ejercicio con cardiomiopatía dilatada (n=6, p: 0.002) con respecto a aquellos con el mismo tipo de cardiomiopatía pero con tolerancia normal al ejercicio (Fig. 65).

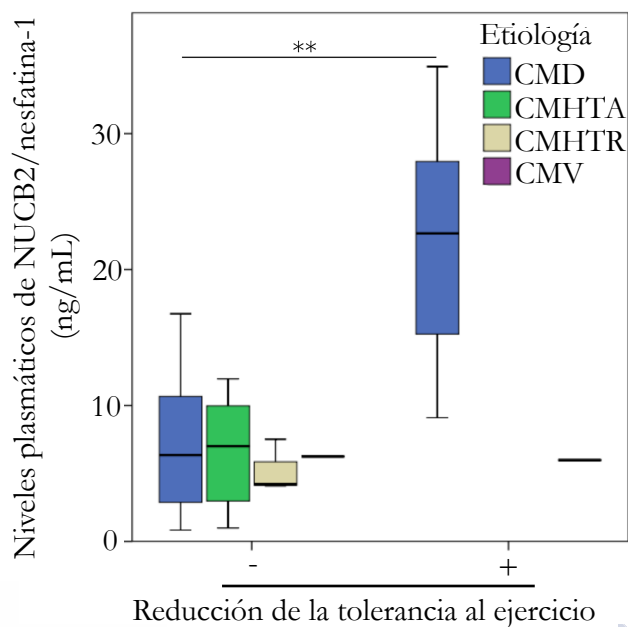


Figura 65: Análisis estadístico de los niveles plasmáticos de nesfatina-1 en pacientes con o sin reducción de la tolerancia al ejercicio en función del tipo de cardiomiopatía. CMD: cardiomiopatía dilatada, CMHTA: cardiomiopatía hipertensiva, CMHTR: cardiomiopatía hipertrófica, CMV: cardiomiopatía valvular. **p<0.01.



DISCUSIÓN



En la actualidad sabemos que el tejido adiposo, además de almacenar energía, es capaz de producir una gran variedad de proteínas y factores de secreción conocidos comúnmente como adipokinas, las cuales actúan tanto a nivel local de forma autocrina/paracrina, como a nivel sistémico de forma endocrina, regulando una gran variedad de procesos biológicos, entre los que se encuentra de manera destacada la función cardiovascular, y que son factores cuya producción se encuentra alterada en los estados de obesidad.^{131-134,231} Debido a que la fisiopatología de la obesidad no se conoce completamente, es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la misma y su relación con las enfermedades metabólicas y cardiovasculares para poder desarrollar nuevas estrategias dirigidas hacia su prevención y tratamiento, así como de sus comorbilidades.⁶²⁰ Las adipokinas y las hormonas metabólicas han surgido en los últimos años como un nexo de unión entre la obesidad, la inflamación, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares^{133,621} debido a su probada influencia sobre la regulación de la tensión arterial, la función endotelial, la función cardiomiocitaria, la aterosclerosis, la inflamación, la hipertrofia o el daño por isquemia/reperfusión, de modo que la identificación y el estudio de nuevas hormonas implicadas en la regulación de la función cardiovascular proporciona nuevas oportunidades para el desarrollo de aproximaciones más efectivas para prevenir las enfermedades cardiovasculares.^{231,622}

Asimismo, el corazón se considera hoy en día un órgano endocrino capaz de sintetizar productos de secreción, como los péptidos natriuréticos y diversas hormonas,^{261,325,335,623} implicados no solo en la regulación de la función cardiovascular sino también en la regulación del gasto energético y el metabolismo.^{261,325-328,623} Debido a la estrecha relación que existe entre las enfermedades cardiovasculares y el metabolismo energético, es fundamental llegar a comprender el papel que las nuevas hormonas metabólicas y/o adipokinas (tanto las sintetizadas por el corazón como las procedentes de otros lugares de síntesis) puedan desempeñar en la regulación de la viabilidad y el metabolismo celular a nivel cardiaco, con el fin de comprender mejor la fisiopatología de las enfermedades cardiometabólicas.^{261,325-328,623} Desde la identificación a mediados de la década de los noventa de las primeras adipokinas, se ha producido un rápido avance en el conocimiento de las mismas, identificándose una gran variedad de adipokinas y hormonas metabólicas con distintas funciones sobre la fisiopatología de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares,⁶²⁴ como la leptina, la adiponectina, la resistina, la lipocalina-1, la adipolina, o la omentina, y cuyo número continúa creciendo en la actualidad.⁶²⁵

La nesfatina-1 es una nueva hormona metabólica descubierta en 2006 por Oh-I y col.³⁶³ en el hipotálamo como una molécula inductora de anorexia. Al igual que para otros

péptidos con acción a nivel cerebral, la función de nesfatina-1 no se reduce a un solo efecto, sino que se ha demostrado que la nesfatina es una hormona pleiotrópica implicada en diversas funciones, como el vaciado gástrico,⁴¹² la ingesta de agua,⁴¹⁷ la modulación del estrés,⁵⁵⁵ la regulación del sistema simpático,⁵⁹⁴ la reproducción,⁵⁶⁷ el control del sueño,^{562,565} el desarrollo de ansiedad y miedo,^{493,555-558} la termorregulación,⁴¹⁰ la adipogénesis,⁴⁰¹ la homeostasis de la glucosa⁴⁸⁵ y, de manera muy significativa, en la función cardiovascular.⁴⁰²

Al tener la capacidad de poder cruzar la barrera hematoencefálica en ambos sentidos,^{436,437} distintos estudios se han centrado en la posible expresión de nesfatina-1 en tejidos periféricos, observando altos niveles de este péptido en la mucosa gástrica,³⁹⁸ el páncreas,³⁹⁷ el tejido adiposo,⁴⁰¹ las gónadas³⁹⁹ y también en el plasma,⁴⁴⁵ de forma que se sugiere que la nesfatina-1 producida y secretada a nivel periférico también podría ejercer sus acciones a nivel central. Debido a que el tejido adiposo es uno de los principales órganos productores de nesfatina-1, algunos autores la consideran también una nueva adipokina,^{401,453,520} a pesar de que su principal fuente de producción es el estómago,³⁹⁸ en donde se observan niveles de expresión incluso superiores a los detectados en el cerebro.

En este trabajo de tesis presentamos un amplio número de experimentos utilizando una aproximación traslacional para estudiar la expresión de nesfatina-1 en tejido cardíaco de ratón, rata y humano, mostrando su expresión tanto en tejido auricular como ventricular cardíaco y su implicación en el metabolismo energético de los cardiomiocitos y en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, un trabajo ya publicado en parte en la revista *Endocrinology* en el año 2013 (ver anexo).^{444,626}

1.-Producción de nesfatina-1 en el corazón.

Hasta la fecha, solo se han publicado dos trabajos donde se demuestra la producción de NUCB2/nesfatina-1 en tejido cardíaco en rata,^{398,402} aunque únicamente en el trabajo de Angelone y col. (2013)⁴⁰² se observa una banda de aproximadamente 9 kDa, utilizando la técnica de western blot, que confirma la producción de la forma madura de 82 aminoácidos correspondiente a nesfatina-1. De hecho, los únicos estudios que han demostrado la presencia de la forma madura de nesfatina-1 a día de hoy han sido el que acabamos de mencionar de Angelone y col. (2013)⁴⁰² y el trabajo original de Oh-I y col. (2006),³⁶³ donde se identificó por primera vez la nesfatina-1 como una proteína de aproximadamente 9 kDa en el fluido cerebrospinal de rata. El resto de trabajos publicados hasta la fecha solo detectan la proteína correspondiente a NUCB2 de aproximadamente 50 kDa en el cerebro, la mucosa gástrica, el páncreas, la pituitaria y el tejido adiposo.^{398,401,427,467,567} Algunos autores sugieren que esta discrepancia indica la posibilidad de

un procesamiento de NUCB2 posterior a su secreción, bien en los fluidos corporales o bien en sus lugares de acción.^{108,415,463,500}

En este trabajo de tesis hemos demostrado por primera vez la expresión de ARNm de NUCB2 y de la proteína nesfatina-1 (9.5 kDa) en cardiomiocitos en cultivo y en tejido auricular y ventricular de corazón humano, de rata y de ratón, así como también la presencia de la proteína PC1/3, hormona encargada de la proteólisis de NUCB2 para dar lugar a la forma activa de nesfatina-1,³⁶³ en tejido cardíaco auricular humano, confirmando así el procesamiento proteolítico potencial de NUCB2 en el tejido cardíaco. De acuerdo con estos resultados, existen trabajos en la bibliografía dónde se observa la presencia de ARNm de PC1/3 en tejido cardíaco humano y de proteína en ventrículo izquierdo de ratón.^{627,628}

En cuanto a la distribución de NUCB2/nesfatina-1 en las células cardíacas, se observó una localización claramente perinuclear de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos de rata y humano, así como también en cortes de tejido auricular humano. Probablemente, esta localización se corresponda a la presencia de NUCB2/nesfatina-1 en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi, ambos típicamente localizados alrededor de la membrana nuclear en cardiomiocitos.^{629,630} Apoyando esta hipótesis, en los primeros trabajos realizados sobre la distribución cerebral de nesfatina-1 se ha demostrado también una distribución perinuclear de nesfatina-1 en las células neuronales de los principales núcleos cerebrales productores de esta hormona, observando su localización también en estructuras unidas a la membrana del aparato de Golgi.^{399,427,432,500}

Además de producir NUCB2/nesfatina-1, los cardiomiocitos en cultivo son capaces de secretar nesfatina-1 al medio, como hemos demostrado cuantificando la secreción de NUCB2/nesfatina-1 en el medio de cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata mediante ELISA. Este es también el primer dato publicado sobre la secreción de nesfatina-1 por parte de cardiomiocitos,⁶²⁶ de hecho, los únicos estudios donde se observa la secreción de nesfatina-1 son el de Ramanjaneya y col. (2010)⁴⁰¹ en explantes de tejido adiposo de rata y el de González y col. (2011)⁴⁵⁴ en la línea de células β -pancreáticas de ratón MIN6. Nuestros resultados muestran que los cardiomiocitos secretan nesfatina-1 al medio a concentraciones en el mismo rango que las detectadas por explantes de tejido adiposo y superiores a las secretadas por la línea celular MIN6.

2.-Nesfatina-1 y metabolismo energético cardíaco.

En la actualidad, se ha propuesto que la nesfatina-1 es una hormona metabólica multifuncional: existen numerosas evidencias que indican que esta hormona actúa como un

coadyuvante de la insulina, ya que se ha visto que en ratas tiene un efecto antihiper glucémico⁵⁰⁴ y que su administración a nivel central incrementa la sensibilidad a la insulina,^{221,631} además de influenciar la excitabilidad de las neuronas sensoras de glucosa a nivel hipotalámico.⁴⁸¹ La nesfatina-1 también es capaz de inducir la liberación de insulina de manera dependiente de la glucosa en células pancreáticas de rata y ratón,^{485,486} así como también la secreción de glucagón en células pancreáticas de ratón.⁴⁸⁷ Además, los islotes pancreáticos de rata secretan NUCB2/nesfatina-1 de forma dependiente de la glucosa,⁴⁸⁶ y los niveles de glucosa plasmáticos se correlacionan negativamente con los niveles de NUCB2/nesfatina-1 en ratas,³⁹⁶ al igual que se observa en algunos estudios realizados en pacientes con diabetes tipo II.^{457,513}

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio funcional acerca del posible efecto de nesfatina-1 sobre el metabolismo de la glucosa a nivel celular. En esta línea, las mejores aproximaciones para determinar la captación de glucosa son la realización de un ensayo de incorporación de glucosa marcada radiactivamente⁶³² y la determinación de la movilización de los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática.⁶³³

En este trabajo de tesis demostramos por primera vez que la nesfatina-1 altera la distribución de GLUT-4, que es el principal transportador de glucosa en el corazón,⁶³⁴ en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo, favoreciendo su translocación desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular de un modo similar a como lo hace la insulina (control positivo). Li y col. (2013)⁵⁰⁸ han descrito también la translocación de GLUT-4 en cortes de tejido adiposo y de músculo esquelético tras la inyección periférica de nesfatina-1 en ratones, dónde además observan un incremento de la síntesis proteica de GLUT-4, resultados en concordancia con los presentados en este trabajo. Además de demostrar la translocación de GLUT-4, estudiamos el posible papel de la nesfatina-1 sobre la captación de glucosa sugerida por dicha translocación, demostrando que esta hormona induce la captación de glucosa por parte de cardiomiocitos en cultivo, tanto de rata como de ratón, lo que nos indica que la nesfatina-1 podría participar directamente en la regulación del metabolismo de la glucosa a nivel cardiomiocitario. Apoyando estos resultados, González y col. (2011)⁴⁸⁶ observan un incremento en la captación de glucosa por el tejido adiposo en ratas tratadas con nesfatina-1, incrementando tanto su captación basal como la inducida por insulina. Es importante destacar que las dosis de nesfatina-1 utilizadas en nuestros experimentos (que son similares a las utilizadas en las demás publicaciones donde se describen los efectos intracelulares de nesfatina-1 *in vitro*^{399,403,430,487}) son mayores que las concentraciones circulantes observadas en humanos y murinos,

sugiriendo que la producción local de nesfatina-1 *in vivo* podría ser fundamental para los efectos periféricos de esta hormona.

En cuanto a las posibles rutas de señalización intracelulares desencadenadas por nesfatina-1 en cardiomiocitos en cultivo, hemos demostrado que esta hormona induce de manera dosis/tiempo-dependiente un incremento en la fosforilación de AKT y ERK1/2, dos kinasas implicadas en la inducción de la translocación de GLUT-4 y en la captación de glucosa en músculo esquelético y en cardiomiocitos.^{616,617} Estos resultados respaldan los estudios de Yang y col. (2012)⁶³¹, de Li y col. (2013)⁵⁰⁸ y de Angelone y col. (2013)⁴⁰² que describen que nesfatina-1 induce la activación de AKT en núcleos hipotalámicos responsables de la homeostasis de la glucosa en rata⁶³¹ y en células del músculo esquelético, tejido adiposo e hígado en ratón,⁵⁰⁸ así como la activación de ERK1/2 en corazones de rata perfundidos.⁴⁰² Además, comprobamos que nesfatina-1 promueve la fosforilación del sustrato de AKT de 160 kDa (AS160), una proteína integrante de la ruta de señalización de la insulina que está implicada en la translocación de GLUT-4 (Fig. 5).^{633,635}

Cabe resaltar que este es el primer trabajo publicado acerca del papel de nesfatina-1 sobre la fosforilación de AS160, la translocación de GLUT-4 y la captación de glucosa *in vitro*, de manera que estos datos podrían contribuir a esclarecer el papel fisiológico o fisiopatológico de nesfatina-1 sobre el metabolismo glucídico sugerido por otros autores.⁶³⁶

En cuanto a los ácidos grasos, principal sustrato energético del corazón en condiciones fisiológicas normales,⁵⁶ no se conoce ningún trabajo que haya estudiado la posible función de nesfatina-1 sobre su captación y metabolismo a nivel cardiaco. En esta línea, nuestro grupo ya había demostrado previamente que otras adipokinas, en concreto la adiponectina, son capaces de inducir tanto la captación de glucosa como de ácidos grasos por cardiomiocitos en cultivo,²⁶¹ resultados que fueron corroborados por otros investigadores,⁶³⁷ al igual que ocurre con el tratamiento con leptina.⁶³⁸ Solo Dong y col. (2013) han observado el incremento del metabolismo de los ácidos grasos en músculo esquelético mediante la fosforilación de AMPK y ACC tras la administración de nesfatina-1 en ratones con diabetes inducida por la dieta y dosis bajas de estreptozotocina (antibiótico inductor de diabetes debido a su acción sobre el desarrollo de necrosis en las células β -pancreáticas).⁶³⁹ Nuestros resultados muestran por primera vez que nesfatina-1 es capaz de inducir la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos de rata en cultivo pero, sin embargo, no hemos podido demostrar que esta hormona induzca la activación ni de AMPK ni de ACC en nuestras células.

Quedaría pendiente tras este trabajo determinar qué ocurre con la glucosa y los ácidos grasos captados por los cardiomiocitos, para estudiar si son metabolizados adecuadamente o si, por el contrario, podrían estar induciendo toxicidad al ser acumulados o mal metabolizados. Aunque los ácidos grasos son necesarios para el correcto aporte de ATP requerido por el corazón, el incremento de los niveles lipídicos cardiacos se ha asociado con distintas condiciones fisiopatológicas, como la resistencia a la insulina a nivel cardiaco o la cardiomiopatía diabética.⁶⁴⁰⁻⁶⁴² Cuando el flujo de entrada de ácidos grasos excede la capacidad de oxidación de la mitocondria, los ácidos grasos se acumulan en forma de triacilgliceroles, y se ha visto que este acúmulo se correlaciona con la generación de intermediarios biológicamente activos con efectos lipotóxicos, como el diacilglicerol, dando lugar a la aparición de resistencia a la insulina y a la inducción de apoptosis.⁶⁴³⁻⁶⁴⁵ Por ejemplo, se ha visto que la captación de ácidos grasos inducida por la leptina en la línea celular HL-1 induce una oxidación de los mismos a tiempos cortos de tratamiento, mientras que a tiempos largos (24 horas) se produce un desacoplamiento entre la captación y la oxidación de los mismos.⁶³⁸ Asimismo, un exceso de la captación de glucosa podría dar lugar a un incremento de lactato, que se asocia también con el detrimento de la función cardiaca, habiéndose observado mayores niveles de lactato en situaciones de isquemia o diabetes, ambas asociadas con el desarrollo de insuficiencia cardiaca.⁶⁴⁶

3.-Regulación de la producción de nesfatina-1 en tejido cardiaco de rata.

Dieta.

En roedores, la síntesis de NUCB2/nesfatina-1 parece responder a la dieta y al estado nutricional tanto a nivel central, concretamente en neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico,^{363,435} como en tejidos periféricos como el estómago⁵⁰¹ o el tejido adiposo,⁴⁰¹ que son tejidos en los que nesfatina-1 podría participar en el control de la homeostasis energética en respuesta al estado metabólico. En este trabajo demostramos que la expresión de NUCB2/nesfatina-1 en tejido auricular cardiaco de rata se encuentra incrementada en ratas alimentadas con dieta alta en grasa, mientras que en tejido ventricular no se observan diferencias. Además, los niveles de NUCB2/nesfatina-1 en aurícula se correlacionan positivamente con los niveles de NUCB2/nesfatina-1 plasmáticos, y ambos, a su vez, se correlacionan también positivamente con el porcentaje de grasa corporal. En esta línea, Ramanjaneya y col. (2010)⁴⁰¹ observan que las concentraciones de NUCB2/nesfatina-1 en plasma son mayores en ratones con obesidad inducida por la dieta con respecto a ratones no obesos.

La obesidad supone un estrés metabólico para el corazón que, en último término, conduce a una situación de inflexibilidad metabólica y lipotoxicidad en la cual el transportador de ácidos grasos CD36 es el principal responsable del incremento crónico de la captación de ácidos grasos por el músculo cardiaco bajo estas circunstancias.⁶¹⁶ Debido a ello, comprobamos si en las ratas alimentadas con dieta alta en grasa existían diferencias en los niveles de expresión de CD36 y si sus niveles de expresión se correlacionaban con los de NUCB2/nesfatina-1, pero no hemos podido demostrar que existan diferencias en la expresión cardiaca de CD36 entre las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y las alimentadas con dieta normal, ni tampoco que exista alguna correlación entre los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 y CD36. En esta línea, distintos trabajos han descrito la mayor expresión de CD36 en cortes de tejido cardiaco en ratas y ratones alimentados con dieta alta en grasa mediante inmunohistoquímica,^{647,648} por lo que las diferencias entre dichos trabajos y nuestros resultados podrían deberse a la técnica utilizada.

Ayuno.

No hemos podido demostrar que existan diferencias en los niveles de expresión de ARNm de NUCB2 en tejido auricular de rata tras 36 horas de ayuno con respecto a las ratas alimentadas *ad libitum*. Hasta la fecha, no existe ningún estudio sobre la posible regulación de nesfatina-1 en tejido cardiaco debido al ayuno pero, sin embargo, sí que existen trabajos que han descrito en rata y ratón que el ayuno disminuye los niveles de esta hormona tanto en plasma como en el estómago o en el hipotálamo.^{363,396,398,435,501} Esto podría deberse a que en aquellas situaciones donde podría darse un compromiso sistémico en cuanto al aporte de energía, como es el ayuno, los principales tejidos implicados en la regulación de la ingesta y el metabolismo energético son el estómago y el cerebro. Sin embargo en humanos, los estudios realizados hasta el momento no han podido demostrar que el ayuno afecte a los niveles plasmáticos de nesfatina-1.^{445,457}

Obesidad.

La obesidad es un factor clave en el desarrollo del síndrome metabólico, que se describe como la asociación de la resistencia a la insulina, la hipertensión y la hiperlipemia en los estados de obesidad,⁶⁴⁹ y cuya prevalencia en los últimos años se está incrementando de forma dramática, con importantes consecuencias sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.⁶⁴⁹ Distintos trabajos se han centrado en el estudio del papel de las adipocinas y hormonas metabólicas en la fisiopatología del síndrome metabólico,^{153,195,650,651}

y para ello se han utilizado distintos modelos animales, siendo algunos de los más comunes las ratas Zucker (ratas con obesidad inducida por una mutación en el receptor de leptina), los ratones ob/ob (genéticamente obesos debido a una mutación en el gen de la leptina), los ratones db/db (genéticamente diabéticos debido a una mutación en el receptor de leptina) y ratones con resistencia a la leptina por obesidad inducida por dieta alta en grasa.⁶⁵²

Hemos estudiado el posible efecto de la obesidad inducida genéticamente en ratas Zucker sobre la expresión cardiaca de NUCB2/nesfatina-1, observando que no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de esta hormona entre ratas normopeso y obesas, así como tampoco se observa ninguna correlación con el porcentaje o la cantidad de grasa corporal. Estos resultados nos indican que los niveles cardiacos de nesfatina-1 no se ven influenciados por la obesidad inducida genéticamente, al contrario de lo que ocurriría con las ratas con dieta alta en grasa, lo que nos sugiere que la regulación de la expresión de nesfatina-1 en corazón depende más de la dieta que de la obesidad inducida por resistencia a la leptina.

Por otro lado, observamos una correlación entre los niveles cardiacos de NUCB2/nesfatina-1 con la cantidad de masa magra, pero consideramos que dicha correlación podría deberse a la edad de los animales. De hecho, independientemente del fenotipo de las ratas, los niveles cardiacos de esta hormona son mayores en las ratas de 21 semanas que en las de 6 semanas. La única publicación científica hasta el momento acerca de la posible relación entre niveles de nesfatina-1 y la edad es la de Li y col. (2014),⁶⁵³ dónde determinan en ratones BALB/c de 2, 6 y 24 meses de edad los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1, no observando diferencias significativas con respecto a la edad.

Retraso en el destete.

Cada vez hay más estudios donde se reconoce que la lactancia materna confiere protección a la hora de desarrollar en la etapa adulta patologías como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión, la diabetes o la hipercolesterolemia, que presentan una etiología compleja resultante de la interacción entre factores genéticos y factores ambientales.⁶⁵⁴⁻⁶⁵⁷ Como se ha comentado anteriormente (ver introducción), las adipokinas juegan un papel muy importante en el desarrollo de estas enfermedades y, por ejemplo, se ha visto que los niños alimentados con leche materna presentan mayores niveles plasmáticos de leptina.^{658,659} En este trabajo hemos demostrado que el retraso en el destete en ratas induce un incremento en la producción de NUCB2/nesfatina-1 en tejido

cardiaco auricular de rata en la etapa adulta, lo que demuestra por primera vez la regulación de la producción de una hormona metabólica a nivel cardiaco por parte de la prolongación de la lactancia materna, y sugiere que el tipo de nutrición neonatal podría llegar a tener efectos directos en la regulación del metabolismo cardiaco.

4.-Regulación de los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata por estímulos pro y antiinflamatorios.

Es bien reconocido que un estado crónico de inflamación de bajo grado y la activación del sistema inmune están asociados con la patogénesis de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo II en los estados de sobrepeso y obesidad.⁶⁶⁰ Las concentraciones plasmáticas de mediadores inflamatorios como TNF- α o IL-6 se encuentran elevadas en los estados de resistencia a la insulina, de forma que los mayores niveles circulantes de TNF- α e IL-6 interfieren con la señalización de esta hormona, suprimiendo su efecto antiinflamatorio y promoviendo así la inflamación.⁶⁶¹ A su vez, se ha visto también que la IL-1 β induce la deficiencia de la secreción de insulina por las células β -pancreáticas.⁶⁶⁰ Así, la obesidad y el síndrome metabólico se asocian con niveles circulantes alterados de citocinas y corticosteroides, los cuales, además, podrían participar en la regulación de la producción de adipocinas.⁴⁰¹ Por ejemplo, TNF- α estimula la secreción de leptina e inhibe la secreción de adiponectina en los adipocitos.^{662,663}

En cuanto a la secreción de nesfatina-1 por estímulos pro y antiinflamatorios, Ramanjaneya y col. (2010)⁴⁰¹ observaron en adipocitos 3T3-L1 y en explantes de tejido adiposo de rata que el tratamiento con TNF- α , IL-6, y dexametasona induce la expresión/secreción de NUCB2/nesfatina-1. En este trabajo hemos corroborado la modulación de los niveles de expresión génica de NUCB2/nesfatina-1 por moduladores de procesos inflamatorios, esta vez a nivel cardiaco, observando que tanto la IL-6 como la IL-1 β no tienen efectos sobre la expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1, mientras que el TNF- α y la dexametasona inducen un incremento significativo de la expresión de esta hormona.

5.-Regulación de los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata por la insulina.

Desde el descubrimiento de la nesfatina-1 como una nueva molécula anorexigénica en 2006,³⁶³ distintos autores se han centrado en el estudio de su papel sobre el metabolismo energético y su implicación en la regulación de la secreción/sensibilidad a la insulina. Así,

en los últimos años se ha descrito a la nesfatina-1 como una hormona coadyuvante de la insulina, presentando efectos hipoglucemiantes y potenciadores de la liberación de la insulina por el páncreas.^{454,485,487,636,664} Nuestros datos muestran que la insulina disminuye la expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata, un efecto contrario a otros estudios realizados *in vitro* donde observan que tanto la insulina como niveles altos de glucosa estimulan la producción/secreción de NUCB2/nesfatina-1 por células MIN6 y por explantes de tejido adiposo respectivamente.^{401,454}

6.-Análisis mediante microarray de genoma completo de los efectos de nesfatina-1 sobre el perfil de expresión génica en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo.

Hasta la fecha, los principales estudios realizados *in vitro* sobre el mecanismo de acción a nivel celular de nesfatina-1 se han centrado en sus efectos sobre la señalización del calcio intracelular como segundo mensajero,^{477,485,542} en el metabolismo energético y en la liberación y mejora de la sensibilidad a la insulina,^{401,403,485-487,508} en su función como posible molécula inflamatoria⁴⁵³ o en su efecto sobre la viabilidad celular.⁵⁷² Sin embargo, no existe ningún estudio acerca del efecto de nesfatina-1 de forma general sobre el perfil de expresión génica.

Aunque actualmente seguimos trabajando en el análisis del microarray para identificar nuevos genes candidatos para su posterior validación y estudio, nuestros resultados preliminares muestran que la nesfatina-1 afecta principalmente a la expresión de genes implicados en el metabolismo y el desarrollo a nivel cardíaco, así como en la regulación del estrés y el comportamiento, todas funciones ampliamente conocidas de esta hormona.^{420,503,555,558,665-667} Entre las rutas modificadas de forma significativa por el tratamiento con nesfatina-1 aparece la ruta de señalización de ErbB4 como una de las más alteradas. ErbB4 es uno de los receptores con actividad tirosín kinasa de la neuregulina-1 β , junto con ErbB2 y ErbB3, de forma que la unión de la neuregulina-1 β a sus receptores induce su dimerización tanto en forma de homodímeros como de heterodímeros, desencadenando la consecuente cascada de señalización intracelular.^{668,669} La señalización de la neuregulina-1 β /ErbB es necesaria en el desarrollo y en el mantenimiento de la fisiología normal del sistema cardiovascular en la etapa adulta en rata,^{668,669} estando implicada en la regulación del tono vascular y la presión sanguínea, la angiogénesis, la adaptación a la hipertrofia, la captación de glucosa por el músculo esquelético o el mantenimiento y supervivencia de los cardiomiocitos.⁶⁶⁹ En concreto, la señalización mediante el receptor ErbB4 interviene en la regeneración miocárdica dando lugar a una mejora de la

insuficiencia cardíaca^{668,670,671} y protegiendo frente al daño inducido por isquemia/reperfusión a través de la activación de AKT.⁶⁷²

Hasta el momento no se conoce un receptor específico para nesfatina-1, aunque a nivel hipotalámico se ha sugerido que la nesfatina-1 actúa a través de un receptor acoplado a proteínas G en rata, identificado mediante ensayos de inhibición y testando la capacidad de nesfatina-1 sobre la excitabilidad neuronal,⁴³⁰ resultado posteriormente corroborado en la línea de células neuronales de ratón NB41A3 y ampliado mediante ensayos de unión de nesfatina-1 marcada con I¹²⁵ a la superficie celular.⁴⁷³ Por otro lado, se ha sugerido al receptor de oxitocina como un posible receptor funcional de nesfatina-1, ya que su inhibición revierte el efecto anorexigénico e hipertensivo de nesfatina-1 a nivel cerebral.⁴¹⁸

En este trabajo estudiamos el papel de ErbB4 como posible mediador de la señalización de la nesfatina-1 en cardiomiocitos neonatales de rata. Mediante la inhibición de dicho receptor con AG1478 determinamos el efecto sobre la fosforilación de ERK1/2 observada previamente tras el tratamiento con nesfatina-1, demostrando que a pesar de la inhibición del receptor ErbB4, la nesfatina-1 sigue siendo capaz de desencadenar su cascada de señalización intracelular induciendo la fosforilación de ERK1/2, lo que nos sugiere que o bien ErbB4 no es un receptor específico para nesfatina-1 en cardiomiocitos, o bien que en caso de serlo, podría darse la coexistencia de otro tipo de receptor a través del cual nesfatina-1 transmita su señal intracelular en este caso.

Estudiamos también el efecto de nesfatina-1 sobre la expresión génica de APOP1, uno de los genes con mayores cambios en su expresión tras el tratamiento de cardiomiocitos neonatales de rata con esta hormona. APOP1 es un gen proapoptótico que interviene en la ruta intrínseca de la apoptosis, donde induce la liberación del citocromo C desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma mediante la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP).⁶⁷³ En este trabajo demostramos que la nesfatina-1 induce una disminución de la expresión génica de APOP1 a tiempos cortos, mientras que, por el contrario, a tiempos largos estimula su expresión. Debido a la escasa bibliografía existente acerca de la función de APOP1 y a los escasos datos publicados acerca de la posible regulación de la viabilidad celular por parte de nesfatina-1, decidimos estudiar el efecto de esta hormona sobre la apoptosis y la viabilidad celular en cardiomiocitos.

7.-Efecto de nesfatina-1 sobre la viabilidad celular cardiomiocitaria.

En cuanto al efecto de nesfatina-1 sobre la viabilidad celular, el único trabajo conocido hasta la fecha es el de Xu y col. (2013),⁵⁷² donde describen un efecto proapoptótico de nesfatina-1 tras 48 horas de tratamiento a dosis de 10 nM en la línea

celular de carcinoma epitelial ovárico humano HO-8910. Sin embargo, por el contrario, Özsavcı y col. (2011)⁵⁷⁰ y Tang y col. (2012)⁵⁷¹ describen un efecto antiapoptótico de nesfatina-1 en tejido cerebral tras la inducción de un traumatismo.

En cardiomiocitos murinos en cultivo, observamos por primera vez que la nesfatina-1 induce apoptosis y reducción de la actividad mitocondrial tras 12-24 horas de tratamiento. Nuestros resultados apoyan el trabajo de Xu y col. (2013),⁵⁷² ya que observamos una inducción de la apoptosis a las mismas dosis de nesfatina-1, e incluso en un período menor de tiempo de tratamiento.

Aunque queda por determinar en este trabajo la ruta mediante la cual la nesfatina-1 induce apoptosis en los cardiomiocitos, los resultados que ya hemos comentado sobre la inducción de la expresión génica de APOP1 a tiempos largos apoya el posible papel de la nesfatina-1 como una molécula proapoptótica a tiempos largos de tratamiento. Además, no podemos descartar la posible existencia de una relación entre el incremento de la captación de glucosa y ácidos grasos inducida por nesfatina-1 y la disminución de la viabilidad celular, estudios todavía en desarrollo. De momento podemos solamente especular que podría deberse a una posible cardiotoxicidad debida al desacoplamiento entre la captación y la oxidación de glucosa y de ácidos grasos, un fenómeno descrito ampliamente en cardiomiocitos^{638,674} y que se ha demostrado anteriormente que se induce en este tipo celular por otra hormona metabólica como la leptina⁶³⁸

8.-Estudios de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en tejido cardiaco humano.

Hasta la fecha, solo se han publicado dos trabajos donde se estudia la regulación de la expresión de NUCB2/nesfatina-1 en células o tejidos humanos. Yamada y col. (2010)³⁶⁴ encontraron que la troglitazona (medicamento antidiabético y antiinflamatorio) estabiliza en ARNm de NUCB2 mediante la activación de ERK1/2 en una línea celular humana de meduloblastoma, y Riva y col. (2011)⁴⁸⁷ observaron que la deficiencia de NUCB2 en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes tipo II se puede remediar mediante su cultivo en condiciones glucolipotóxicas.

En este trabajo estudiamos la regulación de la expresión génica de NUCB2/nesfatina-1 en tejido auricular y ventricular cardiaco de pacientes con enfermedad cardiovascular establecida.

Relación entre los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 y el género.

En tejido cardiaco auricular humano, observamos que existen mayores niveles de

expresión de NUCB2/nesfatina-1 en mujeres con respecto a los varones, lo que nos indica una dependencia del sexo sobre los niveles de expresión cardíacos de esta hormona. Estos son los primeros resultados en la bibliografía acerca de una relación entre niveles tisulares cardíacos de nesfatina-1 y género en humanos⁶²⁶. Hasta el momento, el único trabajo publicado que describe una relación entre expresión de nesfatina-1 a nivel tisular y el sexo es el de Xu y col. (2009),⁴⁴⁹ donde demuestran en ratas hembra un incremento del 40-50% de la expresión de NUCB2/nesfatina-1 en el núcleo hipotalámico Edinger-Westphal con respecto a los machos.

Se sabe desde hace tiempo que las mujeres presentan una cierta protección frente al desarrollo de ECVs con respecto a los varones.^{675,676} En este sentido, en este trabajo hemos observado que las mujeres que no presentan lesión coronaria tienen mayores niveles de expresión cardíaca de NUCB2/nesfatina-1 con respecto a las que presentan esta patología, sin observar, sin embargo, ninguna diferencia entre ambos grupos en los varones.

Relación entre los niveles cardíacos de NUCB2/nesfatina-1 e hipertensión arterial.

Se ha demostrado la existencia de una regulación de los niveles plasmáticos de algunas hormonas metabólicas con conocidos efectos pro⁶⁷⁷⁻⁶⁷⁹ y antihipertensivos⁶⁸⁰ (leptina y adiponectina respectivamente) tras el tratamiento con IECAs en pacientes con hipertensión: los niveles plasmáticos de leptina se ven reducidos,⁶⁸⁰ al contrario de lo que ocurre con la adiponectina, cuyos niveles circulantes se incrementan tras el tratamiento con IECAs.⁶⁸⁰

En la bibliografía existen numerosos estudios que describen la función prohipertensiva de nesfatina-1 en animales de experimentación, en los que se ha visto que su administración incrementa la tensión arterial en rata y ratón.^{476,598,681} Se ha descrito asimismo la existencia de una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y la tensión arterial en humanos.⁶⁸² En concordancia con dichos estudios, en este trabajo hemos observado que los varones a tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) (aquellos con hipertensión o con insuficiencia cardíaca), presentan menores niveles de expresión génica de NUCB2/nesfatina-1 en tejido auricular con respecto a los no tratados.

Relación entre los niveles cardíacos de NUCB2/nesfatina-1, la diabetes y el gap de glicación.

Existe cierta controversia sobre la posible relación entre la nesfatina-1 y la

fisiopatología de la diabetes tipo II en humanos, ya que los distintos trabajos realizados en este campo, basados en el estudio de los niveles plasmáticos de nesfatina-1 en pacientes con diabetes, muestran resultados contradictorios: por un lado, Li y col. (2010)⁴⁵⁷ y Deniz y col. (2012)⁵¹⁰ describen menores niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 en pacientes con diabetes tipo II y mujeres con diabetes gestacional respectivamente, mientras que por otro lado Zhang y col. (2012)⁵¹³ observan mayores niveles plasmáticos de esta hormona en pacientes con diabetes tipo II.

Diabetes.

Debido al efecto de nesfatina-1 sobre la captación de glucosa en cardiomiocitos⁶²⁶ y a su reconocido papel en la regulación de la glucemia,^{221,481,485-487,504,631} decidimos estudiar los niveles de expresión tisulares a nivel cardiaco en aurícula de pacientes a tratamiento con antidiabéticos orales (metformina), y observamos que los varones que toman este medicamento presentan mayores niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 con respecto a los que no lo toman, sin observar ninguna diferencia en el grupo de las mujeres. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles cardiacos de NUCB2/nesfatina-1 en pacientes con diabetes tipo II respecto a pacientes no diabéticos. Sin embargo, al analizar el conjunto de los varones diabéticos (tipo I y tipo II) se observa que en aquellos diabéticos existen mayores niveles de expresión cardiaca de NUCB2/nesfatina-1 respecto a los no diabéticos.

La metformina es el principal antidiabético oral utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo II (también se utiliza en pacientes con diabetes tipo I), y además tiene numerosos efectos cardioprotectores.^{196,683,684} Aunque no se conoce con exactitud su modo de acción a nivel intracelular, se sabe que la metformina mejora el control de la glucemia suprimiendo la producción de glucosa hepática e incrementando la captación de glucosa por tejidos periféricos de manera dependiente de la señalización de AMPK y de la movilización del transportador de glucosa GLUT-4, aunque en los últimos años se sugieren también nuevas vías de señalización independientes de AMPK que todavía necesitan ser estudiadas.⁶⁸⁵ Todos estos efectos de la metformina sobre el control glucémico hacen plausible el efecto que hemos observado sobre los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 a nivel cardiaco. Distintos grupos de investigación han demostrado, como hemos hecho nosotros con nesfatina-1 a nivel cardiaco en este trabajo, que la metformina es capaz de modificar los niveles plasmáticos de determinadas hormonas, como la leptina, la adipolína, la omentina, la vaspina o la adiponectina en humanos,⁶⁸⁶⁻⁶⁸⁸

observando además diferencias con respecto al sexo en los niveles de vaspina y adiponectina.⁶⁸⁸

Por otro lado, como hemos comentado anteriormente, Yamada y col. (2010)³⁶⁴ observan que otro medicamento antidiabético como la troglitazona estabiliza en ARNm de NUCB2 mediante la activación de ERK1/2 en una línea celular humana de meduloblastoma, trabajo que apoya nuestros resultados.

Gap de glicación.

El gap de glicación se utiliza como un índice para estimar la glucemia mediante el cálculo de la diferencia entre la HbA_{1c} medida en sangre y la predicha mediante una recta de regresión que utiliza los valores de fructosamina plasmáticos.²¹⁸ Los pacientes con un gap de glicación <-1 se consideran bajos glicadores, entre -1 y 1 glicadores medios, y >+1 altos glicadores,^{218,219} de modo que el gap de glicación ha sido propuesto como un indicador del riesgo de padecer complicaciones derivadas de la diabetes (a mayor gap de glicación mayor riesgo),²¹⁸⁻²²⁰ e incluso como un predictor de la mortalidad debido a complicaciones vasculares en pacientes diabéticos.²¹⁹

Hasta el momento, los únicos estudios realizados acerca de la relación entre los niveles de nesfatina-1 y la HbA_{1c} son el de Zhang y col. (2012),⁵¹³ que muestra que en pacientes con diabetes tipo II de reciente diagnóstico y en pacientes con intolerancia a la glucosa existe una correlación positiva de los niveles plasmáticos de nesfatina-1 con la glucosa y con la HbA_{1c}, y el de Lui y col. (2014),⁵²² donde se observa una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de nesfatina-1 y de HbA_{1c} en un grupo 80 pacientes formados por 30 pacientes con diabetes tipo II, 25 con resistencia de la tolerancia a la glucosa, y 25 controles.

En este trabajo hemos visto que los niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en tejido auricular cardiaco en los pacientes considerados como bajos glicadores (aquellos con menor riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares derivadas de la diabetes) se correlacionan negativamente con la glucosa plasmática, pasando a correlacionarse positivamente en los glicadores medios y perdiéndose la correlación en los altos glicadores, pero, además, en los altos glicadores observamos una correlación negativa entre los niveles de NUCB2 cardiacos y el gap de glicación. De este modo, las correlaciones que se establecen entre niveles cardiacos de nesfatina-1 y niveles de glucosa plasmáticos en pacientes con enfermedad cardiovascular varían en función del grupo de riesgo que se les asigne según su gap de glicación. Nuestros resultados apoyan la validez del gap de glicación

como un sistema para estratificar el riesgo de complicaciones en pacientes con enfermedad cardiovascular al separar a los pacientes en función del riesgo cardiovascular derivado de la diabetes, observando diferencias entre la correlación de los niveles cardiacos de nesfatina-1 y la glucemia. En esta línea, nuestros datos parecen estar en concordancia con el trabajo de Zhang y col. (2012)⁵¹³ donde describen que en pacientes con diabetes tipo II de reciente diagnóstico y en pacientes con intolerancia a la glucosa existe una correlación positiva de los niveles plasmáticos de nesfatina-1 con la glucosa y con la HbA_{1c}.⁵¹³

Relación entre los niveles de NUCB2/nesfatina-1 en ventrículo izquierdo de pacientes en la fase final de la insuficiencia cardiaca.

La insuficiencia cardíaca es un síndrome incapacitante y frecuente que genera una gran morbimortalidad y que suele ser secundaria a la enfermedad coronaria, a la presencia de cardiomiopatías o a la hipertensión arterial.^{689,690} Se define como la incapacidad del corazón para suplir las demandas de oxígeno y nutrientes de los tejidos, lo que resulta en fatiga y disnea, afectando a la calidad de vida y las actividades de la vida diaria de estos pacientes.^{689,691,692} Aunque durante los últimos 50 años la supervivencia después del diagnóstico de la insuficiencia cardíaca ha mejorado ligeramente en ambos sexos, en la actualidad las pautas óptimas de tratamiento consiguen solo retardarla, pero no detener la progresión de la enfermedad, de manera que el 40% de las muertes se debe a la progresión de la enfermedad a fase terminal, otro 40% a muerte súbita y el 20% restante se debe a otras causas.⁶⁹³

En este trabajo hemos demostrado que los pacientes con insuficiencia cardiaca terminal con cardiomiopatía isquémica presentan mayores niveles de expresión de ARNm de NUCB2/nesfatina-1 en el ventrículo izquierdo con respecto a los pacientes control. Angelone y col. (2013)⁴⁰² han demostrado que la nesfatina-1 protege frente al daño inducido por isquemia/reperfusión en corazones de rata perfundidos. La isquemia se origina debido al déficit de aporte sanguíneo al corazón por la obstrucción de una arteria, dando lugar un déficit de aporte de oxígeno y de energía al corazón.⁶⁹⁴ En los procesos de isquemia la glucosa pasa a ser el sustrato preferente para el corazón.⁶⁹⁵ De este modo, los mayores niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en los pacientes isquémicos podrían reflejar un mecanismo compensatorio para suplir las demandas energéticas del corazón isquémico.

9.-Niveles de Nesfatina-1 en plasma de pacientes con insuficiencia cardiaca que presentan reducción de la tolerancia al ejercicio.

La reducción de la tolerancia al ejercicio es uno de los primeros síntomas de la insuficiencia cardiaca, y habitualmente es el principal motivo por el cual los pacientes acuden al médico, de modo que la reducción de la tolerancia al ejercicio está estrechamente relacionada con el diagnóstico de la enfermedad.⁶⁹² La capacidad de realizar ejercicio depende de la capacidad del corazón para aumentar la salida de sangre hacia los músculos y de la eficacia de los músculos para utilizar el oxígeno de la sangre, por lo que la captación máxima de oxígeno depende del gasto cardiaco y de la diferencia arterio-venosa de oxígeno.⁶⁹² En los pacientes con insuficiencia cardiaca el gasto cardiaco no se incrementa con el ejercicio de forma adecuada debido a que la fracción de eyección y la frecuencia cardiaca son menores de lo requerido para soportar el ejercicio.⁶⁹² Además, en la insuficiencia cardiaca el corazón desarrolla una dependencia de la glucosa como sustrato energético preferente, lo que requiere que el transporte de la glucosa y su oxidación estén estrechamente regulados para suplir al corazón de un aporte adecuado de ATP.^{56,696} Debido a ello, se han propuesto como posibles tratamientos para la insuficiencia cardiaca agentes potenciadores de la sensibilidad a la insulina y la captación de glucosa.⁶⁹⁷ En esta línea, adipokinas como la adiponectina, la leptina o la resistina se han mostrado determinantes en la regulación de la resistencia a la insulina:^{651,698,699} pacientes con cardiomiopatía dilatada con menores niveles plasmáticos de leptina y resistina presentan una mejoría de los parámetros hemodinámicos cardiacos,⁶⁹⁹ mientras que aquellos con menores niveles plasmáticos de adiponectina, implicada en la mejoría de la resistencia a la insulina,¹⁹² tienen peor perfusión miocárdica y menores niveles de HDL plasmáticos.⁷⁰⁰

En este trabajo hemos demostrado por primera vez la existencia de una asociación entre los niveles plasmáticos de nesfatina-1 y la presencia de síntomas clínicos graves de insuficiencia cardíaca, como es la resistencia a la tolerancia al ejercicio, observando mayores niveles de NUCB2/nesfatina-1 de forma independiente al sexo, la edad u otras patologías. Todos los pacientes del estudio que mostraban reducción de la tolerancia al ejercicio padecían cardiomiopatía dilatada, de forma que los niveles de nesfatina-1 en los pacientes con cardiomiopatía dilatada son mayores en aquellos que presentan reducción de la tolerancia al ejercicio, posiblemente debido a un empeoramiento de la enfermedad. La cardiomiopatía dilatada es uno de los principales factores desencadenantes de insuficiencia cardiaca y muerte súbita, suponiendo la causa central de trasplante cardiaco tanto en adultos como en niños en todo el mundo,⁷⁰¹ y se caracteriza

por una dilatación de los ventrículos, principalmente del ventrículo izquierdo, que origina disfunción sistólica y la aparición de insuficiencia cardíaca.⁷⁰² Existen distintas condiciones que conducen a la aparición de cardiomiopatía dilatada, entre las que se incluyen factores genéticos, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias, sin embargo, la etiología de la cardiomiopatía dilatada no se conoce con exactitud, y en muchos de casos no existe una causa clara.⁷⁰² En los últimos años se ha puesto en evidencia que la cardiomiopatía dilatada, concretamente en un estado avanzado, se acompaña de la aparición de resistencia a la insulina, causando importantes consecuencias en el corazón con insuficiencia cardíaca.⁶⁹⁶ La resistencia a la insulina limita tanto la captación de glucosa como su oxidación en los cardiomiocitos, limitando así la formación del ATP necesario para suplir las necesidades del corazón, a pesar de la mayor secreción de insulina como un modo compensatorio.⁶⁹⁶ Así, los mayores niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 plasmáticos en estos pacientes podrían sugerir un posible mecanismo de sobreproducción de nesfatina-1 para intentar suplir las demandas energéticas del corazón insuficiente.

10.-Nesfatina-1 como un posible biomarcador de enfermedades cardiovasculares.

Los biomarcadores son moléculas que se encuentran en la circulación u otro fluido corporal y/o tejidos y órganos en cantidades cuantificables y cuyos niveles varían en condiciones patológicas y en respuesta a intervenciones farmacológicas⁷⁰³.

Aunque la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha con nesfatina-1 han sido realizados en animales, se ha propuesto a esta hormona como un posible futuro biomarcador diagnóstico de determinadas patologías (esta posibilidad deberá de ser confirmada con más estudios experimentales): la nesfatina-1 es capaz de distinguir entre individuos sanos e individuos con hígado graso no alcohólico,⁵¹⁶ depresión,⁵⁵⁸ epilepsia,^{459,560} apnea obstructiva del sueño,⁷⁰⁴ endometriosis,⁷⁰⁵ síndrome de ovarios poliquísticos⁷⁰⁶ o preeclampsia,⁷⁰⁷ y sus niveles salivares y plasmáticos se modifican tras el tratamiento con antiepilépticos.

En este trabajo hemos observado que los niveles cardíacos y plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 son capaces de discriminar entre algunos tipos de patologías cardiovasculares, y se regulan en respuesta a determinados tratamientos médicos. De este modo, nuestros datos apoyan la propuesta sugerida por diversos autores de que podría llegar a plantearse el uso de NUCB2/nesfatina-1 como un posible biomarcador de determinadas patologías^{459,559,708}, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, aunque

son claramente necesarios más estudios para determinar su poder de discriminación/predicción.







CONCLUSIONES



1.-Los cardiomiocitos en cultivo de origen humano y murino son capaces de sintetizar y secretar nesfatina-1.

2.-La nesfatina-1 induce la captación de ácidos grasos y glucosa por parte de cardiomiocitos en cultivo.

3.-La nesfatina-1 estimula la fosforilación de ERK1/2 y AKT en cardiomiocitos murinos en cultivo.

4.-Los niveles de expresión génica cardiomiocitarios de nesfatina-1 se ven influenciados tanto por moduladores inflamatorios como por la insulina.

5.-Los niveles de expresión génica y/o proteica de nesfatina-1 en tejido cardiaco de rata se ven modificados por la dieta, la duración del período de lactancia materna y la edad.

6.-La nesfatina-1 regula la viabilidad de cardiomiocitos murinos en cultivo.

7.-Los niveles de expresión génica de nesfatina-1 en tejido cardiaco auricular humano se ven modificados por la presencia de enfermedad coronaria. Además, existen diferencias en los niveles de expresión de nesfatina-1 en tejido cardiaco auricular humano de pacientes con enfermedad cardiovascular en función del género.

8.-Los niveles de expresión génica de nesfatina-1 en tejido cardiaco auricular humano de pacientes con enfermedad cardiovascular establecida se modulan por el tratamiento con antidiabéticos orales y antihipertensivos.

9.-Los niveles de expresión génica de nesfatina-1 en tejido cardiaco ventricular humano en pacientes en la fase final de la insuficiencia cardiaca son mayores en aquellos pacientes con insuficiencia cardiaca de etiología isquémica.

10.-Los niveles plasmáticos de nesfatina-1 están incrementados en pacientes con insuficiencia cardiaca que presentan una reducción de la tolerancia al ejercicio.





BIBLIOGRAFÍA



1. Frood S, Johnston LM, Matteson CL, Finegood DT. Obesity, complexity, and the role of the health system. *Curr. Obes. Rep.* 2013;2:320–326.
2. Prentice AM. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *Int. J. Epidemiol.* 2006;35(1):93–9.
3. WHO. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series No. 894.* Geneva: World Health Organisation, 2000.
4. Pereira MA. Diet beverages and the risk of obesity, diabetes, and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Nutr. Rev.* 2013;71(7):433–40.
5. Justo GF, Callo GQ, Carletti L, Molina MCB. Nutritional extremes among school children in a rural Brazilian municipality. *Rural Remote Health.* 2012;12(4):2220.
6. Salehi-Abargouei A, Abdollahzad H, Bameri Z, Esmaillzadeh A. Underweight, overweight and obesity among zabolis adolescents: a comparison between international and iranians' national criteria. *Int. J. Prev. Med.* 2013;4(5):523–30.
7. Caleyachetty R, Rudnicka AR, Echouffo-Tcheugui JB, Siegel KR, Richards N, Whincup PH. Prevalence of overweight, obesity and thinness in 9-10 year old children in Mauritius. *Global Health.* 2012;8:28.
8. WHO. *Obesity and overweight.* Fact sheet N°311. World Health Organisation, 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
9. Ji CY, Chen TJ. Empirical changes in the prevalence of overweight and obesity among Chinese students from 1985 to 2010 and corresponding preventive strategies. *Biomed. Environ. Sci.* 2013;26(1):1–12.
10. Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J. More than a simple storage organ: Adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* 2013;110(3):1–10.
11. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The Disease Burden Associated With. *JAMA.* 1999;282(16):1523–1529.
12. Awa WL, Fach E, Krakow D, Welp R, Kunder J, Voll A, Zeyfang A, Wagner C, Schütt M, Boehm B, de Souza M, Holl RW. Type 2 diabetes from pediatric to geriatric age: analysis of gender and obesity among 120,183 patients from the German/Austrian DPV database. *Eur. J. Endocrinol.* 2012;167(2):245–54.
13. Silva F, Ferreira E, Gonçalves R, Cavaco A. Obesidade Pediátrica: a realidade de uma consulta. *Acta Med. Port.* 2012;25(2):91–96.
14. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2008;18(2):158–68.
15. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2013;56(4):369–81.
16. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997;387(6636):903–8.
17. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998;392(6674):398–401.
18. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte J-M, Picard F, Shapiro A, Zhang S, Bertrais S, Hercberg S, Basdevant A, Clément K, Vaisse C. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(5):1811–8.
19. Wallner-Liebmann SJ, Kruschitz R, Hübner K, Hamlin MJ, Schnedl WJ, Moser M, Tafait E. A measure of obesity: BMI versus subcutaneous fat patterns in young athletes and nonathletes. *Coll. Antropol.* 2013;37(2):351–7.
20. Kruschitz R, Wallner-Liebmann SJ, Hamlin MJ, Moser M, Ludvik B, Schnedl WJ, Tafait E. Detecting body fat-A weighty problem BMI versus subcutaneous fat patterns in athletes and non-athletes. *PLoS One.* 2013;8(8):e72002.

21. Liu P, Ma F, Lou H, Liu Y. The utility of fat mass index vs. body mass index and percentage of body fat in the screening of metabolic syndrome. *BMC Public Health*. 2013;13(1):629.
22. National Institutes of Health. *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults—the evidence report*. *Obes Res* 1998;6(Suppl 2):51S–209S.
23. De Mateo Silleras B, Redondo Del Río P, Camina Martín A, Soto Célix M, Alonso Torre SR, Miján de la Torre A, Silleras BDM, Redondo P, Martín AC, Célix MS, Sara R, Torre A, De M. Effect of refeeding on the body composition of females with restrictive anorexia nervosa; anthropometry versus bioelectrical impedance. *Nutr. Hosp.* 2013;28(5):1717–1724.
24. Switzer NJ, Mangat HS, Karmali S. Current trends in obesity: body composition assessment, weight regulation, and emerging techniques in managing severe obesity. *J. Interv. Gastroenterol.* 2013;3(1):34–36.
25. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(5):968–76.
26. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMAthe J. Am. Med. Assoc.* 2013;309(1):71–82.
27. Onat A, Avci GS, Barlan MM, Uyarel H, Uzunlar B, Sansoy V. Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 2004;28(8):1018–25.
28. Poirier P. Adiposity and cardiovascular disease: are we using the right definition of obesity? *Eur. Heart J.* 2007;28(17):2047–8.
29. WHO. *Waist Circumference and Waist–Hip Ratio. Report of a WHO Consultation*. World Health Organization. Geneva: 8-11 December, 2008.
30. Bevacqua RJ. Sobrepeso, obesidad y riesgo cardiovascular. *Insufic. cardíaca.* 2007;2(2):73–75.
31. Kaltman AJ, Goldring RM. Role of circulatory congestion in the cardiorespiratory failure of obesity. *Am. J. Med.* 1976;60(5):645–53.
32. Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO, Snyder DW. Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch. Intern. Med.* 1987;147(10):1725–8.
33. Brassard P, Legault S, Garneau C, Bogaty P, Dumesnil J-G, Poirier P. Normalization of diastolic dysfunction in type 2 diabetics after exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2007;39(11):1896–901.
34. Martin J, Bergeron S, Pibarot P, Bastien M, Biertho L, Lescelleur O, Bertrand F, Simard S, Poirier P. Impact of bariatric surgery on N-terminal fragment of the prohormone brain natriuretic peptide and left ventricular diastolic function. *Can. J. Cardiol.* 2013;29(8):969–975.
35. Lavie CJ, Ventura HO. Analyzing the weight of evidence on the obesity paradox and heart failure: is there a limit to the madness? *Congest. Heart Fail.* 2013;19(4):158–9.
36. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2002;347(5):305–13.
37. Alpert MA, Terry BE, Mulekar M, Cohen M V, Massey C V, Fan TM, Panayiotou H, Mukerji V. Cardiac morphology and left ventricular function in normotensive morbidly obese patients with and without congestive heart failure, and effect of weight loss. *Am. J. Cardiol.* 1997;80(6):736–40.
38. Guglin M, Baxi K, Schabath M. Anatomy of the obesity paradox in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2014;19(5):621–35.
39. Puig T, Ferrero-Gregori A, Roig E, Vazquez R, Gonzalez-Juanatey JR, Pascual-Figal D, Delgado J, Alonso-Pulpon L, Borrás X, Mendez A, Cinca J. Prognostic value of body mass index and waist circumference in patients with chronic heart failure (Spanish REDINSCOR Registry). *Rev. Esp. Cardiol.* 2014;67(2):101–106.
40. Buchholz EM, Rathore SS, Reid KJ, Jones PG, Chan PS, Rich MW, Spertus JA, Krumholz HM. Body mass index and mortality in acute myocardial infarction patients. *Am. J. Med.* 2012;125(8):796–803.

41. Kadakia MB, Fox CS, Scirica BM, Murphy SA, Bonaca MP, Morrow DA. Central obesity and cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome: observations from the MERLIN-TIMI 36 trial. *Heart*. 2011;97(21):1782–7.
42. Kalantar-Zadeh K, Block G, Horwich T, Fonarow GC. Reverse epidemiology of conventional cardiovascular risk factors in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;43(8):1439–44.
43. Kennedy LMA, Dickstein K, Anker SD, Kristianson K, Willenheimer R. The prognostic importance of body mass index after complicated myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;45(1):156–8.
44. Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Somers VK, Lopez-Jimenez F, Thomas RJ, Squires RW, Allison TG. Prognostic importance of weight loss in patients with coronary heart disease regardless of initial body mass index. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2008;15(3):336–40.
45. Lavie CJ, Milani R V, Artham SM, Patel DA, Ventura HO. The obesity paradox, weight loss, and coronary disease. *Am. J. Med.* 2009;122(12):1106–14.
46. Oreopoulos A, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, Padwal R, Ezekowitz JA, Sharma AM, Kovesdy CP, Fonarow GC, Norris CM. The relationship between body mass index, treatment, and mortality in patients with established coronary artery disease: a report from APPROACH. *Eur. Heart J.* 2009;30(21):2584–92.
47. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, Mookadam F, Lopez-Jimenez F. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*. 2006;368(9536):666–78.
48. Das SR, Alexander KP, Chen AY, Powell-Wiley TM, Diercks DB, Peterson ED, Roe MT, de Lemos JA. Impact of body weight and extreme obesity on the presentation, treatment, and in-hospital outcomes of 50,149 patients with ST-Segment elevation myocardial infarction results from the NCDR (National Cardiovascular Data Registry). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011;58(25):2642–50.
49. Nagarajan V, Cauthen CA, Starling RC, Tang WHW. Prognosis of morbid obesity patients with advanced heart failure. *Congest. Heart Fail.* 2013;19(4):160–4.
50. Kapoor JR, Heidenreich PA. Obesity and survival in patients with heart failure and preserved systolic function: a U-shaped relationship. *Am. Heart J.* 2010;159(1):75–80.
51. Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr. Probl. Cardiol.* 1994;19(2):59–113.
52. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* 2013;113(5):603–16.
53. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 1974;36:413–59.
54. Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP. The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int. J. Cardiol.* 2014;171(2):134–43.
55. Horowitz JD, Chirkov YY, Kennedy J a, Sverdlov AL. Modulation of myocardial metabolism: an emerging therapeutic principle. *Curr. Opin. Cardiol.* 2010;25(4):329–34.
56. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ. Res.* 2013;113(6):709–24.
57. Iliadis F, Kadoglou N, Didangelos T. Insulin and the heart. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011;93 Suppl 1:S86–91.
58. Goodwin GW, Taegtmeyer H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;279:H1490–H1501.
59. Wentz AE, d'Avignon DA, Weber ML, Cotter DG, Doherty JM, Kerns R, Nagarajan R, Reddy N, Sambandam N, Crawford PA. Adaptation of myocardial substrate metabolism to a ketogenic nutrient environment. *J. Biol. Chem.* 2010;285:24447–24456.
60. Alaynick WA, Kondo RP, Xie W, He W, Dufour CR, Downes M, Jonker JW, Giles W, Naviaux RK, Giguère V, Evans RM. ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab.* 2007;6(1):13–24.

61. Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003;284:E855–E862.
62. Chatham JC, Young ME. Regulation of myocardial metabolism by the cardiomyocyte circadian clock. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013;55:139–46.
63. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2013;10(2):109–21.
64. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail. Rev.* 2002;7:161–173.
65. Lee L, Horowitz J, Frenneaux M. Metabolic manipulation in ischaemic heart disease, a novel approach to treatment. *Eur. Heart J.* 2004;25(8):634–41.
66. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation.* 2007;116:434–48.
67. Solomon A, Martínez JA. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Rev. médica la Univ. Navarra.* 2006;50:27–37.
68. Routh VH. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel).* 2010;10(10):9002–25.
69. Gil K, Bugajski a, Thor P. Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011;62(6):637–646.
70. Berthoud H-R. The vagus nerve, food intake and obesity. *Regul. Pept.* 2008;149(1-3):15–25.
71. Iwasaki Y, Yada T. Vagal afferents sense meal-associated gastrointestinal and pancreatic hormones: mechanism and physiological role. *Neuropeptides.* 2012;46(6):291–7.
72. Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschöp M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology.* 2001;142(10):4163–9.
73. Williams KW, Scott MM, Elmquist JK. Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;660(1):2–12.
74. Udit S, Gautron L. Molecular anatomy of the gut-brain axis revealed with transgenic technologies: implications in metabolic research. *Front. Neurosci.* 2013;7:134.
75. Zhou L, Podolsky N, Sang Z, Ding Y, Fan X, Tong Q, Levin BE, McCrimmon RJ. The medial amygdalar nucleus: a novel glucose-sensing region that modulates the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes.* 2010;59(10):2646–52.
76. Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front. Integr. Neurosci.* 2009;3:12.
77. Bell FR. Hypothalamic control of food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 1971;30(2):103–9.
78. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp. Diabetes Res.* 2012;2012:824305.
79. Singla P, Bardoloi A, Parkash A a. Metabolic effects of obesity: A review. *World J. Diabetes.* 2010;1(3):76–88.
80. Xu Y, Elmquist JK, Fukuda M. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011;1243:1–14.
81. Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R. Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):1–11.
82. Pritchard LE, White A. Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways. *Endocrinology.* 2007;148(9):4201–4207.
83. Nicholson JR, Peter J-C, Lecourt A-C, Barde Y-A, Hofbauer KG. Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J. Neuroendocrinol.* 2007;19(12):974–82.
84. Ellacott KLJ, Cone RD. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004;59:395–408.
85. López M, Lage R, Tung YCL, Challis BG, Varela L, Virtue S, O’Rahilly S, Vidal-Puig A, Diéguez C, Coll AP. Orexin expression is regulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J. Neuroendocrinol.* 2007;19(9):703–7.

86. Seeley RJ, Drazen DL, Clegg DJ. The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance. *Annu. Rev. Nutr.* 2004;24:133–49.
87. Rodríguez Rivera VM, Simón Magro E. *Bases de la Alimentación Humana*. Editorial Netbiblo. 2008; 370-378.
88. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 2000;62:413–37.
89. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 2005;8(5):571–8.
90. Zanella MT, Ribeiro Filho FF. Emerging drugs for obesity therapy. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2009;53(2):271–80.
91. Institute Européen de Chimie et Biologie. *Signal Transduction Education*. <http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>.
92. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 2006;153:209–35.
93. Hillebrand JJG, de Wied D, Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides.* 2002;23(12):2283–306.
94. Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;16(4):623–37.
95. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 1991;260(2 Pt 2):R321–7.
96. Leibowitz SF. Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends Neurosci.* 1992;15(12):491–7.
97. Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, Zhou J, Marks DL, Cone RD. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology.* 2000;141(9):3072–9.
98. Sohn J-W, Harris LE, Berglund ED, Liu T, Vong L, Lowell BB, Balthasar N, Williams KW, Elmquist JK. Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell.* 2013;152(3):612–9.
99. Van der Klaauw AA, Keogh JM, Henning E, Blackwood A, Haqq AM, Purnell JQ, Farooqi IS. Postprandial total ghrelin suppression is modulated by melanocortin signaling in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(2):E288–92.
100. Da Silva AA, do Carmo JM, Hall JE. Role of leptin and central nervous system melanocortins in obesity hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2013;22(2):135–40.
101. Kawabe T, Kawabe K, Sapru HN. Cardiovascular responses to chemical stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat: role of the hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS One.* 2012;7(9):e45180.
102. Li P, Cui B-P, Zhang L-L, Sun H-J, Liu T-Y, Zhu G-Q. Melanocortin 3/4 receptors in paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow and blood pressure. *Exp. Physiol.* 2013;98(2):435–43.
103. Filippi BM, Abraham MA, Yue JTY, Lam TKT. Insulin and glucagon signaling in the central nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2013;14(4):365–75.
104. Porte D, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes.* 2005;54(5):1264–76.
105. Figlewicz DP, Sipols AJ. Energy regulatory signals and food reward. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010;97(1):15–24.
106. Intech. *Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations*. (Cseri J, ed.); 2012:Chapter 12.
107. Popovic V, Duntas L. Brain somatic cross-talk: Ghrelin, leptin and ultimate challengers of obesity. *Nutr. Neurosci.* 2005;8(1):1–5.
108. Stengel A, Taché Y. Yin and Yang - the Gastric X/A-like Cell as Possible Dual Regulator of Food Intake. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2012;18(2):138–49.
109. Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr. Rev.* 2004;25(3):426–57.
110. Gil-Campos M, Aguilera CM, Cañete R, Gil A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br. J. Nutr.* 2006;96(2):201–26.
111. Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(22):12624–9.

112. Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 2010;44(2):87–97.
113. Balistreri CR, Caruso C, Candore G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:802078.
114. Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007;131(2):242–56.
115. Gilsanz V, Hu HH, Kajimura S. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatr. Res.* 2013;73(1):3–9.
116. Adamczak M, Wiecek A, Wolf G. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin. Nephrol.* 2013;33(1):2–13.
117. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes. Rev.* 2012;13 Suppl 2:83–96.
118. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004;84(1):277–359.
119. Tam CS, Lecoultré V, Ravussin E. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation.* 2012;125(22):2782–91.
120. Feng B, Zhang T, Xu H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013;1281:160–77.
121. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(15):1509–17.
122. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007;293(2):E444–52.
123. Seale P, Lazar MA. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes.* 2009;58(7):1482–4.
124. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW, Rudich S, Weintraub NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ. Res.* 2009;104(4):541–9.
125. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11(2):85–97.
126. Gómez-Hernández A, Perdomo L, Escribano Ó, Benito M. Role of white adipose tissue in vascular complications due to obesity. *Clin. Investig. Arterioscler.* 2013;25(1):27–35.
127. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech.* 2012;5(5):588–94.
128. Harwood HJ, Heal DJ, Smith SL, Jones RB. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology.* 2012;63(1):57–75.
129. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:415–45.
130. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* 2013;9(2):191–200.
131. González-Juanatey JR, Paz FL, Eiras S, Teijeira-Fernández E. Adipokines as novel cardiovascular disease markers. Pathological and clinical considerations. *Rev. española Cardiol.* 2009;62(2):9–16.
132. Conde J, Scotece M, López V, Gómez R, Lago F, Pino J, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Adiponectin and leptin induce VCAM-1 expression in human and murine chondrocytes. *PLoS One.* 2012;7(12):e52533.
133. Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2007;3(12):716–24.
134. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics. Clin. Appl.* 2012;6(1-2):91–101.
135. Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab. J.* 2012;36(5):317–27.
136. Gnacińska, M Małgorzewicz, S Stojek, M Łysiak-Szydłowska, W SworczaK, K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv. Med. Sci.* 2009;54(2):150–7.
137. Zhang H, Cui J, Zhang C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis. *World J. Cardiol.* 2010;2(11):370–6.

138. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2009;117(6):241–50.
139. Suganami T, Ogawa Y. Role of chronic inflammation in adipose tissue in the pathophysiology of obesity. *Nihon Rinsho.* 2013;71(2):225–30.
140. Leal V de O, Mafrá D. Adipokines in obesity. *Clin. Chim. Acta.* 2013;419:87–94.
141. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev.* 2010;11(1):11–8.
142. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 2013;34(1):1–11.
143. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(17):6676–81.
144. Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes.* 2006;55(9):2571–8.
145. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 2006;27(7):762–78.
146. Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS. Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1996;20 Suppl 3:S102–7.
147. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2000;21(6):697–738.
148. Swaak AJ, van Rooyen A, Aarden LA. Interleukin-6 (IL-6) and acute phase proteins in the disease course of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 1989;8(6):263–8.
149. Mårin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L, Björntorp P. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 1992;41(11):1242–8.
150. Misra A, Vikram NK. Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition.* 2003;19(5):457–66.
151. Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;318(1-2):34–43.
152. Hellmér J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992;75(1):15–20.
153. Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad. Med. J.* 2009;85(1009):614–21.
154. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 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.* 2004;145(5):2273–82.
155. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.* 2007;56(4):1010–3.
156. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin. Chem.* 2008;54(6):945–55.
157. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, Rhéaume C, Tchernof A. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int. J. Obes. (Lond).* 2008;32(2):283–91.
158. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(3):1023–33.
159. Meyer LK, Ciaraldi TP, Henry RR, Wittgrove AC, Phillips SA. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte.* 2013;2(4):217–26.

160. Fried SK, Kral JG. Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase activity in morbidly obese patients. *Int. J. Obes.* 1987;11(2):129–40.
161. Veilleux A, Caron-Jobin M, Noël S, Laberge PY, Tchernof A. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes.* 2011;60(5):1504–11.
162. Toczyłowski K, Gruca M, Baranowski M. Epicardial adipose tissue and its role in cardiac physiology and disease. *Postępy Hig. Med. Dosw. (Online).* 2013;67:584–93.
163. Bertaso AG, Bertol D, Duncan BB, Foppa M. Epicardial fat: definition, measurements and systematic review of main outcomes. *Arq. Bras. Cardiol.* 2013;101(1):e18–28.
164. Iozzo P. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 2:S371–9.
165. Marchington JM, Mattacks CA, Pond CM. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1989;94(2):225–32.
166. Al Chekatie MO, Welles CC, Metoyer R, Ibrahim A, Shapira AR, Cytron J, Santucci P, Wilber DJ, Akar JG. Pericardial fat is independently associated with human atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010;56(10):784–8.
167. Cavalcante JL, Tamarappoo BK, Hachamovitch R, Kwon DH, Alraies MC, Halliburton S, Schoenhagen P, Dey D, Berman DS, Marwick TH. Association of epicardial fat, hypertension, subclinical coronary artery disease, and metabolic syndrome with left ventricular diastolic dysfunction. *Am. J. Cardiol.* 2012;110(12):1793–8.
168. Cherian S, Lopaschuk GD, Carvalho E. Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012;303(8):E937–49.
169. Agra RM, Teijeira-Fernández E, Pascual-Figal D, Sánchez-Más J, Fernández-Trasancos A, González-Juanatey JR, Eiras S. Adiponectin and p53 mRNA in epicardial and subcutaneous fat from heart failure patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 2014;44(1):29–37.
170. Teijeira-Fernandez E, Eiras S, Shamagian LG, Somoza AS, Delgado C, Gonzalez-Juanatey JR. Lower epicardial adipose tissue adiponectin in patients with metabolic syndrome. *Cytokine.* 2011;54(2):185–90.
171. Teijeira-Fernandez E, Eiras S, Salgado Somoza A, Gonzalez-Juanatey JR. Baseline epicardial adipose tissue adiponectin levels predict cardiovascular outcomes: a long-term follow-up study. *Cytokine.* 2012;60(3):674–80.
172. Teijeira-Fernandez E, Eiras S, Grigorian-Shamagian L, Fernandez A, Adrio B, Gonzalez-Juanatey JR. Epicardial adipose tissue expression of adiponectin is lower in patients with hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 2008;22(12):856–63.
173. Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, Laing I, Yates AP, Pemberton PW, Malik RA, Heagerty AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009;119:1661–1670.
174. Zhang H, Zhang C. Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose-Vascular Loop. *Am. J. Biomed. Sci.* 2009;1(2):133.
175. Jackson Laboratory. *The Jackson Laboratory: a leading genetics research laboratory.* <http://www.jax.org/>.
176. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973;9(4):294–8.
177. Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 1969;217(5):1298–304.
178. Cammisotto P, Bendayan M. A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone. *Anat. Cell Biol.* 2012;45(1):1–16.
179. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425–32.
180. 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, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;83(7):1263–71.

181. Zha JM, Di WJ, Zhu T, Xie Y, Yu J, Liu J, Chen P, Ding G. Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults. *Endocr. J.* 2009;56(8):935–44.
182. Ahima RS. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. *J. Clin. Invest.* 2008;118(7):2380–83.
183. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269(5223):546–9.
184. Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Kim MH, Chuang J-C, Lee CE, Lauzon DA, Lin P, Brule LJ, Scott MM, Coppari R, Elmquist JK. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):1000–9.
185. Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Ramé C. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 2012;56(10-12):959–67.
186. Arounleut P, Bowser M, Upadhyay S, Shi X-M, Fulzele S, Johnson MH, Stranahan AM, Hill WD, Isales CM, Hamrick MW. Absence of functional leptin receptor isoforms in the POUND (Lepr(db/lb)) mouse is associated with muscle atrophy and altered myoblast proliferation and differentiation. *PLoS One.* 2013;8(8):e72330.
187. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2013;4(June):71.
188. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M, Sisk CL, Berenbaum SA. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Horm. Behav.* 2013;64(2):187–194.
189. Di Yorio MP, Bilbao MG, Biagini-Majorel AM, Faletti AG. Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process. *Reproduction.* 2013;146(6):647–58.
190. Bourguignon J-P, Franssen D, Gérard A, Janssen S, Pinson A, Naveau E, Parent A-S. Early neuroendocrine disruption in hypothalamus and hippocampus: developmental effects including female sexual maturation and implications for endocrine disrupting chemical screening. *J. Neuroendocrinol.* 2013;25(11):1079–87.
191. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002;13(2):84–9.
192. Jackson MB, Ahima RS. Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones. *Clin. Sci. (Lond).* 2006;110(2):143–52.
193. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J. Endocrinol.* 2013;216(1):T1–T15.
194. Rasouli N, Kern P a. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S64–73.
195. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J-P. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34(1):2–11.
196. 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, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005;307(5708):426–30.
197. Hassan M, Latif N, Yacoub M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat. Rev. Cardiol.* 2012;9(12):689–702.
198. Falcão-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenço AP, Leite-Moreira AF. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discov. Today.* 2012;17(15-16):880–9.
199. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;323(1):20–34.
200. Raucci R, Rusolo F, Sharma a, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine.* 2013;61(1):1–14.
201. Lancha A, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutr. Res. Rev.* 2012;25(2):223–48.
202. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J. Vasc. Surg.* 2011;54(3):819–31.

203. Lehr S, Hartwig S, Lamers D, Famulla S, Müller S, Hanisch F-G, Cuvelier C, Ruige J, Eckardt K, Ouwens DM, Sell H, Eckel J. Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol. Cell. Proteomics*. 2012;11(1):M111.010504.
204. Dahlman I, Elsen M, Tennagels N, Korn M, Brockmann B, Sell H, Eckel J, Arner P. Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch. Physiol. Biochem*. 2012;118(3):84–91.
205. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J. Atheroscler. Thromb*. 2011;18(8):629–39.
206. Shin J-A, Lee J-H, Lim S-Y, Ha H-S, Kwon H-S, Park Y-M, Lee W-C, Kang M-I, Yim H-W, Yoon K-H, Son H-Y. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J. Diabetes Investig*. 2013;4(4):334–43.
207. Ahmet Çağrı Aykan, İlker Gül, Ezgi Kalaycıoğlu, Tayyar Gökdeniz, Engin Hatem, Ümit Menteşe, Banu Şahin Yıldız, Mustafa Yıldız. Is metabolic syndrome related with coronary artery disease severity and complexity: An observational study about IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions. *Cardiol. J*. 2014;21(3):245–51.
208. Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2013;1281:123–40.
209. WHO. *WHO consultation: definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications*. Geneva: World Health Organization, 1999.
210. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285(19):2486–97.
211. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059–62.
212. Lazzeri C, Valente S, Chiostrì M, D’Alfonso MG, Gensini GF. Clinical significance of glycated hemoglobin in the acute phase of ST elevation myocardial infarction. *World J. Cardiol*. 2014;6(4):140–147.
213. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes: 2009. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 1:S13–61.
214. Sacks DB. A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care*. 2011;34(2):518–23.
215. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1969;36:838–843.
216. Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA, Ryle AJ, Davie S, Gould BJ. Unexplained variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Diabetologia*. 1990;33(4):208–15.
217. McCarter RJ, Hempe JM, Gomez R, Chalew SA. Biological variation in HbA1c predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:1259–1264.
218. Rodríguez-Segade S, Rodríguez J, Cabezas-Agricola JM, Casanueva FF, Camiña F. Progression of nephropathy in type 2 diabetes: the glycation gap is a significant predictor after adjustment for glycohemoglobin (Hb A1c). *Clin. Chem*. 2011;57(2):264–71.
219. Nayak AU, Nevill AM, Bassett P, Singh BM. Association of glycation gap with mortality and vascular complications in diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:3247–53.
220. Cosson E, Banu I, Cussac-Pillegand C, Chen Q, Chiheb S, Jaber Y, Nguyen MT, Charnaux N, Valensi P. Glycation gap is associated with macroproteinuria but not with other complications in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(7):2070–6.
221. Karastergiou K, Fried SK. Multiple Adipose Depots Increase Cardiovascular Risk via Local and Systemic Effects. *Curr. Atheroscler. Rep*. 2013;15(10):361.
222. Yáñez M, Albala C. Body fat distribution: anthropometric indicators. *Rev. Med. Chil*. 1995;123(12):1520–4.
223. Lakka H-M, Lakka TA, Tuomilehto J, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *Eur. Heart J*. 2002;23(9):706–13.
224. Després J-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*. 2012;126(10):1301–13.
225. Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*. 2013;5(2):498–508.

226. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism*. 2013;62(11):1513–21.
227. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva MER da. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2009;53(2):145–50.
228. Dagenais GR, Yi Q, Mann JFE, Bosch J, Pogue J, Yusuf S. Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *Am. Heart J.* 2005;149(1):54–60.
229. Shimabukuro M, Hirata Y, Tabata M, Dagvasumberel M, Sato H, Kurobe H, Fukuda D, Soeki T, Kitagawa T, Takanashi S, Sata M. Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33(5):1077–84.
230. DeClercq V, Enns JE, Yeganeh a, Taylor CG, Zahradka P. Modulation of cardiovascular function by adipokines. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 2013;13(1):59–72.
231. Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 2013;216(1):T17–36.
232. Félétou. M. *The Endothelium. Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells: Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators.* Morgan & Claypool Life Sciences; 2011; 43-72.
233. Lina Badimóna JM-G. Disfunción endotelial. *Rev. Española Cardiol.* 2006;6(A):21–30.
234. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 2001;276(27):25096–100.
235. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):47–60.
236. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999;13(10):1231–8.
237. Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Lopez-Jimenez F, Gami AS, Sert Kuniyoshi FH, Wolk R, Somers VK. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *Am. J. Cardiol.* 2007;100(2):234–9.
238. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension.* 2003;42(3):231–4.
239. Deng G, Long Y, Yu Y-R, Li M-R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int. J. Obes. (Lond).* 2010;34(1):165–71.
240. Hui X, Lam KSL, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br. J. Pharmacol.* 2012;165(3):574–90.
241. Okui H, Hamasaki S, Ishida S, Kataoka T, Orihara K, Fukudome T, Ogawa M, Oketani N, Saihara K, Shinsato T, Shirasawa T, Mizoguchi E, Kubozono T, Ichiki H, Ninomiya Y, et al. Adiponectin is a better predictor of endothelial function of the coronary artery than HOMA-R, body mass index, immunoreactive insulin, or triglycerides. *Int. J. Cardiol.* 2008;126(1):53–61.
242. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension.* 2003;41(3 Pt 2):625–33.
243. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.* 2007;178(3):1748–58.
244. Adya R, Tan BK, Punn A, Chen J, Randeve HS. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2008;78(2):356–65.
245. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Øie E, Dahl A, Michelsen A, Damås JK, Tunheim SH, Ueland T, Smith C, Bendz B, Tonstad S, Gullestad L, Frøland SS, Krohg-Sørensen K, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation.* 2007;115(8):972–80.

246. Smith J, Al-Amri M, Sniderman A, Cianflone K. Visfatin concentration in Asian Indians is correlated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A1. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2006;65(5):667–72.
247. Yamawaki H, Hara N, Okada M, Hara Y. Visfatin causes endothelium-dependent relaxation in isolated blood vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;383(4):503–8.
248. Tasci I, Erdem G, Ozgur G, Tapan S, Dogru T, Genc H, Acikel C, Ozgurtas T, Sonmez A. LDL-cholesterol lowering increases plasma apelin in isolated hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):222–8.
249. Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y, Kundu RK, Sheikh AY, Agrawal R, Zheng L, Leeper NJ, Pearl NE, Patterson AJ, Anderson JP, Tsao PS, Lenardo MJ, Ashley EA, Quertermous T. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2008;118(10):3343–54.
250. González-juanatey JR, Paz FL, Eiras S. Adipocitocinas como nuevos marcadores de la enfermedad cardiovascular . Perspectivas fisiopatológicas y clínicas. *Rev. Esp. Cardiol.* 2008;62(2):9–16.
251. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001;280:R1483–R1487.
252. Freeman JN, do Carmo JM, Adi AH, da Silva AA. Chronic central ghrelin infusion reduces blood pressure and heart rate despite increasing appetite and promoting weight gain in normotensive and hypertensive rats. *Peptides*. 2013;42:35–42.
253. Aoki H, Nakata M, Dezaki K, Lu M, Gantulga D, Yamamoto K, Shimada K, Kario K, Yada T. Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocr. J.* 2013;60(5):571–81.
254. Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:5854–5859.
255. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*. 2001;104:1430–1435.
256. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004;43(2):165–70.
257. Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 2003;98:401–405.
258. Xu X-B, Pang J-J, Cao J-M, Ni C, Xu R-K, Peng X-Z, Yu X-X, Guo S, Chen M-C, Chen C. GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;289:H1643–H1651.
259. Gruzdeva O, Uchasova E, Belik E, Dyleva Y, Shurygina E, Barbarash O. Lipid, adipokine and ghrelin levels in myocardial infarction patients with insulin resistance. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2014;14:7.
260. Pérez-Pérez A, Maymó J, Gambino Y, Guadix P, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Insulin enhances leptin expression in human trophoblastic cells. *Biol. Reprod.* 2013;89(1):20.
261. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2005;579(23):5163–9.
262. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;221:286–289.
263. Iacobellis G, Di Gioia C, Petramala L, Chiappetta C, Serra V, Zinamosca L, Marinelli C, Ciardi A, De Toma G, Letizia C. Brown fat expresses adiponectin in humans. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:126751.

264. Lin T, Qiu Y, Liu Y, Mohan R, Li Q, Lei B. Expression of adiponectin and its receptors in type 1 diabetes mellitus in human and mouse retinas. *Mol. Vis.* 2013;19:1769–78.
265. Yang J, Lin S-C, Chen G, He L, Hu Z, Chan L, Trial J, Entman ML, Wang Y. Adiponectin promotes monocyte-to-fibroblast transition in renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013;24(10):1644–59.
266. Choi YS, Oh HK, Choi J-H. Expression of adiponectin, leptin, and their receptors in ovarian endometrioma. *Fertil. Steril.* 2013;100:135–41.e1–2.
267. Bouchard L, Hivert M-F, Guay S-P, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes.* 2012;61(5):1272–80.
268. Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, Torre A, Wainer R, de Mazancourt P, Dieudonné M-N. Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertil. Steril.* 2012;97(3):771–8.e1.
269. Perri A, Vizza D, Lofaro D, Gigliotti P, Leone F, Brunelli E, Malivindi R, De Amicis F, Romeo F, De Stefano R, Papalia T, Bonofiglio R. Adiponectin is expressed and secreted by renal tubular epithelial cells. *J. Nephrol.* 2013;26(6):1049–54.
270. Kim J, Zheng W, Grafer C, Mann ML, Halvorson LM. GnRH decreases adiponectin expression in pituitary gonadotropes via the calcium and PKA pathways. *Reprod. Sci.* 2013;20(8):937–45.
271. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone.* 2004;35:842–849.
272. Molica S, Vitelli G, Cutrona G, Todoerti K, Mirabelli R, Digiesi G, Giannarelli D, Sperduti I, Molica M, Gentile M, Morabito F, Neri A, Ferrarini M. Prognostic relevance of serum levels and cellular expression of adiponectin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Hematol.* 2008;88:374–380.
273. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T. Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J. Immunol.* 2007;178:3511–3520.
274. Jortay J, Senou M, Abou-Samra M, Noel L, Robert A, Many M-C, Brichard SM. Adiponectin and skeletal muscle: pathophysiological implications in metabolic stress. *Am. J. Pathol.* 2012;181(1):245–56.
275. Ryu SL, Shim JW, Kim DS, Jung HL, Park MS, Park S-H, Lee J, Lee W-Y, Shim JY. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and PPAR- γ in the lung tissue of obese mice and the effect of rosiglitazone on proinflammatory cytokine expressions in the lung tissue. *Korean J. Pediatr.* 2013;56(4):151–8.
276. Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998;394:790–3.
277. Biesiada G, Czepiel J, Targosz A, Strzalka M, Konturek SJ, Brzozowski T, Mach T, Clinch ID. Expression and release of leptin and proinflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis and infectious diarrhea. *J. Physiol Pharmacol.* 2012;63:471–481.
278. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:11073–11078.
279. Liu L, Qiao J, Wang Y, Chen Y, Gao Y. Expression of leptin and leptin receptor system in woman reproductive organs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83(8):666–8.
280. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature.* 1998;393:684–688.
281. Bruno A, Pace E, Chanez P, Gras D, Vachier I, Chiappara G, La Guardia M, Gerbino S, Profita M, Gjomarkaj M. Leptin and leptin receptor expression in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:230–237, 237.e1–e4.
282. Chou C-H, Wu C-C, Song I-W, Chuang H-P, Lu L-S, Chang J-H, Kuo S-Y, Lee C-H, Wu J-Y, Chen Y-T, Kraus VB, Lee MTM. Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15(6):R190.

283. Vansaun MN, Mendonsa AM, Lee Gorden D. Hepatocellular proliferation correlates with inflammatory cell and cytokine changes in a murine model of nonalcoholic Fatty liver disease. *PLoS One*. 2013;8:e73054.
284. Lin T-C, Lee T-C, Hsu S-L, Yang C-S. The molecular mechanism of leptin secretion and expression induced by aristolochic acid in kidney fibroblast. *PLoS One*. 2011;6(2):e16654.
285. Liu T, Su Q, Zang L, Kang N, Wang Y, Hai Y. Correlation between local microenvironment leptin expression and avascular necrosis of the femoral head. *Chinese J. reparative Reconstr. Surg.* 2012;26(11):1319–23.
286. Cha Y, Kang Y, Moon A. HER2 induces expression of leptin in human breast epithelial cells. *BMB Rep.* 2012;45(12):719–23.
287. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(2):1431–7.
288. Venkateshaiah SU, Khan S, Ling W, Bam R, Li X, van Rhee F, Usmani S, Barlogie B, Epstein J, Yaccoby S. NAMPT/PBEF1 enzymatic activity is indispensable for myeloma cell growth and osteoclast activity. *Exp. Hematol.* 2013;41(6):547–557.e2.
289. Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church TS, Jubrias SA, Conley KE, Smith SR. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;298(1):E117–26.
290. Auguet T, Terra X, Porras JA, Orellana-Gavaldà JM, Martínez S, Aguilar C, Lucas A, Pellitero S, Hernández M, Del Castelló D, Richart C. Plasma visfatin levels and gene expression in morbidly obese women with associated fatty liver disease. *Clin. Biochem.* 2013;46(3):202–8.
291. Tian W, Zhu Y, Wang Y, Teng F, Zhang H, Liu G, Ma X, Sun D, Rohan T, Xue F. Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2013;129:505–512.
292. Nogueira AVB, Nokhbehsaim M, Eick S, Bourauel C, Jäger A, Jepsen S, Cirelli JA, Deschner J. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clin. Oral Investig.* 2014;18(1):171–8.
293. Reverchon M, Cornuau M, Cloix L, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 2013;19:313–26.
294. Seow K-M, Hwang J-L, Wang P-H, Ho L-T, Juan C-C. Expression of visfatin mRNA in peripheral blood mononuclear cells is not correlated with visfatin mRNA in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 2011;26:2869–2873.
295. Lee Y-C, Yang Y-H, Su J-H, Chang H-L, Hou M-F, Yuan S-SF. High visfatin expression in breast cancer tissue is associated with poor survival. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011;20:1892–1901.
296. Meier FMP, Frommer KW, Peters MA, Brentano F, Lefèvre S, Schröder D, Kyburz D, Steinmeyer J, Rehart S, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis. *J. Biol. Chem.* 2012;287(34):28378–85.
297. Shackelford R, Hirsh S, Henry K, Abdel-Mageed A, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase and SIRT3 expression are increased in well-differentiated thyroid carcinomas. *Anticancer Res.* 2013;33(8):3047–52.
298. Kover K, Tong PY, Watkins D, Clements M, Stehno-Bittel L, Novikova L, Bittel D, Kibiryeveva N, Stuhlsatz J, Yan Y, Ye SQ, Moore W V. Expression and regulation of nampt in human islets. *PLoS One*. 2013;8(3):e58767.
299. Picault F-X, Chaves-Almagro C, Progetti F, Prats H, Masri B, Audigier Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur. J. Cancer.* 2014;50(3):663–74.
300. Karatug A, Sacan O, Coskun ZM, Bolkent S, Yanardag R, Turk N, Bolkent S. Regulation of gene expression and biochemical changes in small intestine of newborn diabetic rats by exogenous ghrelin. *Peptides.* 2012;33(1):101–8.

301. Inuzuka H, Nishizawa H, Inagaki A, Suzuki M, Ota S, Miyamura H, Miyazaki J, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Decreased expression of apelin in placentas from severe pre-eclampsia patients. *Hypertens. Pregnancy*. 2013;32(4):410–21.
302. Ozkan ZS, Cilgin H, Simsek M, Cobanoglu B, Ilhan N. Investigation of apelin expression in endometriosis. *J. Reprod. Infertil*. 2013;14(2):50–5.
303. Lu Q, Feng J, Jiang Y-R. The role of apelin in the retina of diabetic rats. *PLoS One*. 2013;8(7):e69703.
304. Wang Q, Wang G-Q, Pang L-X, Xue F, Chen X-Y, Chen R, Kong X-X, Gong Y-S, Fan X-F. Changes of apelin and its receptor in lung tissue of rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline. *Chinese J. Appl. Physiol*. 2013;29(2):101–5.
305. Huang Z-G, Bai S, Chen L, Wang J-T, Ding B-P. Effect of puerarin combined with felodipine on mRNA and protein expression of apelin and APJ in renovascular hypertensive rat. *China J. Chinese Mater. medica*. 2013;38(3):381–5.
306. Coskun ZM, Sacan O, Karatug A, Turk N, Yanardag R, Bolkent S, Bolkent S. Regulation of oxidative stress and somatostatin, cholecystokinin, apelin gene expressions by ghrelin in stomach of newborn diabetic rats. *Acta Histochem*. 2013;115(7):740–7.
307. Ringström C, Nitert MD, Bennet H, Fex M, Valet P, Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Wierup N. Apelin is a novel islet peptide. *Regul. Pept*. 2010;162(1-3):44–51.
308. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attané C, Wanecq E, Guigné C, Bost F, Tanti J-F, Laville M, Vidal H, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2010;298(6):E1161–9.
309. Hu P, Tang J, Chen W, Bao J, Wu L. Increased apelin serum levels and expression in human chondrocytes in osteoarthritic patients. *Int. Orthop*. 2011;35(9):1421–6.
310. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev*. 2005;85:495–522.
311. Hung H-F, Wang B-W, Chang H, Shyu K-G. The molecular regulation of resistin expression in cultured vascular smooth muscle cells under hypoxia. *J. Hypertens*. 2008;26(12):2349–60.
312. Krawczynska A, Olczak E, Rembiszewska A, Herman AP, Gromadzka-Ostrowska J. Time-dependent supplementation of vitamin E influences leptin expression in the aortic layers of rats fed atherogenic diet. *J. Physiol. Pharmacol*. 2014;65(1):33–9.
313. Zhao R-J, Pan Z-Y, Long C-L, Cui W-Y, Zhang Y-F, Wang H. Stimulation of non-neuronal muscarinic receptors enhances chemerin/ChemR23 system in dysfunctional endothelial cells. *Life Sci*. 2013;92(1):10–6.
314. Kim S-R, Jung Y-H, Park H-J, Kim M-K, Jeong J-W, Jang H-O, Yun I, Bae S-K, Bae M-K. Upregulation of thromboxane synthase mediates visfatin-induced interleukin-8 expression and angiogenic activity in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012;418(4):662–8.
315. Reyes MR, Lazalde B, Posadas del Rio FA, Escalante B. Identification of leptin gene expression in sinusoidal endothelial rat liver cells. *Endothelium*. 2008;15(3):121–5.
316. Komura N, Maeda N, Mori T, Kihara S, Nakatsuji H, Hirata A, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin protein exists in aortic endothelial cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e71271.
317. Wu D, Li H, Xiang G, Zhang L, Li L, Cao Y, Zhang J. Adiponectin and its receptors in chronic hepatitis B patients with steatosis in china. *Hepat. Mon*. 2013;13(4):e6065.
318. Wang B-W, Lin C-M, Wu G-J, Shyu K-G. Tumor necrosis factor- α enhances hyperbaric oxygen-induced visfatin expression via JNK pathway in human coronary arterial endothelial cells. *J. Biomed. Sci*. 2011;18:27.
319. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Hibi T. Enhanced expressions of apelin on proliferative hepatic arterial capillaries in human cirrhotic liver. *Hepatol. Res*. 2012;42(5):508–14.
320. Liu SW, Qiao SB, Yuan JS, Liu DQ. Visfatin stimulates production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells. *Horm. Metab. Res*. 2009;41(4):281–6.
321. Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, Davenport AP. Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc. Res*. 2006;69:227–235.

322. Ebner A, Poitz DM, Alexiou K, Deussen A. Secretion of adiponectin from mouse aorta and its role in cold storage-induced vascular dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 2013;108:390.
323. Prochnau D, Straube E, Figulla H-R, Rödel J. Supra-additive expression of interleukin-6, interleukin-8 and basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells following coinfection with *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus as a novel link between infection and atherosclerosis. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2012;23(2):e26–30.
324. Zhang S, Luo X, Huang H, Chai Y, Hu D, Tao Q. N-acetylcysteine antagonizes the Interleukin-18-induced expression of TNF-alpha and IL-6 in mouse vascular smooth muscle cells. *Chinese J. Cell. Mol. Immunol.* 2010;26(1):35–7.
325. Purdham DM, Zou M-X, Rajapurohitam V, Karmazyn M. Rat heart is a site of leptin production and action. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004;287(6):H2877–84.
326. Chandrasekaran B, Kalra PR, Donovan J, Hooper J, Clague JR, McDonagh TA. Myocardial apelin production is reduced in humans with left ventricular systolic dysfunction. *J. Card. Fail.* 2010;16(7):556–61.
327. Beiser DG, Wang H, Li J, Wang X, Yordanova V, Das A, Mirzapourzadeh T, Garcia JGN, Stern SA, Vanden Hoek TL. Plasma and myocardial visfatin expression changes are associated with therapeutic hypothermia protection during murine hemorrhagic shock/resuscitation. *Resuscitation.* 2010;81(6):742–8.
328. Kim M, Oh JK, Sakata S, Liang I, Park W, Hajjar RJ, Lebeche D. Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008;45(2):270–80.
329. Boddu NJ, Theus S, Luo S, Wei JY, Ranganathan G. Is the lack of adiponectin associated with increased ER/SR stress and inflammation in the heart? *Adipocyte.* 2014;3(1):10–8.
330. Fujishima Y, Maeda N, Matsuda K, Komura N, Hirata A, Mori T, Sekimoto R, Tsushima Y, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I. Effect of adiponectin on cardiac β -catenin signaling pathway under angiotensin II infusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;444(2):224–9.
331. Pei H, Qu Y, Lu X, Yu Q, Lian K, Liu P, Yan W, Liu J, Ma Y, Liu Y, Li C, Li W, Lau WB, Zhang H, Tao L. Cardiac-derived adiponectin induced by long-term insulin treatment ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic mice via AMPK signaling. *Basic Res. Cardiol.* 2013;108(1):322.
332. Karmazyn M, Gan XT, Rajapurohitam V. The potential contribution of circulating and locally produced leptin to cardiac hypertrophy and failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2013;91(11):883–8.
333. Gómez-Hurtado N, Fernández-Velasco M, Fernández-Alfonso MS, Boscá L, Delgado C. Prolonged leptin treatment increases transient outward K^+ current via upregulation of Kv4.2 and Kv4.3 channel subunits in adult rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 2014;466(5):903–14.
334. Chen J, Mo H, Guo R, You Q, Huang R, Wu K. Inhibition of the leptin-induced activation of the p38 MAPK pathway contributes to the protective effects of naringin against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells. *Int. J. Mol. Med.* 2014;33(3):605–12.
335. Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, Gallego R, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2004;62(3):481–8.
336. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonski M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:2988.
337. Lumsden NG, Khambata RS, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr. Pharm. Des.* 2010;16(37):4080–8.
338. Collins S. A heart-adipose tissue connection in the regulation of energy metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10(3):157–63.
339. Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 2000;14(10):1345–51.
340. Birkenfeld AL, Budziarek P, Boschmann M, Moro C, Adams F, Franke G, Berlan M, Marques MA, Sweep FCGJ, Luft FC, Lafontan M, Jordan J. Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes.* 2008;57:3199–3204.

341. Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M, Jordan J. Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:3622–3628.
342. Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Tank J, Diedrich A, Schroeder C, Franke G, Berlan M, Luft FC, Lafontan M, Jordan J. Beta-adrenergic and atrial natriuretic peptide interactions on human cardiovascular and metabolic regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91:5069–5075.
343. Engeli S, Birkenfeld AL, Badin P-M, Bourlier V, Louche K, Viguerie N, Thalamas C, Montastier E, Larrouy D, Harant I, de Glisezinski I, Lieske S, Reinke J, Beckmann B, Langin D, et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 2012;122:4675–9.
344. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes.* 2009;58:2880–2892.
345. Addisu A, Gower WR, Landon CS, Dietz JR. B-type natriuretic peptide decreases gastric emptying and absorption. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2008;233(4):475–82.
346. Ropero AB, Soriano S, Tudurí E, Marroquí L, Téllez N, Gassner B, Juan-Picó P, Montanya E, Quesada I, Kuhn M, Nadal A. The atrial natriuretic peptide and guanylyl cyclase-A system modulates pancreatic beta-cell function. *Endocrinology.* 2010;151:3665–3674.
347. Vila G, Grimm G, Resl M, Heinisch B, Einwallner E, Esterbauer H, Dieplinger B, Mueller T, Luger A, Clodi M. B-Type natriuretic peptide modulates ghrelin, hunger, and satiety in healthy men. *Diabetes.* 2012;61:2592–2596.
348. Moro C. Natriuretic peptides and fat metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013;16(6):645–9.
349. Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, et al. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;53:2070–2077.
350. Heinisch BB, Vila G, Resl M, Riedl M, Dieplinger B, Mueller T, Luger A, Pacini G, Clodi M. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia.* 2012;55(5):1400–5.
351. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, Passino C. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;301(1):H12–20.
352. Brooks C. The hypothalamus and obesity. *Med. J. Aust.* 1948;1(11):327–31.
353. Kennedy GC. Experimental hypothalamic obesity. *Proc. R. Soc. Med.* 1951;44(10):899–902.
354. Sunderman FW, Haymaker W. Hypothermia and elevated serum magnesium in a patient with facial hemangioma extending into the hypothalamus. *Am. J. Med. Sci.* 1947;213(5):562–71.
355. Anand BK, Dua S, Shoenberg K. Hypothalamic control of food intake in cats and monkeys. *J. Physiol.* 1955;127(1):143–52.
356. Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am. J. Physiol.* 1997;273(6 Pt 1):E1168–77.
357. Yosten GLC. Novel neuropeptides in the control of food intake: neuronostatin and nesfatin-1. *Vitam. Horm.* 2013;92:1–25.
358. Cui H, Sohn J-W, Gautron L, Funahashi H, Williams KW, Elmquist JK, Lutter M. Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area. *J. Comp. Neurol.* 2012;520(18):1–31.
359. Moullé VS, Le Foll C, Philippe E, Kassis N, Rouch C, Marsollier N, Bui L-C, Guissard C, Dairou J, Lorsignol A, Pénicaud L, Levin BE, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C. Fatty acid transporter CD36 mediates hypothalamic effect of fatty acids on food intake in rats. *PLoS One.* 2013;8(9):e74021.

360. Shimizu H, Mori M. The brain-adipose axis: a review of involvement of molecules. *Nutr. Neurosci.* 2005;8(1):7–20.
361. Breton C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J. Endocrinol.* 2013;216(2):R19–31.
362. Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2103–15.
363. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006;443(7112):709–12.
364. Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology.* 2010;151(6):2494–503.
365. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell.* 2005;123(6):993–9.
366. Liang D, Zeng Q, Xu Z, Zhang H, Gui L, Xu C, Chen S, Zhang S, Huang S, Chen L. BAFF activates Erk1/2 promoting cell proliferation and survival by Ca²⁺-CaMKII-dependent inhibition of PP2A in normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Biochem. Pharmacol.* 2014;87(2):332–43.
367. Feng Y, Niu L-L, Wei W, Zhang W-Y, Li X-Y, Cao J-H, Zhao S-H. A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2013;4:e934.
368. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007;26(22):3227–39.
369. Arsenijevic T, Gregoire F, Chiadak J, Courtequise E, Bolaky N, Perret J, Delporte C. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) participates in adipogenesis by activating ERK signaling pathway. *PLoS One.* 2013;8(9):e72607.
370. Zang K, Wang J, Dong M, Sun R, Wang Y, Huang Y, Liu X, Li Y, Wang F, Yu M. Brd2 inhibits adipogenesis via the ERK1/2 signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One.* 2013;8(10):e78536.
371. Filippi BM, Yang CS, Tang C, Lam TKT. Insulin activates Erk1/2 signaling in the dorsal vagal complex to inhibit glucose production. *Cell Metab.* 2012;16(4):500–10.
372. Filippi BM, Bassiri A, Abraham MA, Duca FA, Yue JTY, Lam TKT. Insulin signals through the dorsal vagal complex to regulate energy balance. *Diabetes.* 2014;63(3):892–9.
373. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565–82.
374. Yeo RWY, Yang K, Li G, Lim SK. High glucose predisposes gene expression and ERK phosphorylation to apoptosis and impaired glucose-stimulated insulin secretion via the cytoskeleton. *PLoS One.* 2012;7(9):e44988.
375. Bowe JE, Chander A, Liu B, Persaud SJ, Jones PM. The permissive effects of glucose on receptor-operated potentiation of insulin secretion from mouse islets: a role for ERK1/2 activation and cytoskeletal remodelling. *Diabetologia.* 2013;56(4):783–91.
376. Lawrence M, Shao C, Duan L, McGlynn K, Cobb MH. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol. (Oxf).* 2008;192(1):11–7.
377. Prasad J, Maurya CK, Pandey J, Jaiswal N, Madhur G, Srivastava AK, Narender T, Tamrakar AK. Diastereomeric mixture of calophyllic acid and isocalophyllic acid stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells: involvement of PI-3-kinase- and ERK1/2-dependent pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;370(1-2):11–9.
378. Kim JH, Park J-M, Yea K, Kim HW, Suh P-G, Ryu SH. Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake. *PLoS One.* 2010;5(3):e9600.
379. Chien Y, Lai Y-H, Kwok CF, Ho L-T. Endothelin-1 suppresses long-chain fatty acid uptake and glucose uptake via distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(1):6–12.
380. Toda C, Shiuchi T, Kageyama H, Okamoto S, Coutinho EA, Sato T, Okamoto-Ogura Y, Yokota S, Takagi K, Tang L, Saito K, Shioda S, Minokoshi Y. Extracellular signal-regulated

- kinase in the ventromedial hypothalamus mediates leptin-induced glucose uptake in red-type skeletal muscle. *Diabetes*. 2013;62(7):2295–307.
381. Gonzalez R, Mohan H, Unniappan S. Nucleobindins: bioactive precursor proteins encoding putative endocrine factors? *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012;176(3):341–6.
382. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;187(1):375–80.
383. Lin P, Le-Niculescu H, Hofmeister R, McCaffery JM, Jin M, Hennemann H, McQuistan T, De Vries L, Farquhar MG. The mammalian calcium-binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein. *J. Cell Biol.* 1998;141(7):1515–27.
384. Valencia CA, Cotten SW, Duan J, Liu R. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. *FEBS Lett.* 2008;582(2):286–290.
385. Karabinos a, Bhattacharya D, Morys-Wortmann C, Kroll K, Hirschfeld G, Kratzin HD, Barnikol-Watanabe S, Hilschmann N. The divergent domains of the NEFA and nucleobindin proteins are derived from an EF-hand ancestor. *Mol. Biol. Evol.* 1996;13(7):990–8.
386. Lin P, Fischer T, Weiss T, Farquhar MG. Calnuc, an EF-hand Ca(2+) binding protein, specifically interacts with the C-terminal alpha5-helix of G(alpha)i3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(2):674–9.
387. Ballif BA, Mincek N V, Barratt JT, Wilson ML, Simmons DL. Interaction of cyclooxygenases with an apoptosis- and autoimmunity-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93(11):5544–9.
388. Nesselhut J, Jurgan U, Onken E, Götz H, Barnikol HU, Hirschfeld G, Barnikol-watanabe S, Hilschmann N, Ile-rich NL, Go H. Golgi retention of human protein NEFA is mediated by its. *FEBS Lett.* 2001;509(3):469–75.
389. Kalnina Z, Silina K, Bruverer R, Gabruseva N, Stengrevics a, Barnikol-Watanabe S, Leja M, Line a, Line ZKKS RBNGASSB-WMLA. Molecular characterization and expression analysis of SEREX-defined antigen NUCB2 in gastric epithelium, gastritis and gastric cancer. *Eur. J. Histochem. EJH.* 2009;53(1):7–18.
390. Miura K, Hirai M, Kanai Y, Kurosawa Y. Organization of the human gene for nucleobindin (NUC) and its chromosomal assignment to 19q13.2-q13.4. *Genomics.* 1996;34(2):181–6.
391. Bergeron F, Leduc R, Day R. Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;24(1):1–22.
392. Lee S-N, Prodhomme E, Lindberg I. Prohormone convertase 1 (PC1) processing and sorting: effect of PC1 propeptide and proSAAS. *J. Endocrinol.* 2004;182(2):353–364.
393. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides.* 2009;30(5):995–998.
394. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides.* 2010;31(2):357–369.
395. Zhang A-Q. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J. Gastroenterol.* 2010;16(14):1735–41.
396. Foo KS, Brauner H, Ostenson C-G, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J. Endocrinol.* 2010;204(3):255–263.
397. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;381(4):643–648.
398. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG. Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology.* 2009;150(1):232–238.
399. García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido M a, Vazquez MJ, Sangiao-Alvarellos S, Romero-Ruiz a, Pinilla L, Diéguez C, Gaytán F, Tena-Sempere M. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology.* 2012;153(4):1959–71.

400. Gonzalez R, Shepperd E, Thiruppugazh V, Lohan S, Grey CL, Chang JP, Unniappan S. Nesfatin-1 regulates the hypothalamo-pituitary-ovarian axis of fish. *Biol. Reprod.* 2012;87(4):84.
401. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology.* 2010;151(7):3169–3180.
402. Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, Quintieri a M, Cerra MC. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70(3):495–509.
403. Tagaya Y, Osaki A, Miura A, Okada S, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Shimizu H, Mori M. Secreted nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Protein Pept. Lett.* 2012;19(9):997–1004.
404. Li R, Wu Q, Zhao Y, Jin W, Yuan X, Wu X, Tang Y, Zhang J, Tan X, Bi F, Liu J-N. The novel pro-osteogenic activity of NUCB2(1-83.). *PLoS One.* 2013;8(4):e61619.
405. Guo Y, Liao Y, Fang G, Dong J, Li Z. Increased nucleobindin-2 (NUCB2) transcriptional activity links the regulation of insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Invest.* 2013.
406. Miyata S, Yamada N, Kawada T. Possible Involvement of Hypothalamic Nucleobindin-2 in Hyperphagic Feeding in Tsumura Suzuki Obese Diabetes Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2012;35(10):1784–1793.
407. Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira J-I, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2012;103(1):136–43.
408. Zhang H, Qi C, Li L, Luo F, Xu Y. Clinical significance of NUCB2 mRNA expression in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2013;32(1):56.
409. Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport.* 2010;21(15):1008–11.
410. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, Tóth ZE. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int. J. Obes. (Lond).* 2012;36(12):1514–21.
411. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides.* 2011;32(1):36–43.
412. Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, Lambrecht NWG, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology.* 2009;150(11):4911–9.
413. Osaki A, Shimizu H, Ishizuka N, Suzuki Y, Mori M, Inoue S. Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. *Neurosci. Lett.* 2012;521(1):46–51.
414. Saldanha JF, Carrero JJ, Mafra D. The possible role of nesfatin-1 on appetite regulation in hemodialysis patients. *Med. Hypotheses.* 2010;77(4):654–657.
415. Stengel A, Taché Y. Nesfatin-1--role as possible new potent regulator of food intake. *Regul. Pept.* 2010;163(1-3):18–23.
416. Chaolu H, Asakawa A, Ushikai M, Li Y-X, Cheng K-C, Li J-B, Zoshiki T, Terashi M, Tanaka C, Atsuchi K, Sakoguchi T, Tsai M, Amitani H, Horiuchi M, Takeuchi T, et al. Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice. *Exp. Ther. Med.* 2011;2(2):369–373.
417. Yosten GLC, Redlinger L, Samson WK. Evidence for a role of endogenous nesfatin-1 in the control of water drinking. *J. Neuroendocrinol.* 2012;24(7):1078–84.
418. Yosten GLC, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010;298(6):R1642–7.
419. Gaigé S, Bonnet MS, Tardivel C, Pinton P, Trouslard J, Jean A, Guzylack L, Troadec J-D, Dallaporta M. c-Fos immunoreactivity in the pig brain following deoxynivalenol

- intoxication: focus on NUCB2/nesfatin-1 expressing neurons. *Neurotoxicology*. 2013;34:135–49.
420. Lents CA, Barb CR, Hausman GJ, Nonneman D, Heidorn NL, Cisse RS, Azain MJ. Effects of nesfatin-1 on food intake and LH secretion in prepubertal gilts and genomic association of the porcine NUCB2 gene with growth traits. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2013;45(2):89–97.
421. Lin F, Zhou C, Chen H, Wu H, Xin Z, Liu J, Gao Y, Yuan D, Wang T, Wei R, Chen D, Yang S, Wang Y, Pu Y, Li Z. Molecular characterization, tissue distribution and feeding related changes of NUCB2A/nesfatin-1 in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*). *Gene*. 2014;536(2):238–46.
422. Albayrak A, Demiryilmaz I, Albayrak Y, Aylu B, Ozogul B, Cerrah S, Celik M. The role of diminishing appetite and serum nesfatin-1 level in patients with burn wound infection. *Iran. Red Crescent Med. J.* 2013;15(5):389–92.
423. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr. J.* 2009;56(4):537–543.
424. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat. Genet.* 1996;13(1):18–9.
425. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 1997;385(6612):165–8.
426. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 1994;8(10):1298–308.
427. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*. 2008;156(3):563–79.
428. Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A, Taché Y. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res.* 2011;1396:20–34.
429. Bonnet MS, Pecchi E, Trouslard J, Jean A, Dallaporta M, Troadec J-D. Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J. Neuroinflammation*. 2009;6:27.
430. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*. 2007;148(10):5088–5094.
431. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(2):662–671.
432. Okere B, Xu L, Roubos EW, Sonetti D, Kozicz T. Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Res.* 2010;1317:92–9.
433. Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jego S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi P-H. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*. 2008;155(1):174–181.
434. Inhoff T, Stengel A, Peter L, Goebel M, Taché Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P. Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides*. 2010;31(2):257–262.
435. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*. 2008;149(3):1295–301.
436. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*. 2007;28(12):2372–81.
437. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*. 2007;28(11):2223–8.
438. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, et al.

- Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab.* 2009;10(5):355–65.
439. Blevins JE, Ho JM. Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2013;14(4):311–29.
440. Kublaoui BM, Gemelli T, Tolson KP, Wang Y, Zinn AR. Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of Sim1 haploinsufficient mice. *Mol. Endocrinol.* 2008;22(7):1723–34.
441. Aoyagi T, Kusakawa S, Sanbe A, Hiroyama M, Fujiwara Y, Yamauchi J, Tanoue A. Enhanced effect of neuropeptide Y on food intake caused by blockade of the V(1A) vasopressin receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;622(1-3):32–6.
442. Dunbar JC, Lu H. Leptin-induced increase in sympathetic nervous and cardiovascular tone is mediated by proopiomelanocortin (POMC) products. *Brain Res. Bull.* 1999;50(3):215–21.
443. Abba J. Kastin ed. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Second edi. Elsevier Inc; 2013.
444. Stengel A. Nesfatin-1: an affair of the heart. *Endocrinology.* 2013;154(12):4443–5.
445. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2010;73(4):484–490.
446. Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NWG, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci. Lett.* 2009;452(3):241–6.
447. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res.* 2009;1300:114–24.
448. Pałasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides.* 2012;46(3):105–12.
449. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience.* 2009;162(4):1141–9.
450. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Shimasaki T, Mitsutomi K, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J. Neurochem.* 2013;124(1):90–9.
451. Mohan H, Unniappan S. Ontogenic pattern of nucleobindin-2/nesfatin-1 expression in the gastroenteropancreatic tissues and serum of Sprague Dawley rats. *Regul. Pept.* 2012;175(1-3):61–9.
452. Jiang L, Bao J, Zhou X, Xiong Y, Wu L. Increased serum levels and chondrocyte expression of nesfatin-1 in patients with osteoarthritis and its relation with BMI, hsCRP, and IL-18. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:631251.
453. Scotece M, Conde J, Abella V, López V, Lago F, Pino J, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. NUCB2/nesfatin-1: a new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study. *J. Orthop. Res.* 2014;32(5):653–60.
454. Gonzalez R, Reingold BK, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Unniappan S. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet β - and MIN6 cells. *J. Endocrinol.* 2011;208(3):R9–R16.
455. Ghanbari Niaki A, Mohammadi Joojاده F, Zare Kookandeh N, Najafi S, Chaichi MJ, Rodbari F, Bayat H. Liver and plasma nesfatin-1 responses to 6 weeks of treadmill running with or without zizyphus jujuba liquid extract in female rat. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 2013;11(2):95–101.
456. Stengel A, Goebel-Stengel M, Jawien J, Kobelt P, Taché Y, Lambrecht NWG. Lipopolysaccharide increases gastric and circulating NUCB2/nesfatin-1 concentrations in rats. *Peptides.* 2011;32(9):1942–7.
457. Li Q-C, Wang H-Y, Chen X, Guan H-Z, Jiang Z-Y. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul. Pept.* 2010;159(1-3):72–77.
458. Dai H, Li X, He T, Wang Y, Wang Z, Wang S, Xing M, Sun W, Ding H. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with acute myocardial infarction. *Peptides.* 2013;46C:167–171.

459. Aydin S, Dag E, Ozkan Y, Erman F, Dagli AF, Kilic N, Sahin I, Karatas F, Yoldas T, Barim AO, Kendir Y. Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 2009;328(1-2):49–56.
460. Aydin S. The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides.* 2010;31(12):2236–40.
461. Yi C-X, Tschöp MH. Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. *Dis. Model. Mech.* 2012;5(5):583–7.
462. Smitka K, Papezova H, Vondra K, Hill M, Hainer V, Nedvidkova J. The role of “mixed” orexigenic and anorexigenic signals and autoantibodies reacting with appetite-regulating neuropeptides and peptides of the adipose tissue-gut-brain axis: relevance to food intake and nutritional status in patients with anorexia nervosa. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:483145.
463. Stengel A, Taché Y. Minireview: Nesfatin-1--An emerging new player in the brain-gut, endocrine, and metabolic axis. *Endocrinology.* 2011;152(11):4033–8.
464. Gonkowski S, Rychlik A, Nowicki M, Nieradka R, Bulc M, Całka J. A population of nesfatin 1-like immunoreactive (LI) cells in the mucosal layer of the canine digestive tract. *Res. Vet. Sci.* 2012;93(3):1119–21.
465. Varricchio E, Russolillo MG, Russo F, Lombardi V, Paolucci M, Maruccio L. Expression and immunohistochemical detection of nesfatin-1 in the gastrointestinal tract of Casertana pig. *Acta Histochem.* 2014;116(4):583–7.
466. Aydin S. Presence of adropin, nesfatin-1, apelin-12, ghrelins and salusins peptides in the milk, cheese whey and plasma of dairy cows. *Peptides.* 2013;43:83–7.
467. Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S. Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS One.* 2010;5(12):14.
468. Kerbel B, Unniappan S. Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J. Neuroendocrinol.* 2012;24(2):366–77.
469. Caldwell LK, Pierce AL, Riley LG, Duncan CA, Nagler JJ. Plasma nesfatin-1 is not affected by long-term food restriction and does not predict rematuration among iteroparous female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLoS One.* 2014;9(1):e85700.
470. Senejani AG, Gaupale TC, Unniappan S, Bhargava S. Nesfatin-1/nucleobindin-2 like immunoreactivity in the olfactory system, brain and pituitary of frog, *Microhyala ornata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014;202:8–14.
471. Stengel a, Taché Y. Role of NUCB2/Nesfatin-1 in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Horm. Metab. Res.* 2013;45(13):975–9.
472. Kits KS, Mansvelder HD. Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000;33(1):78–94.
473. Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, Yamada M, Mori M. Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. *PLoS One.* 2012;7(12):e50918.
474. Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, Ferguson A V. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20(2):245–50.
475. Price CJ, Samson WK, Ferguson A V. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res.* 2008;1230:99–106.
476. Mimeo A, Smith PM, Ferguson A V. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;302(11):R1297–304.
477. Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, Shimizu H, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 evokes Ca²⁺ signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca²⁺ influx through N-type channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390(3):958–962.
478. Berthoud H-R, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton. Neurosci.* 2000;85(1):1–17.

479. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science*. 1981;213(4511):1036–7.
480. Sartor DM, Verberne AJM. Abdominal vagal signalling: a novel role for cholecystokinin in circulatory control? *Brain Res. Rev.* 2008;59(1):140–54.
481. Chen X, Dong J, Jiang Z-Y. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul. Pept.* 2012;177(1-3):21–6.
482. Bonnet MS, Djelloul M, Tillement V, Tardivel C, Mounien L, Trouslard J, Troadec J-D, Dallaporta M. Central NUCB2/Nesfatin-1-Expressing Neurones Belong to the Hypothalamic-Brainstem Circuitry Activated by Hypoglycaemia. *J. Neuroendocrinol.* 2013;25(1):1–13.
483. Bonnet MS, Ouelaa W, Tillement V, Trouslard J, Jean A, Gonzalez BJ, Gourcerol G, Dallaporta M, Troadec J-D, Mounien L. Gastric distension activates NUCB2/nesfatin-1-expressing neurons in the nucleus of the solitary tract. *Regul. Pept.* 2013;187:17–23.
484. Li C, Zhang F, Shi L, Zhang H, Tian Z, Xie J, Jiang H. Nesfatin-1 decreases excitability of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *J. Mol. Neurosci.* 2014;52(3):419–24.
485. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca(2+) influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr. J.* 2011;58(4):305–313.
486. Unniappan S, Gonzalez R, Perry RLS, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Ceddia RB. Nutrient Responsive Nesfatin-1 Regulates Energy Balance and Induces Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Rats. *Endocrinology*. 2011;152(10):3628–37.
487. Riva M, Nitert MD, Voss U, Sathanoori R, Lindqvist A, Ling C, Wierup N. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res.* 2011;346(3):393–405.
488. Yada T, Itoh K, Nakata M. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide and a rise in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increase cytosolic free Ca²⁺ in rat pancreatic beta-cells by enhancing Ca²⁺ channel activity. *Endocrinology*. 1993;133(4):1685–92.
489. Yada T, Sakurada M, Ihida K, Nakata M, Murata F, Arimura A, Kikuchi M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is an extraordinarily potent intra-pancreatic regulator of insulin secretion from islet beta-cells. *J. Biol. Chem.* 1994;269(2):1290–3.
490. Nakata M, Yada T. PACAP in the glucose and energy homeostasis: physiological role and therapeutic potential. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13(11):1105–12.
491. Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, Shibasaki T. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes. Obes. Metab.* 2009;11 Suppl 4:180–8.
492. Vidal G a, Naresh A, Marrero L, Jones FE. Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J. Biol. Chem.* 2005;280(20):19777–83.
493. Szlachcic A, Sliwowski Z, Krzysiek-Maczka G, Majka J, Surmiak M, Pajdo R, Drozdowicz D, Konturek SJ, Brzozowski T. New satiety hormone nesfatin-1 protects gastric mucosa against stress-induced injury: Mechanistic roles of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and vanilloid receptors. *Peptides*. 2013;49C:9–20.
494. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011;62(6):591–9.
495. Zaki M, Coudron PE, McCuen RW, Harrington L, Chu S, Schubert ML. H. pylori acutely inhibits gastric secretion by activating CGRP sensory neurons coupled to stimulation of somatostatin and inhibition of histamine secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2013;304(8):G715–22.
496. Hayakawa T, Kuwahara S, Maeda S, Tanaka K, Seki M. Distribution of vagal CGRP-immunoreactive fibers in the lower esophagus and the cardia of the stomach of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 2009;38(2):124–9.
497. Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121(7):1461–7.
498. Nonogaki K, Ohba Y, Sumii M, Oka Y. Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT_{2C} receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;372(1):186–90.

499. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wisser A-S, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul. Pept.* 2009;157(1-3):84–91.
500. Stengel A, Goebel M, Taché Y. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. *Obes. Rev.* 2011;12(4):261–71.
501. Li Z, Xu G, Li Y, Zhao J, Mulholland MW, Zhang W. mTOR-dependent modulation of gastric nesfatin-1/NUCB2. *Cell. Physiol. Biochem.* 2012;29(3-4):493–500.
502. Xu G, Li Y, An W, Li S, Guan Y, Wang N, Tang C, Wang X, Zhu Y, Li X, Mulholland MW, Zhang W. Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake. *Endocrinology.* 2009;150(8):3637–44.
503. Stengel A, Mori M, Taché Y. The role of nesfatin-1 in the regulation of food intake and body weight: recent developments and future endeavors. *Obes. Rev.* 2013;1:1–12.
504. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu J-N. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391(1):1039–1042.
505. Gantulga D, Maejima Y, Nakata M, Yada T. Glucose and insulin induce Ca²⁺ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;420(4):811–5.
506. Dong J, Guan H-Z, Jiang Z-Y, Chen X. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the dorsal vagal complex and inhibits food intake. *PLoS One.* 2014;9(6):e98967.
507. Wu D, Yang M, Chen Y, Jia Y, Ma ZA, Boden G, Li L, Yang G. Hypothalamic nesfatin-1/NUCB2 knockdown augments hepatic gluconeogenesis that is correlated with inhibition of mTOR-STAT3 signaling pathway in rats. *Diabetes.* 2014;63(4):1234–47.
508. Li Z, Gao L, Tang H, Yin Y, Xiang X, Li Y, Zhao J, Mulholland M, Zhang W. Peripheral effects of nesfatin-1 on glucose homeostasis. *PLoS One.* 2013;8(8):e71513.
509. Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, Koyama K-I, Amitani M, Harada T, Yasuhara D, Inui A. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides.* 2011;32(1):150–3.
510. Deniz R, Gurates B, Aydin S, Celik H, Sahin I, Baykus Y, Catak Z, Aksoy A, Citil C, Gungor S. Cord blood nesfatin-1 and apelin-36 levels in gestational diabetes mellitus. *Endocrine.* 2012;41(3):424–9.
511. Zegers D, Beckers S, de Freitas F, Jennes K, Van Camp JK, Mertens IL, Van Hoorenbeeck K, Rooman RP, Desager KN, Massa G, Van Gaal LF, Van Hul W. Identification of mutations in the NUCB2/nesfatin gene in children with severe obesity. *Mol. Genet. Metab.* 2012;107(4):729–34.
512. Abaci A, Catli G, Anik A, Kume T, Bober E. The relation of serum nesfatin-1 level with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children. *Pediatr. Diabetes.* 2013;14(3):189–95.
513. Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2012;120(2):91–5.
514. Tan BK, Hallschmid M, Kern W, Lehnert H, Randeve HS. Decreased cerebrospinal fluid/plasma ratio of the novel satiety molecule, nesfatin-1/NUCB-2, in obese humans: evidence of nesfatin-1/NUCB-2 resistance and implications for obesity treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(4):E669–E673.
515. Chen YY, Chan RME, Tan KML, Poh LKS, Loke KY, Wang JP, Li H, Hu YH, Wang L, Lee KO, Li GW, Lee YS. The association of a nucleobindin 2 gene (NUCB2) variant with childhood adiposity. *Gene.* 2013;516(1):48–52.
516. Başar O, Akbal E, Köklü S, Koçak E, Tuna Y, Ekiz F, Gültuna S, Yılmaz FM, Aydoğan T. A novel appetite peptide, nesfatin-1 in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2012;72(6):479–83.
517. Çatli G, Abaci A, Anik A, Böber E. Low serum nesfatin-1 levels may be a contributing factor for monogenic obesity due to prohormone convertase 1 deficiency. *Med. Hypotheses.* 2013;81(2):172–4.

518. Frank GR, Fox J, Candela N, Jovanovic Z, Bochukova E, Levine J, Papanhausen PR, O’Rahilly S, Farooqi IS. Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2013;110(1-2):191–4.
519. Ozkan Y, Timurkan ES, Aydin S, Sahin I, Timurkan M, Cital C, Kalayci M, Yilmaz M, Aksoy A, Catak Z. Acylated and desacylated ghrelin, preptin, leptin, and nesfatin-1 Peptide changes related to the body mass index. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:236085.
520. Saldanha JF, Carrero JJ, Lobo JC, Stockler-Pinto MB, Leal VO, Calixto a, Geloneze B, Mafra D. The newly identified anorexigenic adipokine nesfatin-1 in hemodialysis patients: Are there associations with food intake, body composition and inflammation? *Regul. Pept.* 2012;173(1-3):82–5.
521. Anwar GM, Yamamah G, Ibrahim A, El-Lebedy D, Farid TM, Mahmoud R. Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance. *Regul. Pept.* 2014;188:21–4.
522. Liu F, Yang Q, Gao N, Liu F, Chen S. Decreased plasma nesfatin-1 level is related to the thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Res.* 2014;2014:128014.
523. Zegers D, Beckers S, Mertens IL, Van Gaal LF, Van Hul W. Association between polymorphisms of the Nesfatin gene, NUCB2, and obesity in men. *Mol. Genet. Metab.* 2011;103(3):282–6.
524. Dong J, Xu H, Wang P-F, Cai G-J, Song H-F, Wang C-C, Dong Z-T, Ju Y-J, Jiang Z-Y. Nesfatin-1 stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in STZ-induced type 2 diabetic mice. *PLoS One.* 2013;8(12):e83397.
525. Buijs RM, Escobar C, Swaab DF. The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 2013;117C:173–191.
526. Farajnia S, Deboer T, Rohling JHT, Meijer JH, Michel S. Aging of the suprachiasmatic clock. *Neuroscientist.* 2014;20(1):44–55.
527. Buijs RM. The autonomic nervous system: a balancing act. *Handb. Clin. Neurol.* 2013;117C:1–11.
528. Cersosimo MG, Benarroch EE. Central control of autonomic function and involvement in neurodegenerative disorders. *Handb. Clin. Neurol.* 2013;117C:45–57.
529. Kostin A, McGinty D, Szymusiak R, Alam MN. Sleep-wake and diurnal modulation of nitric oxide in the perifornical-lateral hypothalamic area: real-time detection in freely behaving rats. *Neuroscience.* 2013;254:275–84.
530. Kang WS, Park HJ, Chung J-H, Kim JW. REM sleep deprivation increases the expression of interleukin genes in mice hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 2013;556:73–8.
531. Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KÆ, Lapierre JL, Siegel JM. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat. Commun.* 2013;4:1547.
532. Embree M, Michopoulos V, Votaw JR, Voll RJ, Mun J, Stehouwer JS, Goodman MM, Wilson ME, Sánchez MM. The relation of developmental changes in brain serotonin transporter (5HTT) and 5HT1A receptor binding to emotional behavior in female rhesus monkeys: effects of social status and 5HTT genotype. *Neuroscience.* 2013;228:83–100.
533. Gafford GM, Guo J-D, Flandreau EI, Hazra R, Rainnie DG, Ressler KJ. Cell-type specific deletion of GABA(A) α 1 in corticotropin-releasing factor-containing neurons enhances anxiety and disrupts fear extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(40):16330–5.
534. Wilson CA, Vazdarjanova A, Terry A V. Exposure to variable prenatal stress in rats: effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction. *Behav. Brain Res.* 2013;238:279–88.
535. Radak D, Resanovic I, Isenovic ER. Changes in hypothalamus-pituitary-adrenal axis following transient ischemic attack. *Angiology.* 2014;65(8):723–32.
536. Mustafa T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): a master regulator in central and peripheral stress responses. *Adv. Pharmacol.* 2013;68:445–57.
537. De Souza Villa P, Menani JV, de Arruda Camargo GMP, de Arruda Camargo LA, Saad WA. Activation of the serotonergic 5-HT1A receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibits water intake and increases urinary excretion in water-deprived rats. *Regul. Pept.* 2008;150(1-3):14–20.

538. Nadeau L, Arbour D, Mouginot D. Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis. *BMC Physiol.* 2010;10:17.
539. Bi S. Dorsomedial hypothalamic NPY modulation of adiposity and thermogenesis. *Physiol. Behav.* 2013;121:56–60.
540. Kasahara Y, Sato K, Takayanagi Y, Mizukami H, Ozawa K, Hidema S, So K-H, Kawada T, Inoue N, Ikeda I, Roh S-G, Itoi K, Nishimori K. Oxytocin receptor in the hypothalamus is sufficient to rescue normal thermoregulatory function in male oxytocin receptor knockout mice. *Endocrinology.* 2013;154(11):4305–15.
541. Roa J. Role of GnRH neurons and their neuronal afferents as key integrators between food intake regulatory signals and the control of reproduction. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:518046.
542. Xia Z-F, Fritze DM, Li J-Y, Chai B, Zhang C, Zhang W, Mulholland MW. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012;303(5):G570–7.
543. Kolgazi M, Cantali-Ozturk C, Deniz R, Ozdemir-Kumral ZN, Yuksel M, Sirvanci S, Yen BC. Nesfatin-1 alleviates gastric damage via direct antioxidant mechanisms. *J. Surg. Res.* 2014.
544. Szlachcic A, Majka J, Strzalka M, Szmyd J, Pajdo R, Ptak-Belowska A, Kwiecien S, Brzozowski T. Experimental healing of preexisting gastric ulcers induced by hormones controlling food intake ghrelin, orexin-A and nesfatin-1 is impaired under diabetic conditions. A key to understanding the diabetic gastropathy? *J. Physiol. Pharmacol.* 2013;64(5):625–37.
545. Li Z-L, Xu L, Sun X-R, Guo F-F, Gong Y-L, Gao S-L. Central nesfatin-1 influences the excitability of ghrelin-responsive gastric distension neurons in the arcuate nucleus and reduces gastric motility in rats. *Eur. J. Neurosci.* 2013;38(11):3636–43.
546. Bartfai T, Conti B. Molecules affecting hypothalamic control of core body temperature in response to calorie intake. *Front. Genet.* 2012;3:184.
547. Solinas G, Summermatter S, Mainieri D, Gubler M, Montani JP, Seydoux J, Smith SR, Dulloo AG. Corticotropin-releasing hormone directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle possibly through substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology.* 2006;147(1):31–8.
548. Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani H V, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, Carneiro EM, Velloso LA. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology.* 2003;144(11):4831–40.
549. Drago F, Stanciu M, Salehi S, Scapagnini U. The block of central vasopressin V1 but not V2 receptors suppresses grooming behavior and hypothermia induced by intracerebroventricular vasopressin in male rats. *Peptides.* 1997;18(9):1389–92.
550. Murphy HM, Nadzam GR, Wideman CH. Effect of Vasopressin on Circadian Heart Rate, Body Temperature, and Activity. *Neuropsychopharmacology.* 1994;11(4):277.
551. Chagra SL, Zavala JK, Hall M V, Gosselink KL. Acute and repeated restraint differentially activate orexigenic pathways in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.* 2011;167(1):70–8.
552. Carlin KM, Vale WW, Bale TL. Vital functions of corticotropin-releasing factor (CRF) pathways in maintenance and regulation of energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(9):3462–7.
553. Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Dallman MF. Regulation of activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is integral to a larger hypothalamic system that determines caloric flow. *Endocrinology.* 1994;135(3):1125–34.
554. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology.* 2004;145(8):3754–62.
555. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 2008;201(1):115–123.

556. Hofmann T, Stengel A, Ahnis A, Buße P, Elbelt U, Klapp BF. NUCB2/nesfatin-1 is associated with elevated scores of anxiety in female obese patients. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38:2502–2510.
557. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience*. 2010;170(2):478–88.
558. Gunay H, Tutuncu R, Aydin S, Dag E, Abasli D. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(12):1949–53.
559. Ari M, Ozturk OH, Bez Y, Oktar S, Erduran D. High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011;35(2):497–500.
560. Aydin S, Dag E, Ozkan Y, Arslan O, Koc G, Bek S, Kirbas S, Kasikci T, Abasli D, Gokcil Z, Odabasi Z, Catak Z. Time-dependent changes in the serum levels of prolactin, nesfatin-1 and ghrelin as a marker of epileptic attacks young male patients. *Peptides*. 2011;32(6):1276–80.
561. Emul M, Karamustafalioglu N, Kalelioglu T, Genc A, Tasdemir A, Gungor FC, Incir S, Seven A. The nesfatin 1 level in male patients with manic episode and alterations of nesfatin 1 level after antipsychotic and electroconvulsive treatment. *J. Affect. Disord*. 2013;151(3):849–53.
562. Vas S, Adori C, Könczöl K, Kátai Z, Pap D, Papp RS, Bagdy G, Palkovits M, Tóth ZE, Ádori C. Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. *PLoS One*. 2013;8(4):e59809.
563. Jago S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR. Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. *Nat. Neurosci*. 2013;16(11):1637–43.
564. García-Fuster MJ, Parks GS, Clinton SM, Watson SJ, Akil H, Civelli O. The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2012;22(8):607–13.
565. Jago S, Salvert D, Renouard L, Mori M, Goutagny R, Luppi P-H, Fort P. Tuberal Hypothalamic Neurons Secreting the Satiety Molecule Nesfatin-1 Are Critically Involved in Paradoxical (REM) Sleep Homeostasis. *PLoS One*. 2012;7(12):e52525.
566. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J. Mol. Endocrinol*. 2010;45(5):281–90.
567. García-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Romero M, Aguilar E, Gaytán F, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J. Neurosci*. 2010;30(23):7783–7792.
568. Deniz R, Gurates B, Aydin S, Celik H, Sahin İİ, Baykus Y, Catak Z, Aksoy A, Cital C, Gungor S. Nesfatin-1 and other hormone alterations in polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. 2012;42(3):694–9.
569. Boutsikou T, Briana DD, Boutsikou M, Kafalidis G, Piatopoulou D, Baka S, Hassiakos D, Gourgiotis D, Malamitsi-Puchner A. Cord blood nesfatin-1 in large for gestational age pregnancies. *Cytokine*. 2013;61(2):591–4.
570. Özsavcı D, Erşahin M, Şener A, Özakpınar ÖB, Toklu HZ, Akakın D, Şener G, Yeğen BÇ. The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery*. 2011;68(6):1699–708; discussion 1708.
571. Tang C-H, Fu X-J, Xu X-L, Wei X-J, Pan H-S. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides*. 2012;36(1):39–45.
572. Xu Y, Pang X, Dong M, Wen F, Zhang Y. Nesfatin-1 inhibits ovarian epithelial carcinoma cell proliferation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2013;440(4):467–72.
573. Abu-Farha M, Behbehani K, Elkum N. Comprehensive analysis of circulating adipokines and hsCRP association with cardiovascular disease risk factors and metabolic syndrome in Arabs. *Cardiovasc. Diabetol*. 2014;13:76.

574. Catak Z, Aydin S, Sahin I, Kuloglu T, Aksoy A, Dagli AF. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Neuropeptides*. 2014;48(3):167–77.
575. Chitravanshi VC, Kawabe K, Sapru HN. Mechanisms of cardiovascular actions of urocortins in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013;305(2):H182–91.
576. Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RAL. Differential control of cardiac and sympathetic vasomotor activity from the dorsomedial hypothalamus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006;33(12):1265–8.
577. Xu B, Zheng H, Patel KP. Relative contributions of the thalamus and the paraventricular nucleus of the hypothalamus to the cardiac sympathetic afferent reflex. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013;305(1):R50–9.
578. Mayer MA, Höcht C, Giani JF, Muñoz MC, Carranza A, Taira CA, Dominici FP, Puyó AM, Fernández BE. Central insulin-angiotensin II interaction in blood pressure regulation in fructose overloaded rats. *Regul. Pept.* 2013;185:37–43.
579. Japundžić-Žigon N. Vasopressin and oxytocin in control of the cardiovascular system. *Curr. Neuropharmacol.* 2013;11(2):218–30.
580. Yosten GLC, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;297(2):R330–6.
581. Kc P, Dick TE. Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010;174(1-2):55–64.
582. Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I, Iida M. Central alpha-melanocyte-stimulating hormone acts at melanocortin-4 receptor to activate sympathetic nervous system in conscious rabbits. *Brain Res.* 2002;948(1-2):145–8.
583. Kuo JJ, Silva AA, Hall JE. Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. *Hypertension.* 2003;41(3 Pt 2):768–74.
584. Ramaekers D, Beckers F, Demeulemeester H, Bert C, Deneef C, Aubert AE. Effects of melanocortins on cardiovascular regulation in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002;29(7):549–58.
585. Sabatier N, Caquineau C, Douglas AJ, Leng G. Oxytocin released from magnocellular dendrites: a potential modulator of alpha-melanocyte-stimulating hormone behavioral actions? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;994:218–224.
586. Michelini LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284:H2269–H2276.
587. Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, Deligeoroglou E, Iliodromiti Z. The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents. *Int. J. Endocrinol.* 2011;2011:350546.
588. Brailoiu GC, Deliu E, Tica A, Rabinowitz JE, Tilley DG, Benamar K, Koch WJ, Brailoiu E. Nesfatin-1 activates cardiac vagal neurons of nucleus ambiguus and elicits bradycardia in conscious rats. *J. Neurochem.* 2013;126(6):739–48.
589. Mendelowitz D. Advances in Parasympathetic Control of Heart Rate and Cardiac Function. *News Physiol. Sci.* 1999;14:155–161.
590. Nakamura A, Johns EJ. Renal nerves, renin, and angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995;25:581–586.
591. Tanida M, Niiijima A, Shen J, Yamada S, Sawai H, Fukuda Y, Nagai K. Dose-different effects of orexin-A on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2006;231:1616–1625.
592. Tanida M, Shen J, Nagai K. Possible role of the histaminergic system in autonomic and cardiovascular responses to neuropeptide Y. *Neuropeptides*. 2009;43:21–29.
593. Tanida M, Shintani N, Morita Y, Tsukiyama N, Hatanaka M, Hashimoto H, Sawai H, Baba A, Nagai K. Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regul. Pept.* 2010;161:73–80.
594. Tanida M, Mori M. Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport*. 2011;22(6):309–12.

595. Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(3):307–10.
596. Cacciapuoti F. Visceral adiposity as a cause of some cardiovascular disorders. Old and new adipocytokines. *Obe. Metab.* 2010;6:39–45.
597. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J. Physiol. Pharmacol.* 2006;57:505–528.
598. Yamawaki H, Takahashi M, Mukohda M, Morita T, Okada M, Hara Y. A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;418(4):676–81.
599. Opasich C, Cioffi G, Gualco A. Nitroprusside in decompensated heart failure: what should a clinician really know? *Curr. Heart Fail. Rep.* 2009;6(3):182–90.
600. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* 1983;52:352–357.
601. Karaki H, Sato K, Ozaki H, Murakami K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1988;156:259–266.
602. Brophy CM, Woodrum D a, Pollock J, Dickinson M, Komalavilas P, Cornwell TL, Lincoln TM. cGMP-dependent protein kinase expression restores contractile function in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.* 2002;39:95–103.
603. Springer J, Azer J, Hua R, Robbins C, Adamczyk A, McBoyle S, Bissell MB, Rose RA. The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012;52(5):1122–34.
604. Cappello S, Angelone T, Tota B, Pagliaro P, Penna C, Rastaldo R, Corti A, Losano G, Cerra MC. Human recombinant chromogranin A-derived vasostatin-1 mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signaling mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293:H719–H727.
605. Penna C, Alloati G, Gallo MP, Cerra MC, Levi R, Tullio F, Bassino E, Dolgetta S, Mahata SK, Tota B, Pagliaro P. Catestatin improves post-ischemic left ventricular function and decreases ischemia/reperfusion injury in heart. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2010;30:1171–1179.
606. Pagliaro P, Moro F, Tullio F, Perrelli M-G, Penna C. Cardioprotective pathways during reperfusion: focus on redox signaling and other modalities of cell signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;14:833–850.
607. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;14:893–907.
608. Kadoglou NPE, Lampropoulos S, Kapelouzou A, Gkontopoulos A, Theofilogiannakos EK, Fotiadis G, Kottas G. Serum levels of apelin and ghrelin in patients with acute coronary syndromes and established coronary artery disease--KOZANI STUDY. *Transl. Res.* 2010;155:238–246.
609. Taneli F, Yegane S, Ulman C, Tikiz H, Bilge AR, Ari Z, Uyanik BS. Increased serum leptin concentrations in patients with chronic stable angina pectoris and ST-elevated myocardial infarction. *Angiology.* 2006;57:267–272.
610. Celik A, Gurger M, Can Ç, Balin M, Gul E, Kobat MA, Gumusay U, Sahan M, Bursal KB, Celiker I, Aydin S, Aydin S. The effect of nesfatin-1 levels on paroxysmal supraventricular tachycardia. *J. Investig. Med.* 2013;61(5):852–5.
611. Armstrong MT, Lee DY, Armstrong PB. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev. Dyn.* 2000;219(2):226–36.
612. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(6):2979–84.
613. ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
614. Zhong XY, Holzgreve W, Huang DJ. Isolation of cell-free RNA from maternal plasma. *Methods Mol. Biol.* 2008;444:269–73.
615. Paulin D, Li Z. Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp. Cell Res.* 2004;301:1–7.

616. Steinbusch LKM, Schwenk RW, Ouwens DM, Diamant M, Glatz JFC, Luiken JJFP. Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68(15):2525–38.
617. Pu J, Peng G, Li L, Na H, Liu Y, Liu P. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *J. Lipid Res.* 2011;52(7):1319–27.
618. Srivastava RAK, Pinkosky SL, Filippov S, Hanselman JC, Cramer CT, Newton RS. AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. *J. Lipid Res.* 2012;53(12):2490–514.
619. Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol. Rev.* 2006;86(1):205–43.
620. Blüher M. Adipokines – removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol. Metab.* 2014;3(3):230–240.
621. Turer AT, Hill JA, Elmquist JK, Scherer PE. Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ. Res.* 2012;111(12):1565–77.
622. Yoo HJ, Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J. Diabetes.* 2014;5(3):357–63.
623. Ogawa T, de Bold AJ. The heart as an endocrine organ. *Endocr. Connect.* 2014;3(2):1–73.
624. Proença ARG, Sertié RAL, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2014;47(3):192–205.
625. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J. Cardiol.* 2014;63(4):250–9.
626. Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Otero MF, Pereira E, Rubio J, Martínez I, Seoane LM, Gualillo O, Calaza M, García-Caballero T, Portolés M, Roselló-Lletí E, Diéguez C, et al. Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion, and mobilization of GLUT-4. *Endocrinology.* 2013;154(12):4757–67.
627. Seidah NG, Hamelin J, Gaspar AM, Day R, Chrétien M. The cDNA sequence of the human pro-hormone and pro-protein convertase PC1. *DNA Cell Biol.* 1992;11(4):283–9.
628. Røsjø H, Stridsberg M, Florholmen G, Stensløyken K-O, Ottesen AH, Sjaastad I, Husberg C, Dahl MB, Øie E, Louch WE, Omland T, Christensen G. Secretogranin II; a protein increased in the myocardium and circulation in heart failure with cardioprotective properties. *PLoS One.* 2012;7(5):e37401.
629. Kronebusch PJ, Singer SJ. The microtubule-organizing complex and the Golgi apparatus are co-localized around the entire nuclear envelope of interphase cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 1987;88 (Pt 1):25–34.
630. McFarland TP, Milstein ML, Cala SE. Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;49(4):556–64.
631. Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, Li L, Yang G. Nesfatin-1 Action in the Brain Increases Insulin Sensitivity Through Akt Kinase/AMP-Dependent Protein Kinase/Target of Rapamycin Complex 2 Pathway in Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes.* 2012;61(18):1–10.
632. Kraegen EW, Jenkins AB, Storlien LH, Chisholm DJ. Tracer studies of in vivo insulin action and glucose metabolism in individual peripheral tissues. *Horm. Metab. Res. Suppl.* 1990;24:41–8.
633. Klip A, Sun Y, Chiu TT, Foley KP. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014;306(10):C879–86.
634. Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front. Biosci.* 2004;9:201–15.
635. Cartee GD, Wojtaszewski JFP. Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2007;32:557–566.
636. Nakata M, Yada T. Role of NUCB2/nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19(39):6960–5.
637. Palanivel R, Fang X, Park M, Eguchi M, Pallan S, De Girolamo S, Liu Y, Wang Y, Xu A, Sweeney G. Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in

- glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2007;75:148–157.
638. Palanivel R, Eguchi M, Shuralyova I, Coe I, Sweeney G. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism.* 2006;55(8):1067–75.
639. Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, Sinzato YK, Bueno A, Calderon IMP, Rudge MVC. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:819065.
640. Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* 1997;34(1):25–33.
641. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.* 1998;180(1-2):53–7.
642. Carley AN, Severson DL. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005;1734(2):112–26.
643. Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JFC, Luiken JJFP, Heigenhauser GJF, Dyck DJ. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J.* 2004;18(10):1144–6.
644. Angin Y, Steinbusch LKM, Simons PJ, Greulich S, Hoebbers NTH, Douma K, van Zandvoort MAMJ, Coumans WA, Wijnen W, Diamant M, Ouwens DM, Glatz JFC, Luiken JJFP. CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. *Biochem. J.* 2012;448(1):43–53.
645. Borradaile NM, Schaffer JE. Lipotoxicity in the heart. *Curr. Hypertens. Rep.* 2005;7(6):412–7.
646. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 2005;85(3):1093–129.
647. Greenwalt DE, Scheck SH, Rhinehart-Jones T. Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J. Clin. Invest.* 1995;96(3):1382–8.
648. Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DDJ, Pelsers MMAL, El Hasnaoui M, Dang ZC, van den Brom CE, Vlasblom R, Rietdijk A, Boer C, Coort SLM, Glatz JFC, Luiken JJFP. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia.* 2007;50(9):1938–48.
649. Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, Rovella V, Noce A, De Lorenzo A, Di Daniele N. Obesity-related metabolic syndrome: mechanisms of sympathetic overactivity. *Int. J. Endocrinol.* 2013;2013:865965.
650. Elks CM, Francis J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 2010;12(2):99–104.
651. Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur. J. Med. Res.* 2013;18:12.
652. Fellmann L, Nascimento AR, Tibiriça E, Bousquet P. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Ther.* 2013;137(3):331–40.
653. Li J-B, Nishida M, Kaimoto K, Asakawa A, Chaolu H, Cheng K-C, Li Y-X, Terashi M, Koyama KI, Amitani H, Sakoguchi T, Ushikai M, Ikeda S, Aoyama K, Horiuchi M, et al. Effects of aging on the plasma levels of nesfatin-1 and adiponectin. *Biomed. reports.* 2014;2(1):152–156.
654. Kelishadi R, Farajian S. The protective effects of breastfeeding on chronic non-communicable diseases in adulthood: A review of evidence. *Adv. Biomed. Res.* 2014;3:3.
655. McDade TW, Metzger MW, Chyu L, Duncan GJ, Garfield C, Adam EK. Long-term effects of birth weight and breastfeeding duration on inflammation in early adulthood. *Proc. Biol. Sci.* 2014;281(1784):20133116.
656. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Breast feeding and future health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2006;9(3):289–96.
657. Grzelak T, Woźniak U, Czyżewska K. The influence of natural feeding on human health: short- and long-term perspectives. *Prz. Gastroenterol.* 2014;9(1):4–10.

658. Treviño-Garza C, Bosques-Padilla FJ, Estrada-Zúñiga CM, Mancillas-Adame L, Villarreal-Pérez JZ, Abrego-Moya V, Argente J. Typical leptin fall is mitigated by breastfeeding in female infants. *Arch. Med. Res.* 2010;41(5):373–7.
659. Savino F, Nanni GE, Maccario S, Costamagna M, Oggero R, Silvestro L. Breast-fed infants have higher leptin values than formula-fed infants in the first four months of life. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2004;17(11):1527–32.
660. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2014;105(2):141–150.
661. Dandona P. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004;25(1):4–7.
662. Kirchgessner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J. Clin. Invest.* 1997;100(11):2777–82.
663. Hajri T, Tao H, Wattacheril J, Marks-Shulman P, Abumrad NN. Regulation of adiponectin production by insulin: interactions with tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011;300(2):E350–60.
664. Shimizu H, Osaki A. Nesfatin/Nucleobindin-2 (NUCB2) and Glucose Homeostasis. *Curr. Hypertens. Rev.* 2014.
665. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, Tóth ZE. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem. Int.* 2010;57(3):189–97.
666. Cheng Y-Y, Zhao X-M, Cai B-P, Ma L-N, Yin J-Y, Song G-Y. Nesfatin-1 in newborns: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2012;25(7-8):727–732.
667. Garcés MF, Poveda NE, Sanchez E, Sánchez AY, Bravo SB, Vázquez MJ, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy. *Physiol. Behav.* 2014;133:216–22.
668. Galindo CL, Ryzhov S, Sawyer DB. Neuregulin as a heart failure therapy and mediator of reverse remodeling. *Curr. Heart Fail. Rep.* 2014;11(1):40–9.
669. Odiete O, Hill MF, Sawyer DB. Neuregulin in cardiovascular development and disease. *Circ. Res.* 2012;111(10):1376–85.
670. Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell.* 2009;138(2):257–70.
671. Wadugu B, Kühn B. The role of neuregulin/ErbB2/ErbB4 signaling in the heart with special focus on effects on cardiomyocyte proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012;302(11):H2139–47.
672. Fang S-J, Wu X-S, Han Z-H, Zhang X-X, Wang C-M, Li X-Y, Lu L-Q, Zhang J-L. Neuregulin-1 preconditioning protects the heart against ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2010;123(24):3597–604.
673. Yasuda O, Fukuo K, Sun X, Nishitani M, Yotsui T, Higuchi M, Suzuki T, Rakugi H, Smithies O, Maeda N, Ogihara T. Apop-1, a novel protein inducing cyclophilin D-dependent but Bax/Bak-related channel-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006;281(33):23899–907.
674. Coort SLM, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JFC, Luiken JJFP. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol. Cell. Biochem.* 2007;299(1-2):5–18.
675. Murphy E, Lagranha C, Deschamps A, Kohr M, Nguyen T, Wong R, Sun J, Steenbergen C. Mechanism of cardioprotection: what can we learn from females? *Pediatr. Cardiol.* 2011;32(3):354–9.
676. Murphy E, Steenbergen C. Cardioprotection in females: a role for nitric oxide and altered gene expression. *Heart Fail. Rev.* 2007;12(3-4):293–300.
677. Nagalingam S, Uppuluri MV, Gunda P, Ravishanker U, Tirunilai P. Evaluation of leptin and leptin receptor gene 3' UTR polymorphisms in essential hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 2013.

678. Ibrahim HS, Omar E, Froemming GRA, Singh HJ. Leptin increases blood pressure and markers of endothelial activation during pregnancy in rats. *Biomed Res. Int.* 2013;2013:298401.
679. Allison MA, Ix JH, Morgan C, McClelland RL, Rifkin D, Shimbo D, Criqui MH. Higher leptin is associated with hypertension: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J. Hum. Hypertens.* 2013;27(10):617–22.
680. Fontana V, de Faria APC, Oliveira-Paula GH, Silva PS, Biagi C, Tanus-Santos JE, Moreno H. Effects of Angiotensin-converting enzyme inhibition on leptin and adiponectin levels in essential hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2014;114(6):472–5.
681. Osaki A, Shimizu H. Peripheral administration of nesfatin-1 increases blood pressure in mice. *Hypertens. Res.* 2014;37(2):185–6.
682. Zhao Y, Ma X, Wang Q, Zhou Y, Zhang Y, Wu L, Ji H, Qin G, Lu J, Bi Y, Ning G. Nesfatin-1 correlates with hypertension in overweight or obese Han Chinese population. *Clin. Exp. Hypertens.* 2014;1963:1–6.
683. El Messaoudi S, Rongen GA, Riksen NP. Metformin therapy in diabetes: the role of cardioprotection. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2013;15(4):314.
684. Xu X, Lu Z, Fassett J, Zhang P, Hu X, Liu X, Kwak D, Li J, Zhu G, Tao Y, Hou M, Wang H, Guo H, Viollet B, McFalls EO, et al. Metformin protects against systolic overload-induced heart failure independent of AMP-activated protein kinase α 2. *Hypertension.* 2014;63(4):723–8.
685. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* 2014;7:55–64.
686. Tan BK, Chen J, Hu J, Amar O, Mattu HS, Ramanjaneya M, Patel V, Lehnert H, Randeve HS. Circulatory changes of the novel adipokine adipolin/CTRP12 in response to metformin treatment and an oral glucose challenge in humans. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2014;0:1–6.
687. Andreasson AN, Carlsson AC, Wändell PE. High levels of leptin are associated with poor self-rated health in men and women with type 2 diabetes treated with metformin. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013;23(2):e11–2.
688. Esteghamati A, Mousavizadeh M, Noshad S, Zandieh A, Zarei H, Nakhjavani M. Gender-dependent effects of metformin on vaspin and adiponectin in type 2 diabetes patients: a randomized clinical trial. *Horm. Metab. Res.* 2013;45(4):319–25.
689. McMurray JJ V, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GYH, Maggioni A Pietro, Parkhomenko A, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur. Heart J.* 2012;33(14):1787–847.
690. Fundación Española del Corazón. Insuficiencia cardiaca. <http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/insuficiencia-cardiaca.html>. 2014.
691. Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Konstam MA, Mancini DM, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW. 2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with t. *Circulation.* 2009;119(14):1977–2016.
692. Piña IL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, Fletcher BJ, Fleg JL, Myers JN, Sullivan MJ. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation.* 2003;107(8):1210–25.
693. Formiga F, Manito N, Pujol R. [Terminal heart failure]. *Med. Clin. (Barc).* 2007;128(7):263–7.
694. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2012;298:229–317.
695. Opie LH, Sack MN. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002;34(9):1077–89.

696. Shah A, Shannon RP. Insulin resistance in dilated cardiomyopathy. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2003;4 Suppl 6:S50–7.
697. Vyas AK, Yang K-C, Woo D, Tzekov A, Kovacs A, Jay PY, Hruz PW. Exenatide improves glucose homeostasis and prolongs survival in a murine model of dilated cardiomyopathy. *PLoS One.* 2011;6(2):e17178.
698. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin. Chim. Acta.* 2013;417:80–4.
699. Bobbert P, Jenke A, Bobbert T, Kühl U, Rauch U, Lassner D, Scheibenbogen C, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C. High leptin and resistin expression in chronic heart failure: adverse outcome in patients with dilated and inflammatory cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 2012;14(11):1265–75.
700. Giannessi D, Caselli C, Del Ry S, Maltinti M, Pardini S, Turchi S, Cabiati M, Sampietro T, Abraham N, L'abbate A, Neglia D. Adiponectin is associated with abnormal lipid profile and coronary microvascular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy without overt heart failure. *Metabolism.* 2011;60(2):227–33.
701. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007. *J. Heart Lung Transplant.* 2007;26(8):769–81.
702. Lakdawala NK, Winterfield JR, Funke BH. Dilated cardiomyopathy. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2013;6(1):228–37.
703. Tainsky MA. Genomic and proteomic biomarkers for cancer: a multitude of opportunities. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1796(2):176–93.
704. Shen P, Han Y, Cai B, Wang Y. Decreased levels of serum nesfatin-1 in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 2014.
705. Şengül Ö, Dilbaz B, Halıcı Z, Ferah I, Çadırcı E, Yılmaz F. Decreased serum nesfatin-1 levels in endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2014;177:34–7.
706. Ademoglu EN, Gorar S, Carlhoglu A, Yazıcı H, Dellal FD, Berberoglu Z, Akdeniz D, Uysal S, Karakurt F. Plasma nesfatin-1 levels are increased in patients with polycystic ovary syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* 2014.
707. Zhang C, Wang Y, Wang Y, Li J, Liu R, Liu H. Decreased levels of serum nesfatin-1 in patients with preeclampsia. *Biomarkers.* 2014;19(5):402–6.
708. Aydin S. Role of NUCB2/nesfatin-1 as a possible biomarker. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19(39):6986–92.







ANEXO

Artículos ya publicados que contienen datos pertenecientes a este trabajo de tesis.



NESFATIN-1 IN HUMAN AND MURINE CARDIOMYOCYTES: SYNTHESIS, SECRETION, AND MOBILIZATION OF GLUT-4

Sandra Feijóo-Bandín,¹ Diego Rodríguez-Penas,¹ Vanessa García-Rúa,¹ Ana Mosquera-Leal,¹ Manuel Francisco Otero,¹ Eva Pereira,¹ José Rubio,¹ Isabel Martínez,² Luisa María Seoane,³ Oreste Gualillo,⁴ Manuel Calaza,⁵ Tomás García-Caballero,⁶ Manuel Portolés,⁸ Esther Roselló-Lletí,⁸ Carlos Diéguez,⁷ Miguel Rivera,⁸ José Ramón González-Juanatey JR,¹ Francisca Lago.^{1†}

Cellular and Molecular Cardiology Research Unit and Department of Cardiology¹, Biostatistical Research Unit², Endocrine Pathophysiology Research Group,³ Neuroendocrine Interactions in Rheumatic Disease Laboratory⁴, Rheumatology Laboratory,⁵ Department of Pathology⁶ and Department of Physiology⁷ of the Institute of Biomedical Research (IDIS) and University Clinical Hospital (CHUS-SERGAS), Santiago de Compostela, Spain; and La Fe University Hospital,⁸ Valencia, Spain.

Nesfatin-1, a satiety-inducing peptide identified in hypothalamic regions that regulate energy balance, is an integral regulator of energy homeostasis and a putative glucose-dependent insulin coadjuvant. We investigated its production by human cardiomyocytes and its effects on glucose uptake, in the main cardiac glucose transporter GLUT-4 and in intracellular signaling. Quantitative RT-PCR, western blots, confocal immunofluorescence microscopy and ELISA of human and murine cardiomyocytes and/or cardiac tissue showed that cardiomyocytes can synthesize and secrete nesfatin-1. Confocal microscopy of cultured cardiomyocytes following GLUT-4 labelling showed that nesfatin-1 mobilizes this glucose transporter to cell peripherals. Rate of 2-[³H]deoxy-D-glucose incorporation demonstrated that nesfatin-1 induces glucose uptake by HL-1 cells and cultured cardiomyocytes. Nesfatin-1 induced dose- and time-dependent increases in the phosphorylation of ERK1/2, AKT and AS160. In murine and human cardiac tissue, nesfatin-1 levels varied with diet and coronary health. In conclusion, human and murine cardiomyocytes can synthesize and secrete nesfatin-1, that is able to induce glucose uptake and the mobilization of the glucose transporter GLUT-4 in these cells. Nesfatin-1 cardiac levels are regulated by diet and coronary health.

Nesfatin-1 is an 82-aminoacid peptide derived from nucleobindin 2 (NUCB2) through processing by prohormone convertases, the enzymes that process proinsulin (1). First found in hypothalamic regions that regulate energy balance (1), it appears to act there (2) as an integral regulator of energy homeostasis, circadian feeding rhythm and related endocrine functions (3, 4). It also circulates in the bloodstream, plasma levels depending on nutritional state and other metabolic circumstances (5–9). It reduces food and water intake and bodyweight gain in rodents (10–15); increases spontaneous physical activity and

whole body fat oxidation (13); and raises body temperature (14). These multiple metabolic effects, and the reported association between plasma glucose and nesfatin-1 levels in rats and type 2 diabetes patients (5, 8, 16) suggest that it is a glucose-dependent coadjuvant of insulin (13, 17–20), while its dependence on metabolic state has suggested that plasma nesfatin-1 levels may be regulated by sustained changes in adipose tissue mass and/or inflammatory status (6, 21), two of the most important determinants of metabolic syndrome.

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received May 30, 2013. Accepted September 10, 2013.

Abbreviations:

That peripheral sources of nesfatin-1 exist is suggested by its ability to cross the blood-brain barrier and by reports of NUCB2 production - dependent on nutritional status and/or sympathetic nerve activity - by pituitary gland, gastric endocrine cells, endocrine pancreas, liver, subcutaneous and visceral adipose tissue, skeletal muscle, and testis (6, 16, 22–24). However, the only reported observations of endogenous fully-processed nesfatin-1 appear to be those of Oh-I et al (1) in rat cerebrospinal fluid and Angelone et al (25) in rat cardiac extracts.

Like many other peptides that regulate and/or are regulated by feeding and metabolism, nesfatin-1 can influence cardiovascular function. In rat studies it has induced negative inotropism and modulated lusitropism in perfused hearts (25) and increased sympathetic activity, mean arterial pressure and heart rate (26–28). To the best of our knowledge, fully-processed nesfatin-1 peptide has been detected in the human circulation using a sandwich-type ELISA (7) but it has never been identified in other human tissues. In this study we investigated its presence in human cardiac tissue, its influence on correlated signaling proteins (ERK1/2, AKT and AS160) and on GLUT-4 mobilization, and the effects of diet and cardiovascular disease on its levels in cardiomyocytes.

Materials and Methods

All reagents were from Sigma Chemical Co (MO, USA) unless otherwise stated.

Ethics

The study protocol was approved by the Galician Clinical Research Ethics Committee (2007/304). All acquisitions of human tissues were performed with the informed consents and in accordance with the Declaration of Helsinki 2008 (and, when pertinent, the European Convention of Human Rights and Biomedicine (ETS 164) and the UK Human Tissue Act 2004) following approval by local medical/health research ethics committees. All animals were maintained and euthanized following protocols approved by the Animal Care Committee of the University of Santiago de Compostela (USC) in accordance with EU Directive 2010/63.

Human tissue samples

Right atrial appendages were obtained from 268 patients undergoing valve surgery or coronary artery bypass grafting (patient characteristics in Table 1). Ventricular tissue samples from cardiac transplant patients (29) were donated by the University Hospital La Fé, Valencia, Spain. Samples of human stomachs (mucosa) were obtained from the Department of Digestive Pathology of the University Clinical Hospital, Santiago de Compostela.

Animals

Three/four-week-old male Sprague-Dawley rats were fed for 18 weeks with standard diet [3.85 kcal/g; 10% fat (5.6% soy-

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cardiac surgery patients used in the study.

	Male (178)	Female (90)
Demographics		
Age (mean)	69.07	69.77
BMI (kg/m ²) (mean)	28.41	29.1
Normal weight (18,5–24,9 kg/m ²) (n)	29 (16.3%)	17 (18.8%)
Overweight (25–29,9 kg/m ²) (n)	95 (53.3%)	34 (37.7%)
Obesity (>30 kg/m ²) (n)	49 (27.5%)	37 (41.1%)
HTA (n)	129 (72.4%)	67 (74.4%)
T2DM (n)	51 (28.6%)	22 (24.4%)
HLP (n)	93 (52.2%)	52 (57.7%)
Laboratory findings		
Triglycerides (mg/dl)(mean)	109.6	124.76
Cholesterol (mg/dl)(mean)	167.93	189.75
Glucose (mg/dl)(mean)	114.85	114.73
Drugs		
Antiplatelets (n)	64 (35.9%)	29 (32.2%)
Anticoagulants (n)	35 (19.6%)	20 (22.2%)
ACE inhibitors (n)	53 (29.7%)	22 (24.4%)
ARBs (n)	37 (20.7%)	20 (22.2%)
β-blockers (n)	54 (30.3%)	28 (31.1%)
CCBs (n)	39 (21.9%)	11 (12.2%)
Diuretics (n)	95 (53.3%)	41 (45.5%)
OADs (n)	35 (19.6%)	14 (15.5%)
Insulin (n)	13 (7.3%)	7 (7.7%)
Cardiovascular pathologies		
Coronary injury (n)	96	27

BMI: body mass index, HTA: arterial hypertension, T2DM: type-2 diabetes mellitus, HLP: hyperlipidemia, ACE inhibitors: angiotensin-converting-enzyme inhibitors, ARBs: angiotensin II receptor blockers, CCBs: calcium channel blockers, OADs: oral antidiabetics.

bean oil and 4.4% lard), 20% protein, 70% carbohydrate (35% *sucrose*, 31% *cornstarch* and 4% *maltodextrin*); Research Diets, Inc. USA] or high-fat diet [4.73 kcal/g; 45% fat (5.6% soybean oil and 39.4% lard), 20% protein, 35% carbohydrate (17% *sucrose*, 8% *cornstarch* and 10% *maltodextrin*); Research Diets, Inc. USA] and euthanized by decapitation. Hearts were collected and quickly frozen at -80°C . Neonatal (1- to 3-day-old) Sprague-Dawley rats were killed by cervical dislocation and their hearts used for establishment of primary cardiomyocyte cultures (see below).

Cell cultures

Cardiomyocytes from human atrial appendages and neonatal rat hearts and adult mouse atrial HL-1 cardiomyocytes (a gift of Dr. W.C. Claycomb of Louisiana State University Medical Center, USA), were all cultured as previously described (30). Adult human ventricular cardiomyocytes (Promocell GmbH; Heidelberg, Germany) were cultured according to the supplier's instructions.

qPCR

Quantitative reverse-transcription real time PCR for NUCB2 was performed on RNA extracted with the RNeasy Total RNA Extraction Kit (Quiagen, UK) using the master mix and specific primers provided by SABioscience (rat NUCB2, 145 bp, Cat. No. PPR49435A, reference position 1245, GenBank NM 021663.2; rat GAPDH, 172 bp, Cat. No. PPR06557A, reference position 363, GenBank NM 017008.3; human NUCB2, 126 bp, Cat. No. PPH19934A, reference position 894, GenBank NM 005013.2; human GAPDH, 175 bp, Cat. No. PPH00150E, reference position 1287, GenBank NM 002046.3; mouse NUCB2, 95 bp, Cat. No. PPM25549A, reference position 1314, GenBank NM 016773.3; mouse GAPDH, 140 bp, Cat. No. PPM02946E, reference position 309, GenBank NM 008084.2). We also performed one-step reverse-transcription real-time PCR with Brilliant III SYBR Green QRT-PCR Master Mix Kit (Stratagene, USA) for the following specific primers: rat CD36, 92 bp, GCGACATGATTAATGGCACA (forward) and CCTGCAAATGTCAGAGGAAA (reverse), GenBank NM 031561.2; rat GAPDH, 224 bp, GCTCATGACCA-CAGTCCATG (forward) and GGCATGTCAGATCCACAAC (reverse), GenBank NM 017008.4. Results were analyzed using MxPro v4 software (Stratagene, USA).

Western blotting

Cultured cardiomyocytes ($50,000$ cells/cm²) or heart tissue were lysed and subjected to SDS-PAGE/western blotting as described previously (31), using antibodies against nesfatin-1 residues 1–28 (Phoenix Pharmaceuticals, USA), ERK1/2 and phosphoERK1/2 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA), AKT and Ser473-phosphorylated AKT (Cell Signaling Technology Inc, USA), AS160 and phosphoAS160 (Cell Signaling Technology Inc, USA), β -actin and GAPDH (Thermo Fisher Scientific Inc, USA), all at 1:1000 dilution unless AS160 (1:500).

Immunocytochemistry

Using a Dako Link 48 Autostainer, primary cultures of human and neonatal rat cardiomyocytes were stained with FLEX mouse antidesmin antibodies (clone D33, Dako) and rabbit antinesfatin-1 antibodies (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA),

both at 1:200, followed by EnVision FLEX/HRP Dako for detection. Negative controls: normal goat serum or antinesfatin-1 antibody preadsorbed by nesfatin-1 peptide (Phoenix Pharmaceuticals Inc, USA).

Immunocytofluorescent labeling and confocal microscopy

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were deprived of serum for 12 hours before treatment with nesfatin-1 (0.01–1 μM for 10 minutes or 1 μM for 5–30 minutes) or 100 nM insulin. Cells (10,000 per \varnothing 12 mm circular coverslip) and tissues were processed as previously described (31) using rabbit antibodies: anti-GLUT-4 (Abcam, UK) at 1:100 dilution, antinesfatin-1 (Phoenix Pharmaceuticals, USA.) at 1:500, or anti-prohormone convertase 1/3 (Abcam, UK) at 1:100. Quantitative confocal microscopy was performed using a Leica DMIRE2 confocal microscope and software to compare GLUT-4 concentrations in the cell peripherals with those in the cytoplasm and perinuclear region, as other authors have described previously for cardiomyocytes in culture (31–34). A total of 216 cells were analyzed. For each coverslip, a minimum of six distinct and randomly chosen visual fields were photographed and analyzed as z-stacks using a Leica DMIRE2 confocal microscope and software. Mean intensity of Cy3 fluorescence was taken to indicate relative expression level of the GLUT-4 glucose transporter. To measure intensity of fluorescence in the cytoplasm-perinuclear region vs the cell peripherals-cytoplasmic membrane, ROIs (Regions of Interest) of equal sizes were first set up manually, and then the cytoplasm-perinuclear region and the cell peripherals-cytoplasmic membrane ROIs for each of several cells per field chosen randomly and measured automatically. Cells with any of the following characteristics were excluded from analysis: atypically large or small cells; perceptibly in the G1 or later phase of the cell cycle; not in contact with at least one neighbor; having an outer cytoplasmic border not clearly distinguishable from those of its neighbors. Great care was taken to localize the ROIs well within the cell cytoplasmic-perinuclear and cell peripherals areas (as indicated by presence or absence of TO-PRO-3 fluorescence, respectively). To maximize the number of cells measured and the objectivity with which ROI localization was carried out, the process was carried out twice, by two independent observers. Thus over 70 ratios were obtained for each experimental variable.

Glucose uptake experiments

Serum-deprived HL-1 cells or neonatal rat cardiomyocytes (10^4 per P24 well) were treated for 2.5 hours with nesfatin-1 (0.1–100 nM). Treatment for 1 hour with insulin (100 nM) was used as a positive control. Cells were washed twice in glucose-free HEPES-buffered saline solution at pH7.4 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES) and glucose uptake determined as described previously using [³H] 2-deoxy-D-glucose (Perkin Elmer Inc, USA) (13). Nonspecific glucose uptake was determined in the presence of 10 μM cytochalasin B, and the value obtained subtracted from all other measurements.

Enzyme-linked immunosorbent assays

Plasma NUCB2/nesfatin-1 levels of male Sprague-Dawley rats fed for 18 weeks with standard or high-fat diet were determined by ELISA (Phoenix Pharmaceuticals Inc, USA; minimum

detection limit: 0.8 ng/ml; range: 0.1–1000 ng/ml; linear range: 0.8–14.1 ng/ml; intra-assay error: <10%; interassay error: <15%). NUCB2/nesfatin-1 secretion by neonatal rat cardiomyocytes was measured in the culture medium in nine 6-well plates in which cells had been cultured for 3 days at a density of 4.5×10^5 cells/well.

Statistical analyses

All experimental data were obtained from at least three independent experiments. The comparisons between groups of data were done with the appropriate test depending on the normality of the data. We used *t* test with gaussian data and Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis and Wilcoxon signed rank tests with nongaussian data. All the correlation coefficients were measured as Spearman *r*. All the analysis were done with IBM SPSS 15.0 (USA) or Prism 5 GraphPad (USA) softwares.

Results

NUCB2 gene expression in human and murine cardiomyocytes

qPCR showed NUCB2 mRNA in human cardiac tissue and cardiomyocyte cultures (with highest levels, similar to those in stomach, in atrial tissue; Figure 1, Panel A.1); in rat cardiac tissues and cardiomyocyte cultures (with higher levels in atrial than in ventricular cells; Panel B.1); and in mouse cardiac tissue and adult mouse atrial cell line

HL-1 (Panel C.1). That reverse transcription had proceeded properly was confirmed in each case by amplification of GAPDH, that was used to normalize all the data.

Synthesis of nesfatin-1 by human and murine cardiomyocytes

Western blots with antinesfatin-1 antibodies showed a 9.5 kDa band coinciding with the main band of commercial nesfatin-1 peptide in human, rat and mouse cardiac tissue and/or cardiomyocytes (Figure 1, Panels A.2, B.2 and C.2). In rat (Figure 2, Panels A.1 and C d and e) and human (Figure 2, Panels B a-c and C a-c) cardiomyocytes from primary cultures, the perinuclear cytoplasm was intensely immunoreactive with antinesfatin-1 antibody (Panel A.1 b). The possibility that some reactive cells were fibroblasts was ruled out by their immunoreactivity with antibodies against the MHC (data not shown) and/or desmin (Panel C c), and by the use of a cyostatic agent in the culture medium to prevent fibroblast proliferation. Similarly, the cytoplasm of virtually all muscle fibers in sections of human atrial tissue was immunoreactive with antinesfatin-1 antibody (Panel B d-f) and with antiproteinase convertase 1/3 antibody (Panel B g-i). Control stains (normal goat serum or antinesfatin-1 antibody preadsorbed by nesfatin-1 peptide) stained neither cultured

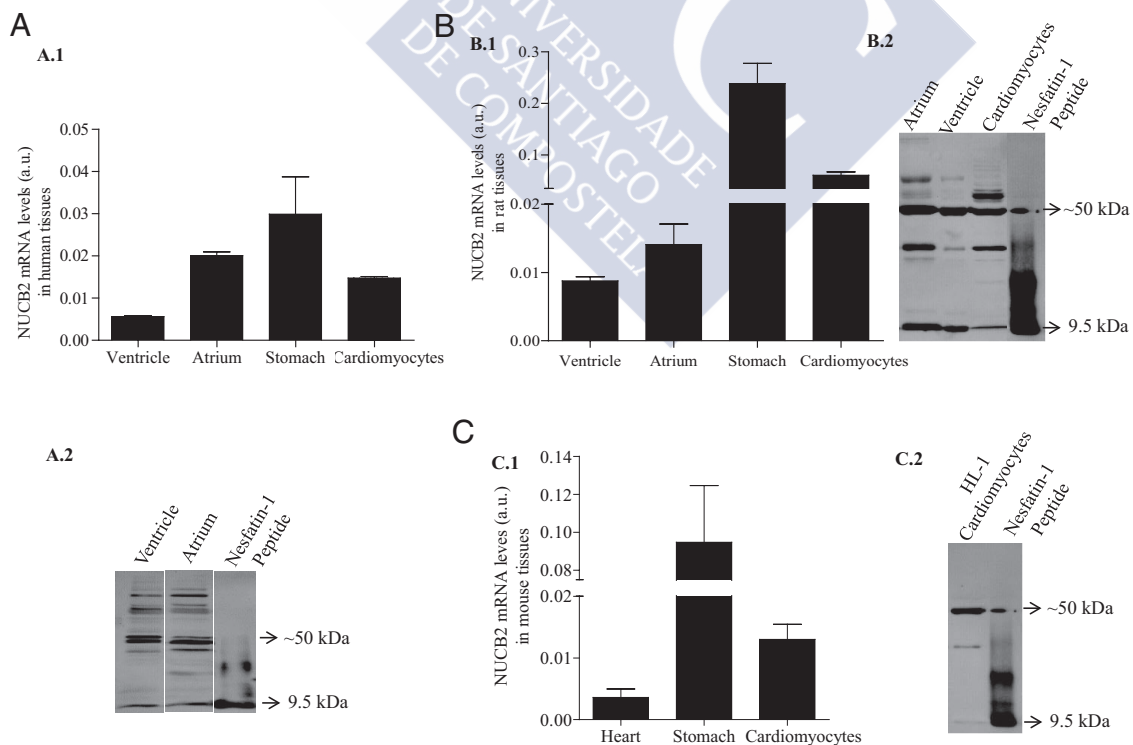


Figure 1. Results of qPCR (Panels A.1, B.1 and C.1) and western blots (Panels A.2, B.2 and C.2) comparing the levels of NUCB2 mRNA and nesfatin-1 peptide (9.5 kDa band; the band at ~50 kDa corresponds to full-length NUCB2 protein), respectively, in human (Panel A), rat (Panel B) and mouse (Panel C) cardiac tissues (ventricle and atrium for humans and rats, whole heart for mouse), cultured cardiomyocytes (adult human ventricular cardiomyocytes, neonatal rat cardiomyocytes and adult mouse HL-1 cells) and stomach (mucosa) tissue. Synthetic nesfatin-1 peptide was run for comparison in western blots. Bar graphs show means \pm SEMs.

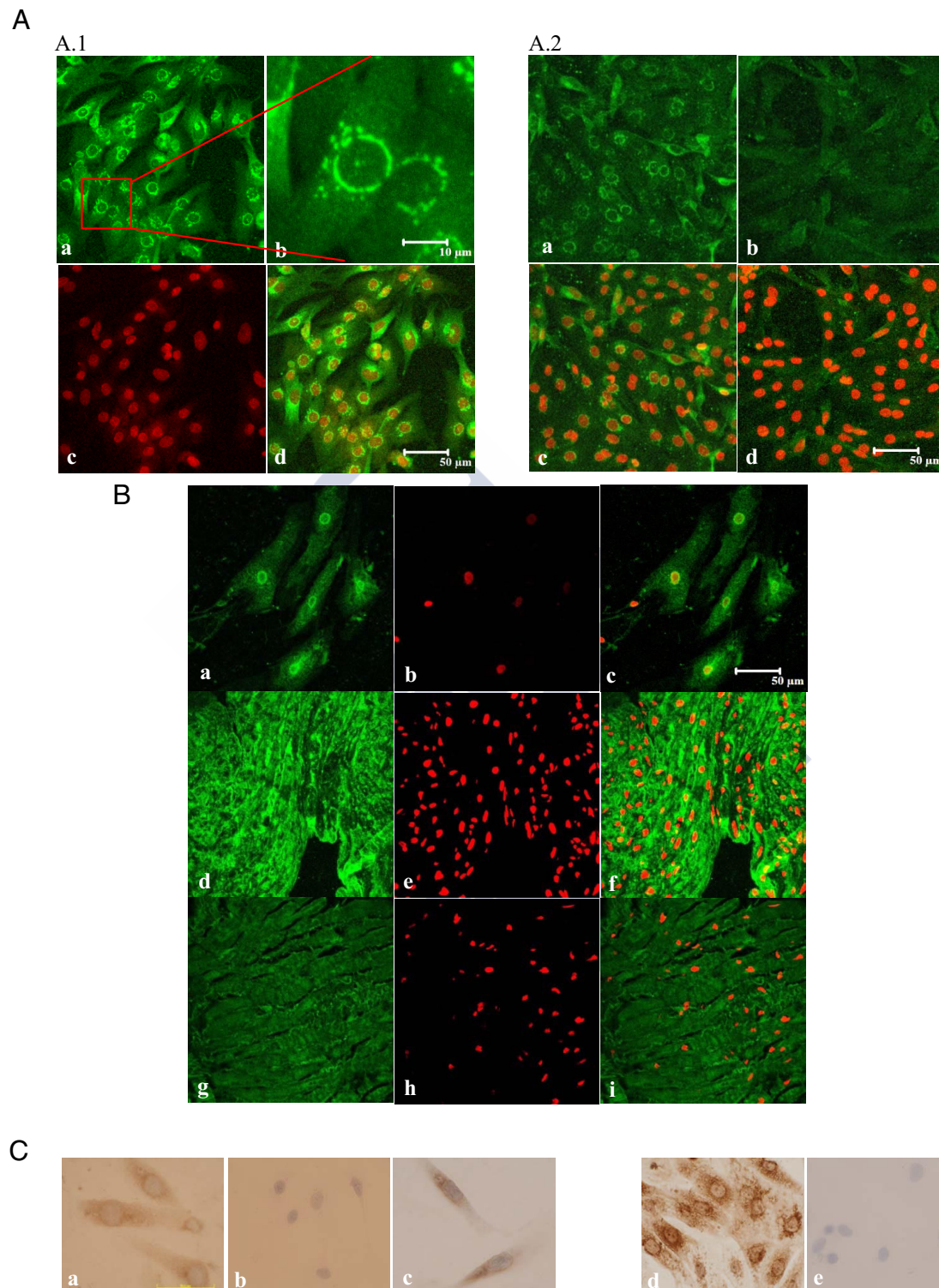


Figure 2. Nesfatin-1 in human and rat cardiomyocytes and myocardium (scale bars: 10 μm in Panel A.1.b, 50 μm elsewhere): **Panel A.** Confocal photomicrographs of primary neonatal rat cardiomyocyte cultures. A.1: a) perinuclear immunofluorescent nesfatin-1; b) detail of (a); c) TO-PRO 3 nuclear marker; d) (a) and (b) merged. A.2: a) perinuclear immunofluorescent nesfatin-1; b) no staining by antinesfatin-1 antibody presaturated with nesfatin-1 (negative control); c) (a) merged with the corresponding TO-PRO 3 image; d) b) merged with the corresponding TO-PRO 3 image. **Panel B.** Confocal photomicrographs of human atrial cardiomyocytes (a-c) or atrial tissue (d-i), showing immunofluorescent perinuclear nesfatin-1 (a,d) or prohormone convertase 1/3 (g), the corresponding TO-PRO 3 images (b,c,h), and the merges of (a) and (b), (d) and (e), and (g) and (h) (c,f,i). **Panel C.** Immunostained nesfatin-1 in human atrial (a) and neonatal rat (d) cardiomyocytes; negative controls (b and e); and immunostained desmin in human atrial cells, confirming cardiomyocyte phenotype (c).

cells (Figure 2, Panels A.2 and C b and e) nor cardiac tissues (data not shown).

Secretion of nesfatin-1 by primary cultures of rat cardiomyocytes

Secretion of NUCB2/nesfatin-1 into the culture medium was measured only in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes due to the limited cardiomyocyte populations afforded by human right atrial appendages in culture. In culture media supporting approximately 4.5×10^5 confluent starving cells the ELISA-measured NUCB2/nesfatin-1 concentration was 4.55 ± 0.52 ng/mg of cellular protein ($n=21$).

Effect of nesfatin-1 treatment on GLUT-4 mobilization in cardiomyocytes

Analysis of confocal images of cultured neonatal rat cardiomyocytes with fluorescence-labeled GLUT-4 showed that 10–1000 nM nesfatin-1 caused significant translocation of GLUT-4 to cell peripherals, decreasing its amount of in the cytoplasm-perinuclear area of the cardiomyocytes in dose- and time-dependent fashion by a factor similar to that caused by 100 nM insulin (Figure 3).

Effect of nesfatin-1 on glucose uptake by cardiomyocytes

Treatment with nesfatin-1 increased 2-deoxy-D- ^3H glucose uptake by $12.5 \pm 3.9\%$ at 0.1 nM ($P < .05$, $n=11$), by $11.9 \pm 4\%$ at 1 nM ($P < .05$, $n=11$), and by $26 \pm 5.4\%$ at 100 nM ($P < .001$, $n=11$) by HL-1 cardiomyocytes, whereas treatment with 100 nM insulin for 1 hour increased 2-deoxy-D- ^3H glucose uptake by $44.3 \pm 8.8\%$ ($P < .001$, $n=6$) (Figure 4, Panel A). Nesfatin-1 also increased significantly 2-deoxy-D- ^3H glucose uptake by primary cultured neonatal rat cardiomyocytes by $14.8 \pm 3.3\%$ at 10 nM ($P < .001$, $n=8$) and by $23 \pm 5.5\%$ at 100 nM ($P < .001$, $n=8$), whereas treatment with 100 nM insulin for 1 hour increased 2-deoxy-D- ^3H glucose uptake by $35.2 \pm 6.2\%$ ($P < .001$, $n=8$) (Figure 4, Panel B).

Nesfatin-1 induces AKT, AS160 and ERK1/2 phosphorylation in cardiomyocytes

Since both AKT and ERK1/2 are kinases involved in the stimulation of GLUT-4 translocation and glucose uptake in muscle and cardiac cells (35, 36), we investigated their phosphorylation under nesfatin-1 stimulus in cultured

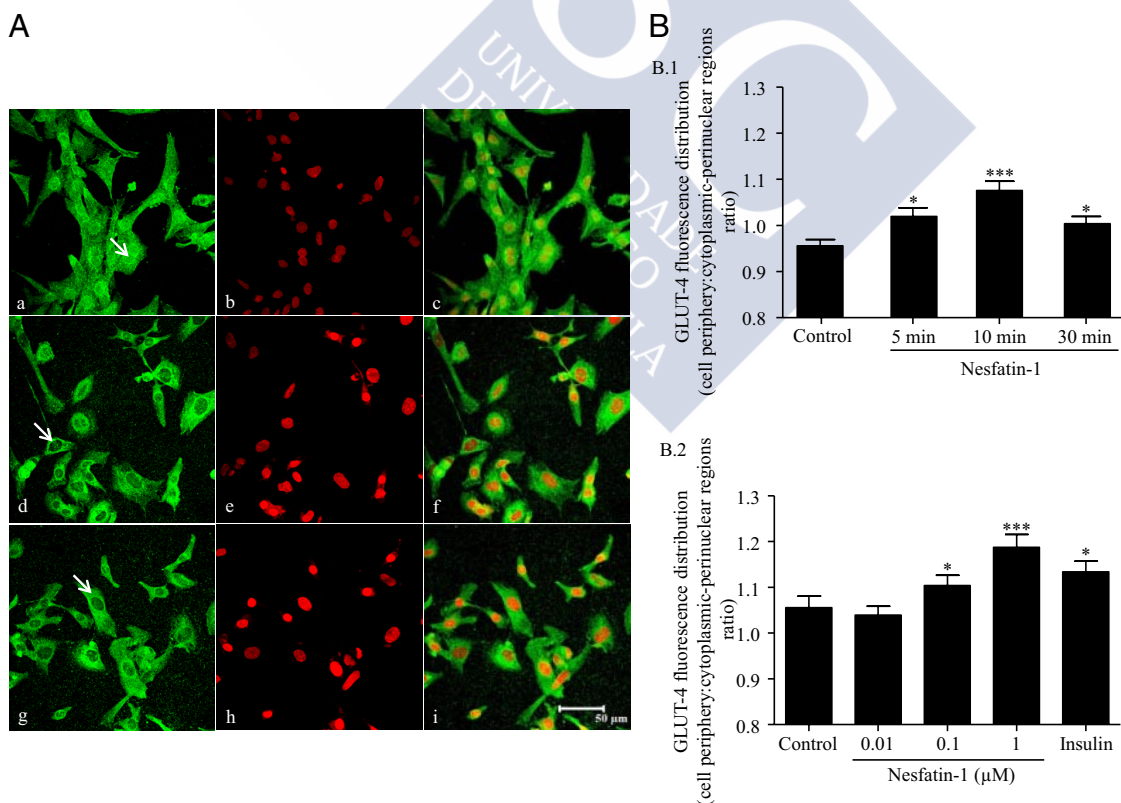


Figure 3. Translocation of glucose transporter GLUT-4 to the cell peripherals in response to nesfatin-1 treatment of neonatal rat cardiomyocytes. **Panel A.** Photomicrographs of untreated cells (a-c) and cells treated with 1 μM nesfatin-1 (d-f) or 100 nM insulin (g-i), showing anti-GLUT-4 stain (a,d,g), TO-PRO nuclear marker (b,e,h), and the corresponding merged images (c,f,i). Note the GLUT-4 redistribution from cytoplasmic-perinuclear area (arrowed) to cell peripherals in (d) and (g). Scale bar, 50 μm . **Panel B.** Ratio of GLUT-4 immunofluorescence in cell peripherals:cytoplasmic-perinuclear regions in experiments showing dependence on the duration (B.1) and intensity (B.2) of exposure to nesfatin-1 (means of > 70 cell peripherals: cytoplasmic-perinuclear regions pairs in each of 3 replicate experiments). Statistical significance: * $P < .05$; *** $P < .001$.

neonatal rat cardiomyocytes. Nesfatin-1 induced dose- and time-dependent increases in the phosphorylation of both AKT and ERK1/2 (Figure 5). In addition, the AKT substrate of 160 kDa (AS160) was also phosphorylated after nesfatin-1 treatments (Figure 5).

Response of rat cardiac nesfatin-1 levels to diet

High-fat diet increased nesfatin-1 mRNA /protein levels in rat atria but not in ventricular tissue (Figure 6. Panel A). Rat atrial NUCB2 mRNA and plasma NUCB2/nesfatin-1 levels were positively correlated with each other and with body fat as a percentage of body weight (Figure 6. Panel A.3). Gene expression levels of the predominant cardiac fatty acid transporter CD36 were similar in the hearts of rats fed with high-fat and standard diets, and we could not find any correlation between CD36 and nesfatin-1 cardiac gene expression levels or between CD30 gene expression and body weight or percentage of body fat (data not shown).

Influences on human cardiac nesfatin-1 levels

In the whole group of patients from whom atrial tissue was obtained, atrial NUCB2 mRNA levels were significantly higher in women without coronary injury (CI) than in those with CI or in men with or without CI (Figure 6. Panel B). No other demographic, anthropometric, biochemical or pharmacological parameters were observed to affect NUCB2 gene expression in cardiac atria.

Discussion

Adipokines have emerged as the nexus linking obesity, inflammation, metabolic syndrome and cardiovascular disease (37, 38). Nesfatin-1's ability to cross the blood-

brain barrier suggested the existence of peripheral sources, and expression of its proprotein NUCB2 was later observed in a number of extracerebral tissues (see Introduction). Hitherto there have been two reports of NUCB2 expression in cardiac tissue, both concerning rats (22, 25), but only Angelone et al (25) detected nesfatin-1 itself, as a band of approximately 9 kDa in western blots. In fact, this latter study, and that of Oh-I et al (1) concerning rat cerebrospinal fluid (CSF), have been the only occasions on which endogenous fully-processed mature nesfatin-1 has unequivocally been observed.

In this work we found that nesfatin-1 is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. Western blots showed the 9 kDa nesfatin-1 band in lysates of primary cultures devoid of the other cell types (fibroblasts, endothelial cells, erythrocytes, etc.,) that may be present in cardiac tissue extracts. Immunostains showed clear perinuclear location, very probably in the endoplasmic reticulum or in the Golgi apparatus, both of them typically located all around the nuclear envelope in cardiomyocytes (39, 40). Human atrial tissue was also immunoreactive for prohormone convertase 1/3, the enzyme catalyzing the cleavage of NUCB2 to yield nesfatin-1.

In culture media of neonatal rat cardiomyocytes the ELISA-measured NUCB2/nesfatin-1 concentration was in the same range to that detected in the culture media of adipose tissue explants (6).

Recent reports suggest that nesfatin-1 acts as a multifunctional metabolic hormone. In particular, there is considerable evidence of its being a glucose-dependent coadjuvant of insulin, since it has an antihyperglycaemic effect (18) and influences the excitability of glucosensing neurons in rat hypothalamus (20); being able to stimulate glucose-induced insulin release and insulin sensitivity in

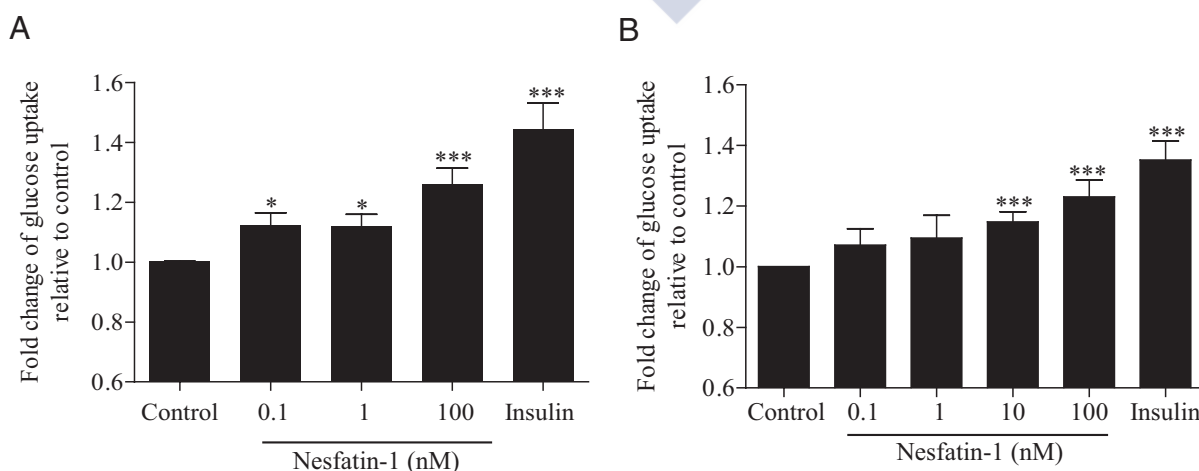


Figure 4. Uptake of 2-deoxy-D-[3 H]glucose by HL-1 (Panel A, $n=11$) and neonatal rat (Panel B, $n=8$) cardiomyocytes following 2.5 hours treatment with nesfatin-1 (0.1–100 nM) or 1 hour treatment with 100 nM insulin, relative to untreated controls. Statistical significance: *, $P < .05$; ***, $P < .001$.

rats and in mouse islet β -cells (13, 19, 41) and secretion of glucagon from mouse pancreatic islets (17). Moreover, the release of NUCB2/nesfatin-1 from rat pancreatic islets is stimulated by glucose (13), and plasma glucose and NUCB2/nesfatin-1 levels are negatively correlated in rats and in type 2 diabetes patients (5, 8, 16). However, ours is the first study of its direct effect on GLUT-4 (the main glucose transporter in the heart) translocation. We found

that in cultured cardiomyocytes nesfatin-1 alters the distribution of GLUT-4, favoring translocation from the cytoplasmic/perinuclear regions to cell peripherals to an extent similar to that induced by insulin, and thus appears to be directly involved in the regulation of cardiomyocyte glucose metabolism. Moreover, our results show that nesfatin-1 induces an increase in glucose uptake by HL-1 mouse cardiac cells and neonatal rat cardiomyocytes in

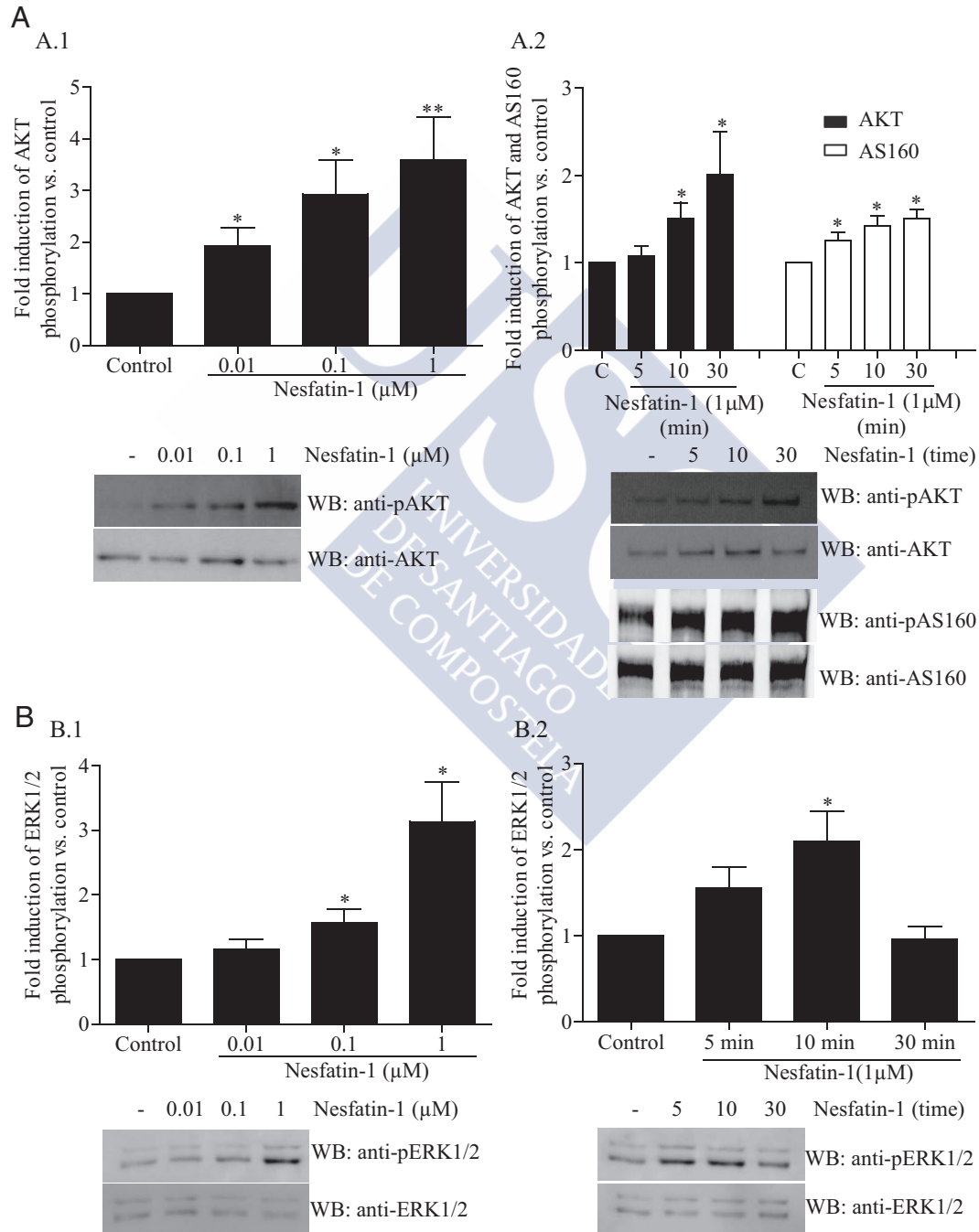


Figure 5. Western blots confirmed the activation of AKT, AS160 and ERK1/2 in nesfatin-1-treated neonatal rat cardiomyocytes. **Panel A.** (A.1): Dependence of AKT phosphorylation on nesfatin-1 dose ($n=8$). (A.2): Dependence of AKT ($n=8$) and AS160 ($n=6$) phosphorylation on treatment duration. **Panel B.** Dependence of ERK1/2 phosphorylation on nesfatin-1 dose ($n=7$) and on treatment duration ($n=6$). Statistical significance: $*P < .05$; $**P < .01$.

culture. A similar direct effect has only previously been observed in adipocytes from nesfatin-1-treated rats, in which both basal and insulin-induced glucose uptake were significantly increased (13). Note that the concentrations of nesfatin-1 in our experiments, as in several other recent studies of its cellular effects (17, 23, 42, 43), were orders of magnitude higher than the nanomolar concentrations found in human and murine plasma (6, 7, 16), suggesting that in vivo these effects might require a local nesfatin-1 source.

Nesfatin-1 induced dose- and time-dependent increases in the phosphorylation of AKT and ERK1/2, which are

both involved in promoting GLUT-4 translocation and glucose uptake in muscle and cardiac cells (35, 36). Our findings parallel observations that central nesfatin-1 administration in rats induces AKT activation in hypothalamic nuclei that mediate glucose homeostasis (19) and that ERK1/2 is activated by nesfatin-1 treatment in perfused rat hearts (25) (although without AKT activation).

Nesfatin-1 promotes in cardiomyocytes the phosphorylation of the AKT substrate AS160, the most distal insulin signaling protein that has been linked to GLUT-4 translocation (44). To note, ours are the first results showing that nesfatin-1 can induce the phosphorylation of AS160,

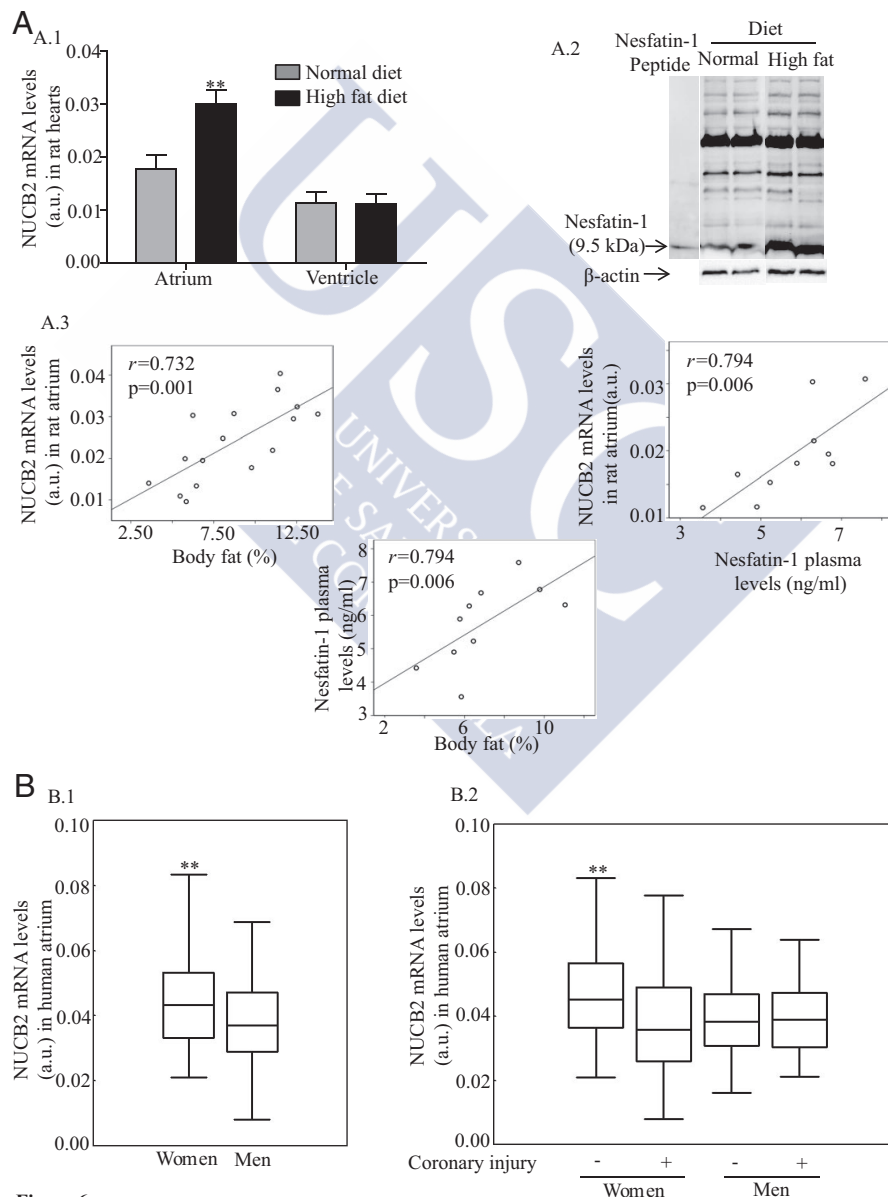


Figure 6

Figure 6. Influence of diet, sex and coronary injury on cardiac nesfatin-1 levels. **Panel A.** In rat atrium, high-fat diet increased NUCB2 gene expression ($n=8$; Panel A.1) and nesfatin-1 levels (Panel A.2). Panel A.3: Rat atrial NUCB2 mRNA levels correlated positively with body fat as a percentage of bodyweight ($n=16$), and plasma nesfatin-1 levels ($n=10$), which last themselves correlated positively body fat ($n=10$). **Panel B:** Atrial NUCB2 mRNA levels (median, [interquartile range]) were higher in women ($n=90$) than in men ($n=178$), but lower in women with coronary injury ($n=27$) than in women without ($n=62$). Statistical significance: ** $P < .01$.

and this could indeed help to clarify the physiological/pathophysiological roles of nesfatin-1 in glucose and energy metabolism suggested previously by others (45). Under basal conditions, the Rab GTPase activating protein domain of AS160 stimulates hydrolysis of Rab-associated GTP and the formation of the inactive GDP-bound Rab, which restrains GLUT-4 exocytosis; however, insulin-stimulated phosphorylation of AS160 by AKT relieves this restraint by leading to an increase in the GTP-bound Rab which, in turn, favors greater GLUT-4 exocytosis to cell-surface membranes (44, 46). AS160 is considered to be a point of convergence for coordinating physiological regulation of GLUT-4 membrane recruitment in cardiomyocytes (47).

In rodents, synthesis of nesfatin-1 (or at least NUCB2) appears to respond to diet or nutritional status both centrally, in the hypothalamic paraventricular nucleus (1, 48), and in peripheral tissues such as the stomach (49), adipose tissue (6) and heart (this work), where it may help control energy expenditure and may respond to developmental and hormonal signals as well as to metabolic status. The finding that cardiac and plasma NUCB2/nesfatin-1 levels are positively correlated, and that both correlate with body fat, is in keeping with a report that plasma NUCB2 concentrations are higher in mice with diet-induced obesity than in nonobese mice (6).

Obesity imposes a metabolic stress to the heart which may ultimately lead to cardiac metabolic inflexibility and lipotoxicity, being the fatty acid transporter CD36 the responsible of the chronic increasing uptake of fatty acids by the cardiac muscle under those circumstances (36). In this work, high-fat diet did not induce changes in cardiac CD36 gene expression, and there was no correlation between cardiac CD36 and nesfatin-1 levels; however, we can not exclude that nesfatin-1 could affect the surface presence of CD36 and its translocation from intracellular storage compartments, and future experiments should clarify a possible involvement of this peptide in the complex interplay between signaling pathways and trafficking components known to be involved in the regulation of GLUT-4 and CD36 translocation (36).

Only two previous studies have investigated NUCB2/nesfatin-1 regulation in human cells or tissues. Yamada et al (50) found that troglitazone stabilizes NUCB2 mRNA through ERK1/2 activation in a human medulloblastoma cell line, and Riva et al (17) that NUCB2 deficiency in the pancreatic islets of type 2 diabetes patients can be remedied by culture in glucolipotoxic conditions. In the present study atrial NUCB2 mRNA levels were significantly higher in women without coronary lesions than in other patients, suggesting a sex-dependent relationship between cardiac nesfatin-1 levels and cardiovascular disease.

In conclusion, nesfatin-1 is synthesized, and helps to regulate glucose metabolism, in the hearts of humans and experimental animals, where its levels vary with diet and ischemic cardiomyopathy.

Acknowledgments

We thank Patricia Viaño for expert technical assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: [¶]CORRESPONDENCE: Dr Francisca Lago, Laboratorio 7, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela (IDIS), Hospital Clínico Universitario, Travesía Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain., Tel: + 34 981 950 902 Fax: +34 981 950 905 Email: Francisca.Lago.Paz@sergas.es.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

This work was supported by: This work was funded by the Health Research Fund of the Carlos III Health Institute (FIS11/00497) and the Spanish Society of Cardiology; VG-R is funded by the University Professional Development Program (FPU) of the Spanish Ministry of Education; MFO by the Rio Hortega Program of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness; DR-P by the International PhD School, USC; SF-B and AM-L by the IDICHUS Research Foundation of USC Clinical Hospital; and LMS, OG and FL by SERGAS.

References

- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006;443:709–712.
- Yosten GLC, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1642–R1647.
- García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/Nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol*. 2010;45:281–290.
- Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434:434–438.
- Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrients-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul Pept*. 2010;159:72–77.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*. 2010;151:3169–3180.
- Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, OH-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73:484–490.
- Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased plasma

- levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012;120:91–95.
9. Basar O, Akbal E, Köklü S, Koçak E, Tuna Y, Ekiz F, Gültuna S, Yılmaz FM, Aydoğan T. A novel appetite peptide, nesfatin-1 in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72:479–483.
 10. Shimizu H, OH-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 2009;150:662–671.
 11. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, OH-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab*. 2009;10:355–365.
 12. Stengel A, Goebel M, Taché Y. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. *Obes Rev*. 2011;12:261–271.
 13. Gonzalez R, Perry RL, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Ceddia RB, Unniappan S. Nutrient responsive nesfatin-1 regulates energy balance and induces glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Endocrinology*. 2011;152:3628–3637.
 14. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, Tóth ZE. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36:1514–1521.
 15. Miyata S, Yamada N, Kawada T. Possible involvement of hypothalamic nucleobindin-2 in hyperphagic feeding in Tsumura Suzuki Obese Diabetes Mice. *Biol Pharm Bull*. 2012;35:1784–1793.
 16. Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol*. 2010;204:255–263.
 17. Riva M, Nitert MD, Voss U, Sathanoori R, Lindqvist A, Ling C, Wierup N. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res*. 2011;346:393–405.
 18. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1039–1042.
 19. Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, Li L, Yang G. Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2012;61:1959–1968.
 20. Chen X, Dong J, Jiang ZY. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Pept*. 2012;177:21–26.
 21. Stengel A, Goebel-Stengel M, Jawien J, Kobelt P, Taché Y, Lambrecht NW. Lipopolysaccharide increases gastric and circulating NUCB2/nesfatin-1 concentrations in rats. *Peptides*. 2011;32:1942–1947.
 22. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*. 2009;150:232–238.
 23. García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Vazquez MJ, Sangiao-Alvarellos S, Romero-Ruiz A, Pinilla L, Diéguez C, Gaytán F, Tena-Sempere M. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology*. 2012;153:1959–1971.
 24. Osaki A, Shimizu H, Ishizuka N, Suzuki Y, Mori M, Inoue S. Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. *Neurosci Lett*. 2012;521:46–51.
 25. Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, Quintieri AM, Cerra MC. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:495–509.
 26. Yosten GLC, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in the brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:R330–R336.
 27. Yamawaki H, Takahashi M, Mukohda M, Morita T, Okada M, Hara Y. A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418:676–681.
 28. Mímee A, Smith PM, Ferguson AV. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302:R1297–R1304.
 29. García-Rúa V, Otero MF, Lear PV, Rodríguez-Penas D, Feijóo-Bandín S, Noguera-Moreno T, Calaza M, Álvarez-Barredo M, Mosquera-Leal A, Parrington J, Brugada J, Portolés M, Rivera M, González-Juanatey JR, Lago F. Increased expression of fatty-acid and calcium metabolism genes in failing human heart. *PLoS One*. 2012;7:e37505.
 30. González-Juanatey JR, Iglesias MJ, Alcaide C, Piñeiro R, Lago F. Doxazosin induces apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro by a mechanism that is independent of alpha1-adrenergic blockade. *Circulation*. 2003;107:127–131.
 31. Lear PV, Iglesias MJ, Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, Mosquera-Leal A, García-Rúa V, Gualillo O, Ghè C, Arnoletti E, Muccioli G, Diéguez C, González-Juanatey JR, Lago F. Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology*. 2010;151:3286–3298.
 32. Slot JW, Garruti G, Martin S, Oorschot V, Posthuma G, Kraegen EW, Laybutt R, Thibault G, James DE. Glucose transporter (GLUT-4) is targeted to secretory granules in rat atrial cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 1997;137:1243–1254.
 33. Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulated Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res*. 2010;86:410–420.
 34. Waller AP, George M, Kalyanasundaram A, Kang C, Periasamy M, Hu K, Lacombe VA. GLUT12 functions as a basal and insulin-independent glucose transporter in the heart. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:121–127.
 35. Pu J, Peng G, Li L, Na H, Liu Y, Liu P. Palmitic acid acutely stimulates glucose uptake via activation of Akt and ERK1/2 in skeletal muscle cells. *J Lipid Res*. 2011;52:1319–1327.
 36. Steinbusch LK, Schwenk RW, Ouwens DM, Diamant M, Glatz JF, Luiken JJ. Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:2525–2538.
 37. Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3:716–724.
 38. Turer AT, Hill JA, Elmquist JK, Scherer PE. Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ Res*. 2012;111:1565–1577.
 39. Kronebusch PJ, Singer SJ. The microtubule-organizing complex and the Golgi apparatus are co-localized around the entire nuclear envelope of interphase cardiac myocytes. *J Cell Sci*. 1987;88:25–37.
 40. McFarland TP, Milstein ML, Cala SE. Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:556–564.
 41. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca(2+) influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr J*. 2011;58:305–313.
 42. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ.

- Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*. 2007;148:5088–5094.
43. Tagaya Y, Osaki A, Miura A, Okada S, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Shimizu H, Mori M. Secreted nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Protein Pept Lett*. 2012; 19:997–1004.
 44. Cartee GD, Wojtaszewski FP. Role of AKT substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32:557–566.
 45. Nakata M, Yada T 2013 Role of NUCB2/Nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr Pharm Des* (in press).
 46. Bruss MD, Arias EB, Lienhard GE, Cartee GD. Increased phosphorylation of AKT substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes*. 2005; 54:41–50.
 47. Samovski D, Su X, Xu Y, Abumrad NA, Stahl PD. Insulin and AMPK regulate FA translocase/CD36 plasma membrane recruitment in cardiomyocytes via Rab GAP AS160 and Rab8a Rab GT-Pase. *J Lipid Res*. 2012;53:709–717.
 48. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus co-express oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology*. 2008;149:1295–1301.
 49. Li Z, Xu G, Li Y, Zhao J, Mulholland MW, Zhang W. mTOR-dependent modulation of gastric nesfatin-1/NUCB2. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29:493–500.
 50. Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology*. 2010;151:2494–2503.









