



TESE DE DOUTORAMENTO

PAPEL DE LA ENDOGLINA Y DEL SISTEMA CENTRAL GLP-1 EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.

Asdo:.....

Daniel Beiroa Tarrío

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

Santiago de Compostela 2014.





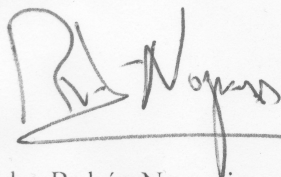
Dr. Rubén Nogueiras Pozo Profesor Titular en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dr. Carlos Diéguez González Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Dra. Sulay Amparo Tovar Carro Investigador Contratado en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Certifican que la tesis: " Papel de la Endoglina y del sistema central GLP-1 en la homeostasis energética" elaborada por Daniel Beiroa Tarrío ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia "Ramón Domínguez" del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela y en el Centro de Investigaciones e Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la UCS (CIMUS), estimando que los objetivos del Plan de Investigación así como las actividades formativas necesarias han sido cumplidos, consideran la tesis concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

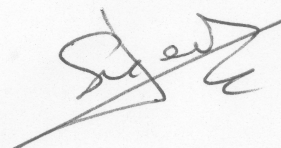
Y para que así conste firmamos la presente autorización.



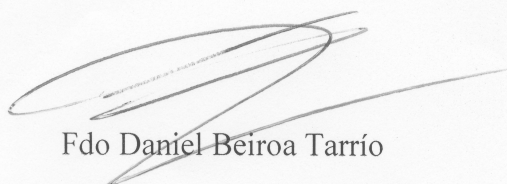
Fdo: Rubén Nogueiras Pozo



Fdo: Carlos Diéguez González



Fdo: Sulay A. Tovar Carro



Fdo Daniel Beiroa Tarrío

15 de Septiembre en Santiago de Compostela 2014



ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN	15
OBESIDAD: LÍNEAS GENERALES.....	15
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	18
<i>Hipotálamo</i>	18
Núcleo Arcuato (ARC).....	19
NPY	19
AgRP.....	20
POMC- Sistema Melanocortinas.....	20
CART.....	20
Núcleo Dorsomedial (DMH).....	22
Núcleo Paraventricular (PVH).....	22
Hipotálamo Lateral (LH)	22
Orexinas (OXs)	22
MCH	23
Núcleo VMH.....	25
TEJIDO ADIPOSO BLANCO.....	25
<i>Leptina</i>	26
<i>Resistina</i>	27
<i>Adiponectina</i>	28
<i>Interleukina 6</i>	28
<i>TNFα</i>	28
SEÑALES GASTROINTESTINALES CON ACCIONES METABÓLICAS.....	29
<i>Insulina</i>	29
<i>Ghrelin</i>	30
INTESTINO DELGADO	32
<i>Colecistoquinina</i>	32
<i>GIP</i>	32
<i>GLP-1</i>	33
Acciones sobre la secreción de insulina.....	34
Acciones en el sistema nervioso central.....	35
Efectos termogénicos.....	36
Análogos de GLP-1.....	36
OTROS REGULADORES DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	37
ENDOGLINA.....	37
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	43
CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV).....	45
IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS.....	46
ADMINISTRACIÓN EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS.....	46
TEST DE AVERSIÓN CONDICIONADA AL SABOR.....	47
<i>Metodología Experimental:</i>	47
TEST DE EXPOSICIÓN A FRÍO.....	48
TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y A LA INSULINA (GTT E ITT)	48
FENOTIPADO METABÓLICO.....	48
PERFUSIÓN INTRACARDÍACA.....	48
INCLUSIÓN EN PARAFINA.....	49
TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA	49
MEDIDA DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.....	49

WESTERN BLOT (WB):.....	50
<i>Extracción de proteínas totales:</i>	50
<i>Electroforesis y Transferencia</i>	50
<i>Inmunodetección</i>	50
<i>Disoluciones Western Blot</i>	51
PCR EN TIEMPO REAL (REAL TIME PCR).....	52
<i>Extracción de RNA total</i>	53
<i>Retrotranscripción</i>	53
<i>PCR Tiempo Real (TAQMAN)</i>	54
<i>Disoluciones Real Time PCR:</i>	55
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	56
SELECCIÓN DE PACIENTES.....	57
ANTROPOMETRÍA.....	57
CALORIMETRÍA INDIRECTA.....	58
DETERMINACIONES SANGUÍNEAS.....	60
TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	60
RESULTADOS	61
BLOQUE I. EFECTO DE LA HAPLODEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	61
<i>Los ratones heterocigotos para endoglina alimentados con dieta estándar no presentan alteraciones metabólicas.</i>	61
<i>Homeostasis de la glucosa.</i>	63
<i>Los ratones heterocigotos para endoglina alimentados con dieta alta en grasa presentan una composición corporal y un fenotipo metabólico normal.</i>	64
<i>Homeostasis de la glucosa en animales alimentados con dieta alta en grasa.</i>	67
<i>Efectos moleculares en la vía de la insulina.</i>	68
BLOQUE II. EFECTO ANIVEL DEL SISTEMA CENTRAL DE GLP-1 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGETICA Y ADIPOSIDAD.....	72
<i>Estudio dosis- respuesta de liraglutide en ratas.</i>	72
<i>Estudio dosis- respuesta en ratón.</i>	74
<i>Estimulación del receptor de GLP-1 a nivel central con GLP-1 y Liraglutide.</i>	75
<i>Test de aversión condicionada al sabor</i>	75
<i>Fenotipado metabólico.</i>	76
<i>Efectos de la estimulación del receptor de glp-1 sobre el tejido adiposo marrón.</i>	79
<i>Efectos de la estimulación del receptor de glp-1 en el tejido adiposo blanco.</i>	82
<i>Efectos de la estimulación central del receptor de glp-1 sobre el hígado</i>	84
<i>La estimulación del receptor de glp-1 a nivel hipotalámico regula la actividad termogénica.</i>	85
<i>Ampk es esencial para las acciones de liraglutide en bat y wat.</i>	95
<i>Efectos de liraglutide en modelos animales de obesidad inducida por dieta.</i>	100
<i>Efectos de la administración de liraglutide de forma crónica.</i>	104
<i>Los análogos de glp-1 incrementan el gasto energético en pacientes obesos con diabetes de tipo 2.</i>	105
DISCUSIÓN	108
BLOQUE I. EFECTO DE LA HAPLODEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	108
BLOQUE II. EFECTO ANIVEL DEL SISTEMA CENTRAL DE GLP-1 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGETICA Y ADIPOSIDAD.....	110
CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	118
AGRADECIMIENTOS	138

ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA Carboxilasa
ACTH	Adrenocorticotropina
ADIPO-R	Receptor de Adiponectina
ADR β	Adreno Receptores β
AgRP	Proteína Relacionada con Agoutí
AICAR	5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide
AKT	Proteín Quinasa B
ALK	Kinasa de Linfoma Anaplásico
AMPK	Proteín Quinasa Activada por AMP.
AMPK-CA	Proteín Quinasa Activada por AMP Constitutivamente Activa
ARC	Núcleo Arcuato
AUC	Área Bajo la Curva
BAT	Tejido Adiposo Pardo
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
BMP7	Proteínas Morfogénica Ósea
BTG2	Gen Translocador de la Célula β
CART	Tráncrito Regulado por Anfetamina y Cocaína
CB	Receptor Canabinoide Tipo 1
CCK	Colecistoquinina
CEBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CG-1	Transportador mitocondrial de glutamato GC-1
CIDEA	Cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A
CPT1	Carnitina Palmitoiltransferasa 1
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina

CRH-R1	Receptor de la Hormona Liberadora de Corticotropina Tipo 1
DMH	Hipotálamo Dorsomedial
DPP-IV	Dipeptidil Peptidasa IV
EE	Gasto Energético
Eng	Endoglina
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
Epac2	Rap guanine nucleotide exchange factor
ERK	Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares
EX4	Exendina 4
FAPT1	Proteína Transportadora de Ácidos Grasos
FAS	Ácido Graso Sintasa
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FOXO1	Forkhead Box O1
FRET	Transferencia de Energía Fluorescente Mediante Resonancia
G6Pase	Glucosa 6 Fosfatasa
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GH	Hormona de Crecimiento
GHS-R	Receptor del Secretagogo de la Hormona de Crecimiento
GIP	Polipéptido Inhibidor Gástrico
GLP-1	Péptido Similar al Glucagón 1
GLP-1R	Receptor de GLP-1
GLUT4	Transportador de Glucosa 4
GPRR	Polipéptido Pancreático Emparentado con Glicentin
GTT	Test de Tolerancia a la Glucosa
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada 1Ac
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HFD	Dieta Alta en Grasas
HHT	Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

HMW	High Molecular Weight
HSP90	Proteína de Shock Térmico 90
ICV	Intracerebro Ventricular
IL-6	Interleukina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
INSIG2	Gen Inducido por Insulina
IP	Intraperitoneal
IP-1	Péptido Interviniente 1
IR	Receptor de Insulina
ITT	Test de Tolerancia a la Insulina
JAK2	Kinasa de Janus 2
LA	Actividad Locomotora
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LEPRb	Forma Larga del Receptor de Leptina
LH	Hipotálamo Lateral
LMW	Low Molecular Weight
LPL	Lipoprotein Lipasa
MAPK	Quinasa Activado por Mitógeno
MCH	Hormona Concentradora de Melanina
MCR4	Receptor de Melacortina 4
MNC	Células Mononucleares
MPGF	Fragmento Mayor del Glucagón
NAc	Núcleo Acumbens
NEFAS	Ácidos Grasos Libres No Esterificados
NFk β	Factor Nuclear Kappa-Beta
NOR1	Receptor Huérfano Derivado de Neuronas
NPk	Proteín Kinasa Nuclear
NPY	Neuropéptido Y

OMS	Organización Mundial de Salud
OXs	Orexinas
pAKT	Proteín Quinasa B Fosforilada
PC	Convertasa de Proteínas
Pdx1	Caja Homeótica Pancreática y Duodenal
PEPCK	Fosfenol Piruvato Carboxiquinasa
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
PGC1 α	Coactivador Tipo 1 del Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas
PI3k	Fosfoinositol 3-Quinasa
PiC	Transportador Mitocondrial de Fosfatos
PKA	Proteín Quinasa A
POMC	Proopiomelancortina
PPAR γ	Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas
PTEN	Homologo de Fosfatasa y Tensina
PVH	Hipotálamo Paraventricular
REE	Gasto Energético en Reposo
REMLs	Moléculas Similares a la Resistina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RQ	Cociente Respiratorio
RT	Reverso Transcripción
SAD-A	Synapses of amphids defective kinase-A
SD	Dieta Estándar
SDF-1 α	Factor Derivado de las Células Estromales
SH2B1	Proteínas adaptadora de SH2B
Sirt1	Sirtuina 1
SLC	Proteínas Transportadoras de Solutos
Smad2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
SOCS3	Supresor de la Señalización de Cytokinas 3

SPH2	Fosfatasa de Tiroxina 2
SREBP1	Proteína de Unión a Elementos Regulados por Esterol
STAT	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
TG	Triglicéridos
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante β
TKO	Triple Knockout
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRH	Hormona Liberadora de Tirotrópica.
TRKB	Receptor de los Factores de Crecimiento BDNF/NT-3
UCP1	Proteína Desacopladora 1
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vasculor
VMH	Hipotálamo Ventromedial
VSMC	Células de Músculo Liso Vasculor
VTA	Área Ventral Tegmental
WAT	Tejido Adiposo Blanco
WT	Fenotipo Salvaje
α MSH	Hormona Estimulante de Melanocitos



INTRODUCCIÓN

OBESIDAD: LÍNEAS GENERALES.

La OMS (organización mundial de la salud) define la obesidad como la acumulación excesiva o anormal de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud. La identificación de la obesidad se mide mediante el Índice de Masa Corporal, (IMC) que es la relación existente entre el peso expresado en kilogramos y la altura expresada en metros cuadrados.

Durante el desarrollo evolutivo del Homo sapiens la selección natural ha premiado la capacidad para almacenar la energía en forma de grasas, permite aprovechar al máximo los recursos disponibles. Pero lo que antaño supuso una ventaja muy importante para la supervivencia, actualmente, en gran parte de los países no lo es, ya que los humanos se encuentran en un ambiente en el que no existe una limitación en el acceso a los nutrientes, lo que unido a un cambio en los hábitos de vida de la población, están provocando un incremento muy acusado en los casos de obesidad y sobrepeso(1).

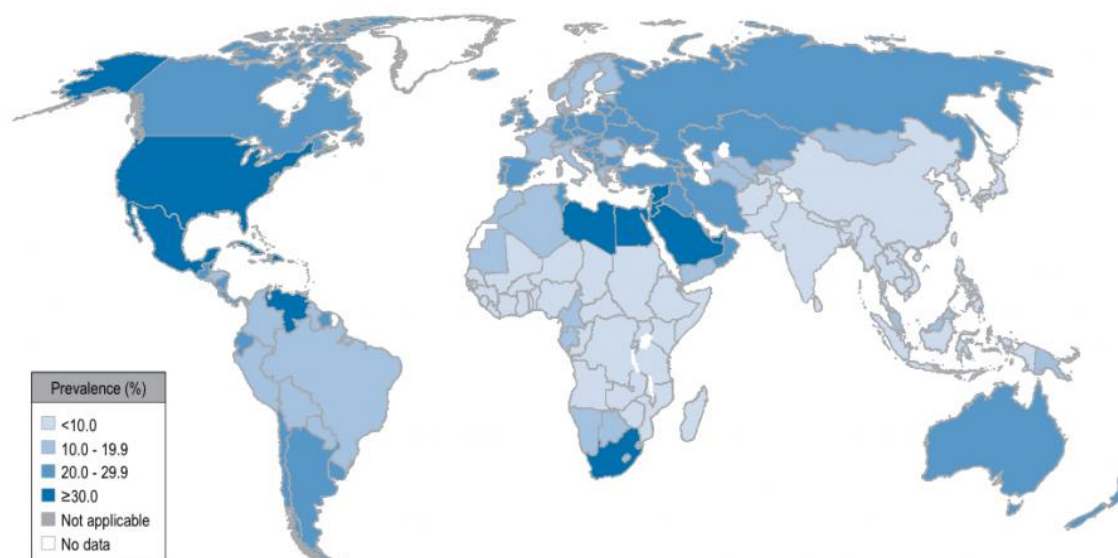


Figura1: Mapa mundial de la obesidad.

El principal problema que presenta el incremento en los casos de obesidad es que va pareja a procesos de daños vasculares (tanto cerebrales como cardíacos), diabetes tipo II, problemas respiratorios, alteraciones en el aparato locomotor (osteoartritis especialmente) e incluso ciertos tipos de cáncer(2).

El concepto de balance energético es fundamental para comprender el proceso de acúmulo de grasa en el organismo. El balance energético es la relación entre la energía que capta el organismo y la energía consumida así la energía que entra en el organismo es obtenida del procesado de los alimentos ingeridos,

por lo que tanto la cantidad de alimento ingerido como el gasto energético van a ser dos aspectos fundamentales para el balance energético.

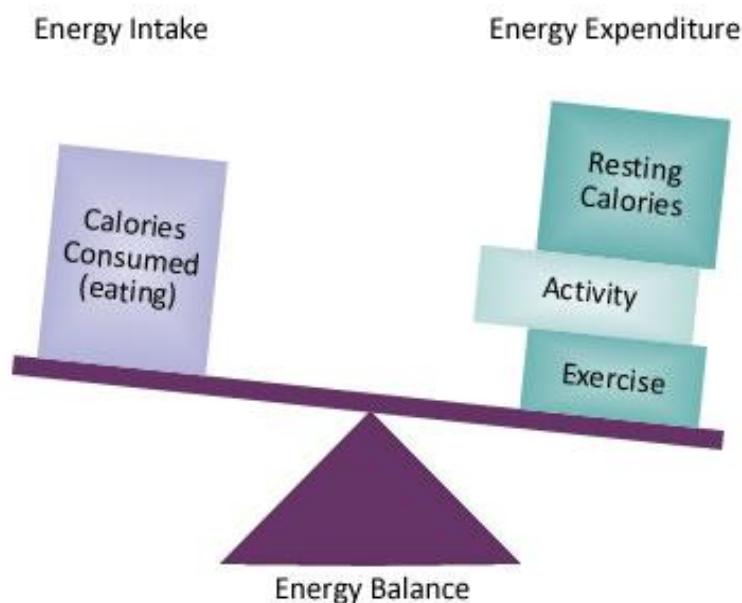


Figura2: Balance energético.

Cuando el balance energético es positivo la energía sobrante se almacena en el tejido adiposo blanco (WAT). Dicho tejido está formado principalmente por adipocitos que se caracterizan por ser células redondeadas de gran diámetro que presentan una gran gota lipídica conformada mayoritariamente por triglicéridos que ocupa la mayor parte del citoplasma relegando al resto de orgánulos y al núcleo a la periferia de la célula. Como se ha comentado anteriormente la función principal del tejido adiposo blanco es el almacenaje de energía si bien también presenta la capacidad de secretar una serie de moléculas conocidas como adipocinas que intervienen en la regulación del balance energético.

En el caso de que el gasto energético supere al aporte energético procedente de los alimentos se considera un estado de balance energético negativo. El gasto energético puede ser llevado a cabo mediante tres vías:

Ejercicio físico: produce un consumo de energía mediante el uso de los nutrientes en los músculos del organismo. La cantidad de energía gastada mediante esta vía va a depender en gran medida de los hábitos de vida de cada individuo.

Metabolismo basal: se define como la cantidad mínima de energía necesaria para que el organismo pueda llevar a cabo las funciones metabólicas básicas. El gasto energético asociado al metabolismo basal va a depender de varios factores como pueden ser altura, sexo, masa muscular, etc.

Termogénesis: se define como la capacidad de generar calor mediante reacciones metabólicas. Este fenómeno es muy importante ya que ayuda a mantener la homeostasis térmica que permite que las reacciones fisiológicas ocurran de la forma correcta. El principal tejido implicado en este proceso es el

tejido adiposo pardo (BAT) lo que lo sitúa en un lugar privilegiado en la regulación del balance energético.

Tejido adiposo pardo

El BAT está formado por adipocitos pardos que se caracterizan fundamentalmente porque su citoplasma presenta un número elevado de gotas lipídicas así como una gran cantidad de mitocondrias que son las responsables del color característico de este tejido.

Los primeros estudios sobre este tejido central en el metabolismo datan de finales de la década de los años 70, en ellos se establece que el BAT está inervado por el sistema nervioso simpático y que su actividad va a variar tanto con la dieta como por la exposición a frío. La producción de calor va a ocurrir a través de la proteína desacopladora UCP1(3, 4), que produce una vía alternativa en la cadena de transporte de electrones consistente en ciclos fútiles en los que se produce el gasto de energía con el único objetivo de generar calor.

En la concepción clásica, este tipo de tejido se encuentra en neonatos pero con el paso del tiempo va a ir involucionando, siendo inactivo o inexistente en humanos adultos al contrario de lo que ocurre en roedores donde el tejido si permanece funcional en la edad adulta, si bien recientemente mediante el uso de técnicas de imagen como el PET (Positron Emission Tomography) junto a estudios de histología, han permitido identificar tejido adiposo pardo funcional en individuos adultos sanos que sufrieron una exposición moderada a frío(5).

A lo largo de los años 80 fueron descritos los receptores β -adrenérgicos los cuales van a ser estimulados por la liberación de noradrenalina liberada por los extremos de las fibras pertenecientes al sistema nervioso simpático. Se conocen tres tipos de poblaciones de receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 y β_3) que están presentes en el tejido adiposo pardo y en el tejido adiposo blanco, tanto en humanos como en roedores, la activación del receptor β_3 produce un incremento de la lipólisis así como la producción de calor mediante el ciclo alternativo de la cadena de transporte de electrones (6).

Asociados a estos descubrimientos, se encontró que en el tejido adiposo blanco de aquellos individuos que fueron tratados con agonistas del receptor β_3 -adrenérgico aparecían células con una morfología similar a las del tejido adiposo pardo (fueron nombrados como adipocitos beige)(7). La utilización de ratones genéticamente modificados ha permitido determinar que la homeostasis térmica no solo va a estar regulada mediante los cambios en el tejido adiposo pardo en parches anatómicamente localizados sino que los adipocitos beige presentarían un rol central en el proceso(8).

Se ha postulado que los dos tipos de adipocitos con relevancia en el proceso termogénico tendrían precursores celulares distintos; así los adipocitos pardos procederían de precursores mesenquimales iguales a los de las células miogénicas (cardíacas y musculares) mientras que los adipocitos beige tendrán su origen en precursores comunes a los de los adipocitos blancos, por lo que la diferenciación a adipocitos beige es una diana terapéutica de gran interés en la actualidad(9).

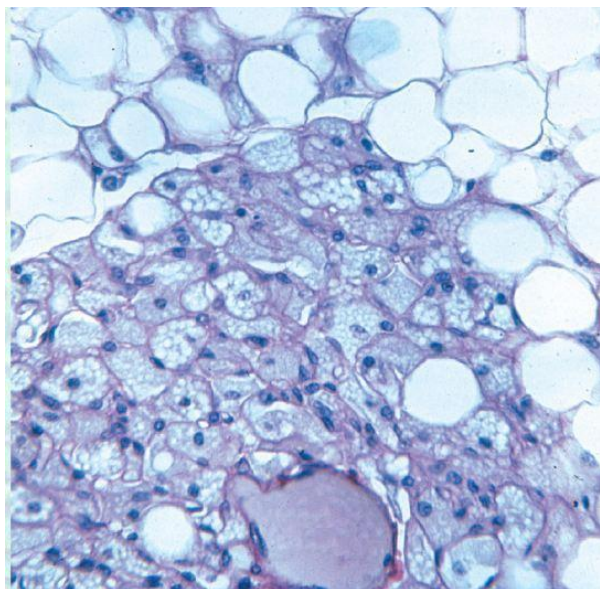


Figura3: Histología de tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo.

Así la regulación del balance energético es un proceso altamente complejo en el que intervienen tanto señales fisiológicas como de comportamiento además de un gran número de tejidos. Todas estas señales se van a integrar tanto a nivel del sistema nervioso central como en sistemas periféricos.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.

El interés por entender el papel del cerebro en la regulación del balance energético corporal empezó en la década de los 50 cuando se observó que pacientes con adenomas hipofisarios presentaban un rápido y significativo aumento de peso. Años después, y a través de distintos experimentos con ratas en los que mediante lesiones o bloqueos farmacológicos se estableció la teoría del “modelo de doble centro” en la que se postulaba la existencia de dos centros hipotalámicos implicados en la regulación del peso corporal: el denominado centro de saciedad llamado hipotálamo ventromedial (VMH) y centro del hambre nombrado como área hipotalámica lateral (LH) (10).

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

Hipotálamo

Dentro del cerebro, el hipotálamo es una región fundamental en la regulación de la ingesta ya que regula las señales periféricas. Dentro del hipotálamo se diferencian distintos núcleos neuronales, el núcleo arcuato (ARC) hipotálamo paraventricular (PVH), dorsomedial (DMH), lateral (LH) y ventromedial (VMH) implicadas en la regulación de la ingesta.

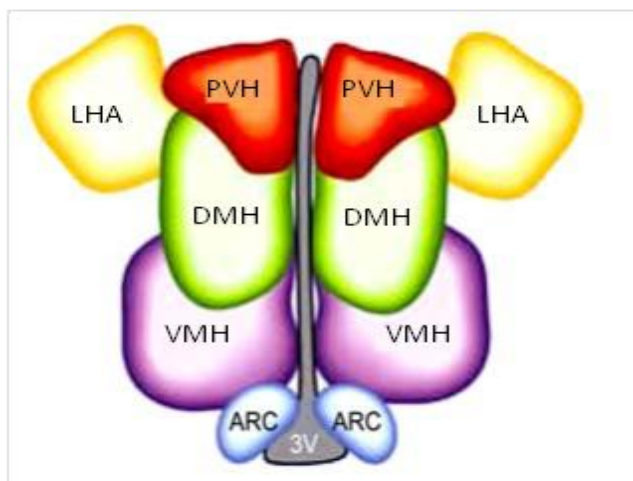


Figura4: Esquema de los núcleos hipotálamicos más relevantes en la regulación de metabolismo energético. (11)

Núcleo Arcuato (ARC)

Está considerado el principal núcleo regulador de la ingesta por las siguientes razones: Está situado en la parte más basal del hipotálamo, justo encima de la eminencia media. En esta zona casi no existe barrera hematoencefálica permitiendo el paso de numerosas sustancias circulantes en sangre hacia el cerebro, pudiendo así responder rápidamente a fluctuaciones en nutrientes y hormonas.

Los grupos neuronales que lo componen están muy inervados por axones desde distintas zonas del cerebro y presentan receptores para muchas hormonas, reflejando así la existencia de una alta regulación.

En él se diferencian dos grupos de neuronas (NPY/AgRP y POMC/CART) que están próximos e interconectados, que reciben señales del estado nutricional y producen neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos respectivamente, constituyendo el primer orden de neuronas implicadas en la regulación de la ingesta(12).

NPY

Es un neuropéptido secretado por las neuronas NPY del ARC, que emiten proyecciones hacia otros núcleos neuronales (PVH, DMH y LH). La administración de NPY en ratas, tanto intracerebroventricular como en diferentes núcleos hipotálamicos (VMH, PVH y LH) estimula la ingesta y disminuye el gasto energético(13). Además, activa enzimas lipogénicas en el hígado y tejido adiposo blanco.

Los niveles de mRNA de NPY en el ARC, así como el péptido NPY, aumentan de forma significativa durante el ayuno y disminuyen después de este. (14) A pesar de que NPY es una señal orexigénica, el ratón deficiente en NPY, presenta un fenotipo normal, con una pequeña disminución en la ingesta provocada por ayuno. Esto puede ser debido a un mecanismo compensatorio generado por otros neuropéptidos como por ejemplo AgRP (15). NPY se une a los receptores YR. Se han descrito 6, de los cuales Y1R-Y5R se encuentran en rata, mientras que Y6R se ha descrito en ratón(16). Debido a la capacidad de NPY de unirse a distintos receptores hace pensar que el efecto orexigénico del neuropéptido pueda ser debido a una acción conjunta de los distintos receptores siendo los receptores Y1R e Y5R los principales responsables de mediar el efecto de NPY. El ratón deficiente Y1R es obeso

(17), el bloqueo de Y5R inhibe la ingesta (18) y el ratón deficiente en YR5 tiene atenuada la respuesta a NPY(19).

AgRP

AgRP (Péptido relacionado con Agutí) es un neuropéptido de 132 aminoácidos que se expresa en el núcleo arcuato del hipotálamo y además en humanos también se expresa en el tejido adiposo(20). Coexpresa con NPY y las neuronas AgRP proyectan a varios núcleos hipotalámicos, tales como PVH y DMH y a regiones extrahipotalámicas(21).

La leptina inhibe la liberación de AgRP, al igual que NPY, la expresión de AgRP está regulada por la deficiencia de leptina causada por ayuno o mutación (22) además es un potente y selectivo antagonista de los receptores de melanocortinas implicados en el control del balance energético(23). La inhibición de estos receptores conlleva un fenotipo obeso que está asociado con hiperfagia, disminución de la termogénesis y de la eficiencia calórica. A diferencia de NPY, la administración de AgRP de manera crónica en roedores causa una sostenida hiperfagia que lleva a obesidad (24, 25).

POMC- Sistema Melanocortinas

La proopiomelanocortina (POMC) es un polipéptido de gran tamaño que se expresa en neuronas del núcleo arcuato, es el precursor de una serie de proteínas como la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) y la adrenocorticotropina (ACTH). Los niveles de expresión de POMC reflejan el estado energético del organismo ya que disminuyen con el ayuno y aumentan tras la administración de leptina o después de 6h tras la realimentación(26). Tanto mutaciones en el gen POMC como anomalías en su procesamiento dan lugar a obesidad temprana (27). Dentro de las melanocortinas, la más implicada en la regulación de la ingesta y el peso corporal es α -MSH (hormona estimulante de melanocitos), que ejerce su efecto mediante la unión con los receptores de melanocortinas (MC3 y MC4), expresados mayoritariamente en zonas sobre las que proyectan las neuronas del ARC tales como el PVH. Además de disminuir la ingesta, activa el eje tiroideo y aumenta el gasto energético mediante el aumento de la termogénesis (28, 29).

Los agonistas de estos receptores de melanocortinas causan anorexia, mientras que los antagonistas inducen hiperfagia y obesidad; además alteraciones en estos receptores son de gran importancia en el desarrollo de la obesidad temprana severa en humanos(30, 31). En ratones, la deficiencia genética del receptor de melanocortinas 4 origina hiperfagia y obesidad (32).

CART

Tránsito regulado por anfetamina y cocaína (CART) se expresa en las mismas neuronas que POMC en el ARC. La homología de CART entre humanos y ratas es del 92%, y pese a esta alta conservación, en ratas existen dos isoformas mientras que en humanos solo la forma corta CART (33).

El péptido CART se expresa en distintas zonas del cerebro incluyendo el PVH, DMH, región perifornical, LH y sobretodo en el ARC. Las neuronas que secretan CART están asociadas a los sistemas de recompensa y refuerzo, procesamiento sensorial, estrés, regulación endocrina e ingesta (caracterizada por la inhibición de la ingesta sin modificar gasto energético) (34). La administración ICV de CART provoca activación neuronal en el PVH, causando así la reducción de la ingesta en condiciones normales

y la ingesta que se origina tras un periodo de ayuno (35). Los niveles de expresión de CART caen durante el ayuno o diabetes, indicando que la expresión de CART está regulada por señales periféricas (36).

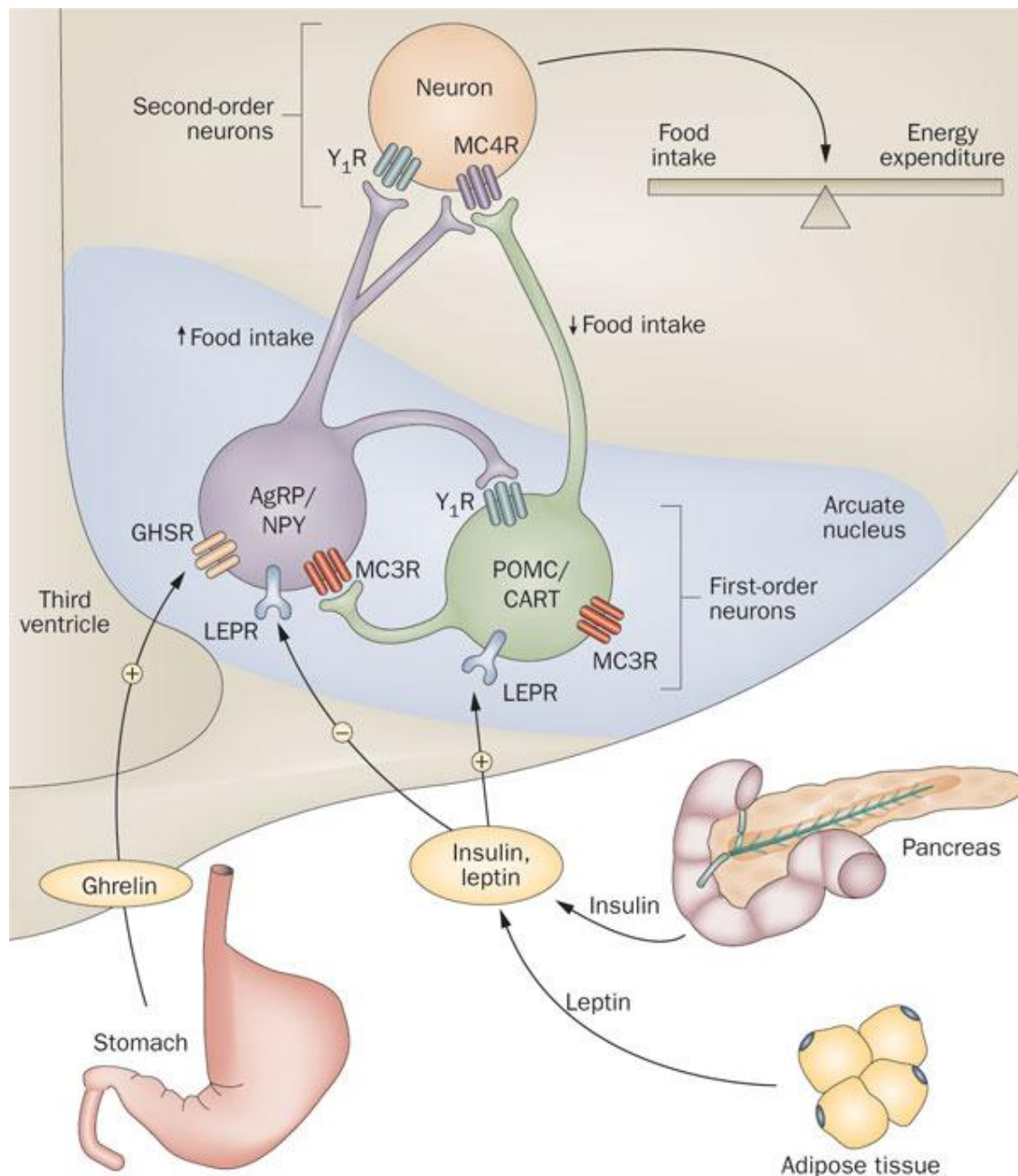


Figura5:Regulación de la ingesta mediante las acciones en las neuronas hipotalámicas y su integración con señales periféricas(37)

Núcleo Dorsomedial (DMH)

El núcleo DMH, recibe conexiones de otras zonas como el hipotálamo medio y lateral, así como del ARC de donde recibe proyecciones de NPY/AgRP integrando y procesando esta información (38). Está relacionado con la modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño y vigilia, ritmo circadiano y actividad locomotora (39).

Núcleo Paraventricular (PVH)

Está situado en la parte anterior del hipotálamo, próximo a la parte superior del tercer ventrículo. Es el principal núcleo productor de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH). Constituye una de las áreas de neuronas secundarias que procesan la información para la regulación de la homeostasis energética, ya que recibe proyecciones desde las neuronas NPY/AgRP del ARC (atenúan la señal inhibitoria GABA-érgica), melanocortinas (aumenta la señal GABA-érgica), orexinas y otras zonas como el núcleo tracto solitario.

El PVH es muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta como CCK, NPY, ghrelin o GLP-1. Estas proyecciones desde otros núcleos, así como los péptidos periféricos, pueden regular la actividad de las neuronas TRH y de las que expresan CRH, indicando así que el PVH integra señales nutricionales con el eje hipofisario y tiroideo (40). El PVH puede, además, ser un lugar de interacción entre el sistema de endocannabinoides y neuronas reguladoras de la ingesta: se ha encontrado que el receptor de endocannabinoides CB1 se coexpresa con CRH y CRH-R1, de modo que el aumento de endocannabinoides lleva a un descenso en la secreción de CRH, pudiendo éste ser el mecanismo a través del cual se ejerce, en última instancia, el efecto de los glucocorticoides sobre la ingesta (41).

Hipotálamo Lateral (LH)

Este núcleo forma parte del segundo orden de integración de señales implicadas en la regulación energética, especialmente del ARC. En él se sintetizan dos tipos de péptidos: hipocretinas (orexinas) y hormona concentradora de melanina (MCH). Se caracterizan por emitir proyecciones a un amplio número de zonas del sistema nervioso central (córtex, tálamo o sistema límbico) participando en numerosas funciones tales como aprendizaje, memoria, emoción, y respuestas motoras en función del estado energético ya que están reguladas por numerosas hormonas, entre ellas, ghrelin y leptina.

Orexinas (OXs)

Las orexinas A y B, se obtienen a partir del procesamiento proteolítico de la pre-pro-orexina. Son secretadas por neuronas distintas (42), y ejercen su efecto a través de proyecciones a distintas zonas del cerebro entre las que se encuentran PVH, ARC, tálamo, córtex cerebral, núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal motor del vago. Esta serie de conexiones sugieren que las orexinas están implicadas en diferentes aspectos relacionadas con la ingesta de nutrientes. Las orexinas se unen a dos receptores específicos, ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, pertenecientes ambos al grupo de receptores acoplados a proteínas G (43). Se las ha relacionado también con la ingesta de líquidos y con el sueño pues la falta del gen de orexinas en ratones induce narcolepsia (44, 45).

La administración central de orexina A ejerce un potente efecto orexigénico, mientras que la orexina B no tiene efecto (46). La expresión del mRNA de pre-pro-orexina aumenta en situaciones de ayuno, y este efecto se revierte cuando se trata a las ratas con leptina en el ventrículo lateral (47). Se sabe que el

50% de las neuronas productoras de orexinas expresan receptores tanto de orexina como de leptina, y que se activa la expresión de orexina ante hipoglucemia causada por insulina. Todas las neuronas hipotalámicas que se activan durante el estado de ayuno reciben proyecciones desde las neuronas productoras de orexina, entre ellas el NPY con el que establece, a bajas concentraciones, un efecto sinérgico sobre la ingesta, pudiendo ser el sistema de las orexinas un regulador de NPY y de su efecto sobre ingesta y metabolismo. El ratón deficiente para la orexina es hipofágico pero con un índice de crecimiento normal, gracias a una disminución en la tasa metabólica. Es además un buen modelo de estudio de narcolepsia humana (48) ya que las neuronas productoras de orexinas proyectan también a áreas asociadas con el despertar y la atención.

En circunstancias de inanición, las orexinas pueden mediar tanto en respuesta a la atención, para mantenerse despiertos, como en la ingesta dando la orden del inicio de la comida. Esto hace que las orexinas sean buenas candidatas para la conexión entre insomnio y obesidad. La orexina puede jugar un importante papel como hormona periférica implicada en la regulación de la ingesta energética ya que también se expresa en células endocrinas de la mucosa gástrica, intestino y páncreas (49), y la administración periférica aumenta los niveles de glucosa en sangre.

MCH

Es un péptido orexigénico que ejerce su efecto sobre la ingesta de forma independiente de NPY y orexina, ya que no se observa ningún efecto sinérgico cuando se administran juntos en el tercer ventrículo de ratas (50). Además de participar en la regulación de la ingesta, se le han atribuido otras funciones: regulación del sueño y vigilia, reproducción, regulación de la sed y la integración de señales sensoriales y su respuesta motora. Los niveles de mRNA de MCH están elevados en animales obesos y durante el ayuno, y la administración repetida de MCH ICV incrementa la ingesta y produce obesidad moderada en ratas (51). Además, la delección del gen en ratón resulta en un fenotipo hipofágico y muy delgado, con una tasa metabólica muy alta, mientras que el ratón transgénico que sobreexpresa el precursor de MCH es hiperfágico y desarrolla obesidad central.

El efecto estimulador de ingesta de MCH parece competir con α -MSH puesto que, tras la administración conjunta de ambos péptidos, uno antagoniza el efecto del otro (52). El LH puede ser también un lugar de acción para el sistema de endocannabinoides ya que las neuronas orexigénicas de esta zona (orexina y MCH) expresan CB1, receptor de endocannabinoides (41). Se ha demostrado recientemente que la estimulación de CB1 activa la misma ruta intracelular que la orexina A, sugiriendo un papel orexigénico de los endocannabinoides a través de esta población neuronal. Además, teniendo en cuenta que estas neuronas proyectan hacia zonas del VTA, es posible que el LH actúe como punto integrador de señales orexigénicas, hipotalámicas y extrahipotalámicas, mediadas por el sistema de endocannabinoides. También las neuronas MCH pueden participar en la señal orexigénica de los endocannabinoides, ya que se ha comprobado que los endocannabinoides pueden estimular las neuronas MCH, disminuyendo la señal inhibitoria GABA, causando un aumento de la ingesta. Efecto que puede ser bloqueado mediante la administración de leptina.

Se ha encontrado que la inyección central de MCH controla el metabolismo de lípidos en WAT mediante la sobre-expresión de proteínas clave del metabolismo lipídico y responsables del

almacenamiento de lípidos. Estos efectos están acompañados por un descenso de la lipólisis (11). Estos efectos del MCH sobre el WAT están mediados por el sistema nervioso simpático.

La inyección central de MCH estimula, en el hígado, el almacenaje de lípidos. Este proceso se produce por la conexión existente entre el sistema nervioso central y el hígado a través del sistema nervioso parasimpático. Los efectos registrados en el metabolismo lipídico en el hígado son regulados por la actividad de MCH en el núcleo lateral(11).

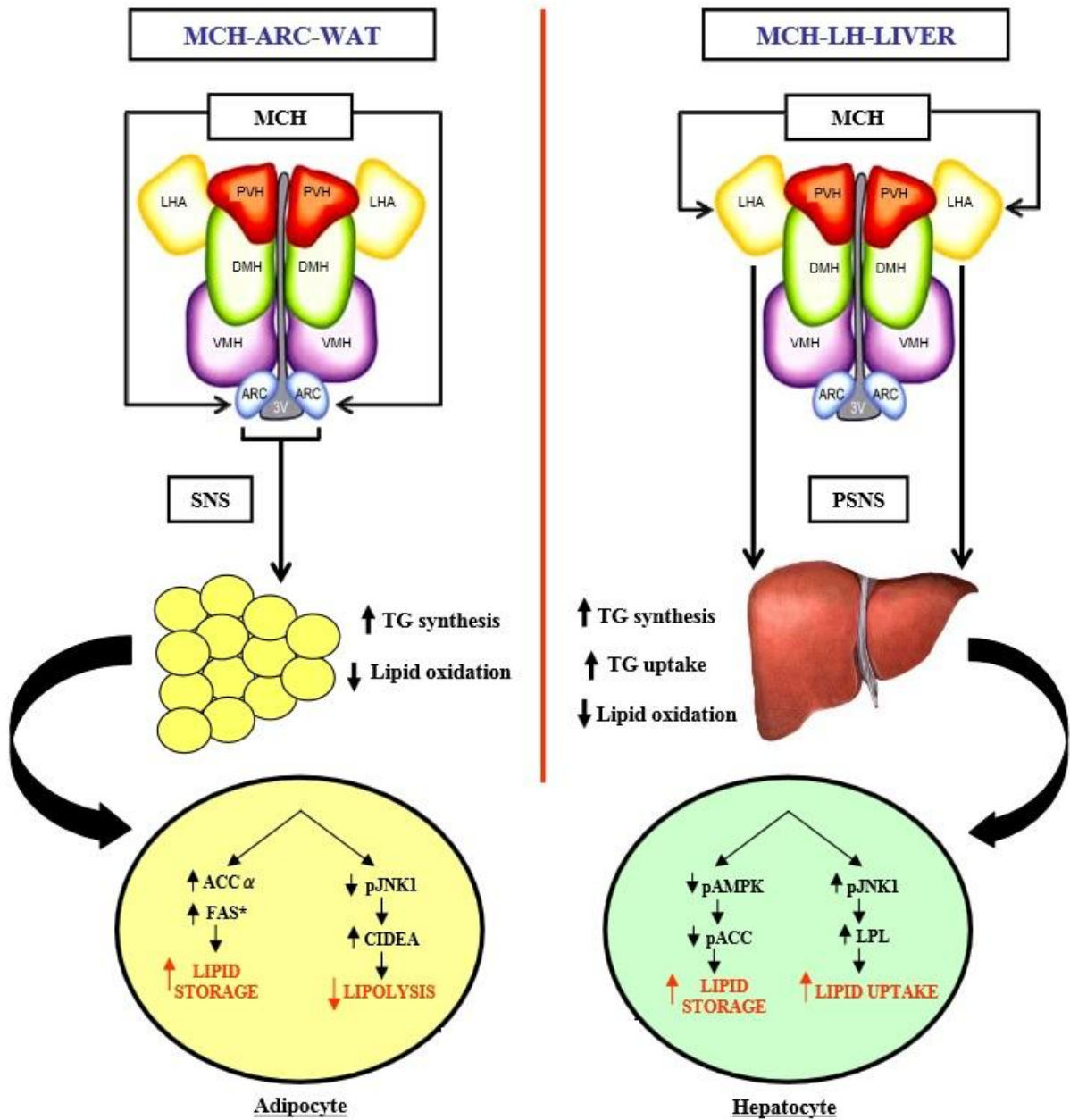


Figura6: Efectos de la inyección central de MCH en el metabolismo periférico.

Núcleo VMH

Desde que fue denominado “centro de saciedad” al comprobar que lesiones bilaterales causaban hiperfagia y obesidad, la participación del núcleo VMH en la regulación de la ingesta parece clara (10). El VMH puede aumentar directamente la actividad de las neuronas POMC mediante microcircuitos, estimulando su actividad excepto en estado de ayuno en el que disminuye, además de proyectar hacia otros núcleos hipotalámicos y al tronco cerebral. Por su parte el ARC también regula la actividad del VMH donde se encuentran receptores de melancortinas, y receptores del péptido Y, sugiriendo que tanto POMC como NPY emiten proyecciones al VMH.

La administración de NPY en el VMH aumenta la ingesta, el ayuno está asociado con unos niveles elevados de NPY en esta región, mientras que la respuesta electrofisiológica de las neuronas en el VMH a α -MSH está disminuida en animales en ayuno y/o tratados con AgRP. La importancia del VMH en la regulación de la homeostasis energética ha sido apoyada por estudios en los que se demuestra la existencia de ObRb y activación neuronal inducida por leptina: inyecciones selectivas de leptina en el VMH reducen la ingesta y el peso corporal en ratas delgadas. También, estados metabólicos alterados tales como ayuno o preñez alteran de forma selectiva la expresión de ObRb en el VMH. Mientras, la delección de ObRb, de forma selectiva en este núcleo, disminuye la ganancia de peso corporal con un aumento de los niveles plasmáticos de leptina y de la expresión de UCP1 en BAT (53).

Otro ejemplo de regulación núcleo específica de la ingesta a nivel del VMH, es la modificación de la actividad de AMPK y consecuentemente de la vía de metabolismo de lípidos (54). En concreto, se ha propuesto que la inhibición de FAS a nivel del VMH (genética, farmacológica o por hormonas periféricas) provoca el descenso de la ingesta, sugiriendo que FAS en este núcleo puede actuar como un sensor nutricional integrando señales periféricas con los mecanismos centrales que regulan la ingesta. Además, en el VMH se expresa el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), implicado en la regulación del desarrollo neuronal y su plasticidad, y cuya expresión se reduce en situaciones de ayuno (53). Se ha comprobado en humanos que la alteración de BDNF o su receptor TRKB, causan hiperfagia y obesidad, además de retraso en el desarrollo mental, disminución de la memoria a corto plazo e hiperactividad (55, 56). Este factor, que interviene en las funciones metabólicas reguladas por el VMH, está regulado a su vez por distintos factores nutricionales. Este efecto no es mediado por el sistema de melancortinas, a diferencia de lo que se pensaba inicialmente, ya que BDNF reduce la ingesta y el peso corporal en ratones deficientes de MCR4 (52).

TEJIDO ADIPOSEO BLANCO

Tradicionalmente se pensaba que el tejido adiposo blanco presentaba únicamente la capacidad de almacenar energía en forma de grasa, posteriormente se ha encontrado que dicho tejido presenta capacidad secretora. Actualmente se conocen gran cantidad de péptidos que van a presentar acciones tanto a nivel autocrino como a nivel endocrino, al conjunto de estos péptidos se denominan adipoquinas (57). Este tejido presenta la capacidad de recibir información procedente de otros órganos así como la capacidad de responder a dichas señales, lo que hace que el tejido adiposo blanco se convierta en un tejido clave en la regulación de procesos biológicos (58).

Leptina

La leptina fue identificada en 1994 a raíz de la identificación del gen *ob*, el cual codifica a un péptido de 167 aminoácidos con un peso de 16 KDa (59), va a ser secretada por el tejido adiposo blanco, de tal modo que en individuos obesos los niveles de leptina van a estar incrementados debido al aumento en la cantidad de tejido adiposo blanco y van a reducirse con la pérdida de peso. Se expresa en menor medida en otros tejidos como el tejido adiposo marrón y el músculo esquelético entre otros. Es capaz de llegar al cerebro atravesando la barrera hematocefálica a través de un transportador activo y saturable(60).

Existen numerosas formas del receptor de leptina que se generan mediante splicing alternativo de mRNA derivado de la expresión del gen *ob*, por ejemplo en ratones existen cinco tipos distintos. Estas isoformas se diferencian en tres grupos: las secretadas que se caracterizan porque van a presentar únicamente dominios extracelulares. Las formas cortas caracterizadas porque presenta varios aminoácidos truncados y que se distribuyen fundamentalmente por los capilares del sistema nervioso central por lo que se cree que son responsables del transporte a través de la barrera hematocefálica. Por último quedaría la denominada como forma larga (LEPRb), que pertenece al grupo de receptores similares al de la interleukina 6 (IL-6). Estructuralmente su principal característica es la existencia de un dominio intracelular variable, este receptor de leptina se encuentra mayoritariamente en diversos núcleos hipotalámicos incluyendo el arcuato (donde estimula a las neuronas POMC/CART e inhibe las NPY/AgRP), el dorsomedial, el ventromedial y toda una serie de regiones extrahipotalámicas. Se caracteriza porque carece de actividad enzimática *per se*, dicha actividad es debida a la quinasa de Janus 2 (JAK2) a la cual se encuentra unida (61, 62).

La unión de la leptina con el LEPRb desencadena tanto la autofosforilación de JAK2 como del LEPRb en varios residuos de tiroxinas, permitiendo así la unión con una serie de moléculas señalizadoras, las cuales a su vez pueden ser fosforiladas por JAK2. STAT3 se une a la tiroxina 1138, debido a esta unión STAT3 es fosforilada por JAK2, posteriormente se produce la dimerización de STAT3 que es trasladada al núcleo donde actúa regulando la transcripción de genes diana entre los que se encuentran los de los neuropeptidos orexigénicos por lo que esta vía de señalización es fundamental para el efecto anorexigénico de la leptina. En ratones en los que se cambia la tiroxina 1138 por otro aminoácido, los ratones son hiperfágicos y obesos(62, 63).

Otro lugar de fosforilación importante es la tiroxina 1077, a la cual se une STAT5 de tal modo que va a ser activada mediante fosforilación por la actividad de JAK2. La eliminación de STAT5 genera obesidad e hiperfagia. La actividad de STAT5 va a contribuir a la acción anorexigénica de la leptina (62, 64).

La tiroxina 985 constituye otro lugar de fosforilación relacionado con la actividad de la leptina, a este residuo se puede unir la fosfatasa de tiroxina 2 (SHP2), este proceso estimula la vía de señalización asociada a la quinasa extracelular regulada por señales (ERK). Dicha vía de señalización inhibe los efectos asociados a la vía JAK2/STAT3(65). A este residuo también se puede unir SOCS3 que es un inhibidor de STAT3(62, 66, 67). Existe otra vía relacionada con la actividad a nivel hipotalámico de la leptina, un actor principal en la activación de esta vía es la proteína adaptadora SH2B1 que se va a unir a JAK2 con el receptor de insulina (IRS), mediando la activación de PI3K. La disrupción del gen de SH2B1 lleva asociado resistencia a insulina y obesidad(68). La activación de PI3K activa a su vez a AKT, enzima que fosforila a FOXO1 en varios lugares provocando su inactivación, la cual se manifiesta reduciendo la

ingesta y el peso corporal. La sobreexpresión de FOXO1 en el núcleo arcuato produce la desaparición de los efectos de la leptina que llevan asociados un incremento de la ingesta y el peso corporal(69), mientras que la eliminación de FOXO1 produce una reducción de la ingesta y del peso corporal(70).

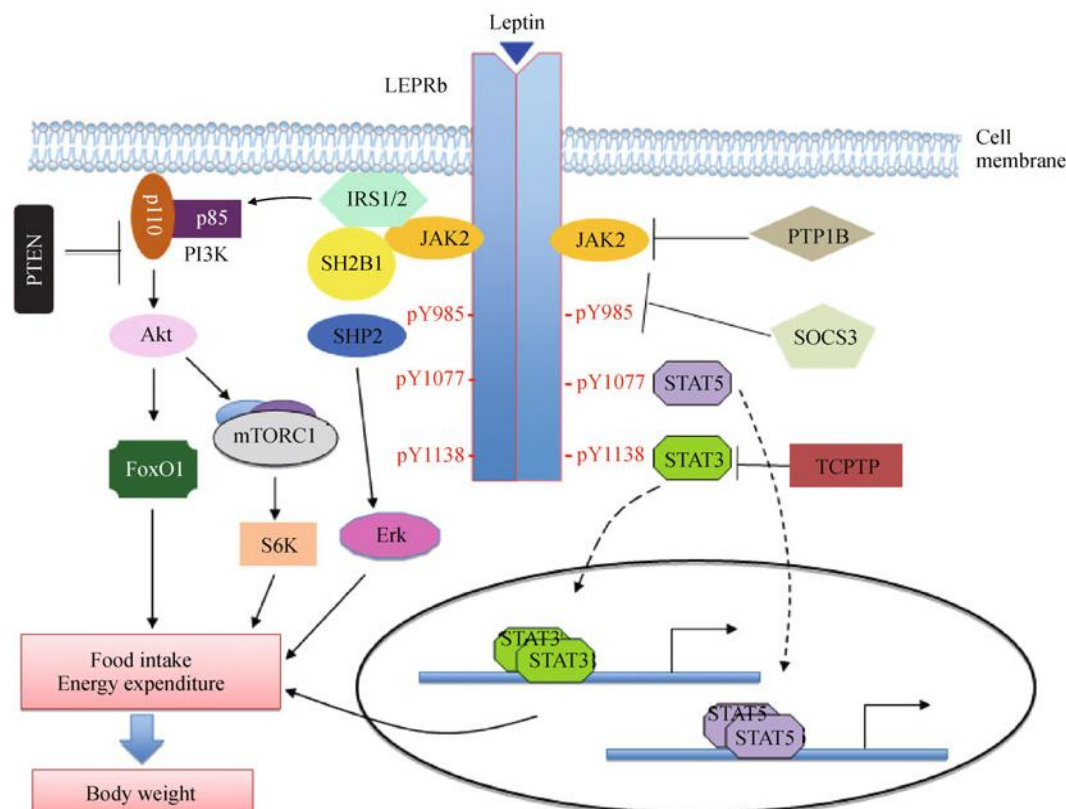


Figura7:Vía de señalización de la leptina(62).

Resistina

La resistina es un péptido de 114 aminoácidos perteneciente a un grupo de proteínas ricas en cisteína (RELMS) implicadas en procesos de inflamación. En roedores se sintetiza fundamentalmente en el tejido adiposo blanco, aunque se expresa en mucha menor medida en otros tejidos como la hipófisis, glándulas adrenales, hipotálamo, etc(71, 72). Los niveles de resistina circulantes están incrementados en animales obesos, la inmunoneutralización de la resistina lleva asociada un incremento en la tolerancia a la glucosa y una mejora en las acciones de la insulina(73, 74).

La administración ICV de resistina en ratas en estado de ayuno, produce un descenso transitorio en la ingesta, de tal modo que después de 3 horas ya no se observa dicho descenso en la ingesta(75). Este descenso de la ingesta es debido al bloqueo del incremento de NPY/AGRP y el descenso de CART debido al estado de ayuno. Además incrementa la expresión de SOCS3 independientemente de los niveles de leptina circulantes (76).

En humanos la resistina se puede detectar en suero, pero a diferencia de lo que ocurre en ratones, su liberación va a ser debida mayoritariamente a la actividad de los macrófagos del tejido adiposo blanco(77). Humanos y ratones presenta una homología de un 60% tanto en la secuencia de ADN como

en la secuencia de aminoácidos que conforman la proteína(78). Estas diferencias génicas son consideradas las responsables de la carencia en la producción de resistina en adipocitos humanos, esta alteración en la síntesis es debida a la carencia de un sitio genómico de unión a PPAR γ en adipocitos blancos humanos (79).

El uso de ratones transgénicos que expresan resistina humana en macrófagos y monocitos presentan predisposición a desarrollar resistencia a insulina(80). Estos datos parecen evidenciar que los efectos de la resistina descritos en ratón serían extrapolables a humanos. En pacientes humanos se han encontrados datos que apoyan los efectos descritos con animales y datos que los contradicen(81).

Adiponectina

La adiponectina es un péptido de 247 aminoácidos que se caracteriza porque está formada por 3 subunidades que se agregan formando hexámeros (LMW) o estructuras más complejas (HMW), además se puede encontrar en forma completa o bien como un fragmento globular.

La adiponectina actúa a través de dos receptores diferentes Adipo-R1 que se expresa de forma mayoritaria en el músculo esquelético y Adipo- R2 que se encuentra principalmente en el hígado. Estos receptores regulan el efecto de la adiponectina sobre la fosforilación de AMPK y la actividad de PPAR γ lo que conlleva un incremento de la β -oxidación de los ácidos grasos y la captación de glucosa, por lo que presenta un rol importante en la regulación de la sensibilidad a la insulina(82).

Interleukina 6

La interleukina 6 es una citokina que circula en forma glicosilada de tal modo que su peso molecular oscila entre 22 y 27 KDa. Se expresa en el tejido adiposo blanco y en el sistema nervioso central y su receptor es homólogo al del receptor de leptina (83).

Los niveles séricos de IL-6 son proporcionales al índice de masa corporal y se encuentran incrementados en estados de obesidad(84) y además la IL-6 está relacionada con un incremento en la resistencia a la insulina y un descenso en la tolerancia a la glucosa. Los niveles plasmáticos de IL-6 se utilizan como indicadores de desarrollo de diabetes de tipo 2 y de patologías cardiovasculares .

El ratón KO para IL-6 se caracteriza porque presenta incrementados tanto el peso corporal como la ingesta a partir de los 6 meses de edad llegando a desarrollar obesidad en condiciones de dieta estándar. La inyección a nivel central de IL-6 produce una reducción en la ingesta y en la adipogénesis, aumenta la lipólisis y el gasto energético, y revierte los efectos que se observan en los ratones KO. Los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-6 presenta problemas de crecimiento y una reducción de peso corporal asociado a una reducción en la masa grasa(85, 86).

TNF α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citokina proinflamatoria que se sintetiza como una proteína transmembrana de 26 KDa (87) que posteriormente se escinde un fragmento de 17 KDa que va a ser soluble y es la molécula que se conoce como TNF α y es la biológicamente activa. Se sintetiza fundamentalmente en la fracción estromal del tejido adiposo blanco(88).

La pérdida de peso reduce los niveles circulantes de TNF α llevando consigo un incremento en la sensibilidad a la insulina. La administración crónica TNF α reduce la sensibilidad a la insulina y de tal modo si administramos bloqueantes se incrementa la sensibilidad a la insulina. Dicho fenómeno se observa

en roedores pero no en seres humanos. El ratón carente de TNF α presenta protección contra la resistencia a insulina debida a la obesidad (89, 90).

SEÑALES GASTROINTESTINALES CON ACCIONES METABÓLICAS

El sistema gastrointestinal está formado por varios órganos los cuales van a producir hormonas que están implicadas en los procesos de regulación tanto de la homeostasis energética, la gran mayoría de estas señales van a estar relacionadas con la reducción de la ingesta o con la pérdida de peso.

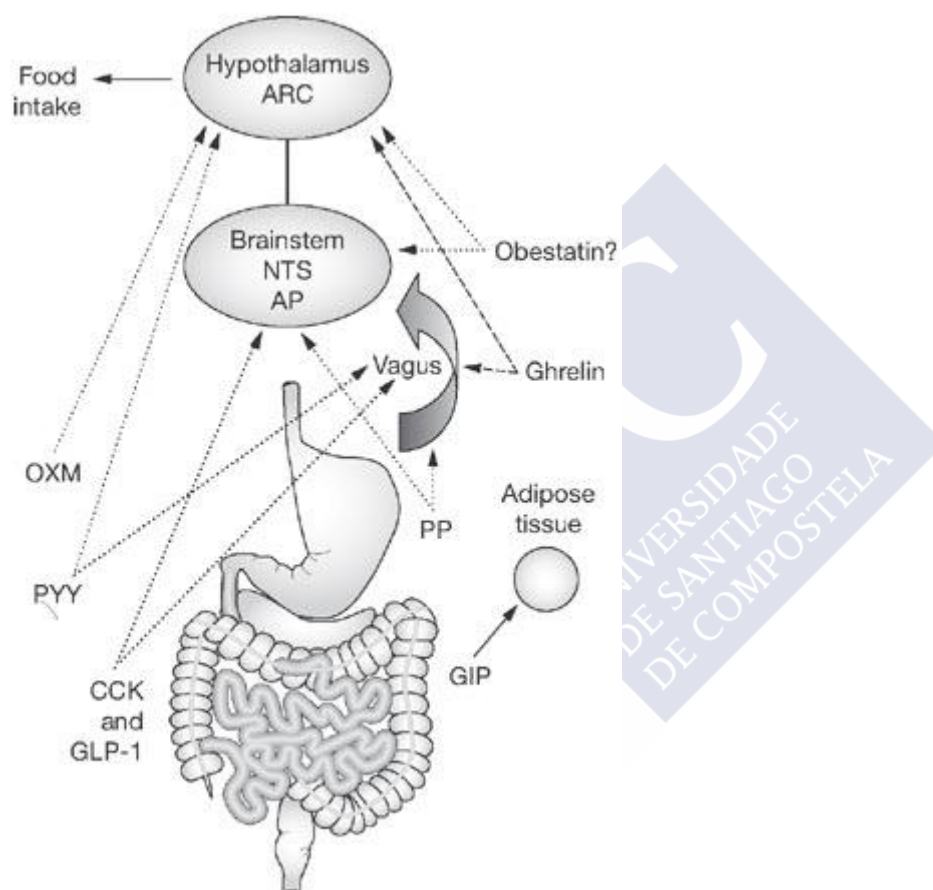


Figura8: Principales señales gastrointestinales con efectos metabólicos(91).

Insulina.

La insulina es sintetizada en el páncreas, en unas estructuras multicelulares con capacidad secretora conocidas como son los islotes de Langerhans. La liberación de la insulina a la sangre estimula la captación de glucosa en tejidos periféricos sensibles a su acción como el músculo esquelético, el hígado y el WAT. La insulina presenta la capacidad de atravesar la barrera hematocefálica (a través de transporte mediado por receptor) permitiendo su actuación en el sistema nervioso central(92).La administración ICV de insulina disminuye la ingesta, llegando a revertir el síndrome hiperfágico en individuos afectados por

diabetes tipo I, estos efectos son debidos a la acción de la insulina en las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo(93).

El receptor de insulina (IR) se encuentra distribuido en una gran cantidad de tejidos, aparte de los previamente mencionados músculo esquelético, hígado y WAT el receptor de insulina se puede encontrar también en los glóbulos rojos en la sangre y en las neuronas en distintas regiones del sistema nervioso central(fundamentalmente el bulbo olfatorio , la hipófisis y el hipotálamo). Se han generado ratones knockout para los receptores de insulina(IR-1, IR-2) específicos para el sistema nervioso central. Los machos KO no presentan diferencias en peso e ingesta con respecto a los controles contrariamente a lo que ocurre en las hembras las cuales son aproximadamente 10-15% más pesadas que los controles y cuya ingesta se encuentra incrementada. Tanto machos como hembras presentan más grasa que los controles lo que lleva apareado un incremento de los niveles de leptina (94).

La unión insulina con su receptor hace que este último adquiera actividad catalítica y pueda fosforilar a proteínas diana, que en última instancia modifican la expresión, entre otros, de distintos neuropéptidos hipotalámicos tales como NPY y POMC, regulando así el efecto de la insulina sobre la ingesta y el peso corporal(95, 96).

Ghrelin

Ghrelin es un péptido de 28 aminoácidos identificado en el año 1999 y que es sintetizado en el estómago. Históricamente era conocido un receptor huérfano (GHS-R) cuya activación estaba ligada a un incremento en la secreción pulsátil de la hormona de crecimiento (GH). Se sintetizaron toda una serie de secretagogos tanto peptídicos como no peptídicos que eran capaces de incrementar la secreción de GH tanto in vivo como in vitro. El estudio del GHSR en líneas celulares que fueron puestas en contacto con extractos de diferentes tejidos y en las que posteriormente, se analizaron los niveles Ca^{2+} intracelular que se producen durante la activación del receptor. Este proceso permite determinar en qué tejidos se encuentra la molécula que activan al receptor, siendo en el estómago donde se encontraba la mayor actividad del receptor(97). A mayores de esta capacidad para incrementar la secreción de GH, el ghrelin también incrementa la ingesta(98, 99) y la adiposidad(100) tanto en humanos como en roedores debido a la liberación de los péptidos NPY y AgRP, que son producidos en neuronas del ARC.

La unión de ghrelin con su receptor, GHSR1a, produce un incremento en la actividad de Sirt1. Sirt1 es una encima deacetilasa que se encuentra ampliamente distribuida en tejidos periféricos con relevancia en el control del metabolismo (WAT, músculo esquelético, células β e hígado)(101-104) donde regula la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de lípidos, también se encuentra en el sistema nervioso central donde regula la homeostasis energética y de la glucosa (105) además también va a ejercer su actividad deacetilasa sobre p53.

El incremento en la actividad deacetilasa de Sirt1, debido a la unión de ghrelin a su receptor, produce la deacetilación de p53, que a su vez produce un incremento en la fosforilación de la proteína-kinasa activada por AMP (AMPK)(106).

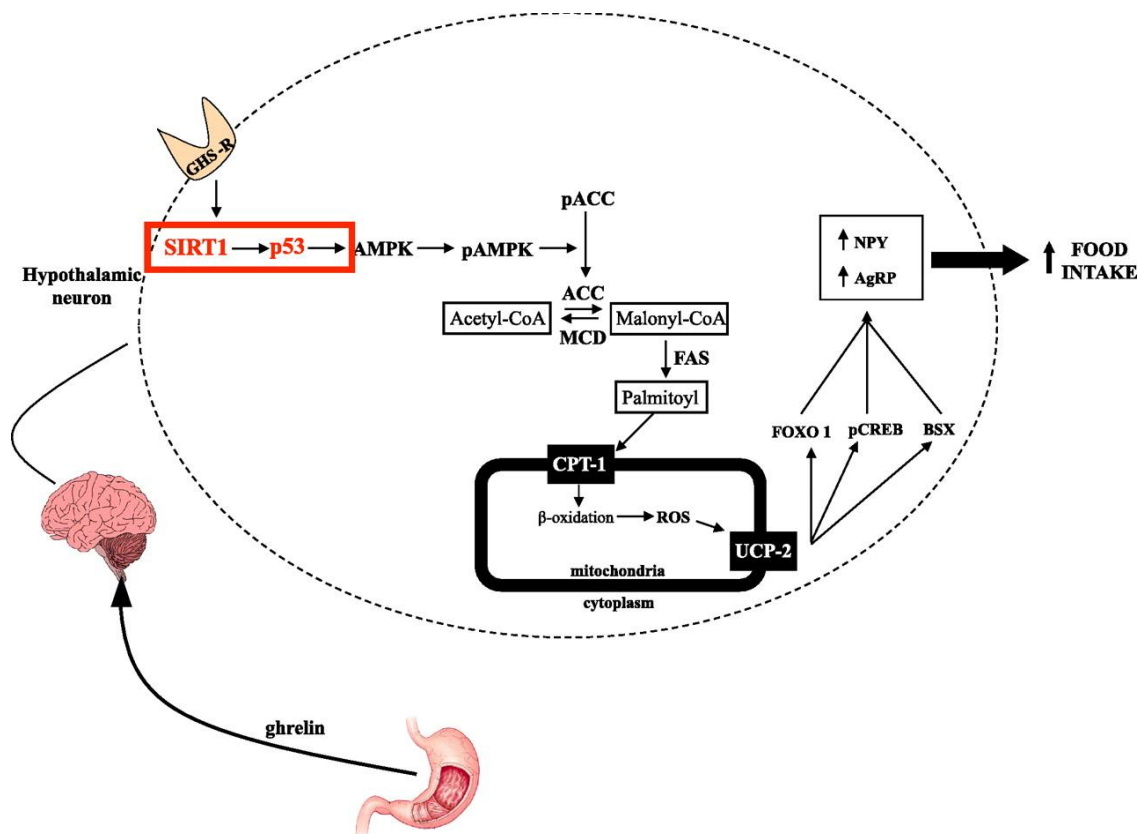


Figura9: Vía de señalización hipotalámica de ghrelin(106).

AMPK se va a expresar en regiones hipotalámicas relevantes para el control de la ingesta (ARC, LH, PVH y VMH), y su actividad es fundamental en la respuesta adaptativa en el proceso de regulación de la ingesta. Así, en estado de ayuno AMPK se encuentra activado (mediante fosforilación) proceso que es revertido cuando los animales se realimentan(107).

Esta fosforilación produce la activación de AMPK, lo que a su vez conlleva una inhibición del metabolismo de ácidos grasos mediante la fosforilación de acetil coenzima A carboxilasa (ACC) dando lugar a un descenso en los niveles de malonil coenzima A y un incremento en la actividad de carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1). Este incremento en la actividad de CPT1A se relaciona con un aumento en la beta oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, dicho proceso metabólico está asociado a la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son eliminadas por la proteína desacopladora 2 (UCP2) lo que permite la activación de las neuronas hipotalámicas productoras de NPY y AgRP.(107, 108) incrementando así la ingesta. Recientemente se ha descrito una segunda vía en la que la unión de ghrelin con su receptor provoca un incremento en la producción de ceramidas en el hipotálamo, fenómeno imprescindible para la acción orexigénica de ghrelin. El incremento en la concentración de ceramidas está mediado por la actividad de CPT1C, que se expresa en la pared del retículo endoplasmático.

La inhibición de la síntesis de ceramidas bien mediante el uso de fármacos o con ratones KO para CPT1C desembocan en la desaparición de los efectos orexigénicos de ghrelin. Del mismo modo el incremento de la síntesis de ceramidas mediante la sobreexpresión de CPT1C mediante vectores adenovirales se produce un incremento en la ingesta.(109)

La inyección subcutánea de ghrelin diariamente durante 2 semanas produce un incremento significativo en la masa corporal. Mediante el estudio de la composición corporal usando técnicas de absorción de rayos-X se ha encontrado que dicho aumento de masa es debido únicamente al incremento del tejido adiposo blanco, mientras que la masa muscular y ósea permanecen inalteradas. Siguiendo este protocolo experimental se ha encontrado un incremento en el cociente respiratorio (RQ), lo que significa que estos individuos están utilizando carbohidratos como fuente de combustible en el lugar de grasa, este cambio en el cociente respiratorio se produce independientemente de cambios en el gasto energético (EE) y en la actividad locomotora (LA). Además el efecto en la adiposidad es independiente del efecto del ghrelin sobre la GH, ya que en ratas dwarf (deficientes en GH) a las que se inyectó ghrelin subcutánea mantienen el efecto sobre la adiposidad.(100).

INTESTINO DELGADO

Colecistoquinina

La colecistoquinina (CCK) es un péptido que se expresa a lo largo de todo el tracto digestivo si bien, la mayor parte se produce en células I del duodeno, de donde es liberado rápidamente a la circulación y tejidos circundantes en respuesta a la llegada de alimentos al intestino, siendo la liberación mayor en aquellas dietas ricas en grasa o en proteínas. El principal efecto de la CCK es la reducción de la ingesta, retrasa el vaciado gástrico, y estimula la secreción de enzimas pancreáticas(110). Existen 2 receptores para CCK: el CCK-1R (o CCK-A) que se encuentra a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y el CCK-2R(o CCK-B) que se localiza en el cerebro.

La administración de CCK inhibe la ingesta mediante la reducción en la duración de la comida, a altas dosis se produce náusea y fenómenos de aversión al sabor. Este efecto anorexigénico es mediado por el receptor CCK-1R y la señal al sistema nervioso central se realiza a través del nervio vago, ya que se ha encontrado un bloqueo en este efecto después de la vagotomía(111, 112). Los antagonistas de CCK generan un incremento en la cantidad de calorías ingeridas así como la reducción en la percepción de la sensación de saciedad(113).

CCK presenta una vida media muy corta, de tal modo que solo tendrá efecto cuando es administrada menos de 15 minutos antes de la ingesta. La administración crónica de CCK no produce un descenso de peso si bien se ha descrito que en tratamiento conjunto con leptina mejora el efecto en la pérdida de peso asociada al tratamiento con leptina(114).

GIP

El polipeptido inhibidor gástrico (GIP) es un péptido de 42 aminoácidos sintetizado predominantemente en la células K en las regiones proximales del intestino delgado, también se localiza en el sistema nervioso central favorece la supervivencia celular(115). Los niveles circulantes de GIP son bajos durante periodos de ayuno pero estos niveles se incrementan pocos minutos después de la ingesta de nutrientes.

El receptor de GIP presenta dos isoformas, de 466 y 493 aminoácidos respectivamente, que se expresan en las células β pancreáticas, tejido adiposo, corazón y cerebro. El receptor de GIP está acoplado a la adenilato ciclasa cuya activación va a incrementar el calcio intracelular y el flujo de ácido araquidónico. La activación del receptor de GIP produce la activación de vías de señalización dependientes de factores de crecimiento que incluyen a la quinasa activada por mitógeno (MAPK), las

quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), fosfoinositol 3 kinasa (PI3K) y la proteína kinasa B (AKT).

GLP-1

El Péptido Similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1) se produce en las células L del intestino delgado a partir del proglucagón, péptido resultante de la expresión del gen del glucagón. El proglucagón es un polipéptido de 160 aminoácidos que se expresa en el intestino (delgado y grueso), células α del páncreas, papilas gustativas y regiones del sistema nervioso central entre las que se encuentra el hipotálamo (116, 117). En todos estos tejidos se produce el mismo mRNA que va a ser procesado de forma diferencial originando cada uno de sus derivados.

Así en las células α del páncreas la enzima convertasa de proproteínas (PC2) escinde al preproglucagón en varias moléculas: Glucagón, el polipéptido pancreático emparentado con glicentin (GRPP), el fragmento mayor del glucagón (MPGF) y el péptido interviniente (IP-1) (118). Por otro lado en las células L del intestino delgado y en el sistema nervioso central, el proceso de proteólisis va a ser mediado por la enzima PC1/3, en este caso se originan: GRPP, Oxintomodulina, GLP-1, GLP-2, IP-2 y Glicentin (119). En las papilas gustativas se encuentran las tres convertasas de proteínas, lo que se traduce en la formación de glucagón y GLP-1 y 2 (120).

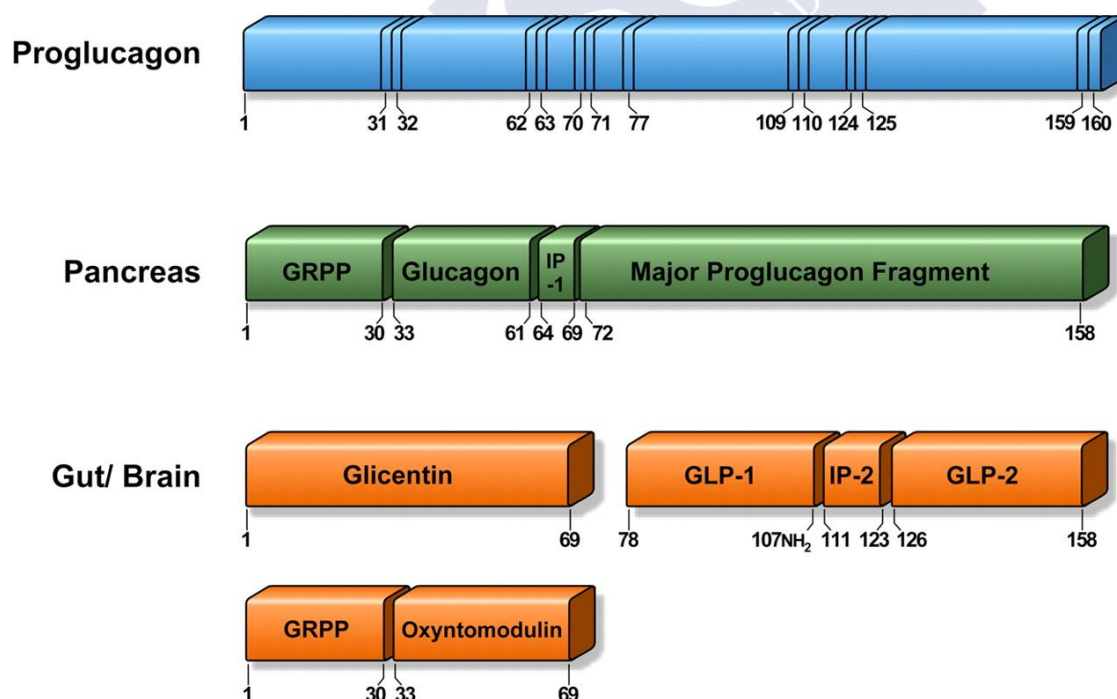


Figura10 :Procesado del glucagón(121).

El GLP-1 se secreta como respuesta a diferentes nutrientes (como carbohidratos, grasa, fibra, etc.) en un patrón bifásico, una primera fase a los 10-15 minutos después de la ingesta y una segunda fase entre 30-60 minutos (122).

La molécula completa de GLP-1 está conformada por 37 aminoácidos, de esta forma inicial se truncan los 6 aminoácidos iniciales y, en ocasiones, el aminoácido final para dar lugar a la forma activa mayoritaria de GLP-1(123). La vida media del GLP-1 en sangre es muy corta, aproximadamente 2 minutos, esto es debido a su eliminación por vía renal, por vía hepática y también por la degradación proteolítica a través de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

El receptor de GLP-1(GLP-1R) es una proteína heptamérica de 463 aminoácidos, acoplada a proteínas G que se expresa en múltiples tejidos: islotes pancreáticos, los conductos del páncreas, riñones, pulmones, en la piel, corazón, células inmunes, hipotálamo, hipocampo y córtex cerebral; la presencia del GLP-1R en el hígado, en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético no está clara si bien se han encontrado efectos específicos de GLP-1 en estos tejidos(124).

Acciones sobre la secreción de insulina.

En el páncreas el GLP-1R se encuentra mayoritariamente en las células β , aunque también existe en células α y δ . La activación del GLP-1R estimula la síntesis de AMP cíclico mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa, el aumento de AMPc estimula la actividad de la proteína quinasa A, un incremento del calcio intracelular, la inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP y finalmente la liberación de la insulina(125). El uso de Rp-cAMPS, un antagonista de PKA, produce una marcada reducción en la secreción de insulina(126).

Ratones KO para el receptor de GLP-1 son viables y se desarrollan correctamente, presentan niveles incrementados de glucosa en sangre tanto en ayuno como en la fase postprandial sin que existan cambios en la ingesta o en el peso(127).

Existe una vía alternativa a la anteriormente descrita que interviene en la liberación de insulina por parte del páncreas debido a la acción de GLP-1, independiente de la acción PKA. En esta vía el acúmulo de AMPc va a activar a las proteínas Epac2, que son proteínas que actúan como sensores de cAMP. Las proteínas Epac2 van a tomar como diana a un grupo de pequeñas proteínas G (Rab3 y Rab3A). GLP-1 aumenta la actividad de la enzima glucoquinasa fosforilando a la D-Glucosa lo que produce la activación de la vía regulada por la actividad de Epac2(128).

SAD-A es una proteína activada por AMP que se expresa únicamente en el sistema nervioso central y en el páncreas, la sobreexpresión de SAD-A no origina cambios en los niveles basales de glucosa pero si produce un incremento en los efectos derivados de GLP-1 y sus agonistas(129).

El gen translocador de la célula β (BTG2) interviene en numerosas funciones celulares como la diferenciación, proliferación y supervivencia celular e interviene en la regulación de los efectos de GLP-1 en la secreción de insulina mediante el incremento de la actividad del factor de transcripción de Pdx-1(130).

En ratas vagotomizadas se ha observado una reducción de la secreción de insulina con respecto a los controles cuando se inyecta GLP-1 a dosis fisiológicas. Si inyectamos GLP-1 a dosis farmacológicas se produce un incremento en la cantidad de insulina secretada si bien las diferencias registradas entre los distintos grupos experimentales se mantienen (131).

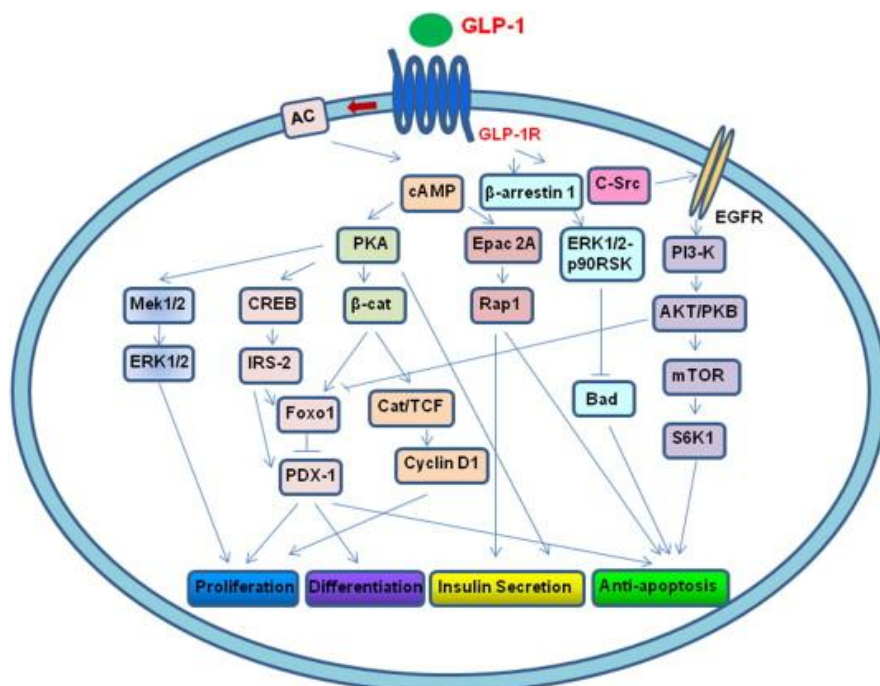


Figura11 :Efectos de GLP-1 en las células B del páncreas(124).

Acciones en el sistema nervioso central.

El receptor de GLP-1 se expresa en el núcleo del tracto solitario, en un grupo de neuronas no catecolaminérgicas. Este grupo neuronal proyecta hacia otras regiones cerebrales, siendo el hipotálamo la principal de estas regiones. En el hipotálamo podemos encontrar receptores de GLP1 en los principales núcleos hipotalámicos encargados de regular la homeostasis energética siendo el núcleo paraventricular el que presenta una mayor densidad de este tipo de neuronas (132, 133). Numerosos estudios han demostrado que la activación a nivel central del receptor de GLP-1 produce un descenso en la ingesta y una reducción en el peso corporal(134).

El núcleo arcuato es capital en el proceso de regulación de la ingesta debido a la presencia de neuronas orexigénicas (NPY/AgRP) y anorexigénicas (POMC/CART). Así la administración en el tercer ventrículo de GLP-1 en ratas ayunadas durante 48h bloquea el incremento de los niveles de mRNA de NPY/AgRP inducidos por el periodo de ayuno. En el caso de los neuropéptidos anorexigénicos, que disminuyen su expresión tras el ayuno, este efecto también se ve atenuado con el tratamiento de GLP-1. Estos cambios en la expresión de los neuropéptidos encargados de la regulación de la ingesta evidencian que GLP-1 presenta un rol importante en la regulación de la sensación de la saciedad(135).

La inyección directamente en el núcleo arcuato no presenta efectos sobre la regulación de la ingesta, lo cual es contradictorio con los datos existentes de la expresión del mRNA en esta región(136). Sin embargo cuando se produce la inyección en el núcleo paraventricular la supresión de la ingesta es robusta(137).

El glutamato monosódico administrado durante el desarrollo postnatal en ratas, lleva a la eliminación de las neuronas NPY en el arcuato. Estas ratas siguen respondiendo a la inyección de NPY en el núcleo paraventricular, y este efecto no es bloqueado por la administración de GLP-1 ICV como si ocurre en

ratas intactas(138). Esto evidencia una conexión neuronal directa en entre los núcleos paraventricular y arcuato.

GLP-1 va a actuar de forma sinérgica con la leptina en sus efectos en el hipotálamo, así la inyección conjunta de ambos fármacos intraperitonealmente incrementa el efecto anorexigénico independientemente de la estimulación de los efectos hipotalámicos de leptina (no se produce sobreexpresión de pSTAT3)(139).

Además de proyectar hacia el hipotálamo las neuronas GLP-1 presentes en el núcleo del tracto solitario van a proyectar a otras zonas del sistema nervioso central, y algunas de esas zonas como son el núcleo acumbens (NAc) o el área ventral tegmental (VTA) son zonas fundamentales en la regulación de los mecanismos de recompensa.

La inyección de GLP-1 directamente en el núcleo acumbens produce un descenso de la ingesta sin producir malestar intestinal(140). En estudios de comportamiento en el que los animales son enjaulados junto con un mecanismo de palanca (sistema de condicionamiento operante) que permite el acceso a pellets de comida dulce, los individuos tratados con GLP-1 (tanto en NAc como VTA) presentan menor actividad activando la palanca por lo que este tratamiento reduce al preferencia por la comida debido a la reducción de la recompensa obtenida derivada del consumo de la comida dulce(141).

Efectos termogénicos.

Recientemente se ha descrito que la activación del receptor de GLP-1 en el sistema nervioso central incrementa la actividad del tejido adiposo marrón interescapular a través de la estimulación del sistema nervioso simpático. Como resultado se encuentra un incremento en la temperatura y un incremento en la lipogénesis del BAT. Usando animales carentes de receptor de GLP-1 (GLP-1R KO) se observa como en animales KO no ocurre la activación del tejido adiposo marrón(142).

Análogos de GLP-1

GLP-1 presenta una serie de efectos beneficiosos como tratamiento para la obesidad si bien presenta una vida media demasiado corta para que pueda ser utilizado como tratamiento, como respuesta a este inconveniente surgieron análogos con el objetivo de evitar la degradación del GLP-1 por parte de la DPP-IV.

A principios de los años noventa se descubrió en la saliva del lagarto Gila (*H. suspectum*) un péptido, exendin-4 (EX4), capaz de unirse al receptor de GLP-1, la homología con GLP-1 del al 53% pero a partir de su estructura se desarrollaron fórmulas sintéticas más efectivas como el exenatide. (143)

Exenatide presenta únicamente dos residuos de diferencia con GLP-1, se caracteriza porque lleva asociado un incremento de la vida media hasta casi las tres horas, la inyección subcutáneo dos veces al día lleva a un descenso de HbA1c de un 1% y una pérdida de peso de entorno a 2 kilos tras 30 semanas de tratamiento. Comparando los efectos de Exenatide frente al tratamiento con insulina no se observa un descenso significativo de los niveles de HbA1c pero en los individuos tratados con insulina presenta un incremento de peso de 3 kg(144).

Liraglutide es un análogo sintético de GLP-1 que presenta una homología del 97%, dentro de estos cambios de secuencia destaca la conjugación del ácido palmítico a la lisina 36 utilizando un glutamato como elemento de unión. Esta estructura resulta óptima para la actividad en estudio in vitro y también un

incremento en la duración de las acciones (145, 146). En la sangre, liraglutide se une a la albúmina lo que reduce los efectos de DPP-IV sobre la vida media de la molécula. Los efectos de liraglutide producen un descenso en la hemoglobina glicosilada de un 1,8% y lleva asociada una pérdida de peso de 2-3 kg tras 26 semanas de tratamiento. En estudios que comparan los efectos de liraglutide con los exenatide evidencian una mayor reducción de hemoglobina glicosilada así como una mayor pérdida de peso convirtiéndolo en el análogo idóneo para el tratamiento de la obesidad de los disponibles en la actualidad (147, 148).

OTROS REGULADORES DE LA HOMEOSTASIS ENERGETICA.

Además de todos los antes citados, hay un gran número de señales procedentes de distintos órganos y tejidos que pueden influenciar la ingesta y/o gasto energético. El papel desempeñado por distintas señales hormonales procedentes de glándulas endocrinas tales como la tiroides, gónadas, adrenales o hipofisarias entre otras es ampliamente conocido. Más recientemente se ha postulado, y en algún caso demostrado, que señales procedentes del tejido muscular, hígado o hueso pueden influenciar de forma marcada en algún caso dicha homeostasis. Dada la temática de esta tesis en este apartado solo revisaremos en profundidad una proteína generada en el endotelio vascular, la endoglina, que despertó nuestro interés.

ENDOGLINA

La endoglina (también conocida como CD105) es una glicoproteína homodimérica transmembrana (184 kDa) identificada en la células proliferantes del endotelio vascular donde está altamente expresada (149). También se expresa en menor medida en otros tejidos como el músculo liso, células mesangiales, fibroblastos, hepatocitos y keratinocitos(150). Actúa como receptor accesorio para el factor de crecimiento transformante β (TGF β)(151).

La endoglina es una proteína integral de membrana de tipo I que presenta un gran dominio extracelular, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citosólico pequeño. Presenta dos isoformas alternativas: la isoforma larga que es la mayoritaria, (L) y la isoforma corta (S) que se diferencian tanto en el tamaño como en la secuencia del dominio intracelular; así la forma L presenta un dominio intracelular de 47 aminoácidos frente a los 14 de la forma S de los cuales 7 presentan una secuencia exclusiva para esta isoforma(152). La endoglina humana presenta una secuencia característica RGD (Arg-Gly-Asp) que es un lugar de adhesión de proteínas presentes en la matriz extracelular, este motivo no se va encontrar en ratón, rata, perro y cerdos.

Estructuralmente la endoglina pertenece a la familia de las proteínas de la zona pelúcida caracterizada por una secuencia de 260 aminoácidos en la región extracelular(153). La región citosólica está fosforilada de forma constitutiva, por lo que puede ser objetivo de serin y treonin kinasas entre las que se incluyen los receptores de TGF β tanto de tipo I (ALK-I) como de tipo II(154).

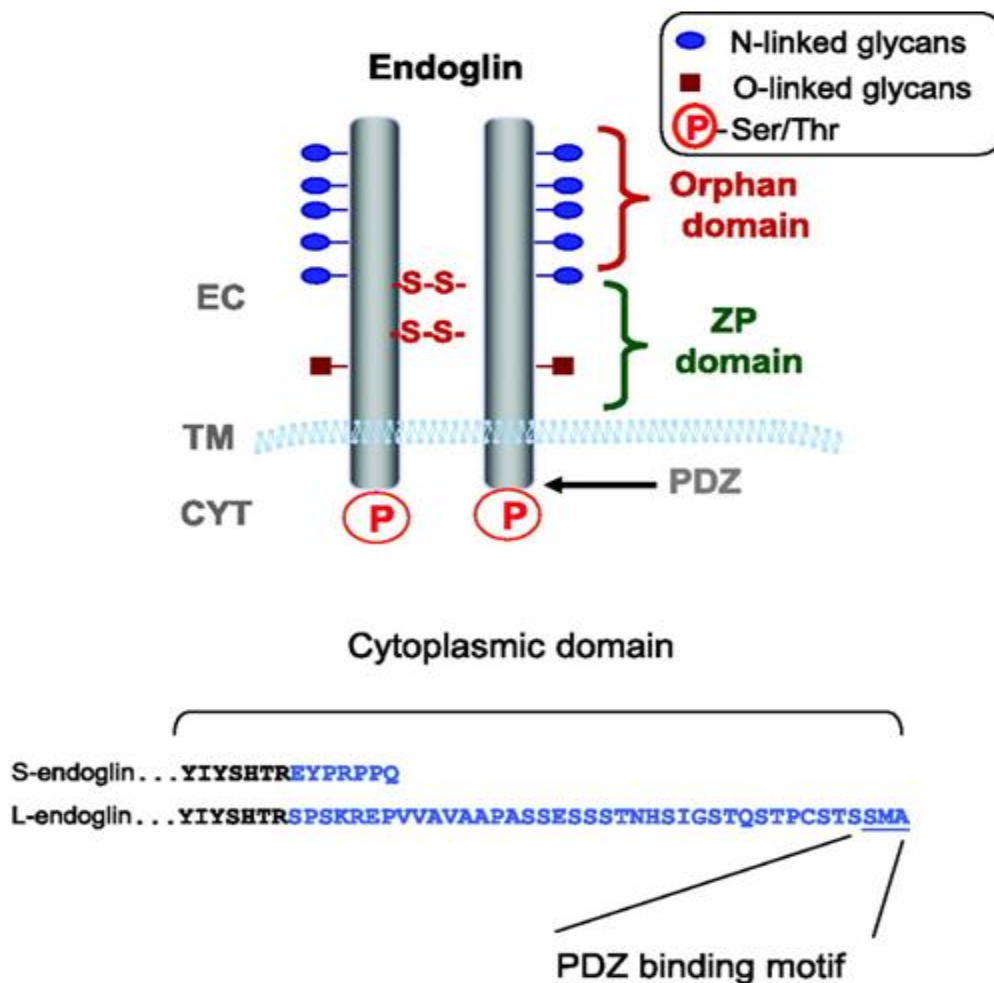


Figura12: Estructura y secuencia de la endoglina(150).

La endoglina es un receptor accesorio de TGF- β que modula la actividad de TGF- β 1 y 3 pero no de TGF- β 2 en numerosos tipos celulares(155). En monocitos humanos, entre otros tejidos, la presencia de endoglina reduce los efectos producidos por TGF- β en la inhibición de la proliferación celular, la expresión de diferentes componentes de la matriz extracelular (proteoglucanos, colágeno, fibronectina e inhibidor del activador del plasminógeno-1)(156-158). Así la inhibición de endoglina mediante el uso de anticuerpos específicos o de RNA antisentido estimula los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular y sobre la migración mediados por TGF- β . Del mismo modo la sobre-estimulación de endoglina contrarresta los efectos inhibitorios anteriormente descritos(159). En células endoteliales la inhibición de endoglina produce un incremento en la apoptosis debida a los efectos de TGF- β y fenómenos de hipoxia. Estos resultados se correlacionan perfectamente con el hecho de que los niveles de endoglina se encuentren incrementados en células endoteliales durante procesos de angiogénesis (160, 161).

La angiogénesis es un proceso complejo y altamente regulado que origina nuevos vasos sanguíneos que permite satisfacer las necesidades metabólicas y de oxígeno de los diferentes tejidos. Este proceso consta de dos fases diferenciadas y coordinadas, una fase de activación y una fase de maduración (162,

163). Las células epiteliales en estado de reposo presentan un ratio de división muy bajo, si bien aquellas que se encuentran involucradas en un proceso de angiogénesis presentan un ratio de división muy elevado. Así durante la fase de activación se originan una serie de ramificaciones desde el vaso principal, esta fase se caracteriza por la degradación de la matriz extracelular y la proliferación de dichas células lo que origina un “brote” que crece en dirección al estímulo angiogénico mediante división del endotelio(164). Este proceso de expansión va a ir remitiendo durante la fase de maduración y se produce el reclutamiento de células mesenquimales que pueden ser pericitos o células de músculo liso vascular (VSMC). Este proceso es muy complejo y se origina debido a interacciones entre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- β y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los animales KO para endogлина mueren durante la gestación debido a defectos cardíacos que se originan por la deficiencia en VSMC. Esto es debido a que la ausencia de endogлина impide las acciones de TGF- β , lo que reduce el reclutamiento de células mesenquimales dando lugar a paredes vasculares defectuosas (165, 166).

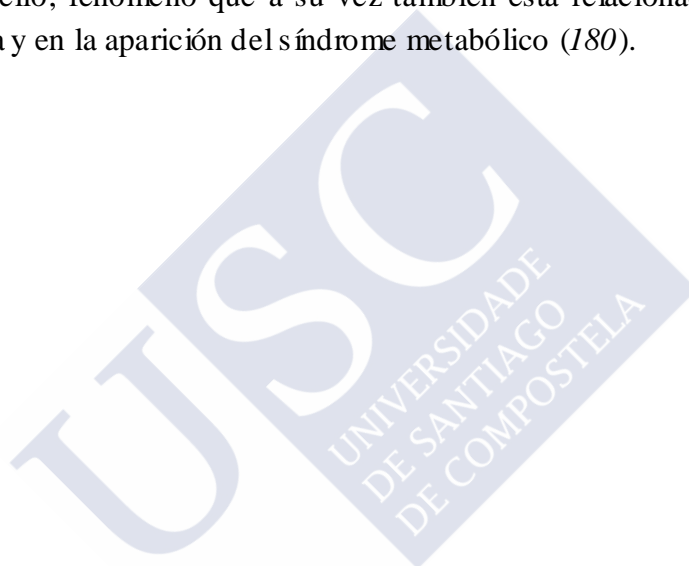
Muchos de los procesos descritos anteriormente ocurren de la misma forma durante la angiogénesis tumoral. La endogлина se encuentra sobre-expresada tanto en las células de los vasos sanguíneos como en células tumorales lo que la convierte en un marcador de diagnóstico de algunos tipos de cáncer. Los animales haploinsuficientes (Eng +/-) a los que se les inocularon células tumorales vía subcutánea presentaban tumores de menor tamaño y con una menor irrigación(167).

Las células mononucleares (MNCs) activadas intervienen en el proceso de reparación de los vasos sanguíneos y presentan niveles elevados de endogлина (168, 169). Inyectando MNCs sanos tanto de individuos sanos como de individuos haploinsuficientes se observa una mejora en la actividad del miocardio, efectos que no ocurren cuando inyectamos monocitos afectados por telangiectasia hemorrágica hereditaria (que son haplodeficientes para endogлина)(170). Los monocitos Eng +/- presenta una menor capacidad para localizar a las células miocárdicas. El proceso de la localización de las células está mediado por SDF-1 α (factor derivado de las células estromales), una quimioquina que regula la adherencia de las células mononucleares a los vasos sanguíneos, donde estimula la proliferación de las células endoteliales en la zona. La liberación de SDF-1 α está regulada por la actividad de VEGF, el cual se encuentra disminuido en células Eng +/- lo que explicaría la reducción en el reclutamiento de MNC, lo que evidencia la conexión existente entre la expresión de endogлина y la reparación vascular(171).

El bloqueo de NO debido a las acciones farmacológicas o bien por motivos genéticos lleva asociado un descenso de la angiogénesis producida como resultado a fenómenos isquémicos(172, 173). La regulación de eNOS está mediada por el estrés endotelial, hipoxia, ciertas hormonas y por factores de transcripción entre los que destaca TGF-1 β . Así, la endogлина presenta un rol importante en la regulación de la expresión de eNOS, un proceso que es llevado a cabo mediante 2 mecanismos. La endogлина es capaz de regular la expresión del mRNA de eNOS a través del receptor de TGF- β e incrementando los niveles de su sustrato Smad2. Este incremento de Smad2 es debido a un incremento en su estabilidad mediante la reducción de la ubiquitinación evitando así su posterior degradación mediante proteasoma. El proceso proteolítico esta mediado mediante Smurf 2 cuya expresión está regulada por endogлина. El segundo mecanismo de regulación está relacionado con el control de la actividad de eNOS. En condiciones fisiológicas para la producción de NO van a ser necesarias la unión de eNOS con endogлина y

Hsp90. En células sin endoglina no se va a producir NO, y en aquellos organismos haploinsuficientes presenta unos niveles de NO inferiores a los controles de fenotipo salvaje (173-176).

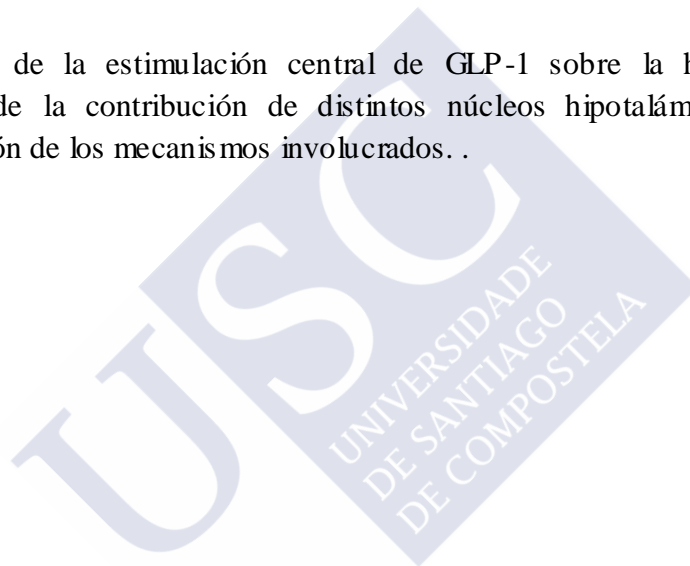
La endoglina presenta un rol esencial en el desarrollo de los vasos sanguíneos ya que su deficiencia da lugar al desarrollo de la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), cuyos afectados presentan una malformación en los vasos sanguíneos de la piel, mucosas y otros órganos internos como los pulmones, el hígado y el cerebro (177). Esta malformación origina hemorragias en todos estos tejidos, debido a la aparición de lesiones vasculares. El mecanismo parece ser debido a los procesos apoptóticos masivos debidos a la haploinsuficiencia de la endoglina. En pacientes con este tipo de patología se ha encontrado alteraciones en la regulación (tanto aumentados como disminuidos) de un 20% de genes involucrados en el control de la homeostasis energética (178), lo que otorga a la endoglina una potencial importancia en procesos metabólicos. Se ha encontrado que existe una correlación positiva entre los niveles de endoglina plasmáticos y la hemoglobina glicosilada circulante en humanos afectados por diabetes de tipo 2 (179). Como se ha comentado antes la endoglina está relacionada con la aparición de problemas en el funcionamiento del endotelio, fenómeno que a su vez también está relacionado con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y en la aparición del síndrome metabólico (180).



OBJETIVOS

Estudiar el papel de la haploinsuficiencia de endoglina sobre la homeostasis energética y metabólica y caracterizar su posible influencia sobre el desarrollo de la obesidad inducida por dieta alta en grasa. .

Estudiar los efectos de la estimulación central de GLP-1 sobre la homeostasis energética y adiposidad. Valoración de la contribución de distintos núcleos hipotalámicos en dichas acciones biológicas y caracterización de los mecanismos involucrados. .





MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para realizar estos experimentos se utilizaron ratas Sprague-Dawley (Animalario General, Universidad de Santiago de Compostela). En todos los diseños experimentales se trata de ratas macho adultas (peso aproximado de 250-300g). Los animales permanecen en el animalario durante 5 ó 6 días antes del experimento, para que se adapten a las condiciones de temperatura y luz. Estas condiciones, que se mantienen constantes, son de 22°C e iluminación controlada con ciclos alternos de 12 horas (luz/oscuridad). Las ratas se alimentan con pienso comercial (SD) (ver tabla 1) y agua ad libitum.

Para los experimentos con ratones se utilizaron ratones macho de la cepa swiss (Animalario General, Universidad de Santiago de Compostela) adultos de 8 semanas de edad (peso aproximando 20 gramos). Los animales permanecen en el animalario durante 5 o 6 días antes del experimento, para que se adapten a las condiciones de temperatura y luz. Las condiciones del estabulario son de 22°C e iluminación controlada con ciclos alternos de 12 horas (luz/oscuridad). Los ratones fueron alimentados con pienso sólido comercial (**tabla1**) y agua ad libitum. En el caso de los modelos de obesidad inducida por dieta, los ratones fueron alimentados con dieta alta en grasa 45% (HFD) (Research Diets 12451; 45% of calories from fat, 4.73 kcal/g, Research Diets, New Brunswick, NJ) durante un periodo de 12-16 semanas. (**Tabla1**)

Los ratones haplodeficientes en endogлина son un modelo genético que se caracteriza porque los animales presentan el gen de la endogлина en haploidía, por lo que presentan niveles reducidos de expresión de endogлина. Estos ratones son utilizados como modelos animales que mimetizan los efectos de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Estos animales fueron producidos a partir de una base genética C57BL/6 y animales de esa cepa fueron utilizados como controles. Los modelos deficientes en endogлина fueron proporcionados por los doctores J.M. López Nova (CSIC y CIBERER) y C. Bemabéu (Departamento de Fisiología y Farmacología Universidad de Salamanca). (181, 182)

Los ratones p53 KO son un modelo extensamente utilizado en el estudio sobre desarrollo y formación de tumores, los animales fueron producidos a partir de una cepa mixta C57BL/6J y 129/Sv. En estos animales se eliminaron un 40% de la capacidad codificadora de dicho gen de tal modo que no origina p53. (183)

Los ratones FGF21 KO fueron obtenidos del Mutant Mouse Regional Center, y se caracterizan porque son de una cepa mixta de C57BL/6J con C57BL/6BCrl. Presentan un bloqueo total de la expresión de FGF21. Este modelo animal fue cedido por el grupo del doctor F. Villarroya (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Barcelona y CIBEROBn).

Los ratones Sirt1 tg fueron obtenidos a partir de una cepa pura de CB57/BL6, la sobreexpresión de Sirt1 en estos animales produce un incremento de entre dos y cuatro veces con respecto a compañeros de camada no transgénicos, este incremento va a afectar tanto a los niveles de RNAm como a los de proteínas.(184) Este modelo animal fue cedido por el grupo del doctor M. Serrano (CNIO).

Todos los procedimientos llevados a cabo sobre animales vivos fueron aprobados por el jefe del servicio provincial de gandería del departamento territorial da consellería do medio rural da provincia de A Coruña bajo los números de procedimiento (15005 AE/12/FUN01/FIS02/RNP1 en el caso de rata y 15005 AE/12/FUN01/FIS02/RNP2 en el caso de ratón) de acuerdo con la legislación vigente(Real Decreto 1201/2005,del 10 de Octubre, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Decreto 296/2008, del 30 de Diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el “Registro de centros de cría”, de suministradores y usuarios y la “Comisión Galega de Benestar dos Animais de Experimentación”. Orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el “Comité de Bioética da Consellería do Medio Rural”. Ley 1/1993, del 13 de abril, de protección de los animales domésticos y salvajes en cautividad. Decreto 153/1998, del 2 de abril, por lo que se aprueba el reglamento que desarrolla la Ley 1/1993, del 13 de abril. Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación transporte, explotación y sacrificio.

Composición	SD(g)	SD(kcal)	HFD(g)	HFD(kcal)
Caseína	200	800	200	800
L-cisteína	3	12	3	12
Almidón de maíz	315	1260	72,8	291
Maltodextrina 10	35	140	100	400
Sucrosa	350	1400	172,8	691
Celulosa	50	0	50	0
Aceite de soja	25	225	25	225
Manteca de cerdo	20	180	177,5	1598
Mezcla de minerales S10026	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato cálcico	5,5	0	5,5	0
Citrato potásico	16,5	0	16,5	0
Mezcla de vitaminas V10001	10	40	10	40
Bitartrato de Colina	2	0	2	0

Tabla1: Composición dieta estándar y dieta alta en grasas.

CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV).

Esta operación debe llevarse a cabo aproximadamente unos 4 días antes del experimento. El objeto de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral. Se utilizan cánulas de polietileno. En el caso de rata se usa el modelo PE-20, de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro interno) y en el caso de ratón se usa el modelo PE-50 (0,58mm de diámetro interno y 0,965 de diámetro externo) (Clay-Adams, Becton-Dickinson, New Jersey, USA)

En uno de los extremos de la cánula se pone un tope, y se corta en bisel a unos 3/4 mm de distancia en el caso de rata y entre 2/3 mm en el caso de ratón, siendo esta parte la que se introduce en el cerebro y que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se sella hasta el momento de la inyección cuando se corta el extremo sellado con una tijera permitiendo la entrada de la aguja para la inyección.

Una vez anestesiados los animales se realiza un corte transversal en la piel de la cabeza a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localiza a simple vista el bregma, que separa frontales de occipitales, y que se utiliza como punto de referencia para realizar un orificio (1.2 mm lateral y 1 mm posterior, 1mm lateral y 0,1mm posterior para rata y ratón respectivamente) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente, se añade cianoacrilato para que la cánula quede perfectamente fijada y se selle toda la zona abierta. Para comprobar que la cánula se ha colocado en la posición correcta, se inyecta Protamina 2%, disuelta en agua con acetato sódico, que claramente tiñe el ventrículo lateral de azul, demostrando así la buena implantación de la cánula.

A través de dicha cánula se lleva a cabo la administración de diferentes tratamientos, en primer lugar llevamos a cabo una dosis respuesta en ratas en la que se inyecta liraglutide a diferentes dosis para determinar la dosis adecuada para experimentos posteriores. Las dosis utilizadas fueron: 1 y 10 µg/rata el grupo de controles se trata con suero fisiológico. Se llevaron a cabo controles de ingesta mediante el peso de la comida, antes de inyectar el fármaco y a 2,4,6,8,24,48 y 72 horas posteriores a la inyección del compuesto. El peso se controló antes de la inyección y a las 24,48 y 72 horas posteriores a la inyección del compuesto.

La misma metodología se ha replicado utilizando ratones como modelo animal. Las dosis utilizadas para ratón son 0,3,1 y 3 µg de liraglutide por ratón, igualmente los controles se tratan con suero fisiológico.

El siguiente experimento se utiliza para contrastar los efectos de liraglutide (3 µg/ratón) con los de GLP-1(1µg/ratón) dosis adaptada de estudios previos (185, 186), a este experimento se añadió un grupo "pair feed" que se caracteriza porque es tratado con vehículo pero tiene el acceso a la comida restringido al peso medio de la comida ingerida por el grupo de liraglutide (3µg/ratón). Se llevaron a cabo una serie de experimentos con animales genéticamente modificados (FGF21 KO, p53 KO y Sirt1Tg) que presentan una metodología experimental compartida. En este tipo de experimentos hay dos genotipos diferentes aquellos que presentan la alteración genética (ya sean KO o transgénicos) y aquellos individuos con un fenotipo salvaje. Cada uno de estos genotipos va a ser tratados tanto con liraglutide (3µg/ratón) como con

suero fisiológico (a modo de controles). Se llevan a cabo controles de ingesta y peso tras 24 horas tras la administración del compuesto.

La doble administración de fármacos a través de las cánulas ICV presenta una metodología experimental más compleja que en el caso de la inyección simple. En este trabajo se llevó a cabo la administración simultánea de AICAR y Liraglutide. En este experimento se establecen 4 grupos experimentales; un grupo control tratado con suero fisiológico, un grupo tratado con liraglutide (3µg/ratón), un grupo tratado con AICAR (5µg/ratón) y un grupo tratado con liraglutide y AICAR, cabe destacar que a todos los animales se les inyecta el mismo volumen independientemente de la sustancia a administrar. Se llevan a cabo controles de ingesta y peso tras 24 horas tras la administración de los fármacos.

IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS

Para la realización de un tratamiento crónico a nivel central se usan minibombas osmóticas (modelo 1007D; Alza Corp., Palo Alto, CA). Estas bombas, que tienen un volumen de expulsión constante de aproximadamente 0,5 µl/hora, se rellenan con el compuesto a utilizar o su vehículo hasta un volumen total de aproximadamente 103 µl, y se ponen en fisiológico en un baño a 37 °C durante, al menos, 4 horas previas a la operación para asegurar que ya están liberando el tratamiento cuando se colocan sobre el animal, durante el proceso de montaje de las bombas se les acopla un tubo de silicona. Para colocar estas bombas se procede a realizar una canulación ICV seguida de un corte en la zona lumbar de la rata, practicando un bolsillo mediante la separación de la piel de las capas inferiores para crear el espacio suficiente para implantar la minibomba, una vez la bomba se encuentra colocada en la zona lumbar se acopla el tubo de silicona a la cánula y se sella la unión con cianoacrilato. Una vez en el interior, se sutura el corte para evitar que la minibomba se desplace.

La implantación de bombas osmóticas se ha llevado a cabo tanto en individuos normales como con individuos obesos. En ambos experimentos se utilizaron tres grupos experimentales; Controles (Suero Fisiológico), Liraglutide (3µg/ratón) y “pair feed” (tratados con suero fisiológico, comida restringida).

ADMINISTRACIÓN EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS.

Una vez anestesiados los animales y comprobado el plano quirúrgico, se les practica un corte de aproximadamente un centímetro en la piel de la cabeza, perpendicular a la sutura sagital del cráneo y se retira el tejido subcutáneo dejando el cráneo al descubierto. A continuación, los animales son inmovilizados en un marco estereotáxico (David Kopf Instruments). Las inyecciones se realizan de forma bilateral en cada núcleo (una inyección en cada hemisferio) con una microjeringa Hamilton (Hamilton, Serie 700, Modelo 7001, Vol. 1µL calibre 25) dirigida a las coordenadas estereotáxicas propias de cada núcleo que se determinan siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico Paxinos G. & Watson C de cerebro de rata. El sistema inyector se mantiene en las coordenadas durante 5 minutos adicionales posteriores a la administración intranúcleo. Una vez finalizada la inyección y retirada la microjeringa, la piel de la cabeza se fija al cráneo con cianoacrilato.

Se llevaron a cabo inyecciones en el núcleo arcuato, paraventricular, dorsomedial, lateral y ventromedial en los dos hemisferios cerebrales. **(Tabla 2)**

	Anterior	Lateral	Ventral
Arcuato	2,8 mm	0,3 mm	10,2 mm
Lateral	2,85 mm	2 mm	8,1 mm
Dorsomedial	3,12 mm	0,5 mm	8,6 mm
Paraventricular	1,9 mm	0,5 mm	8 mm
Ventromedial	2,85 mm	0,6 mm	10 mm

Tabla2: Coordenadas estereotaxia inyección directa de Liraglutide.

Los grupos experimentales utilizados en este experimento son controles (suero fisiológico) y liraglutide (10µg/rata). Después de la cirugía los animales fueron sometidos a un proceso de analgesia mediante la inyección de ácido acetil salicílico (300µg/Kg). Se llevaron a cabo controles de peso e ingesta a las 24 horas tras la cirugía.

En el núcleo ventromedial también se llevó a cabo la sobreexpresión de AMPK mediante el uso de vectores adenovirales (1×10^9 pfu tanto de AMPK-CA como de GFP que actúa como control) y la inyección simultánea de liraglutide. Para esto se diseñaron cuatro grupos experimentales distintos: Vehículo+GFP, Liraglutide (10µg/rata)+GFP, Vehículo+pAMPKCA y Liraglutide (10µg/rata)+pAMPK-CA. Se administró ácido acetil salicílico (300µg/Kg) y se llevaron a cabo controles de ingesta y peso a las 24 horas.

TEST DE AVERSIÓN CONDICIONADA AL SABOR

Este experimento se realiza para averiguar si el tratamiento con una determinada sustancia está causando algún tipo de reacción adversa en los animales. Para ello, se intenta asociar el tratamiento con sabor dulce (bebida preferida al agua por los animales).

Así, durante los cinco primeros días de experimento se restringe a 2 horas diarias el acceso a la bebida (agua normal), mientras que el día del tratamiento, en el mismo momento de la administración de la sustancia, se le da de beber durante media hora la bebida dulce (agua con sacarina).

Metodología Experimental:

Grupos experimentales:

Vehículo (Suero Fisiológico) IP + Vehículo (Suero Fisiológico) ICV.

LiCl IP + Vehículo (Suero Fisiológico) ICV.

Vehículo (Suero Fisiológico) IP + Liraglutide (3µg/ratón) ICV.

La administración de LiCl intraperitoneal va a generar malestar intestinal. Al día siguiente, a la misma hora que se les permitió el acceso a la bebida los días anteriores, se le ofrecen a cada animal dos botellas, una con agua y otra con sacarina. Si el tratamiento administrado les causa algún tipo de malestar, los animales asociarán el sabor dulce con ese malestar, y elegirán preferentemente el agua corriente como

bebida. Mientras que si el tratamiento no tiene ningún tipo de efecto en el animal, optará por beber la bebida dulce. En el caso del LiCl los animales van a presentar siempre preferencia por el agua corriente.

TEST DE EXPOSICIÓN A FRÍO.

A los animales se les afeita la región escapular el día previo al experimento de exposición a frío. El día del experimento los ratones son estabulados en una cámara fría a 4°C durante 6h. Se mide la temperatura por vía rectal (BAT-12 Microprobe-Thermometer; Physitemp, Clifton, NJ) cada 60 minutos siendo la primera medida antes de entrar en la cámara fría. En aquella medida en las que se produzca una diferencia de temperatura significativa se sacan fotos con una cámara térmica (E60bx: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR, West Malling, Kent, U.K.) que son analizadas mediante software específico (FLIR-Tools-Software; FLIR).

TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y A LA INSULINA (GTT E ITT)

Los test de tolerancia a glucosa e insulina nos permite conocer la capacidad que tiene el metabolismo de un individuo para tolerar la glucosa y el grado de resistencia a insulina. Para esto la noche previa al test dejamos a los animales en ayuno, una vez pasada la noche tomamos una medida de los valores de glucosa basales, tomando una muestra de sangre a través de la cola y la depositamos en una tira reactiva conectada a un glucómetro. A continuación pesamos los animales e inyectamos glucosa o insulina IP en función de su peso y del test a realizar (2 gr/kg de D-glucosa y 0,75U/Kg de insulina respectivamente). Se toman medidas de glucosa sanguínea a través de la cola a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección.

Con los datos obtenidos se construye una curva a partir de la cual se calcula el Área Bajo la Curva (AUC) de cada uno de los grupos experimentales por separado.

FENOTIPADO METABÓLICO.

El fenotipado metabólico se lleva a cabo mediante un sistema de calorimetría indirecto formado por jaulas individuales que presentan ventilación y sensores que registran la actividad locomotora (LA), el gasto energético (EE), cociente respiratorio (RQ). También presenta sensores específicos para el control de la ingesta de comida y agua (PhenoMaster, Sophisticated Life Science Research Instrumentation, TSE system, Germany). Los animales permanecen las 48 horas previas al experimento en unas cajas especiales para que se adapten al tamaño de la jaula y al sistema de comida y bebida que presenta el sistema de fenotipado, pasado este periodo los animales se estabulan en la cajas metabólicas y permanecen dentro durante un período de 24/48 horas durante el cual se llevan a cabo la toma de medidas para los diferentes parámetros.

PERFUSIÓN INTRACARDÍACA

El cerebro de los animales se fija mediante perfusión intracardiaca como paso previo al estudio inmunohistoquímico. Tras la anestesia intraperitoneal del animal con el anestésico habitual y comprobar el plano quirúrgico se procede a la apertura de la cavidad abdominal. Tras la localización del apéndice xifoides, este se levanta ligeramente con unas pinzas procediendo a la rotura del diafragma y al corte de las parrillas costales. Tras la apertura de la caja torácica y del pericardio, a continuación se administra mediante una inyección intracardiaca 200 µl de heparina (*Heparina sódica Mayne 5%; Mayne Pharma*) en el ventrículo izquierdo, con el fin de evitar problemas de coagulación en los vasos durante la perfusión.

A continuación, se realiza una pequeña incisión en la punta del ventrículo izquierdo por la cual se introduce una cánula hasta llegar a la raíz de la aorta. Tras pinzar la vía se secciona la orejuela de la aurícula derecha. A través de dicha vía se bombea una solución de suero fisiológico 0.9% NaCl, con el fin de eliminar la sangre del sistema circulatorio. La decoloración del hígado, así como la de la propia solución salina que sale por la orejuela seccionada marca el inicio del proceso de fijado. A través de la misma vía se introducen 500 ml de una solución de formalina (100mM) en tampón fosfato pH=7.4) durante aproximadamente 10 minutos. La eficacia de la perfusión puede constatarse por la rigidez plena del animal. Los tejidos son diseccionados y mantenidos en la solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se realizan un par de lavados en tampón fosfato.

INCLUSIÓN EN PARAFINA

Una vez fijadas las muestras mediante perfusión intracardíaca se lleva a cabo la inclusión en parafina que permite conservar y contar las muestras en sección de pocos micrómetros de espesor. El primer paso de este proceso es la eliminación del agua presente en la muestra ya que la parafina es inmisible con ella, para esto se pasa la muestra por una serie de baños de etanol seriados, se llevan a cabo tres baños de 10 minutos, en etanol de 70°,90°,96° y etanol absoluto. Posteriormente se la muestra se sumerge en un sustancia que sea miscible tanto con el etanol como con la parafina, en nuestro caso xileno (3 baños de 10 minutos). La muestra se sumerge en parafina previamente fundida, se llevan a cabo tres pases de una hora cada uno. Finalmente se trasvasa la parafina líquida en un molde y se deja enfriar para que se forme un bloque con la muestra en su interior. A partir de este bloque se llevan a cabo secciones de 6µm que se sitúan en un portaobjetos para ser posteriormente teñida con hematoxilina- eosina.

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.

Previo a la tinción hematoxilina-eosina hay que preparar la muestra, el primer paso es proceder al desparafinado de la misma para lo que se realizan dos baños en xileno de 10 minutos. Posteriormente se llevan a cabo una serie de incubaciones (2 baños de 10 minutos) en una serie de disoluciones de etanol de concentración descendiente (50°, 70°,80°,96° y etanol absoluto) tras esto se sumergen la muestras en agua destilada para finalizar el proceso de hidratación.

La fase de tinción propiamente dicha comienza con la inmersión de la muestra en hematoxilina durante 10 minutos. Para eliminar los restos de la hematoxilina, las muestras se sumergen en agua corriente seguida de dos lavados en agua destilada de 5 minutos. Una vez eliminados los restos de hematoxilina comienza la exposición de la muestra a la eosina durante dos minutos. Se mantiene 3 minutos en etanol de 70°, seguido de 5 minutos en etanol 96° y finalizando la deshidratación de la muestra con dos lavados con etanol absoluto. Posteriormente se trata la muestra con xileno (2 inmersiones de 10 minutos) y finalmente se aplica medio de montaje para finalizar las preparaciones y permitir su observación al microscopio.

MEDIDA DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Para la realizar las medidas de composición corporal se ha usado la técnica de resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI). Las medidas se realizan antes del tratamiento y el último día de tratamiento, previo al sacrificio de los animales.

WESTERN BLOT (WB):

El western blot es una técnica que nos permite detectar proteínas específicas dentro de una mezcla compleja de las mismas. Además esta técnica nos permite cuantificar los niveles de una proteína de interés en una muestra. El western blot consta de diferentes pasos:

Extracción de proteínas totales:

Se realiza todo el proceso en hielo para evitar que las proteínas se degraden. Las muestras de tejido se introducen en tampón de lisis (en una proporción 1:5 peso:volumen), y posteriormente son homogenizadas mecánicamente. Se centrifuga a 13500 rpm a 4°C durante 30 minutos. En el sobrenadante se determina la concentración de proteína (método colorimétrico Bradford) mediante el reactivo Bio-Rad Protein Assay Kit, (Bio-Rad Laboratorios, Inc., Richmond, CA). En el caso de tejido adiposo (fundamentalmente blanco aunque puede ocurrir en también e pardo) es necesario llevar a cabo varias centrifugaciones seguidas del retirado del sobrenadante, este proceso permite ir reduciendo progresivamente los lípidos en la muestra que interfieren con las determinaciones posteriores. Se añade el tampón de carga y tampón de lisis, y se calientan a 95°C durante 10 minutos.

Electroforesis y Transferencia.

La separación por peso de las proteínas se realiza por electroforesis en geles SDS-PAGE, compuesto por dos fases:

Fase superior o stacking que se caracteriza porque presenta un tamaño de poro muy amplio que permite que las proteínas entren en la segunda fase formando una mezcla homogénea.

Fase inferior o separadora que permite la separación de las proteínas exclusivamente en función del tamaño. El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del tamaño de las proteínas a estudiar.

La cantidad total de proteína cargada es de 40 µg de hipotálamo y 20 µg de tejido adiposo pardo e hígado o 15 µg en el caso del tejido adiposo blanco. Para determinar el peso de las proteínas y confirmar la transferencia de las muestras se utiliza un marcador comercial (Precision plus protein Standard, Bio-RAD)

Para cargar el gel, la proteína se lleva a un volumen de 16 µl con tampón de lisis, y se le añade tampón de carga 5X (el tampón de carga debe de quedar en la muestra a 1X). La electroforesis se realiza durante 60-75 minutos bajo las siguientes condiciones: Voltaje constante 130 V y Amperaje 180 mA.

La transferencia (Transferencia Semiseca) se realiza sobre membrana de PVDF (Millipore), que debe ser activada previamente (5 minutos en Etanol, 2 minutos en H₂O destilada y 2 minutos en Tampón de Transferencia). Duración transferencia: 90 minutos a 25 V y 180 mA. Finalizada la Transferencia se bloquea la membrana con exceso de proteína (BSA 3%) durante 60 minutos de agitación a temperatura ambiente.

Inmunodetección.

Se lava la membrana con solución de lavado TBS-TWEEN 0.1 % en 3 lavados de 10 minutos.

Se incuba con el Anticuerpo primario toda la noche a 4°C ó 2 horas a T^a ambiente en solución de bloqueo (TBS-TWEEN al 0.1% + 3% BSA) en agitación (**Tabla5**). Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la TBS-TWEEN.

Se incuba 1 hora a T^a ambiente con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo, este anticuerpo secundario está conjugado con HRP y quimioluminiscencia. (**Tabla5**) Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la TBS-TWEEN.

Se incuba la membrana durante 1-2 minutos con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia a volúmenes iguales (1ml de cada), en oscuridad y sin agitación.

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

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

Para rehibridar la membrana con otros anticuerpos es necesario incubarla en solución de “stripping” durante 30 minutos a 50°C. Así se consigue despegar el anticuerpo de la membrana. A continuación se lava con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos) y se procede a bloquear de nuevo la membrana. Para conservar la membrana para futuros experimentos se lava en PBS, se seca al aire sobre un papel de filtro y se guarda.

Disoluciones Western Blot

Tampón de lisis: (500ml): 3.0285 ml TRIS-HCl pH=7.5, 5 ml Triton X-100 v/v, 0.185 ml EDTA, 0,19 ml EGTA, 0.092 ml Ortovanadato sódico, 1.0495 ml Fluoruro Sódico, 1.115 ml Pirofosfato Sódico, y 42.75 Sacarosa. Esta solución se conserva a 4° C y en el momento de su uso se le añaden los inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics): 1 pastilla de cóctel de inhibidores/5ml tampón de lisis.

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

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

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

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

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

TBS-TWEEN (1l): (24,2 g Tris - Base, 80 g NaCl y 1 ml Tween 20© en un volumen final de 1L, a un pH=7.6)

Sustrato de Quimioluminiscencia: Pierce® ECL Wb substrate6 (Thermo scientific)

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución	Anticuerpo Secundario	Casa comercial	Dilución
NFκβ	Santa cruz biotechnology	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
pAKT	Cell Signaling	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
AKT	Cell Signaling	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
PTEN	Santa cruz biotechnology	1:1000	Anti-Ratón	Dako Cytomation	1:5000
GLUT4	Santa cruz biotechnology	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
UCP1	Abcam	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
UCP3	Abcam	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
CIDEA	Santa cruz biotechnology	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
PRDM16	Abcam	1:1000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
pAMPK	Cell Signalling	1:2000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
pACC	Millipore	1:500	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
ACC	Millipore	1:2000	Anti-Conejo	Dako Cytomation	1:5000
β-Tubulina	Sigma Aldrich	1:5000	Anti-Ratón	Dako Cytomation	1:5000
GAPDH	Millipore	1:5000	Anti-Ratón	Dako Cytomation	1:5000

Tabla3: Referencia de anticuerpos primarios y secundarios, diluciones de uso y casa comercial.

PCR EN TIEMPO REAL (REAL TIME PCR).

La PCR en tiempo real es una técnica que nos permite cuantificar los niveles de expresión de un gen determinado mediante el estudio de los niveles de mRNA. Debido a la inestabilidad de las moléculas de RNA previamente se realiza un proceso de retrotranscripción para obtener cDNA que es una molécula que presenta una mayor estabilidad.

Extracción de RNA total.

Las muestras congeladas fueron homogenizadas mecánicamente después de añadirle 650 μ l de de Trizol (Invitrogen).

Agregar 350ul cloroformo. Agitar y dejar 5 min a temperatura ambiente para q se separen las fases.

Con cuidado poner en la centrífuga (que debe estar a 4°C) a 12.000 rpm durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante donde se encuentra el RNA, en la fase fenólica se encuentran el resto de componentes celulares.

Agregamos isopropanol en relación 1:1 con la cantidad de sobrenadante q hayamos extraído más 200ul. Agitamos las muestras y las ponemos 10 min en el -20 para q precipite el RNA.

Centrifugamos 10min a 12.000 rcf a 4°C

Decantamos en un solo movimiento, teniendo cuidado de no perder el pellet. Agregamos 1 ml de Etanol al 75% a cada muestra. Agitamos y centrifugamos durante 10min a 12.000 rpm.

Nuevamente decantamos las muestras seguidas de un spin de 1minuto para eliminar todos restos de isopropanol de las paredes del tubo. A continuación retiramos los restos y disolvemos dicho pellet en agua DEPC.

Retrotranscripción.

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

Volumen de muestra necesario para obtener: 500 ng de (grasa parda o blanca) ó 100 ng (hígado) de RNA total

6 μ l de tampón de reversotranscripción

1.5 μ l ClMg2 de 50 mM (Invitrogen)

6 μ l de mezcla de dNTPs

0.17 μ l de cebadores (Random primers, Invitrogen)

0.25 μ l inhibidor de RNasa (RNaseOUT®, 40 U/ μ l Invitrogen)

2 μ l de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/ μ l, Invitrogen)

Volumen correspondiente de H₂O MQ para obtener el volumen final de 30 μ l

En la reversotranscripción se carga una muestra a mayores que es un control negativo (30 μ l de mezcla de reacción excepto MMLV, cuyo volumen era sustituido por H₂O MQ).

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

PCR Tiempo Real (TAQMAN)

Se usa como sistema de detección las Sondas Taqman (Sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas, de tal modo que cuando la sonda está íntegra, la fluorescencia entre ambos fluorocromos se anula.

El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580nm. Los primers usados fueron diseñados según la base de datos BLAST del NCBI. La mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final era de 12 µl estaba constituida por:

2.92 µl H₂O-MQ

0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM) (**Tabla6**)

0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM)(**Tabla6**)

0.36 µl Sonda (5 µM)(**Tabla6**)

6 µl Taqman Universal PCR máster mix; (Applied Biosystems)

2 µl Muestra (RT)

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

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

Las condiciones de amplificación fueron de:

1) 50°C durante 2 minutos

2) 95°C durante 10 minutos,

3) 95 ° durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Número de ciclos: 40

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

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

Disoluciones Real Time PCR:

TRIZOL® Reagent (Invitrogen)

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

Tampón de Reverso Transcripción:(5X first strand buffer; Invitrogen)(250 nM Tris -HCl, pH 8.3, 375nM KCl, 15mM MgCl₂, 50nM DDT)

Mezcla de Nucleótidos: (dTTP, dCTP, dGTP, dATP, con una concentración de 10 mM de cada uno.

Gen	Secuencia
18S	FW 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3' RV 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3' PB 5'-GAC GGC AAG TCT GGT GCC AGC A-3'
HPRT	FW 5'-AGC CGA CCG GTT CTG TCA T-3' RV 5'-GGT CAT AAC CTG GTT CAT CAT CAC-3' PB 5'-CGA CCC TCA GTC CCAGCG TCG TGAT-3'
ACC α	FW 5'-TGG GCG GGA TGG TCT CTT T-3' RV 5'-AGT CGC AGA AGC AGC CCA TT-3' PB 5'-ACC TTT GAA GAT TTC GTC AGG ATC TTT GAT GA-3'
ADRB1	FW 5'-CCC CAA GTG CTG CGA TT-3' RV 5'-AGG TAC ACG AAG GCC ATG ATG-3' PB 5'-TCG TCC GTC GTC TCC TTC TAC GTG C-3'
ADRB2	FW 5'-GTG GAT CGC TAT GTT GCT ATC ACA-3' RV 5'-CAC TCG GGC CTT ATT CTT GGT-3' PB 5'-CGC CCT TCA AGT ACC AGA GCC TGC T-3'
ADRB3	FW 5'-CAC CGC TCA ACA GGT TTG ATG-3' RV 5'-CCC AGA AGT CCT GCA AAA ACG-3' PB 5'-ACG TGA AGG GCC GTG AAG ATCC AGC-3'
BMP7	FW 5'-TCC TCA CTG ACG CCG ACA T-3' RV 5'-GGT ATC GAG GGT GGA AGA ATT CT-3' PB 5'-TCA TGA GCT TCG TCA ACC TAG TGG AAC ATG-3'
CEBP α	FW 5'-GTG CGT AAG AGC CGA GAT AA-3' RV 5'-TGG TCA ACT CCA ACA CCT TCT G-3' PB 5'-AAA CAG CGC AAC GTG GAG ACG CA-3'
CEBPB	FW 5'-CAG AGT AGC CCC TTG TCT TTT GG-3' RV 5'-GGA TTG CAG GTC AGA CAC AGA A-3' PB 5'-TGA GGA TAG CCA GGT CAA AGC CCA-3'
CIDEA	FW 5'-CCT ACG ACA TCC GAT GCA CAA-3' RV 5'-TCT GTG CAG CAT AGG ACA TAA ACC-3' PB 5'-CTT CAA GGC CGT GTT AAG GAA TCT GCT G-3'
CPT-1M	Commercial primers provided by Applied Biosystems (Reference Rn01407782_g1)
FAS	Commercial primers provided by Applied Biosystems (Ref.Mm01253292 m1)
FGF21	FW 5'-CAC TCT GGT ACC CAG GAC CAA TAA-3' RV 5'-CCC TCA ACT TTT CTC TGC CTA GGT-3' PB 5'-ACA AGA GTA GAG GTG GTG GGC AGA ATG CC-3'
INSIG2	FW 5'-CGT GCT GCG GTA CAG CC-3' RV 5'-GGC TCT CCT AGA TGC CTG TCA-3' PB 5'-CAG CTG TGA TTG GAC TAT TGT ACC CCT GCA-3'
LPL	FW 5'-GGG AAA TGA TGT GGC CAG ATT-3' RV 5'-CCC TAA GAG GTG GAC GTT GTC T-3' PB 5'-ACT GGA TGG AGG AGG AGT TTA ACT ACC CCC-3'
NOR1	FW 5'-CGC CGA AAC CGA TGT CAG TA-3' RV 5'-ACC TCT CCT CCC TTT CAG ACT GTC T-3' PB 5'-AGT GTC GGA TGG TTA AGG AAG TTG TGC GT-3'
PGC1 α	FW 5'-CGA TCA CCA TAT TCC AGG TCA AG-3' RV 5'-CGA TGT GTG CGG TGT CTG TAGT-3' PB 5'-AGG TCC CCA GGC AGT AGA TCC TCT TCA AGA-3'

PPAR α	Commercial primers provided by Applied biosystems (Ref. Mm0044039 m1)
PPAR γ	FW 5' -CG TGC TGC GGT ACA GCC-3' RV 5' -CGC CAA CAG CTT CTC CTT CTC-3' PB 5' -ATG TCT CAC AAT GCC ATC AGG TTT GGG C-3'
PRDM16	Commercial primers provided by Applied biosystems (Ref. Mm01266512 m1)
SREBP1c	FW 5' -GCG GCT GTT GTC TAC CAT AAG C-3' RV 5' -TGT TGC CAT GGA GAT AGC ATC TC-3' PB 5' -ACC AGC TGC ATG CCA TGG GCA AGT A-3'
UCP1	FW 5' -CGA CTG CCA TGT ACA CCA AGG-3' RV 5' -CCC GAG TCG CAG AAA AGA AG-3' PB 5' -ACC GAC GGC CTT TTT CAA AGG GTT TG-3'
UCP3	Commercial primers provided by Applied biosystems (Ref. Rn00565874 m1)
LPL	FW 5' -GGG AAA TGA TGT GGC CAG ATT-3' RV 5' -CCC TAA GAG GTG GAC GTT GTC T-3' PB 5' -ACT GGA TGG AGG AGG AGT TTA ACT ACC CCC-3'
G6Pase	FW 5' -CCA GGT CGT GGC TGG AGT CT-3' RV 5' -TGT AGA TGC CCC GGA TGT G-3' PB 5' -CAG GCA TTG CTG TGG CTG AAA CTT TCA G-3'
PEPck	FW 5' -CCA CAG CTG CTG CAG AAC AC-3' RV 5' -GAA GGG TCG CAT GGC AAA-3' PB 5' -AGG GCA AGA TCA TCA TGC ACG ACC C-3'
NF κ B	FW 5' -GCC GTG GAG TAC GAC AAC ATC T-3' RV 5' -GTG TAG TCC CAT CAT AGG TGG TAC TGT-3' PB 5' -CTG CTT CTG GAG GGT GAT GCC CAC-3'

Tabla4: Oligonucleótidos y sondas usados en la PCR en tiempo real.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio inmunohistoquímico, el cerebro se fija mediante perfusión intracardiaca tal y como se detalló anteriormente. Una vez fijados los tejidos del animal, se extrae el cerebro y se mantiene inmerso en la misma solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1M durante 1 hora. Las secciones se realizan en un vibrotomo (*Vibratome® Series 1000*) en secciones de 50 μ m de espesor. Las secciones se recogen en buffer fosfato.

Detección inmunohistoquímica de la expresión de c-FOS:

- Incubación en anticuerpo primario c-FOS (*Santa Cruz*) en dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C.
- H₂O₂ 3% en agua destilada (para inhibir la peroxidasa endógena) 10 min
- Como sistema de detección se utilizó *EnVision policlonal* (polímero de dextrano conjugado con anticuerpos anti-conejo y con peroxidasa; *Dako*) 30 min.
- DAB (*Dako*) 10 min, preparada siguiendo el protocolo del fabricante (1 gota de DAB en 1 mL del disolvente suministrado).

Entre cada uno de los pasos se realizan 2 lavados de 10 min cada uno.

Al finalizar la reacción las secciones se extienden en portas xilanzados (*Histobond*) dejándolos secar y posteriormente se deshidratan (etanol), se aclaran (xilol) y se montan con un medio de montaje permanente.

La reacción fue observada y fotografiada bajo un microscopio *Provis AX70 (Olympus Corp.; Tokyo, Japan)*. El número de células teñidas en cada sección se usa como número representativo de células con inmunoreactividad positiva de c-FOS.

SELECCIÓN DE PACIENTES.

Para determinar los efectos potenciales de los agonistas de GLP-1 en humanos, se estudiaron 25 pacientes obesos y con diabetes de tipo 2 emparejados por género, edad e índice de masa corporal (BMI) antes y después del tratamiento antidiabético de 12 meses (+/- 3 meses). Los pacientes fueron sometidos a uno de los siguientes tratamientos: metformina, metformina junto con exenatide o bien metformina junto con liraglutide. La dosis inicial de metformina es de 500mg por vía oral dos veces por día, la dosis fue aumentada a 1000mg por vía oral dos veces por día por vía oral. En el caso de exenatide en la dosis es de 5µg subcutáneo dos veces al día incrementada tras dos semanas a 10 µg subcutáneos 2 veces al día. A los pacientes tratados con liraglutide se les administró una única dosis diaria de 0,6µg subcutáneos que fueron, tras dos semanas, ampliados a 1,2µg subcutáneos en única administración. Se añadió un grupo que solo ha sido tratado con metformina. Todos los pacientes son de origen Caucasoide atendidos en el Departamento de Endocrinología de la Clínica Universitaria de Navarra y se sometieron a una evaluación clínica, incluyendo la historia clínica, examen físico, análisis de la composición corporal, la evaluación co-morbilidad, así como entrevistas nutricionales realizadas por un equipo de consulta multidisciplinaria. Todos los sujetos fueron no fumadores y no mostraban signos de infección. Los criterios de inclusión fueron: edad entre 20 y 80 años, niveles de hemoglobina A1c (HbA1c) $\geq 7,0\%$ y ningún tratamiento previo con insulina y / o una sulfonilurea. Los criterios de exclusión incluyeron lactantes o mujeres embarazadas, hipertensión no controlada tratados o no, niveles de péptido C $<0,1$ ng / ml en ayuno, la hipoglucemia recurrente o hipoglucemia asintomática, la presencias de retinopatía proliferativa o maculopatía que requiera tratamiento agudo, insuficiencia renal definida como s creatinina-sérica ≥ 133 mmol / l en hombres y ≥ 124 mmol / l para las mujeres, historial de pancreatitis crónica o pancreatitis aguda idiopática, algún evento coronario agudo, insuficiencia cardíaca, otro evento cardíaco o un derrame cerebral, alteraciones tiroideas, alteraciones hematológicas o consumo de cualquier fármaco que afecte a la homeostasis energética.

La inyección de exenatide o liraglutide se llevó a cabo en la parte superior del brazo, en el abdomen o en el muslo mediante el uso de un bolígrafo precargado. La administración de exenatide se lleva a cabo antes de dos de las principales comidas de día separadas por un mínimo de 6 horas (idealmente antes del desayuno y de la cena). En el caso de liraglutide se animó a los pacientes a que se inyectaran el fármaco a la misma hora todos los días.

Los procedimientos llevados a cabo en pacientes humanos fueron aprobados por el Comité Ético de la Clínica Universitaria de Navarra de acuerdo a la normativa expuesta en la Convención de Helsinki, todos los pacientes han sido debidamente informados y han dado su aprobación para ser incluidos en este estudio.

ANTROPOMETRÍA.

Para calcular el índice de masa corporal, el peso se ha medido utilizando una balanza con escala digital con un límite de detección de 0,1Kg, la altura ha sido medida utilizando un estadiómetro Holtain

(Holtain Ltd., Crymych, UK) con un límite de detección de 0,1cm. La circunferencia de la cintura fue determinada entre la cresta ilíaca y la caja torácica en la región medioaxilar. La grasa corporal fue estimada mediante pletismografía de desplazamiento de aire (Bod-Pod®, Life Measurements, Concord, California, USA).

CALORIMETRÍA INDIRECTA.

El gasto energético en reposo (REE) y el cociente respiratorio (RQ) fueron determinados mediante un sistema ventilado de circuito abierto durante una noche en ayuno (Vmax29, SensorMedics Corporation, Yorba Linda, California). Tras el ajuste por la composición corporal el REE se compara con la medidas estándar para el REE se rigen por ecuaciones específicas que dependen de la edad y el sexo. La actividad física se ha validado utilizando cuestionarios. Basado en los datos de REE y de actividad física se calcula el gasto energético total para cada uno de los individuos. Los pacientes recibieron consejo dietético por parte de un experto después de las medidas basales. Tanto el gasto energético como la actividad física fueron medidas antes y después del tratamiento durante 12 meses.



TRATAMIENTO	METFORMINA		METFORMINA +EXENATIDE		METFORMINA+LIRAGLUTIDE		Significancia
	Pre-Metformina	Post-Metformina	Pre-Exenatide	Post-Exenatide	Pre-Liraglutide	Post-Liraglutide	
Variables							
Género (h/m)	7/3	7/3	8/3	8/3	10/4	10/4	n.s.
Glucosa (mmol/l)	10.2 +/- 0.6	8.3 +/- 0.5*	10.8 +/- 0.5	8.1 +/- 0.6*	10.9 +/- 1.0	8.0 +/- 0.9*	n.s.
Insulina (mmol/l)	131.4 +/- 15.0	100.3 +/- 12.6*	136.4 +/- 11.2	105.7 +/- 12.0*	137.0 +/- 13.1	104.8 +/- 10.5*	n.s.
HbA1c (%)	8.57 +/- 1.24	6.77 +/- 1.20*	8.49 +/- 1.18	7.01 +/- 0.99*	8.50 +/- 1.33	7.02 +/- 1.08*	n.s.
Triglicéridos (mmol/l)	1.9 +/- 0.4	1.8 +/- 0.7 [†]	2.1 +/- 1.2	1.7 +/- 0.8 [†]	2.0 +/- 0.9	1.8 +/- 0.7 [†]	n.s.
Colesterol Total (mmol/l)	5.2 +/- 0.5	5.1 +/- 0.8 [†]	5.3 +/- 0.7	5.5 +/- 0.8 [†]	5.6 +/- 0.9	5.5 +/- 0.8 [†]	n.s.
Colesterol-LDL (mmol/l)	3.4 +/- 0.5	3.5 +/- 0.9 [†]	3.6 +/- 0.6	3.5 +/- 0.7 [†]	3.6 +/- 0.6	3.4 +/- 0.7 [†]	n.s.
Colesterol-HDL (mmol/l)	1.1 +/- 0.2	1.2 +/- 0.4 [†]	1.2 +/- 0.3	1.1 +/- 0.4 [†]	1.4 +/- 0.5	1.2 +/- 0.4 [†]	n.s.

Tabla5: Características bioquímicas en ayuno de los pacientes con diabetes tipo 2. HbA1c, hemoglobina ; LDL, Lipoproteínas de baja densidad; HDL, Lipoproteínas de alta densidad (Test-t de Student Metformina n=10; Metformina + Exenatide n=11; Metformina + Liraglutide n=14).

DETERMINACIONES SANGUÍNEAS

En roedores, la glucosa plasmática se midió por el método de la oxidasa de la glucosa (glucosa y triglicéridos Spinreact, España). Los ácidos grasos libres no esterificados (NEFAS) se determinaron utilizando un kit comercial (Wako , EE.UU.). Los triglicéridos (TG) y el colesterol se determinaron utilizando un kit comercial de Randox Laboratories (LTD, Reino Unido). Las medidas de leptina e insulina se llevaron a cabo mediante ELISA (Millipore Corporation , Billerica , MA).

En los pacientes, las muestras de plasma se obtuvieron por punción venosa después de una noche de ayuno. La glucosa se analizó en base a reacciones espectrofotométricas enzimáticas llevadas a cabo por un analizador automático (Hitachi Modular P800 , Roche, Basilea , Suiza). La insulina se midió por medio de un ensayo de quimioluminiscencia amplificado enzimáticamente (IMMULITE® , Diagnostic Products Corp. , Los Ángeles, CA). HbA1c fue analizada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se calcularon los niveles de triglicéridos, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL) colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL) - colesterol como se describe previamente (187, 188) . La leptina se midió mediante un método RIA de doble anticuerpo (Linco Research , Inc. , St. Charles , MO) como se informó anteriormente (189) ; -ensayo cocientes intra-e inter de variación fueron 5,0 y 4,5 % , respectivamente . Todos los estudios clínicos fueron aprobados, desde un punto de vista ético y científico , por el Comité de Ética del hospital y se llevaron a cabo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki con los pacientes de dar su consentimiento informado para la participación .

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Los datos son presentados según la fórmula media +/- error estándar de dichas medias. Los test estadísticos utilizados varían en función del experimento, así aquellos con dos grupos se utiliza el test *t* de Student, para aquellos en los que hay más de de dos grupos usamos ANOVA de una vía usando la corrección a posteriori de Bonferroni. Para el estudio de los datos de gasto energético se utilizó un ANCOVA. En cado uno de estos casos se considera que la diferencia entre medias es significativa cuando el valor de $P < 0,05$. El software utilizado para el análisis estadístico fue el Graphpad InStat 3(GraphPad Software, Inc. La Jolla,USA),o bien R statistics.(R Foundation for Statistical Computing,Vienna, Austria).

RESULTADOS

BLOQUE I. EFECTO DE LA HAPLODEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.

Los ratones heterocigotos para endoglina alimentados con dieta estándar no presentan alteraciones metabólicas.

Ratones de la misma edad tanto de fenotipo salvaje (wild type) como heterocigotos para endoglina fueron alimentados con dieta estándar durante 8 semanas (hasta las 12 semanas de edad). Al final de este periodo se llevaron a cabo mediciones de peso, ingesta y composición corporal. No se observan diferencias significativas en el peso (**Figura13.A**), ni en la composición corporal (**Figura13.B-C**) ni en la ingesta (**Figura13.D**).

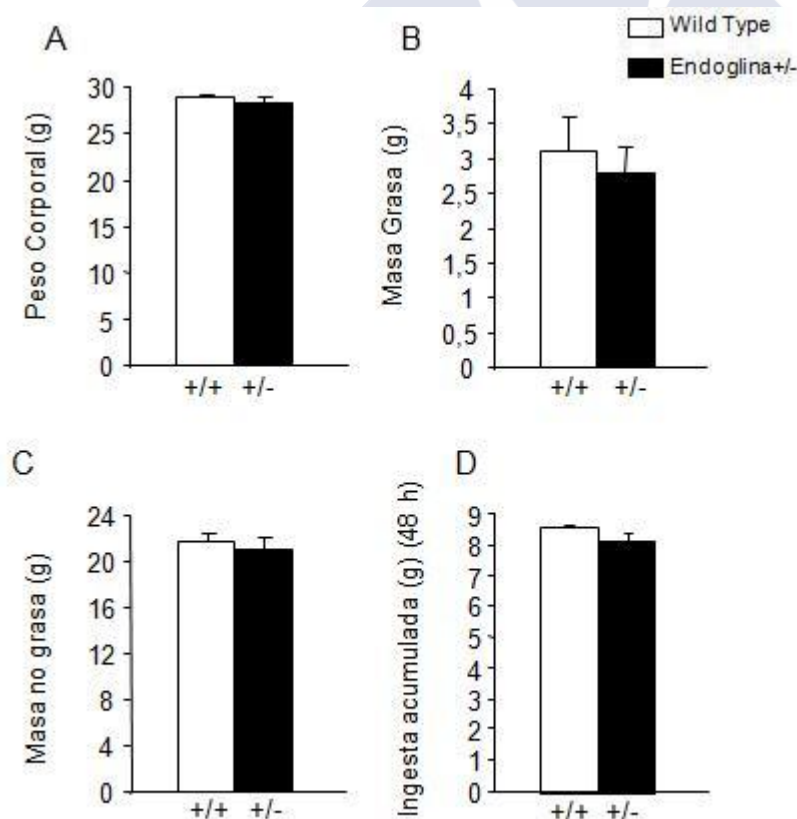


Figura13: Peso corporal (A), masa grasa (B), masa no grasa (C) e ingesta acumulada(D) en ratones haploinsuficientes para endoglina (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Se llevaron a cabo estudios de fenotipado metabólico mediante calorimetría indirecta comenzando por estudios sobre el gasto energético en los cuales no se observaron diferencias entre los dos genotipos estudiados. **(Figura14)**

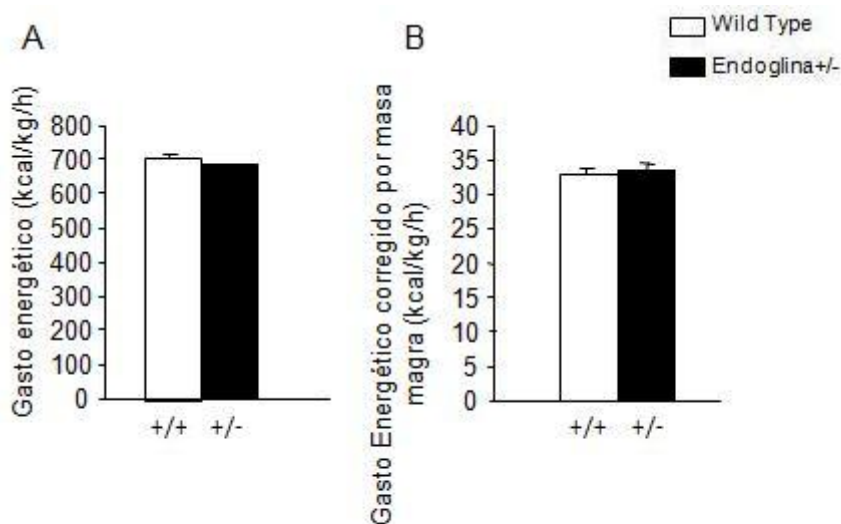


Figura14: Gasto Energético (kcal/g/h) total (A), gasto energético corregido por la masa no grasa (B) (Test de Student n=8 cada grupo)

En cuanto a la actividad locomotora, se observa un ligero pero significativo incremento en los animales heterocigotos con respecto a los wild type **(Figura15.A)** si bien cuando se lleva a cabo la corrección con la masa magra **(Figura15.B)**, no se registra la diferencia entre genotipos.

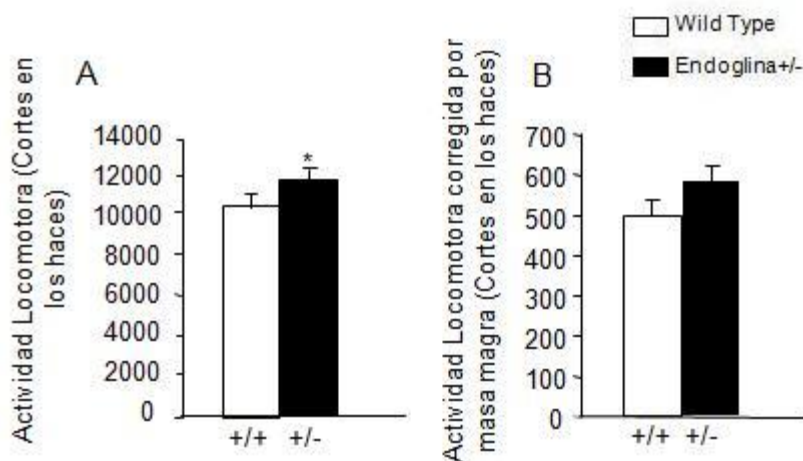


Figura15 : Actividad locomotora total (cortes en el haz de luz infrarroja) (A) corregida por la masa no grasa (B) y por la masa corporal (C) (Test-t de Student n=8 cada grupo).

El estudio del cociente respiratorio (RQ) no revela ningún tipo de alteración debido a la ausencia parcial de endoglina, ni durante la fase de luz ni durante la fase oscura. **(Figura16)**

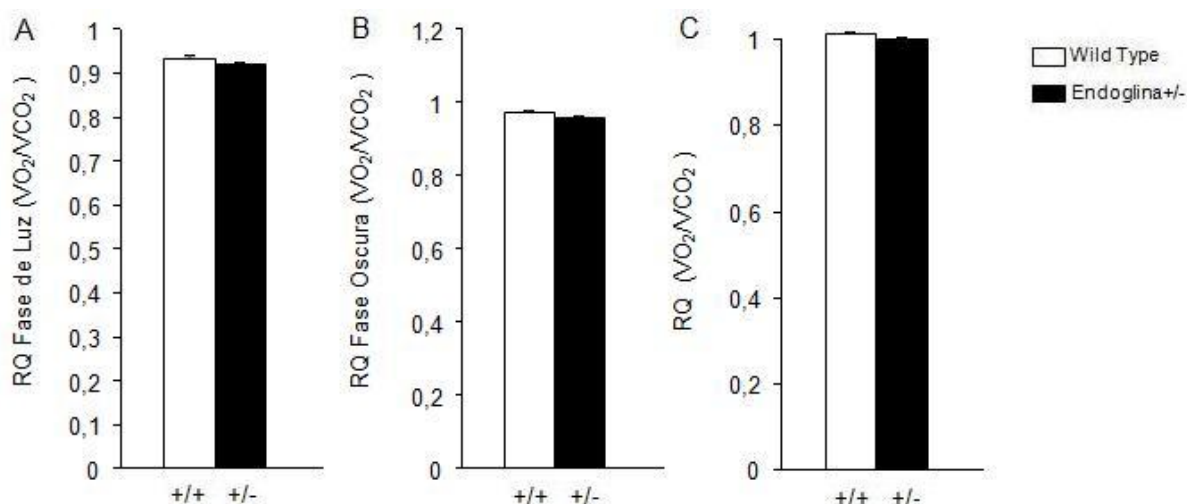


Figura16: Cociente respiratorio (VO₂/VCO₂) en la fase luminosa (A) en la fase oscura (B) y total (C) (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Homeostasis de la glucosa.

Tras el fenotipado metabólico se han estudiado los posibles efectos de la pérdida parcial de la endoglina en el metabolismo de la glucosa, para esto se ha llevado a cabo un test de tolerancia a la glucosa (GTT) y un test de tolerancia a insulina (ITT). En el caso del test de tolerancia a la glucosa no encontramos ningún tipo de alteración en los individuos heterocigotos con respecto a los controles. **(Figura17)**

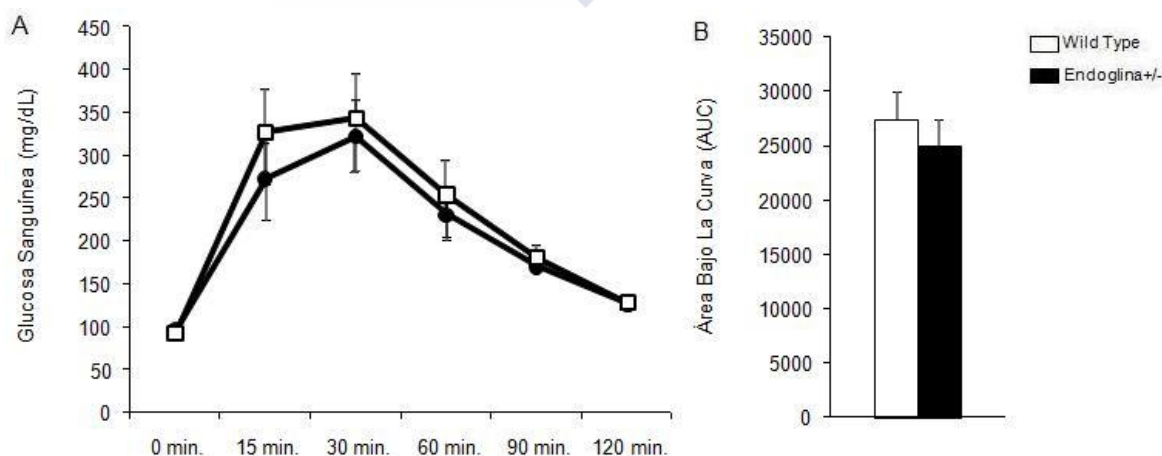


Figura17: Test de tolerancia a la glucosa, medidas de glucosa en sangre (mg/dL en sangre) (A) y área bajo la curva (B) (Test-t de Student n=8 cada grupo).

En el caso del test de tolerancia a la insulina se observan diferencias entre los grupos con los datos de glucosa obtenidos *in vivo* si bien en el área bajo la curva no se observan diferencias entre ambos grupos. **(Figura18)**

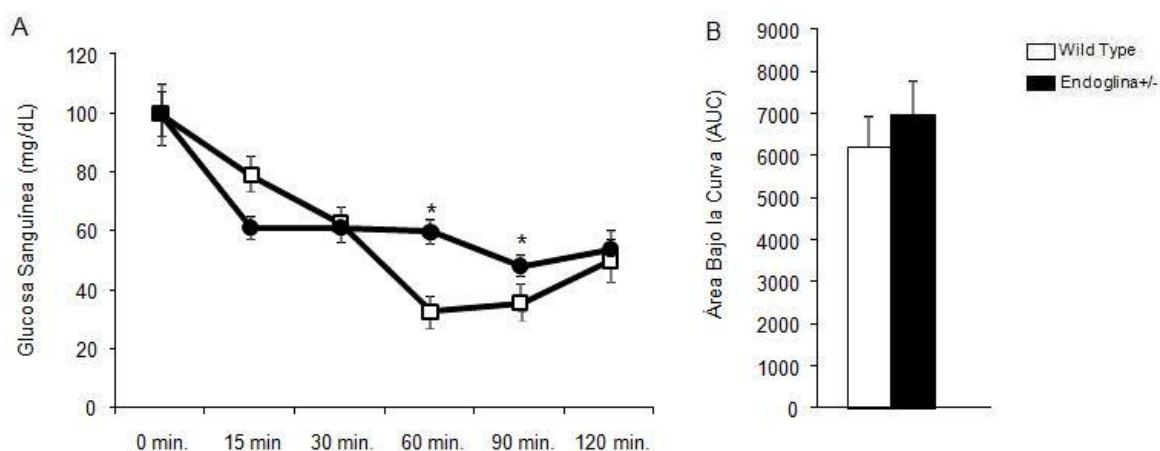


Figura18: Test de tolerancia a la insulina, medidas de glucosa sanguínea (mg/dL) (A) y área bajo la curva (B) (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Los ratones heterocigotos para endoglin alimentados con dieta alta en grasa presentan una composición corporal y un fenotipo metabólico normal.

Ratones de 8 semanas de edad tanto wild type como heterocigotos fueron sometidos a dieta alta en grasa (45% contenido grasa) durante 16 semanas. Tras este periodo se observa que no existen diferencias en el peso corporal (**Figura19.A**) entre ambos grupos, consecuentemente tampoco existen diferencias en la masa corporal ni en la masa magra (**Figura19.B-C**), igualmente no hay cambios en la ingesta(**Figura19.D**).

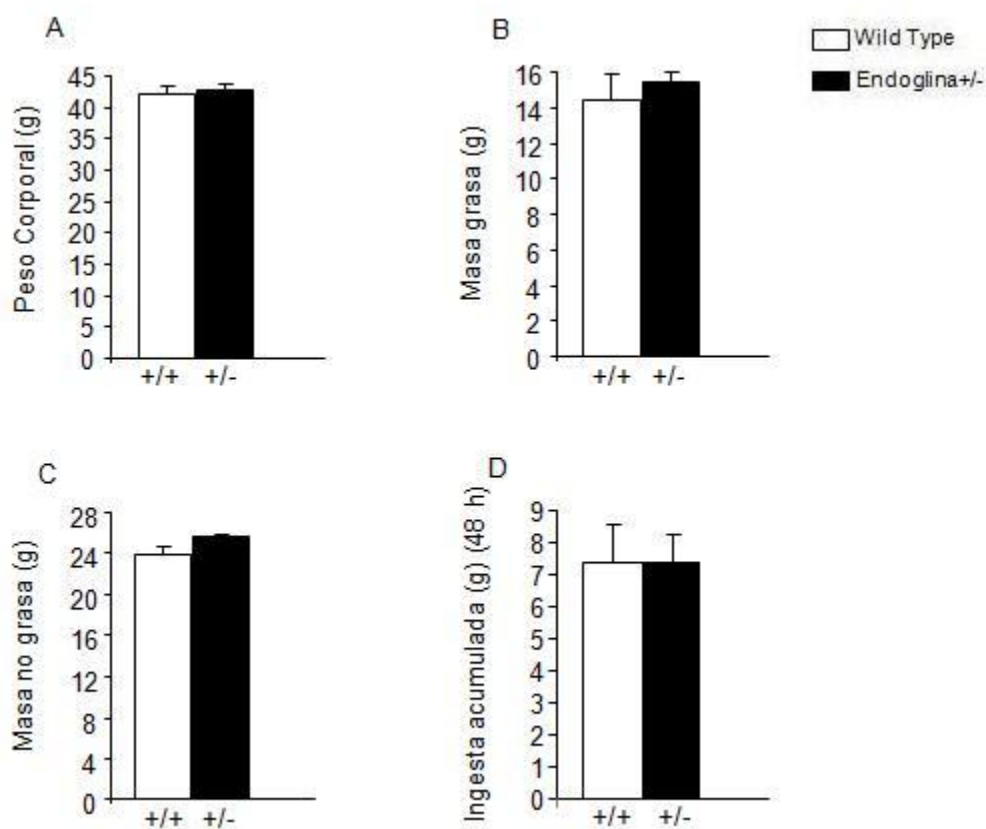


Figura19: Peso corporal (A), masa grasa (B), masa no grasa (C) e ingesta acumulada(D) en ratones haploinsuficientes para endogлина en animales alimentados con dieta alta en grasa (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Igual que con los individuos alimentados con dieta estándar se llevó a cabo el fenotipado metabólico de los individuos obesos. Estudiando el gasto energético no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.(Figura20)

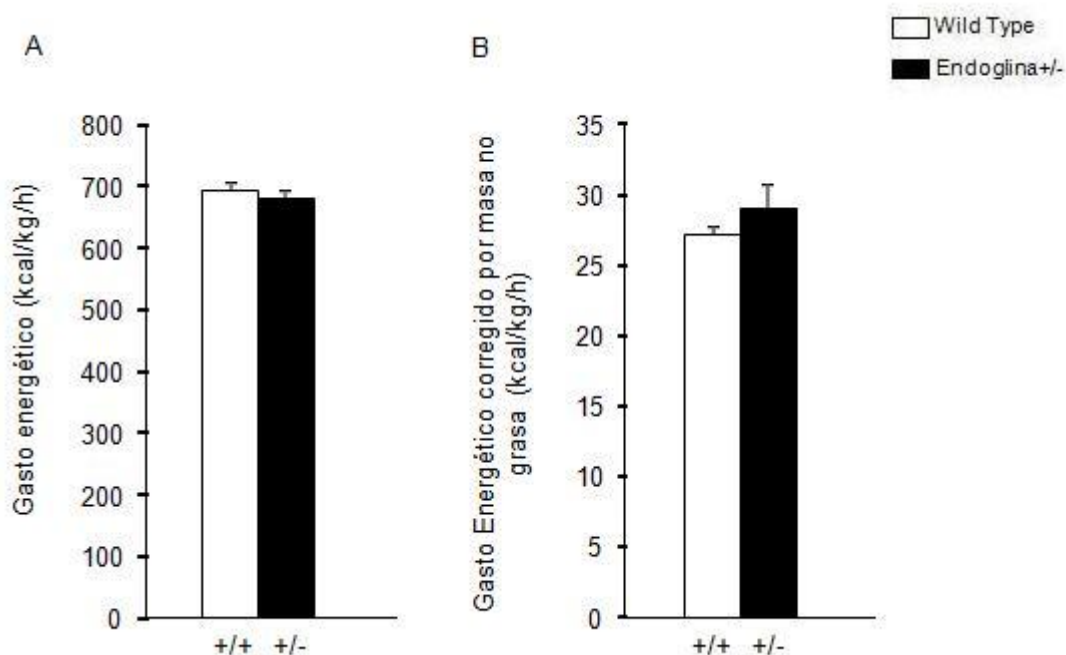


Figura20: Gasto Energético (kcal/g/h) total (A), gasto energético corregido por la masa no grasa (B) en animales alimentados con dieta alta en grasa (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Tampoco se encontraron diferencias en la actividad locomotora total (Figura21.A), lo mismo ocurre con la actividad locomotora corregida por la masa magra (Figura21.B)

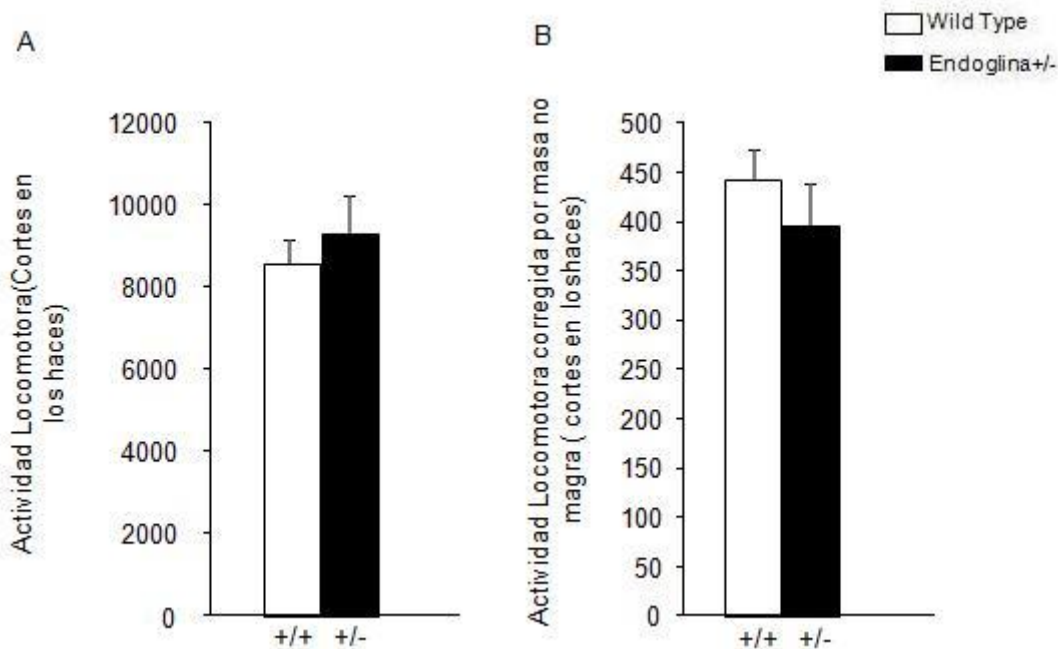


Figura21: Actividad locomotora tota (cortes en el haz de luz infrarroja) (A) corregida por la masa no grasa (B) y por la masa corporal (C). (Test-t de Student n=8 cada grupo).

El estudio del cociente respiratorio no revela diferencias entre ambos grupos ni durante la fase oscura ni durante la fase de luz.(Figura22)

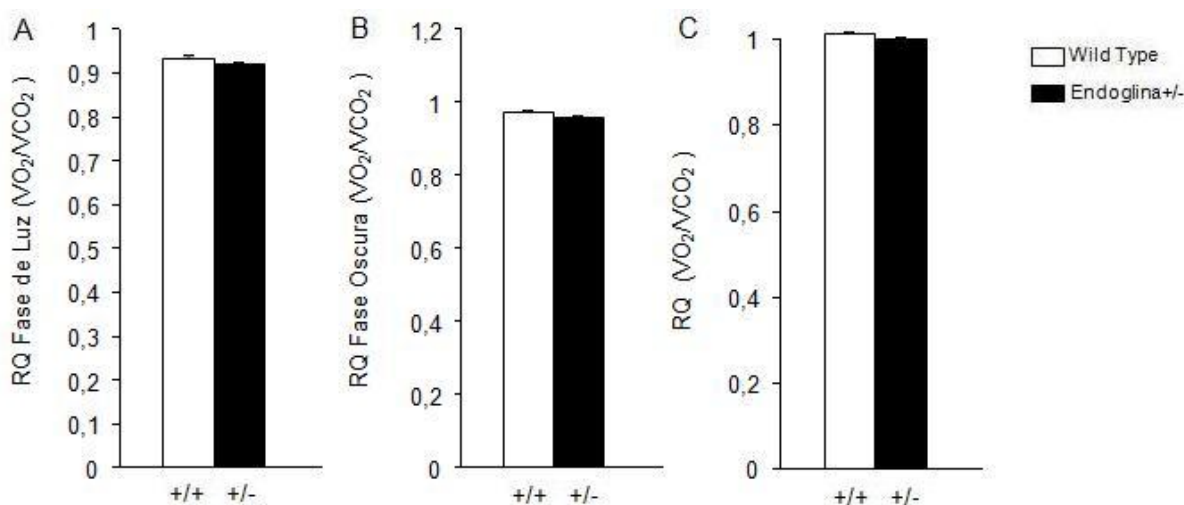


Figura22: Cociente respiratorio (VO₂/VCO₂) en la fase luminosa (A) en la fase oscura (B) y total (C) en animales alimentados con dieta alta en grasas. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Homeostasis de la glucosa en animales alimentados con dieta alta en grasas.

Después de una noche de ayuno, el GTT no evidencia ningún tipo de diferencias entre los animales de fenotipo salvaje y los heterocigotos (Figura23). En el caso del ITT se observa un descenso significativo en las medidas de glucosa *in vivo* 60 minutos después de la inyección en los animales heterocigotos. Sin embargo, cuando se comparan las áreas bajo la curva no se observan diferencias entre grupos.(Figura24)

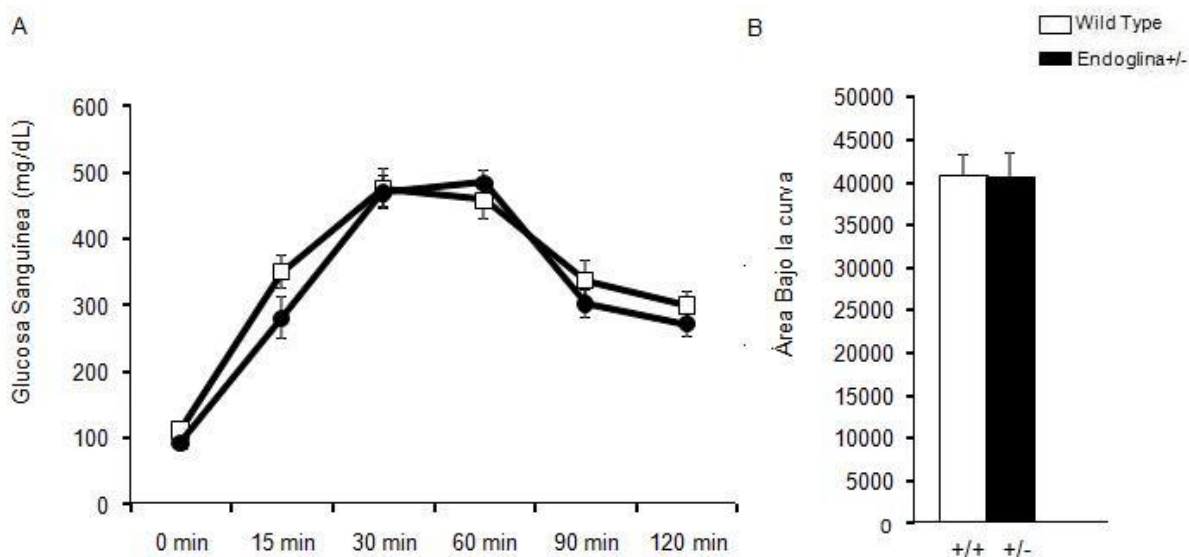


Figura23: Test de tolerancia a la glucosa, medidas de glucosa en sangre (mg/dL en sangre) (A) y área bajo la curva (B) animales con dieta alta en grasas. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

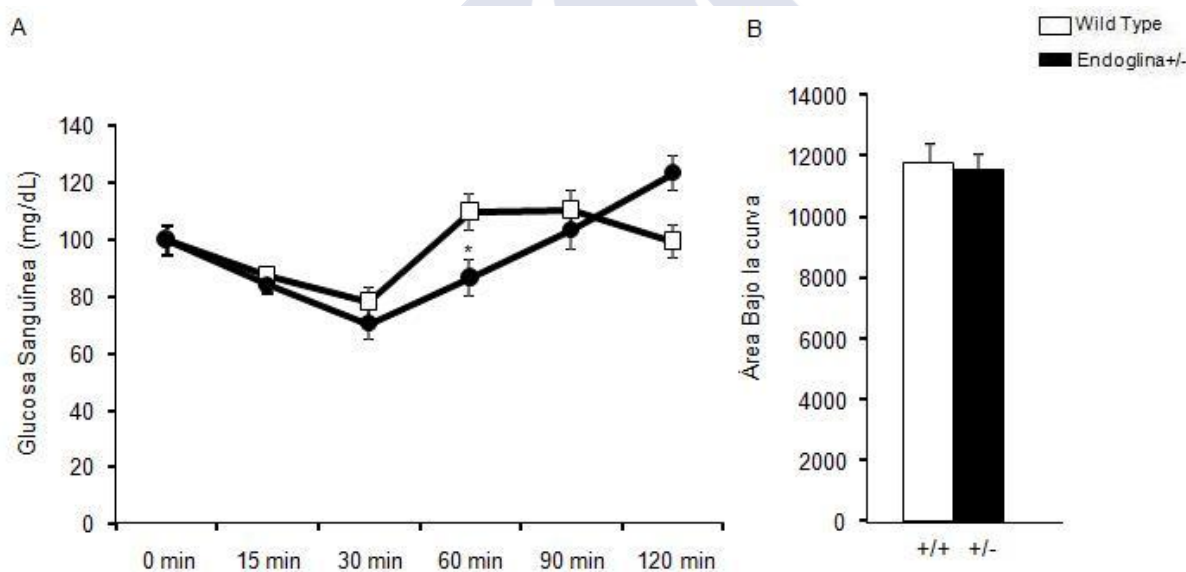


Figura24: Test de tolerancia a la insulina, medidas de glucosa sanguínea (mg/dL) (A) y área bajo la curva (B) animales con dieta alta en grasa. * P < 0,05 vs Wild Type. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Efectos moleculares en la vía de la insulina.

Para observar los efectos a nivel molecular de la deficiencia de endoglin decidimos medir mediante westem blot los niveles de AKT y AKT fosforilado, NFκβ (factor nuclear Kappa-beta) y PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) en músculo esquelético, hígado y tejido adiposo blanco.

Así en el músculo esquelético se observa un incremento en los niveles de AKT si bien cuando observamos el ratio pAKT/AKT, que nos informa del grado de activación de la enzima, no se encuentran diferencias entre ambos grupos. (Figura25)

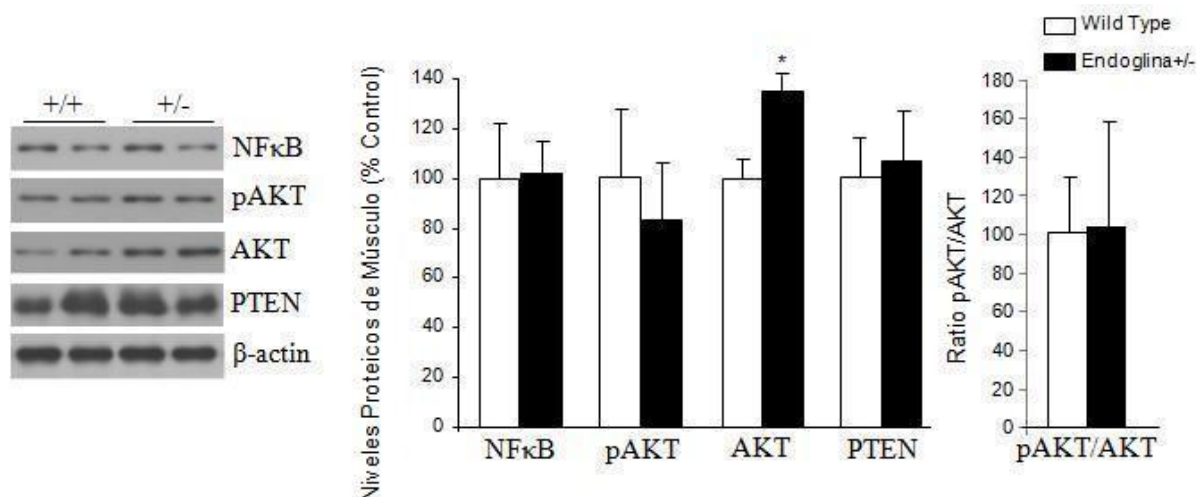


Figura25: Niveles proteicos en músculo esquelético de animales alimentados con dieta alta en grasas. * $P < 0,05$ vs Wild Type. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

En el caso del hígado observamos un descenso en los niveles de pAKT que lleva parejo un descenso en el ratio pAKT/AKT en aquellos animales haploinsuficientes para endoglina, no se encontraron cambios en NFκβ ni PTEN. (Figura26)

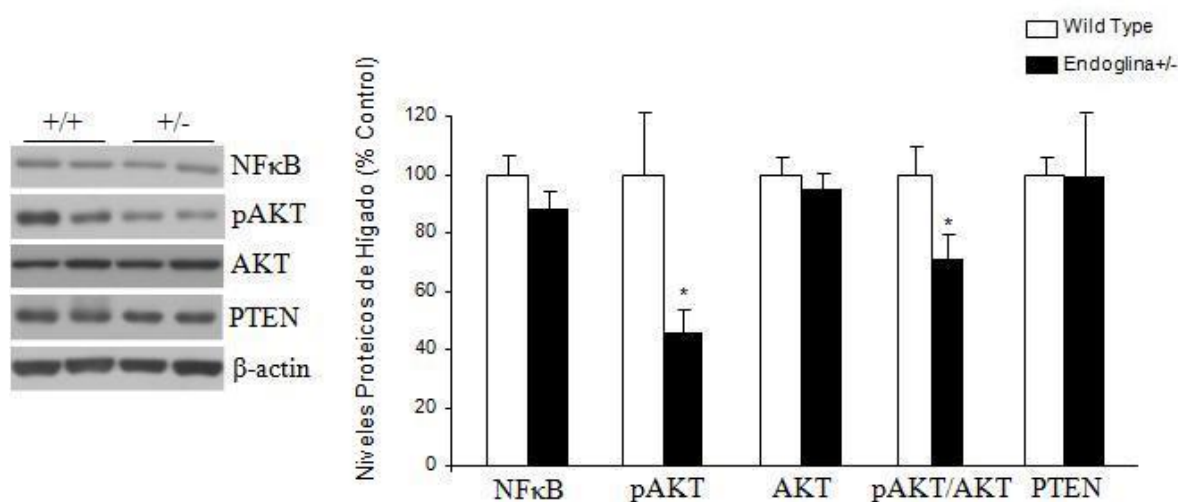


Figura26: Niveles proteicos hepáticos de animales alimentados con dieta alta en grasas. * $P < 0,05$ vs Wild Type. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

El hígado es un actor principal en la regulación del metabolismo de la glucosa por lo que también llevamos a cabo medidas de los principales enzimas involucradas en la producción de glucosa (mediante Real Time PCR) que son la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6Pase) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). El mRNA de estas enzimas no varía con respecto a los controles WT. (Figura27)

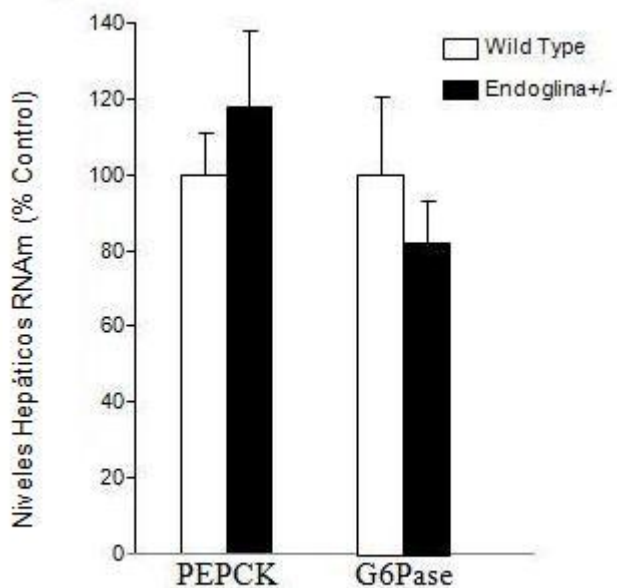


Figura27: Niveles de expresión de RNA mensajero en hígado. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

La acumulación de lípidos en el hígado es uno de los principales efectos asociados al desarrollo de la obesidad, por lo que llevamos a cabo medidas del contenido hepático de triglicéridos, siendo éstos significativamente menores en los animales heterocigotos (**Figura28**)

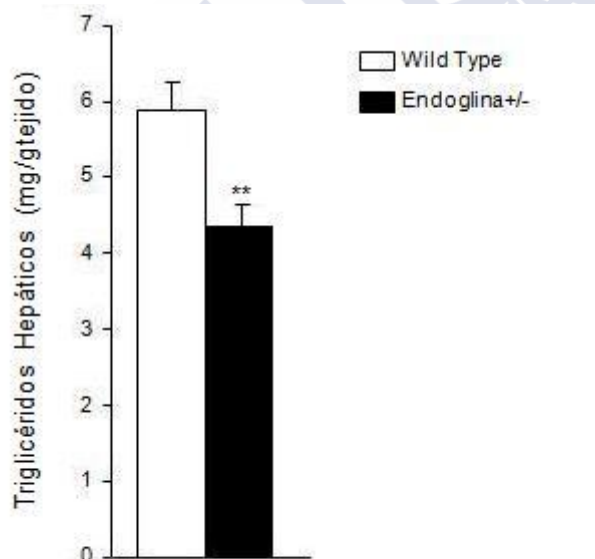


Figura28: Medida de la cantidad de triglicéridos hepáticos. ** P < 0,01 vs. Wild Type. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

En el tejido adiposo blanco no observamos cambios en ninguna de las proteínas anteriores (AKT, pAKT, PTEN o NF κ B), si bien se observa un incremento significativo en los niveles del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en comparación con los controles. (**Figura29**)

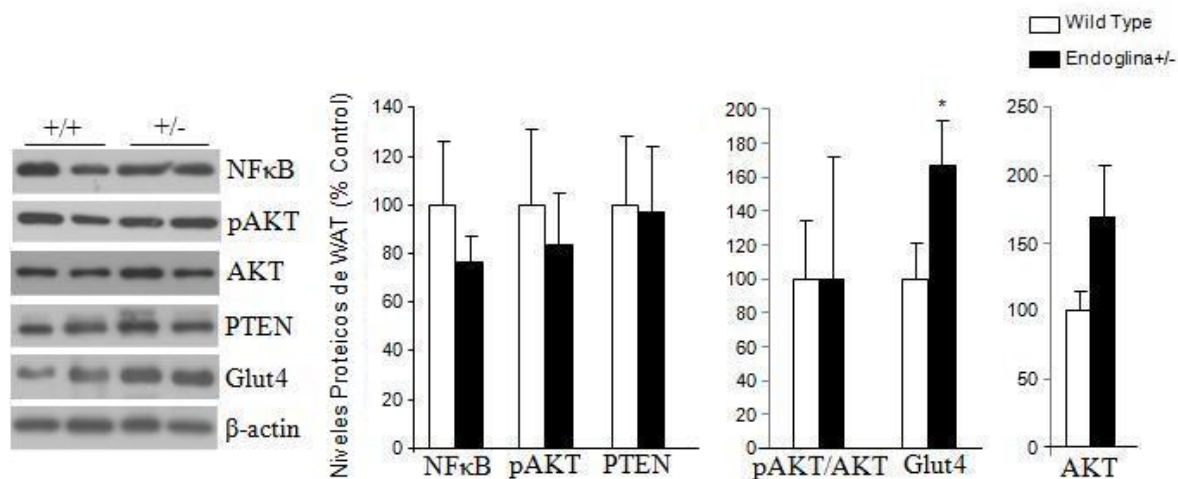


Figura29: Niveles proteicos en tejido adiposo blanco de animales alimentados con dieta alta en grasas. * P < 0,05 vs Wild Type. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Finalmente llevamos a cabo medidas del contenido plasmático de algunos de los principales parámetros circulantes (insulina, glucosa, triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol). La deficiencia parcial de endogлина produce un descenso significativo en los niveles de insulina(**Figura30.A**) permaneciendo inalterados los niveles de triglicéridos(**Figura30.C**), glucosa(**Figura30.B**), ácidos grasos libres(**Figura30.D**) y colesterol.

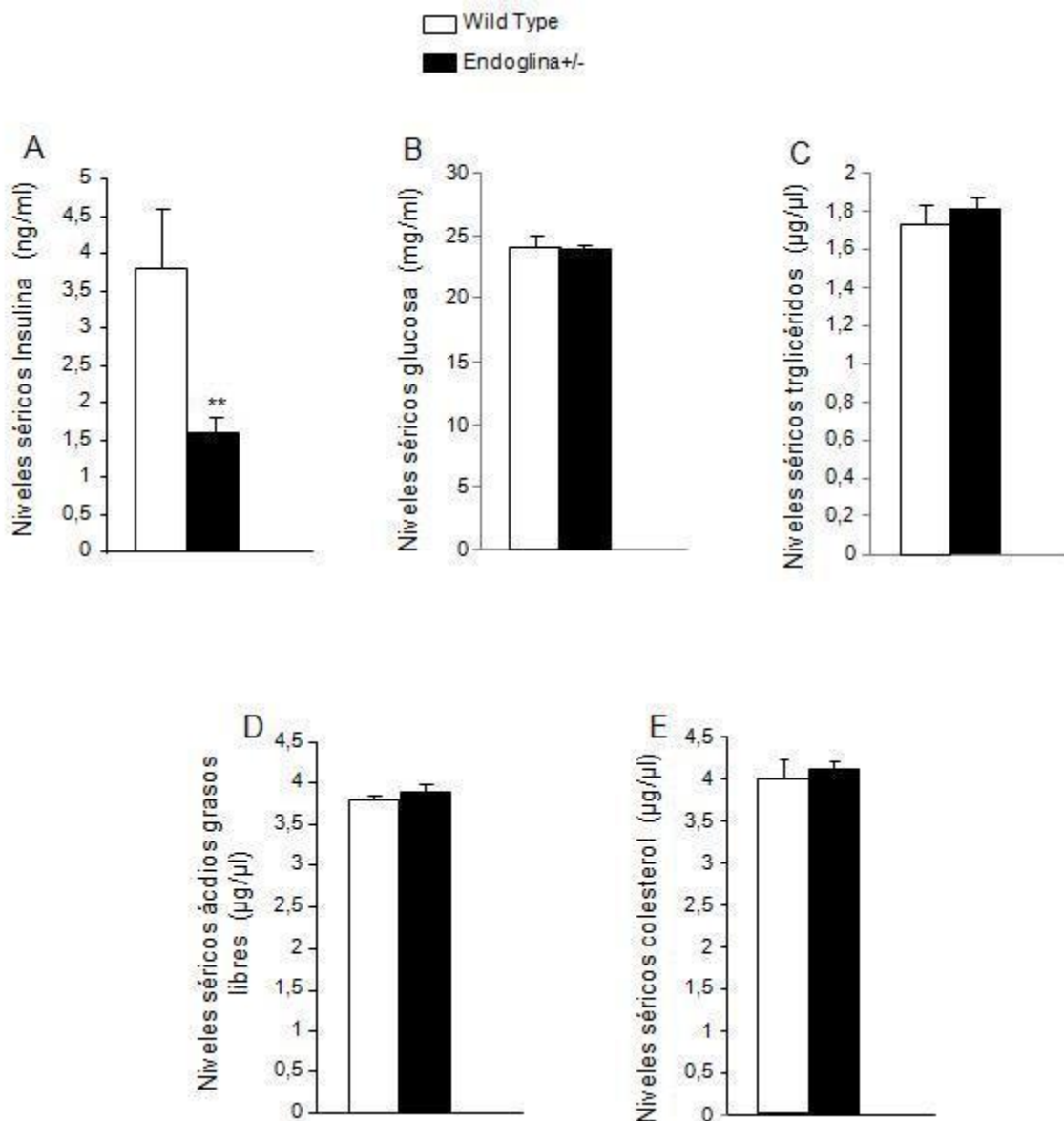


Figura30: Medidas de parámetros circulantes en suero: Insulina (A), glucosa (B), triglicéridos (C), ácidos grasos libres (D) y colesterol (E). ** P < 0,01 vs. Wild Type. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

BLOQUE II. EFECTO A NIVEL DEL SISTEMA CENTRAL DE GLP-1 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGETICA Y ADIPOSIDAD.

Estudio dosis - respuesta de liraglutide en ratas.

El Liraglutide es un análogo de GLP-1 que actúa a largo plazo, se ha demostrado que la administración sistémica de dicho fármaco produce un descenso de peso significativo, si bien los efectos derivados de la inyección central de Liraglutide (análogo de GLP-1) no han sido descritos. A tal efecto se lleva a cabo una canulación ICV seguida de la inyección de Liraglutide a diferentes dosis (1µg/rata y 10µg/rata). (Figura31)

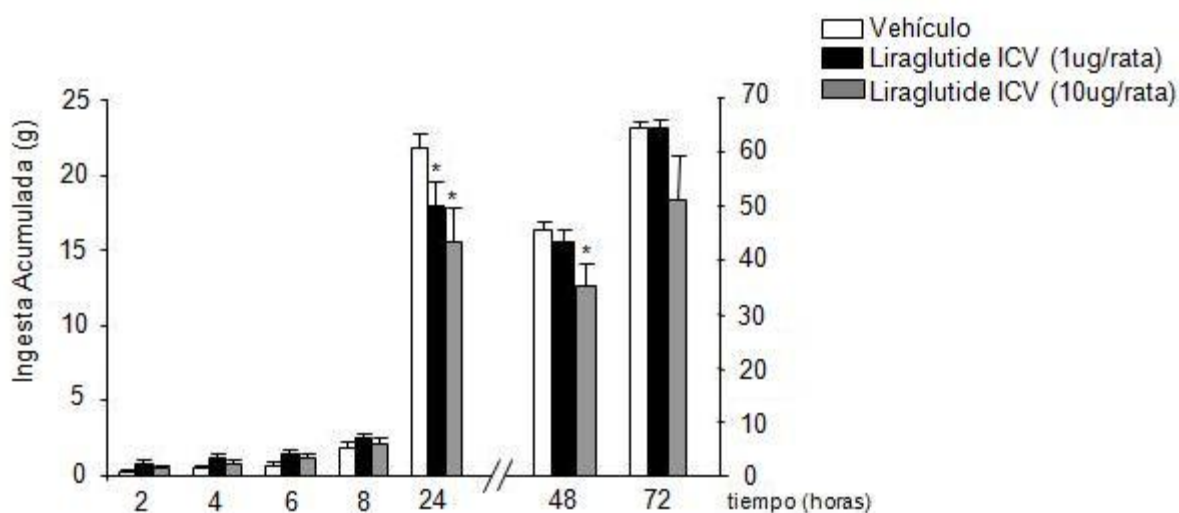


Figura31: Ingesta acumulada medida a las 2, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 horas tras la administración de Liraglutide ICV (dosis de 1µg/rata y 10µg/rata). * P < 0,05 vs. Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

La inyección de liraglutide ICV provoca una reducción significativa de la ingesta en ratas, tanto utilizando una dosis de 1µg como con una de 10µg. El efecto en la reducción de ingesta se registra a las 24 horas tras la inyección y en el caso de la dosis de 10 µg este efecto permanece hasta las 48 horas tras la inyección del fármaco. A las 72 horas post-inyección no se observa ningún efecto significativo en la ingesta acumulada. (**Figura31**)

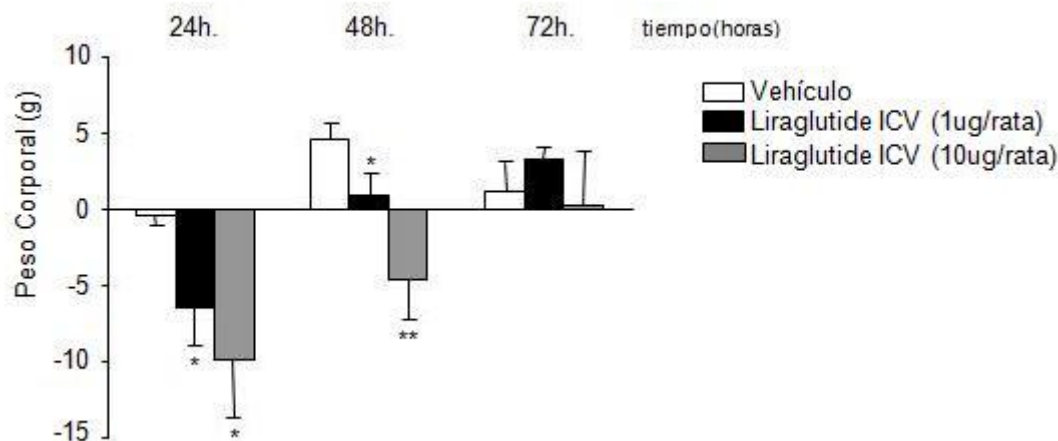


Figura32: Ganancia de peso medida a 24, 48 y 72 horas tras la inyección de Liraglutide ICV (dosis de 1µg/rata y 10µg/rata). * P < 0,05. ** P < 0,01 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

El peso de cada animal se midió a intervalos de 24 horas; se observa una reducción significativa de peso con las dosis de 1µg y 10µg, estos efectos se mantienen a las 48 horas y desaparecen por completo a las 72 horas tras la inyección de liraglutide. A la vista de estos resultados, la dosis utilizada para los experimentos llevados a cabo con ratas en el presente trabajo será la dosis de 10µg/rata. (**Figura32**)

Estudio dosis - respuesta en ratón.

Los experimentos de inyección central de liraglutide en ratón para estudiar el efecto dosis-respuesta se realizaron con el mismo procedimiento al utilizado anteriormente para rata.

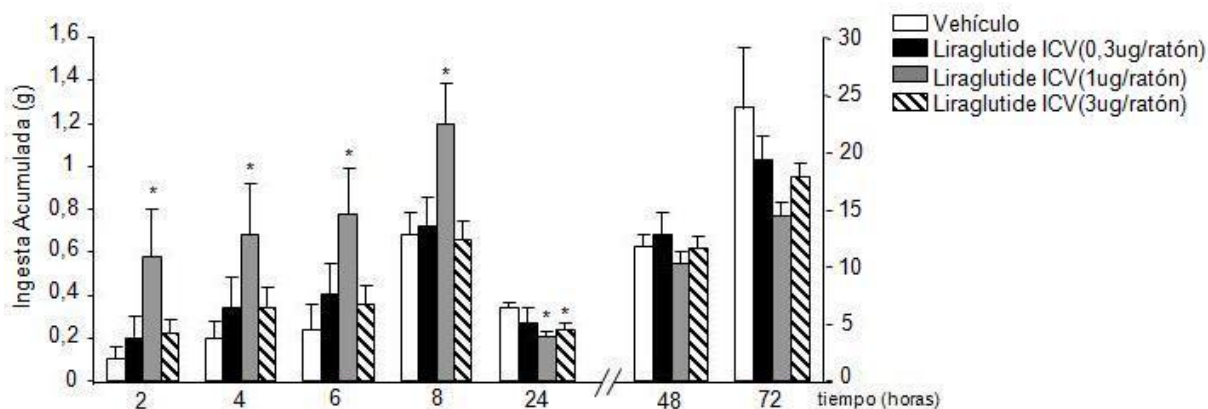


Figura33: Ingesta acumulada medida a las 2,4,6,8,24,48 y 72 horas tras la administración de Liraglutide ICV (dosis de 0,3µg/ratón, 1µg/ratón y 3µg/ratón.) * P < 0,05 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

En el caso del ratón, la inyección central de liraglutide produce un descenso significativo en la ingesta con las dosis de 1 y 3 µg/ratón. A diferencia de lo observado en la dosis respuesta de rata no se observan efectos en la ingesta a las 48 y 72 horas. (Figura33)

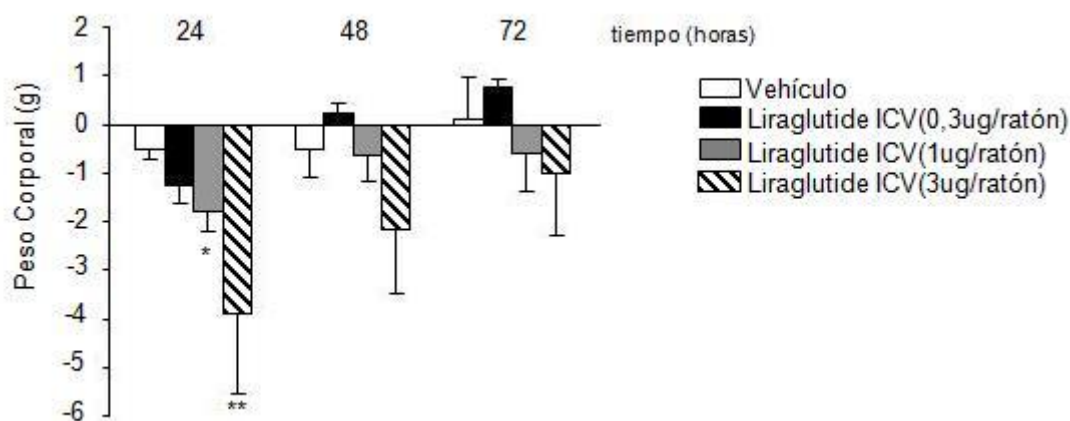


Figura34: Ganancia de peso medida a 24,48 y 72 horas tras la inyección de Liraglutide ICV (dosis de 0,3µg/ratón, 1µg/ratón y 3µg/ratón.) * P < 0,05. ** P < 0,01 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

La administración en el ventrículo lateral de liraglutide, produce un descenso de peso significativo en aquellos animales a los que se les administraron 1 y 3µg. Al igual que en la ingesta, no se producen cambios en el peso corporal a las 48 y 72 horas tras la administración de liraglutide. En los experimentos con ratones utilizaremos la dosis de 3µg ya que con esta dosis los efectos registrados en el peso corporal son más evidentes. (Figura34)

Estimulación del receptor de GLP-1 a nivel central con GLP-1 y Liraglutide.

Como ya se ha visto en los experimentos de las dosis respuesta, el liraglutide altera el peso corporal y la ingesta después de su administración en el sistema nervioso central. En este experimento se comparan los efectos de la inyección tanto de GLP-1 como de liraglutide. Así GLP-1 va a producir una pérdida de peso corporal independientemente de su efecto anorexigénico, fenómeno que también ocurre en el grupo tratado con liraglutide (**Figura35.A**). Sin embargo el liraglutide produce un descenso en la ingesta, fenómeno que no ocurre en el grupo tratado con GLP-1 (**Figura35.A**) debido a que éste es eliminado por la DPP-IV.

Para determinar si la pérdida de peso registrada en el grupo tratado con liraglutide es debida a la reducción de la ingesta se añade al experimento un grupo "pair feed", que se caracteriza porque no pueden comer *ad libitum* sino que su comida está limitada a la cantidad de comida consumida por el grupo tratado con liraglutide. Este grupo se trata con vehículo ICV (**Figura35.B**).

En este experimento observamos que el descenso de peso asociado al tratamiento con liraglutide es independiente de la ingesta ya que el grupo "pair feed", a pesar de comer lo mismo que el grupo tratado con liraglutide no presenta una pérdida de peso. (**Figura35.B**)

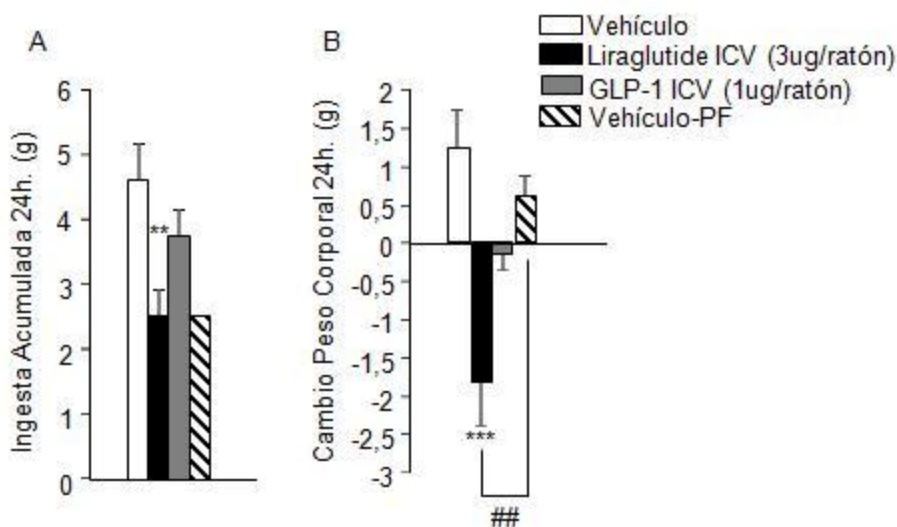


Figura35: Ingesta acumulada (A) y cambios en el peso corporal (B) 24 horas después de la inyección de fármacos y vehículo. . ** $P < 0,01$ vs Vehículo. *** $P < 0,001$ vs Vehículo ## $P < 0,01$ vs. "pair feed". (ANOVA de una vía $n=8$ cada grupo)

Test de aversión condicionada al sabor

Este tipo de procedimiento se lleva a cabo para determinar si los efectos que producen un descenso en la ingesta son debido a acciones específicas del tratamiento o bien son debido a que produzca malestar o sensación de enfermedad en los animales. Los animales tratados con liraglutide presentan una preferencia por la sacarina significativamente mayor que los animales tratados con cloruro de litio (controles positivos para la sensación de malestar).

Nuestros resultados no presentan diferencias significativas en el grupo de ratones tratados con liraglutide con respecto a los valores de preferencia por sacarina obtenidos en el grupo tratado con vehículo, lo que evidencia que la reducción de ingesta reproducida por el liraglutide no está asociada al malestar de los animales. **(Figura36)**

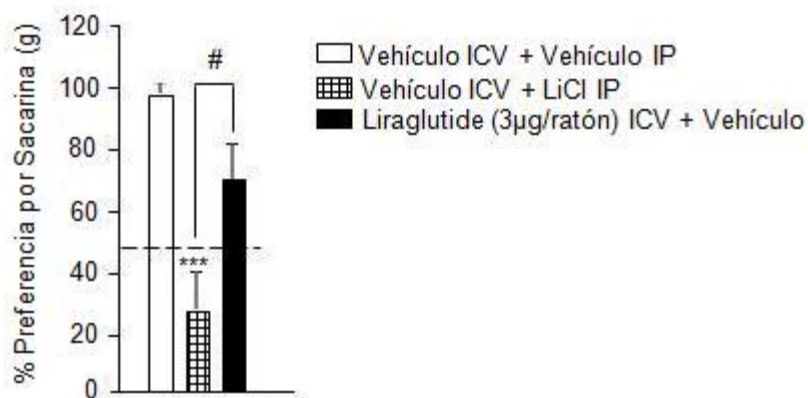


Figura36: Porcentaje de preferencia por sacarina. *** $P < 0,001$ vs Vehículo. # vs. Vehículo ICV LiCl IP .0,05 (ANOVA de una vía $n=8$ cada grupo)

Fenotipado metabólico.

Mediante el fenotipado metabólico se busca comprender que procesos pueden estar implicados en la pérdida de peso asociada a la administración central de liraglutide. Observamos que en los animales tratados con liraglutide no hay diferencias significativas en el gasto energético total **(Figura37.A)**, pero cuando lo corregimos por la cantidad de masa magra, principal responsable del gasto energético, sí se observa un incremento significativo en el gasto energético en los ratones tratados con liraglutide **(Figura37.B)**.

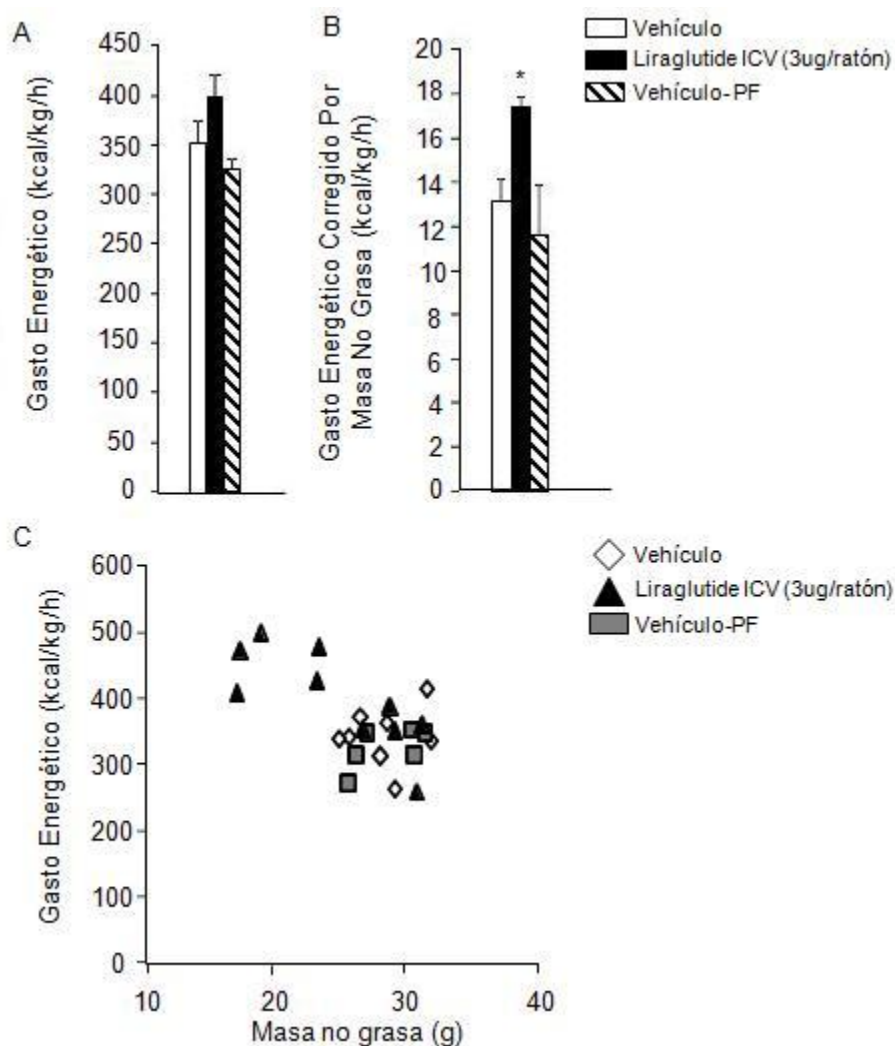


Figura37: Gasto Energético (kcal/g/h) total (A), gasto energético corregido por la masa no grasa (B), gasto energético frente a masa magra (C). * $P < 0,05$ vs Vehículo. (ANCOVA Vehículo $n=8$, Liraglutide $n=10$, Vehículo-PF $n=6$ cada grupo)

La actividad locomotora es uno de los procesos cuyos cambios pueden explicar alteraciones en el gasto energético, pero en el caso de nuestro experimento no se observan alteraciones en la actividad locomotora entre los diferentes grupos. (Figura38)

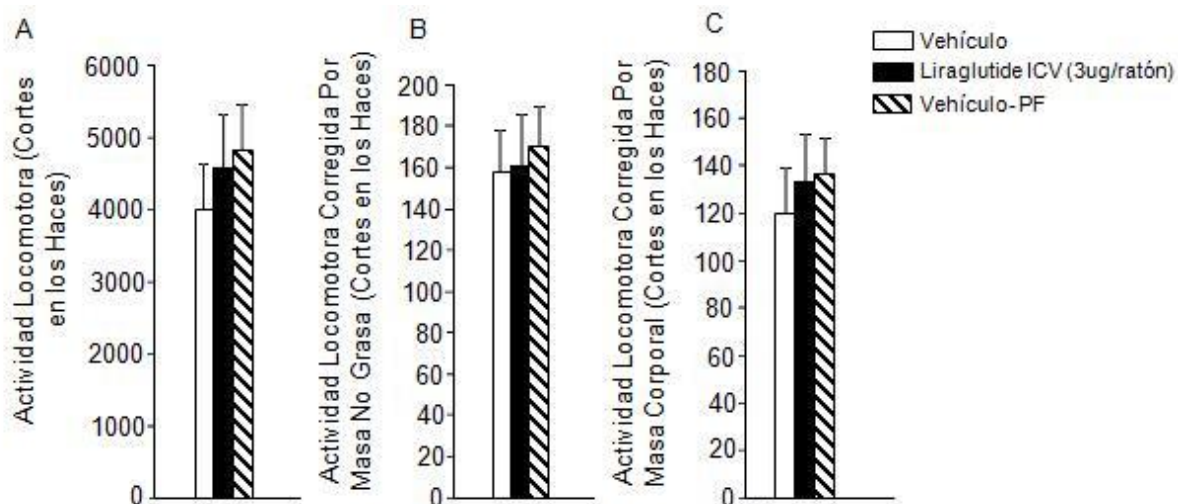


Figura38: Actividad locomotora tota (cortes en el haz de luz infrarroja) (A) corregida por la masa magra (B) y por la masa corporal (C). (ANOVA de una vía Vehículo n=8, Liraglutide n=10, Vehículo-PF n=6)

El cociente respiratorio es la relación existente entre el volumen de CO₂ producido y el volumen de O₂ consumido, este cociente nos va a informar del tipo de nutrientes que está utilizando el organismo para la obtención de energía. En el caso de nuestros animales tratados con liraglutide no se observan alteraciones significativas en el cociente respiratorio. (Figura39)

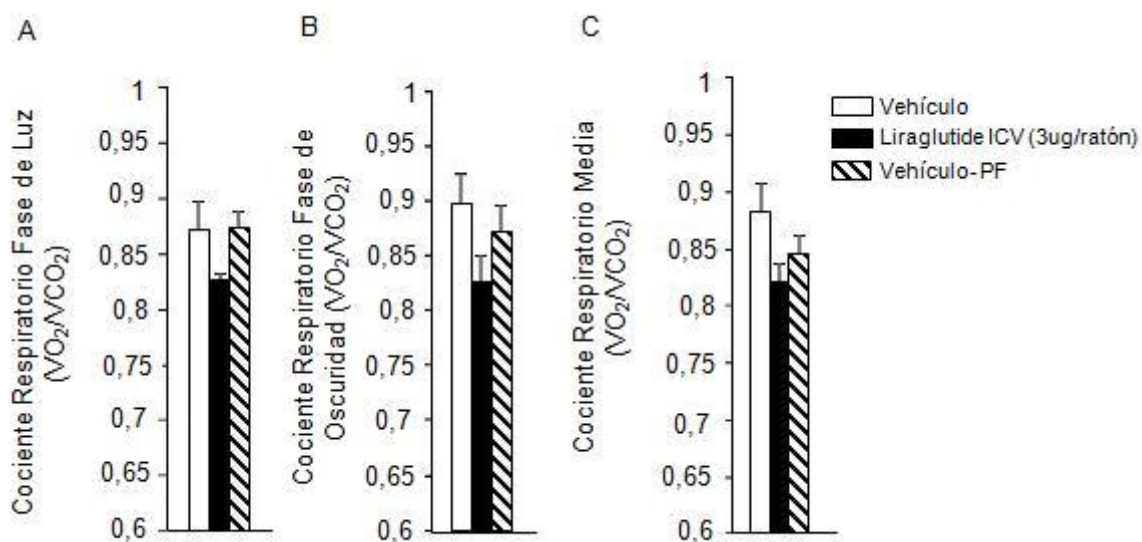


Figura39: Cociente respiratorio (VO₂/VCO₂) en la fase luminosa (A) en la fase oscura (B) y total (C). (ANOVA de una vía Vehículo n=8, Liraglutide n=10, Vehículo-PF n=6)

Efectos de la estimulación del receptor de glp-1 sobre el tejido adiposo marrón.

Anteriormente se ha descrito que el GLP-1 incrementa la temperatura en el tejido adiposo marrón (142). Sin embargo los mecanismos involucrados en las acciones de liraglutide sobre el tejido adiposo pardo no están descritos. En nuestro experimento encontramos que la inyección del fármaco no produce efectos en la temperatura corporal (Figura40.A), si bien en estos mismos animales se observa un incremento en la temperatura interescapular a las 12 horas tras la inyección de liraglutide (Figura40.B-C).

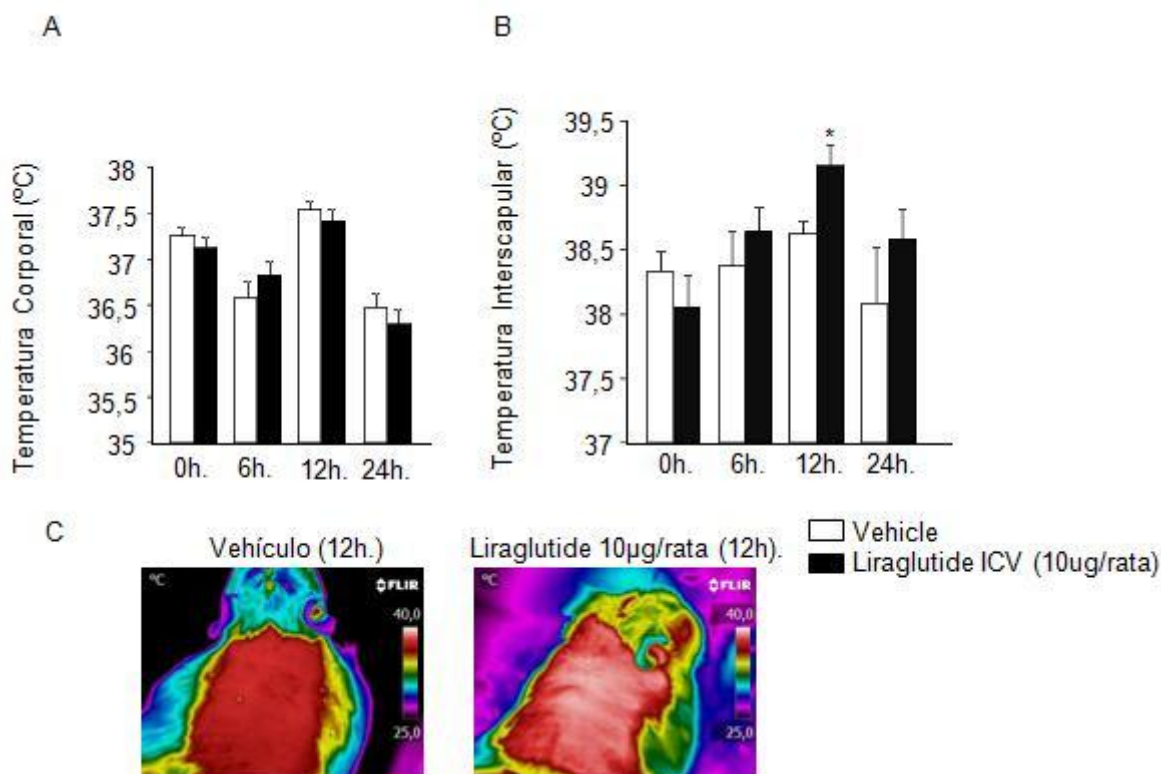


Figura40:A) Temperatura corporal medida por vía rectal. B) Temperatura interescapular medida mediante termografía. C) Fotos termográficas. * $P < 0,05$ vs Vehículo. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

En el estudio histológico del tejido adiposo pardo mediante tinción con hematoxilina-eosina observamos cómo se produce un descenso en el tamaño de las gotas lipídicas en los animales tratados con liraglutide. (Figura41.A)

En los animales tratados con liraglutide se observa un incremento en la expresión génica de una serie de genes relacionados con los procesos termogénicos como son CIDEA, FGF21, BMP7, PRDM16, ADR β 1, UCP1 y UCP3. (Figura 41.B)

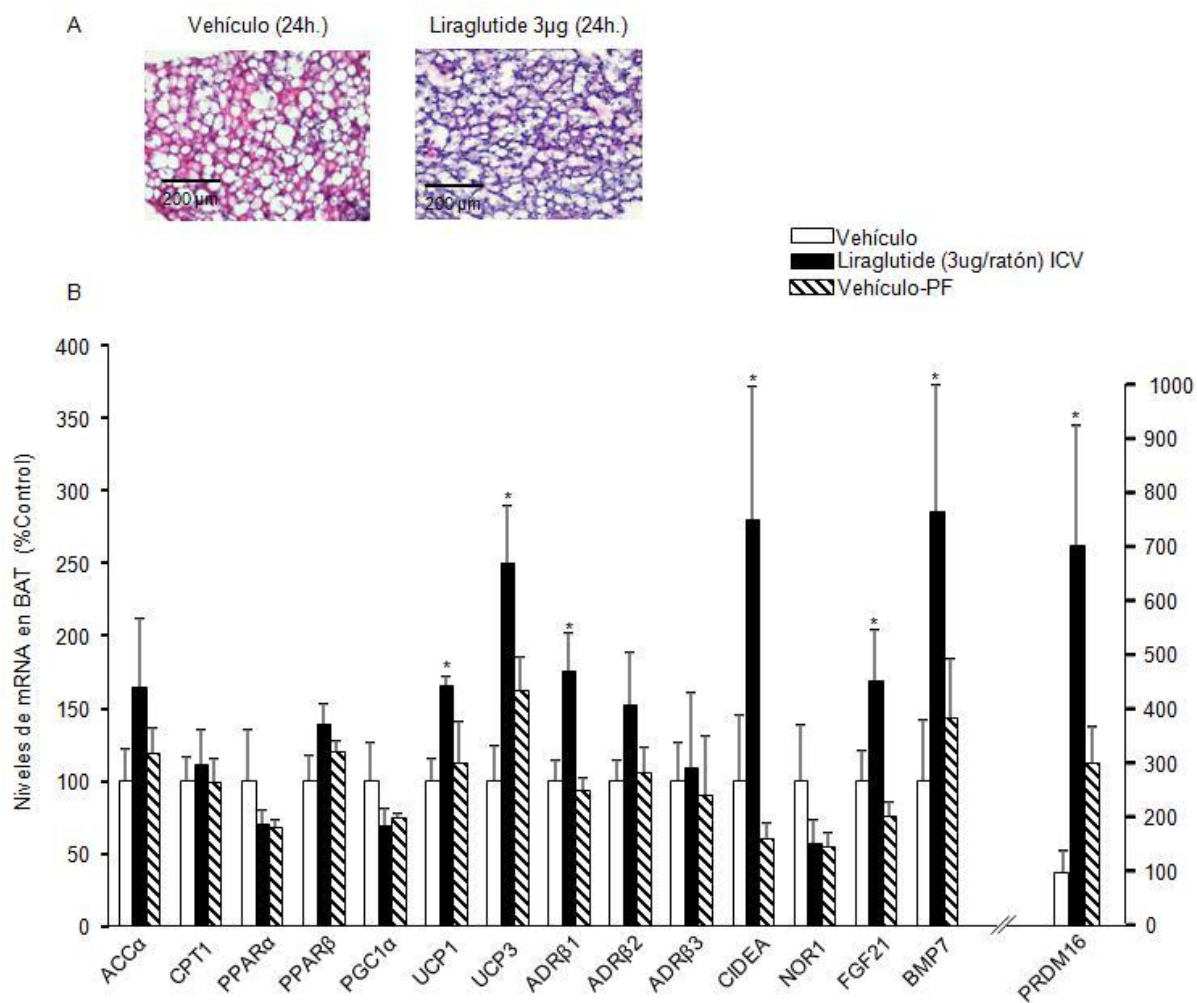


Figura41:A) Tinción Hematoxilina-Eosina tejido adiposo marrón. B)Niveles de RNA mensajero en el tejido adiposo pardo. * P < 0,05. ** P < 0,01 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Estos datos obtenidos mediante PCR se correlacionan con los datos de expresión de proteína obtenidos mediante westem blot.(Figura42)

Tanto estos datos obtenidos mediante el análisis de proteína como los obtenidos de la expresión génica son independientes de la ingesta ya que los incrementos registrados en el programa termogénico en el BAT no se observan en el grupo “pair-Feed”.

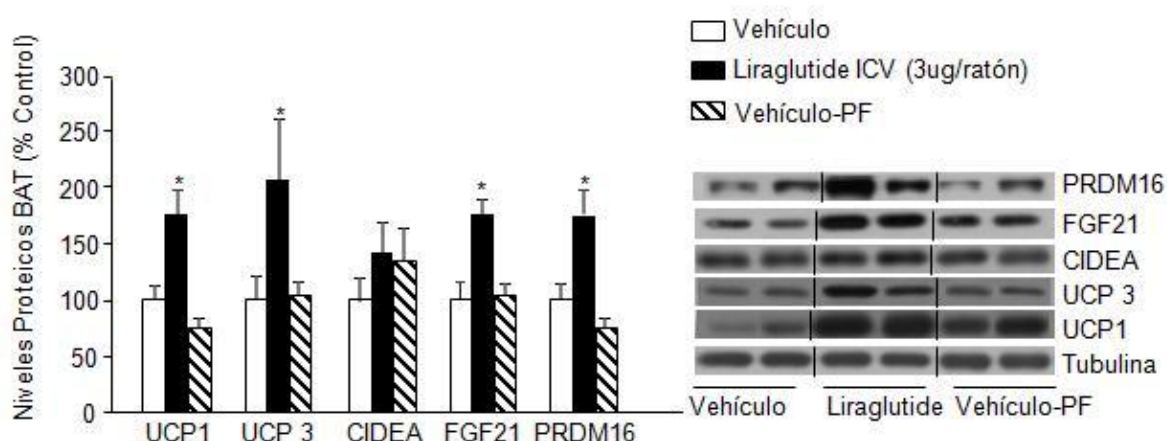


Figura42: Niveles de proteína en el tejido adiposo marrón medida mediante western blot. * $P < 0,05$ vs Vehículo. (ANOVA de una vía $n=8$ cada grupo)

La temperatura basal a las 24 horas tras la inyección de liraglutide no presenta diferencias entre ambos grupos, si bien cuando sometemos a los animales a un periodo a baja temperatura (4°C) observamos que los animales tratados con liraglutide presentan menor pérdida de temperatura que los controles tratados con vehículo, lo que sugiere que estos animales son más resistentes al frío. (Figura43)

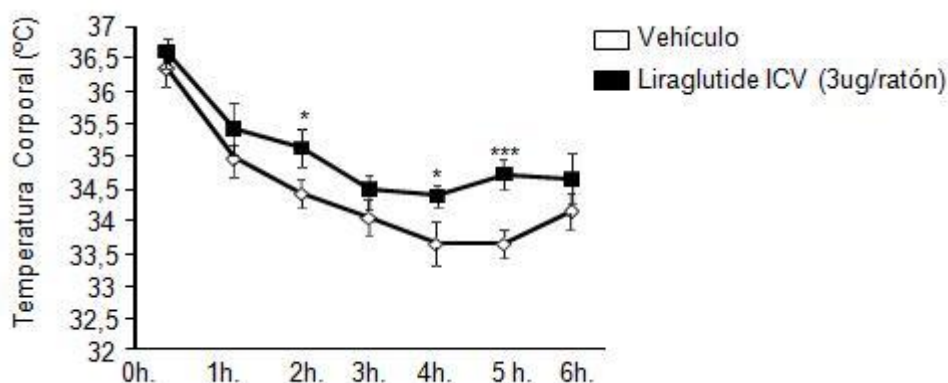


Figura43: Temperatura corporal medida mediante vía rectal. * $P < 0,05$,. *** $P < 0,001$ vs Vehículo. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

Debido al incremento en la expresión de FGF21, que está implicada en procesos termogénicos descritos anteriormente (190), decidimos inyectar liraglutide en el ventrículo lateral en ratones deficientes de FGF21. Como resultado de dicha inyección se produce un descenso significativo en peso (Figura44.B) e ingesta (Figura44.A) tanto en los animales control como en los KO, indicando que la ausencia de FGF21 no bloquea los efectos de liraglutide.

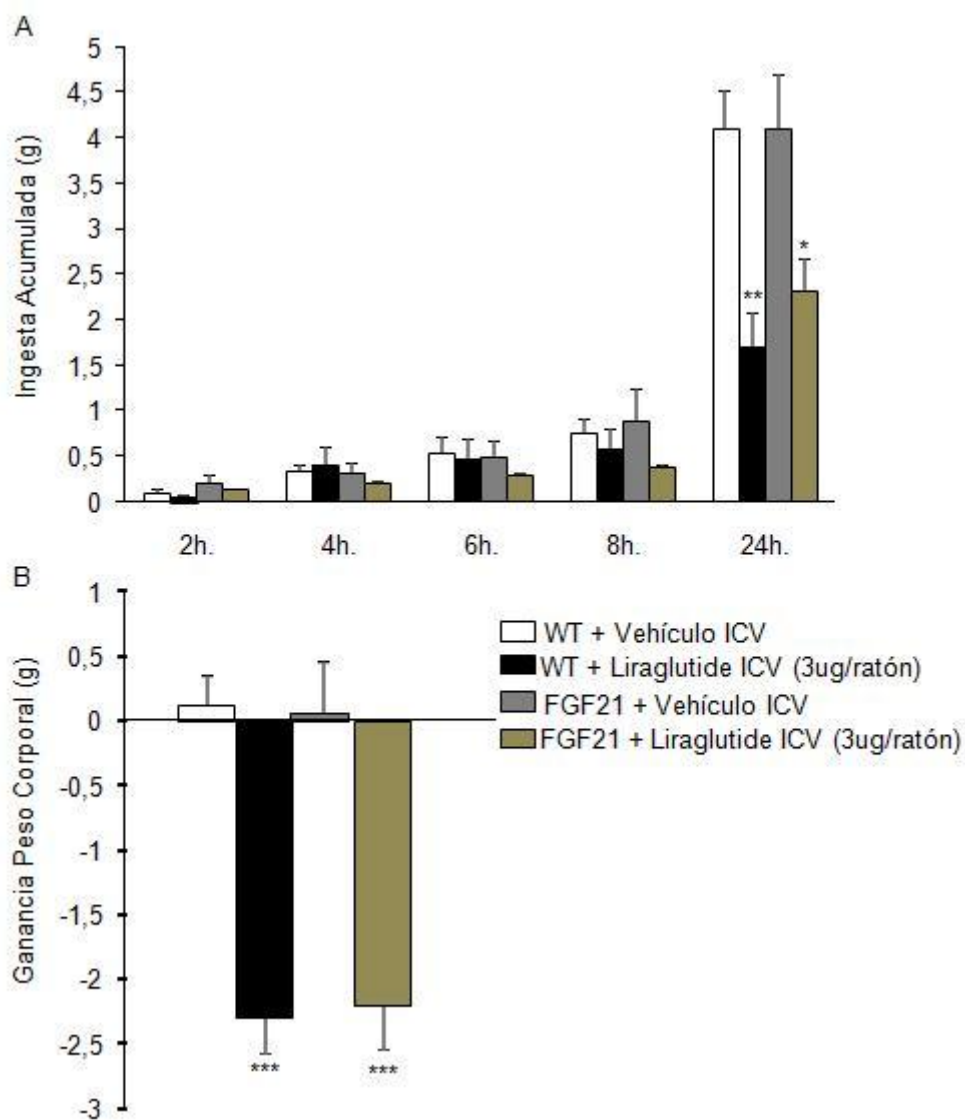


Figura44: Ingesta acumulada a 2,4,6,8 y 24h. (A) ganancia de peso corporal al 24h. (B). *P < 0,05, ** P < 0,01 vs Vehículo, *** P < 0,001 vs Vehículo. (Test-t de Studen; WT+Vehículo vs. WT+ Liraglutide; FGF21KO+ Vehículo vs FGF21KO vs. Liraglutide; n=8 cada grupo)

Efectos de la estimulación del receptor de glp-1 en el tejido adiposo blanco.

En el tejido adiposo blanco los efectos de liraglutide producen una reducción en el tamaño de los adipocitos con respecto a los correspondientes controles, fenómeno que se observa mediante estudios histológicos.(Figura45)

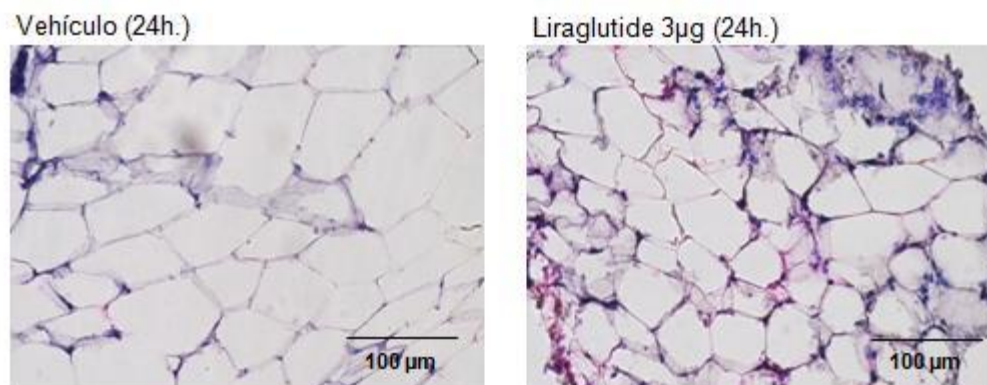


Figura45: Tinción Hematoxilina-Eosina para tejido adiposo blanco.

El estudio de los niveles de expresión del RNA mensajero en el tejido adiposo blanco señala un incremento significativo de UCP1 y Prdm16 de forma independiente a la ingesta ya que en el grupo “pair feed” no se registra este incremento. También se observa un descenso en los niveles de CEBP α tanto en el los individuos tratados con liraglutide como en el grupo “pair feed” lo que evidencia que los cambios en CEBP α no son debido a efectos específicos del fármaco. (Fig 46)

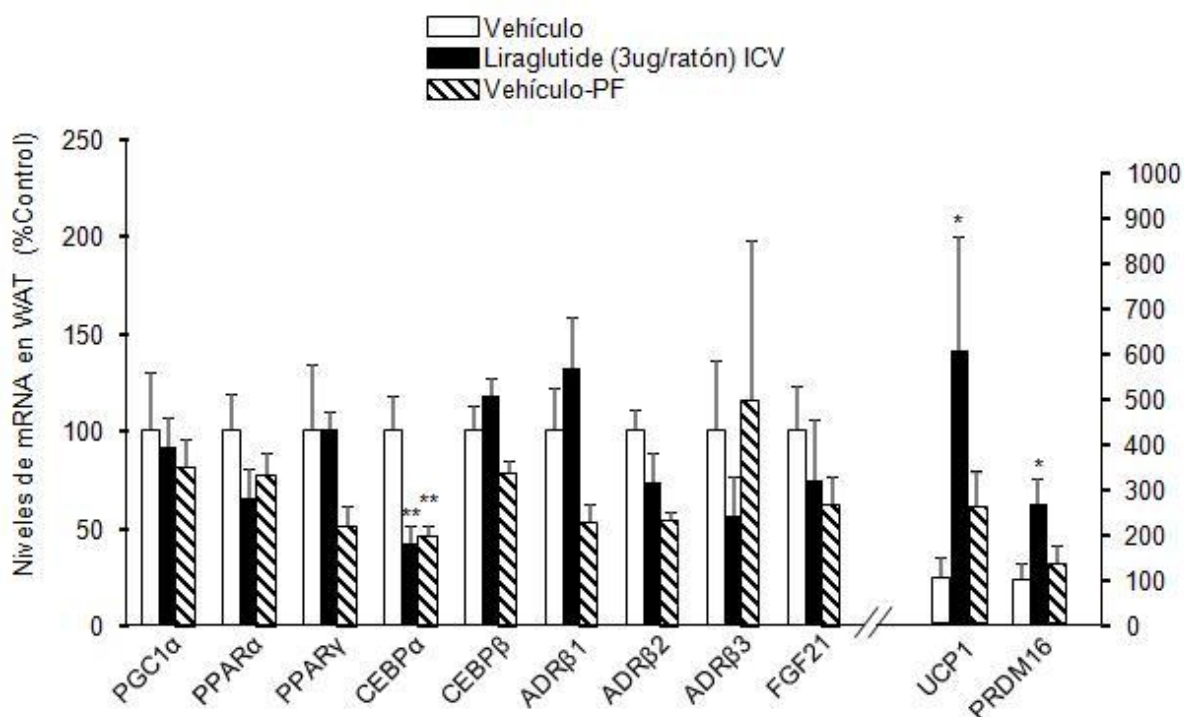


Figura46: Niveles de RNA mensajero en tejido adiposo blanco. * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$ vs Vehículo. (ANOVA de una vía $n=8$ cada grupo)

Debido al incremento registrado en el RNA mensajero de UCP1 decidimos comprobar si también existe un incremento en los niveles de proteína mediante westem blot. Así se ha

encontrado un incremento en los niveles proteicos de UCP1 de forma independiente de la ingesta.(Figura47)

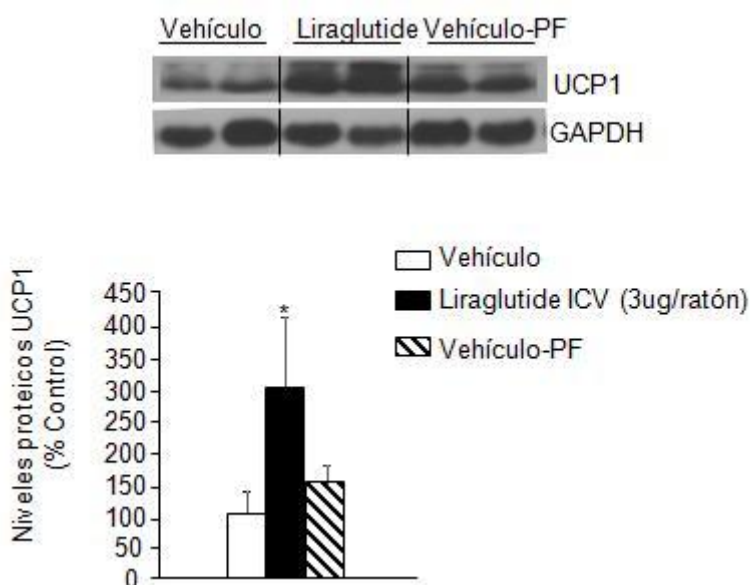


Figura47: Niveles de UCP1 en tejido adiposo blanco * P < 0,05 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Efectos de la estimulación central del receptor de glp-1 sobre el hígado

Una vez analizados ambos tejidos adiposos decidimos estudiar los posibles efectos de la inyección central de liraglutide sobre el hígado. Los niveles de RNAm de diferentes genes implicados en el metabolismo de lípidos en el hígado no varían significativamente debido a la acción central de liraglutide.(Figura48)

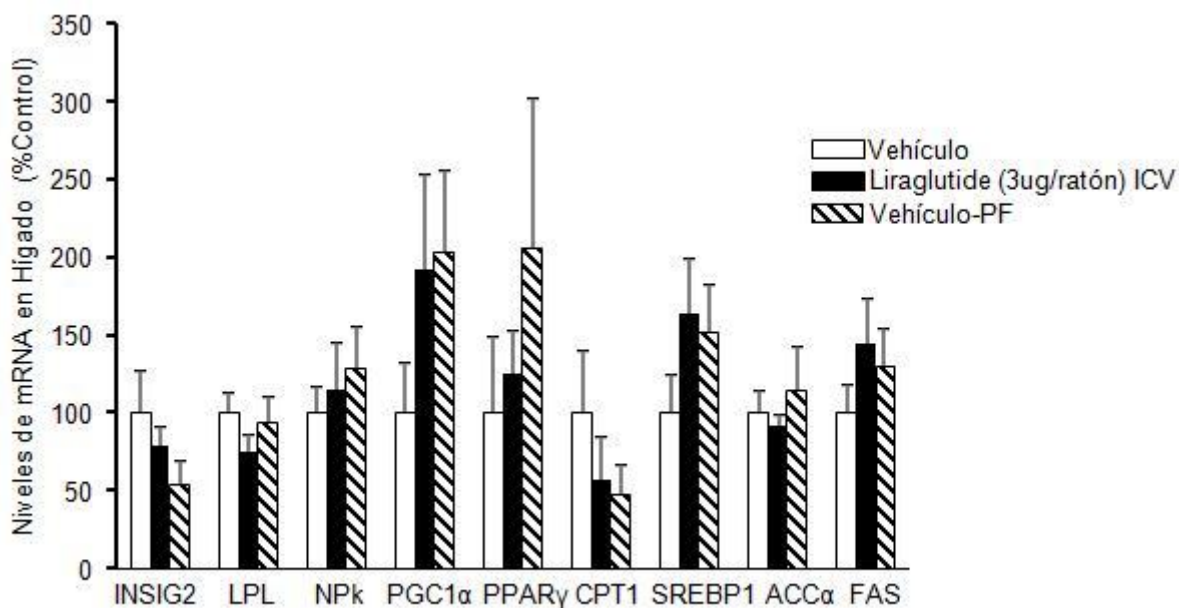


Figura48: Niveles de RNA mensajero en hígado. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo) (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

La estimulación del receptor de glp-1 a nivel hipotalámico regula la actividad termogénica.

Anteriormente se describen todo una serie de efectos asociados a la inyección central de liraglutide en tejidos periféricos. A continuación pasamos a estimular directamente los receptores de GLP-1 en distintos núcleos hipotalámicos mediante la inyección directa de liraglutide en cada uno de ellos. .

La inyección de liraglutide en el núcleo arcuato provoca un descenso significativo del peso(**Figura49.C**) y la ingesta tras 24 horas (**Figura49.B**) en el grupo tratado con liraglutide.

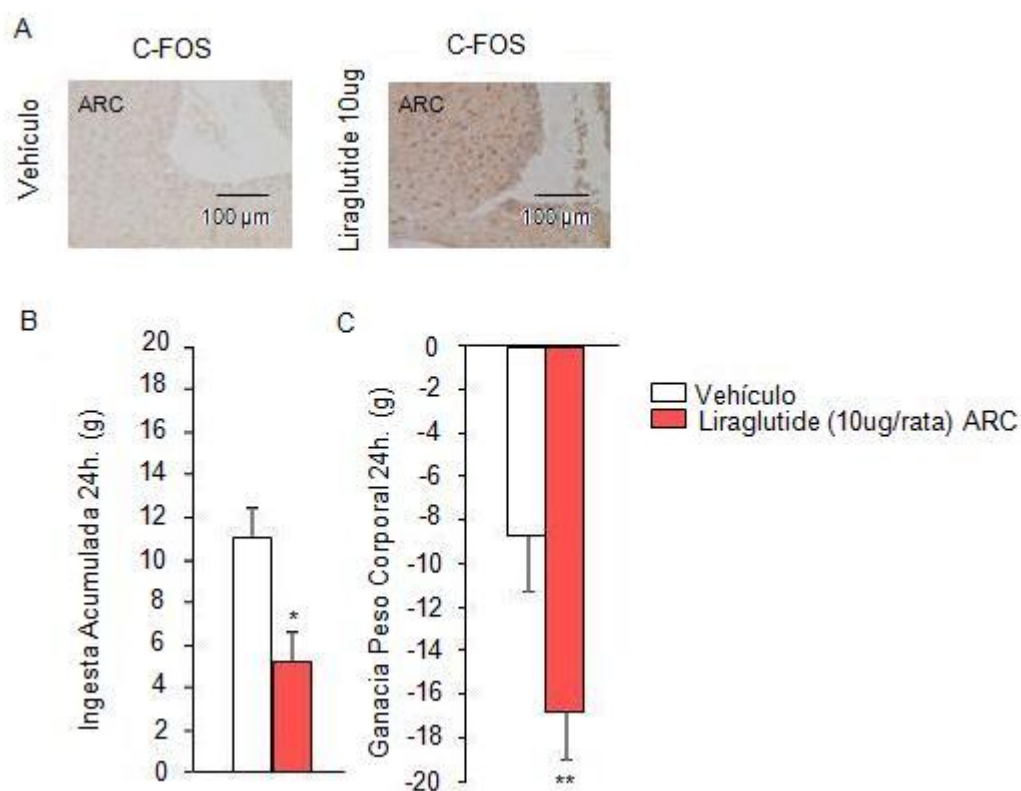


Figura49: Inyección núcleo-específica en el núcleo arcuato. Inmunohistoquímica c-FOS (A), ingesta acumulada (B) y peso corporal (C). * P < 0,05. ** P < 0,01 vs Vehículo. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

En cuanto al análisis de los niveles de expresión de RNAm no se encuentran efectos significativos derivados de la inyección de liraglutide ni en el tejido adiposo pardo (**Figura50.A**) ni en el tejido adiposo blanco. (**Figura50.B**)

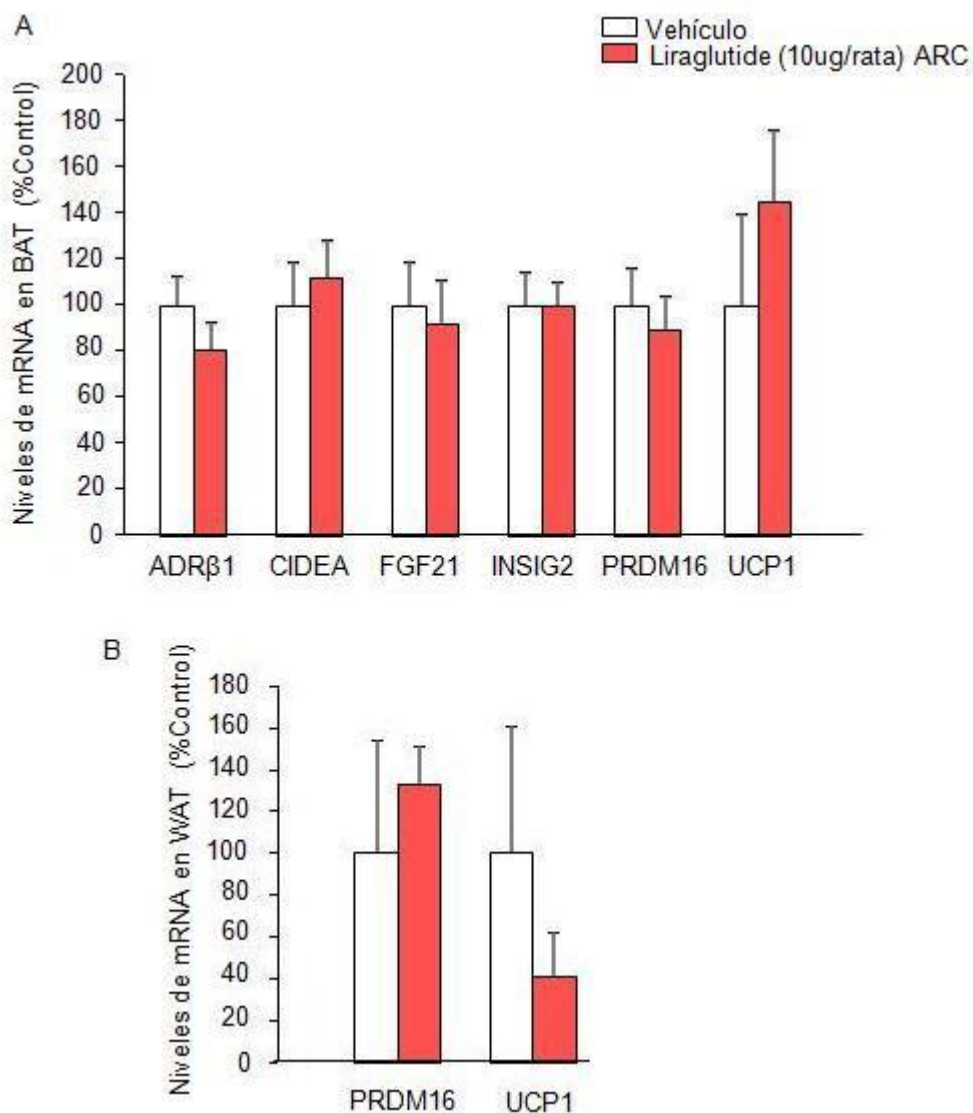


Figura50: Niveles de RNAm en tejido adiposo pardo (A) y tejido adiposo blanco (B) tras la inyección de liraglutide en el núcleo arcuato. * $P < 0,05$ vs control. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

La inyección de liraglutide en el hipotálamos lateral produce un descenso significativo de la ingesta (**Figura51.B**) tras 24 horas, si bien en el caso del peso corporal está próximo a ser estadísticamente significativo (**Figura51.C**) ($P=0,07$). No se observan cambios en la expresión de RNA mensajero ni en el BAT (**Figura52.A**) ni el WAT. (**Figura52.B**)

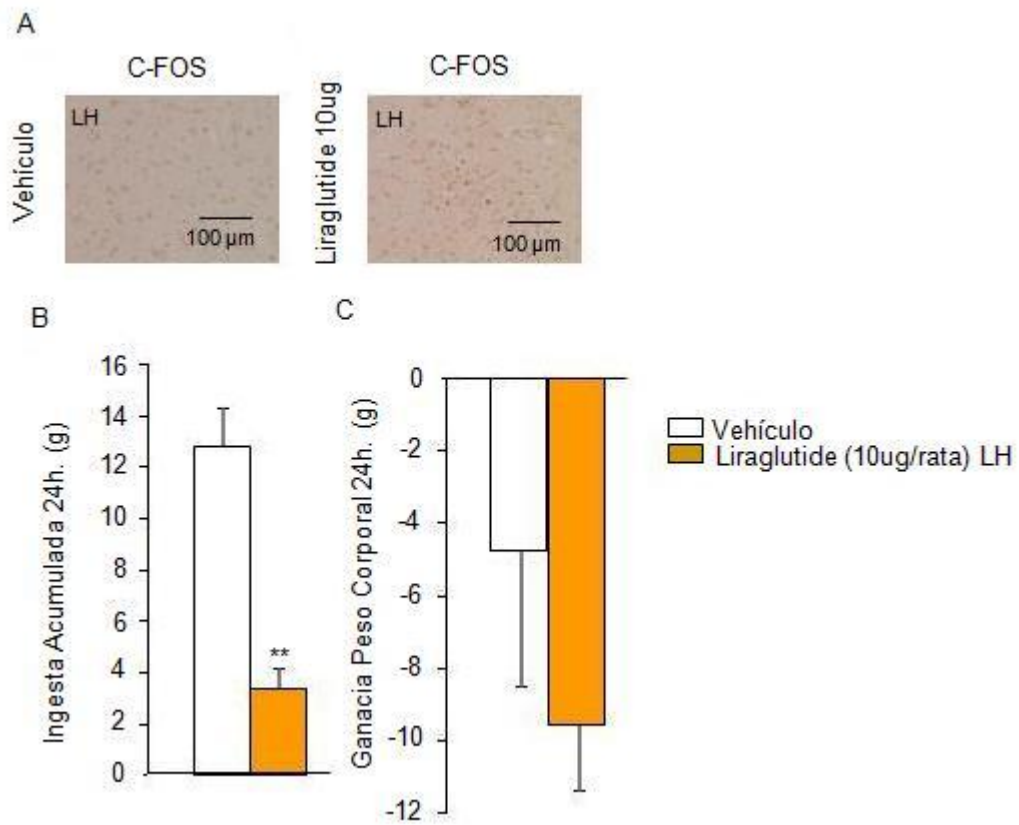


Figura 51: Inyección nucleoespecífica en el núcleo lateral. Inmunohistoquímica c-FOS (A) ingesta acumulada (B) y peso corporal (C). ** $P < 0,01$ vs Vehículo. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

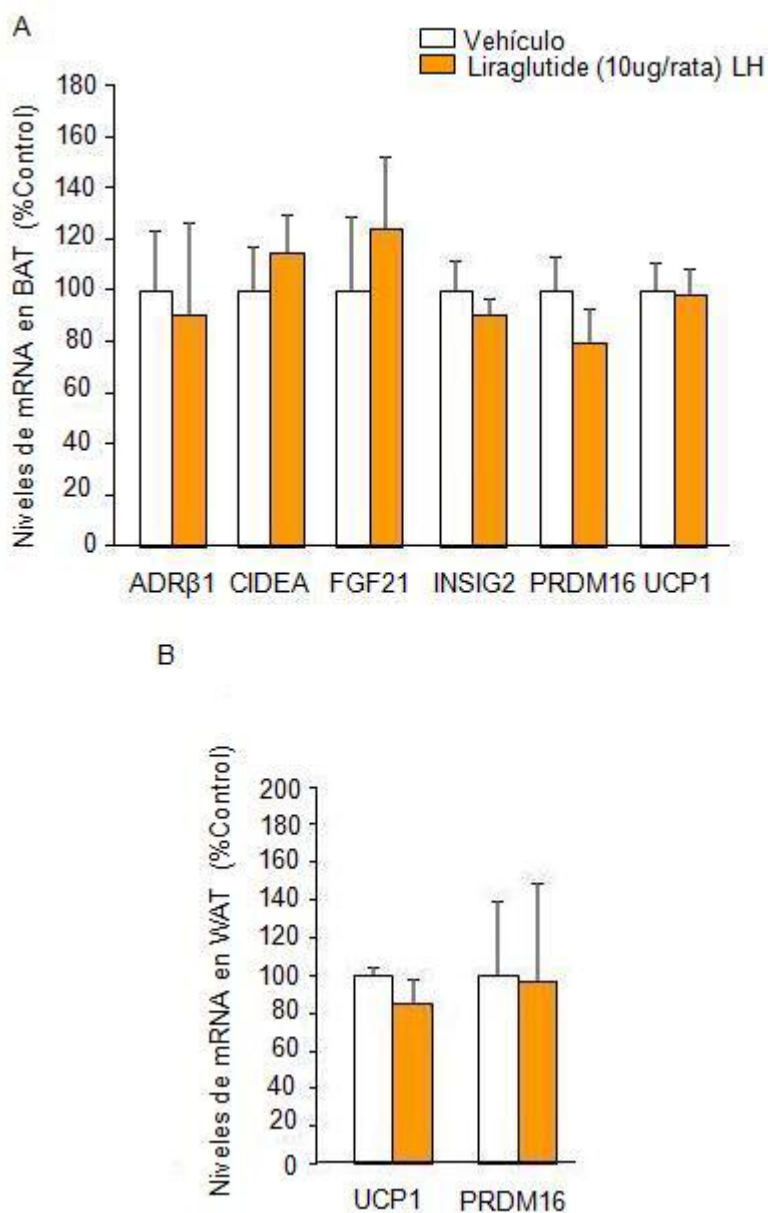


Figura52: Niveles de RNAm en tejido adiposo pardo (A) y tejido adiposo blanco (B) tras la inyección de liraglutide en el núcleo lateral. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

La inyección de liraglutide en el núcleo paraventricular produce un descenso significativo en peso (**Figura35.C**) e ingesta (**Figura53.B**) pero no se observan cambios en los datos obtenidos mediante PCR en tiempo real en ambos tejidos adiposos. (**Figura54.A-B**)

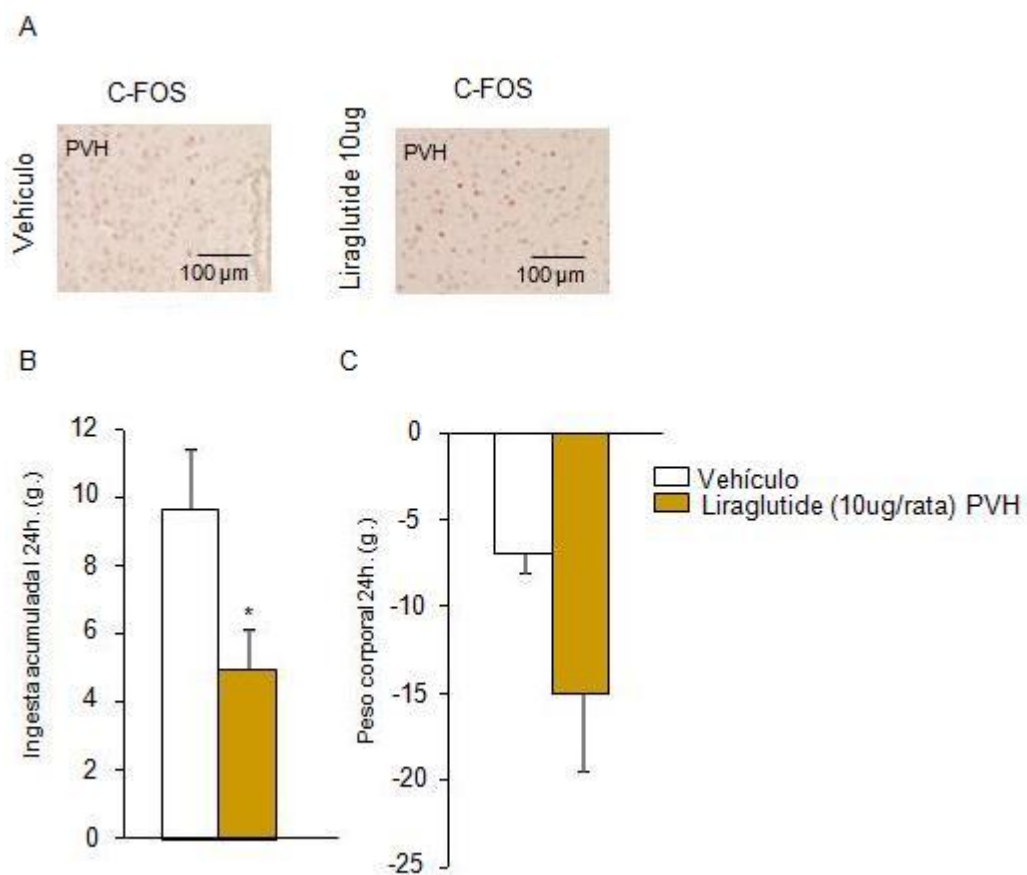
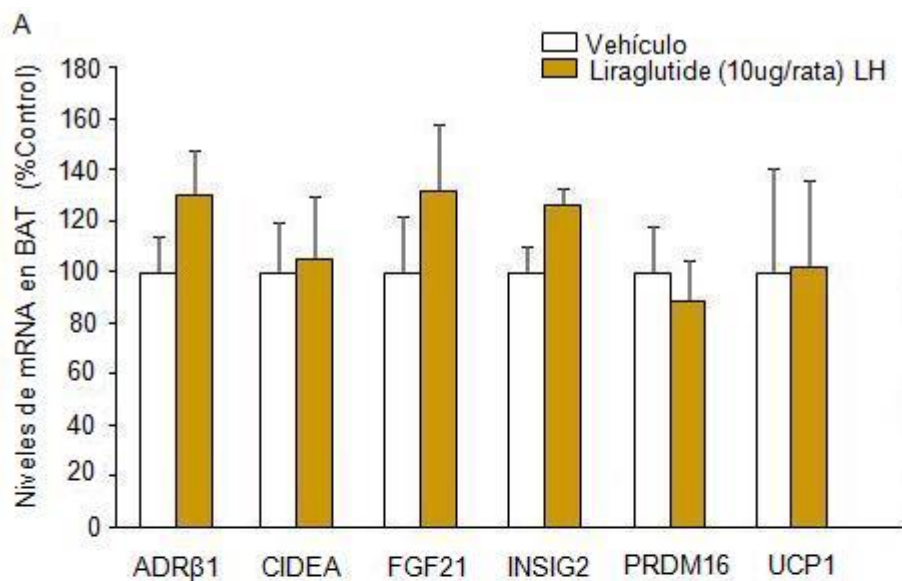


Figura 53: Inyección nucleoespecífica en el núcleo paraventricular. Inmunohistoquímica c-FOS (A) ingesta acumulada (B) y peso corporal (C). * $P < 0,05$ vs Vehículo. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).



B

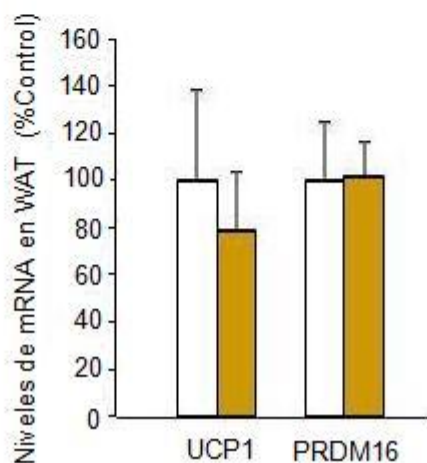


Figura54: Niveles de RNAm en tejido adiposo pardo (A) y tejido adiposo blanco (B) tras la inyección de liraglutide en el núcleo paraventricular. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

La inyección de liraglutide en el núcleo dorsomedial no provoca efectos ni en peso corporal(Figura55.A) ni ingesta acumulada (Figura55.B). Tampoco se observan cambios en la expresión del RNA mensajero tanto de tejido adiposo blanco como pardo.(Figura56.A-B)

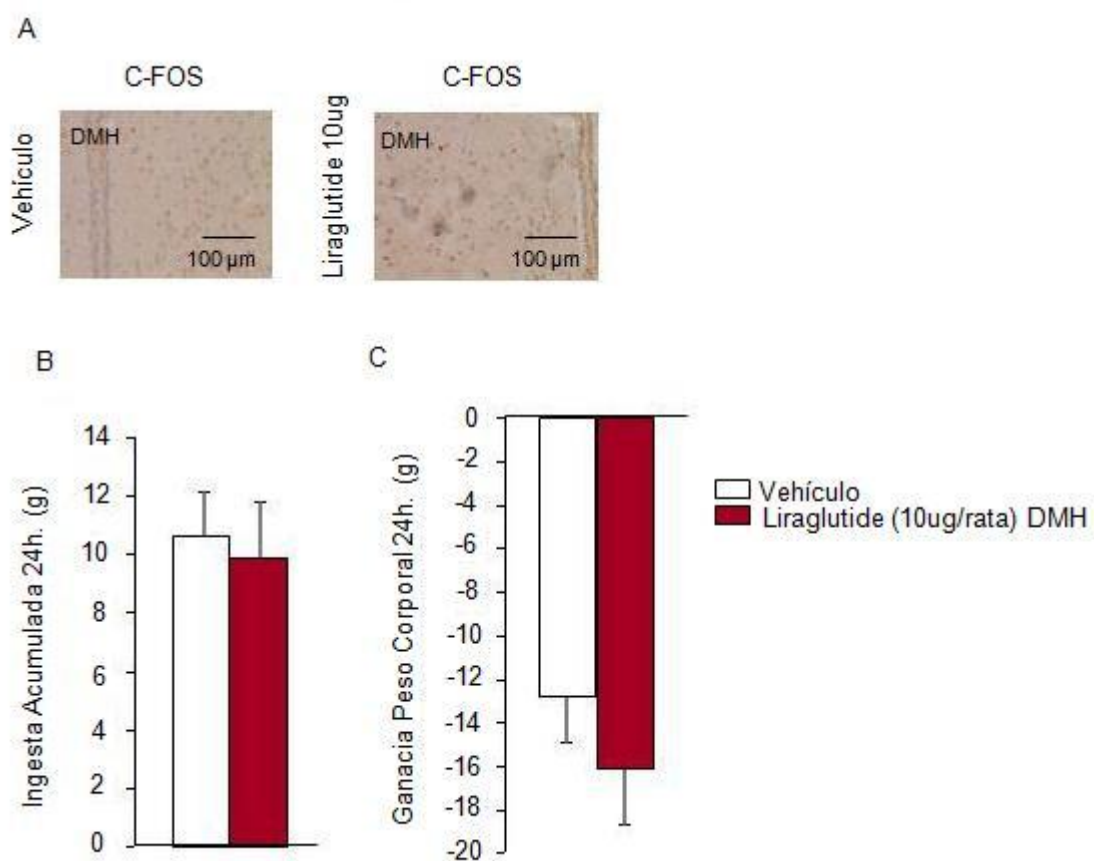


Figura 55: Inyección nucleoespecífica en el núcleo dorsomedial. Inmunohistoquímica c-FOS (A) ingesta acumulada (B) y peso corporal (C). (Test-t de Student n=8 cada grupo).

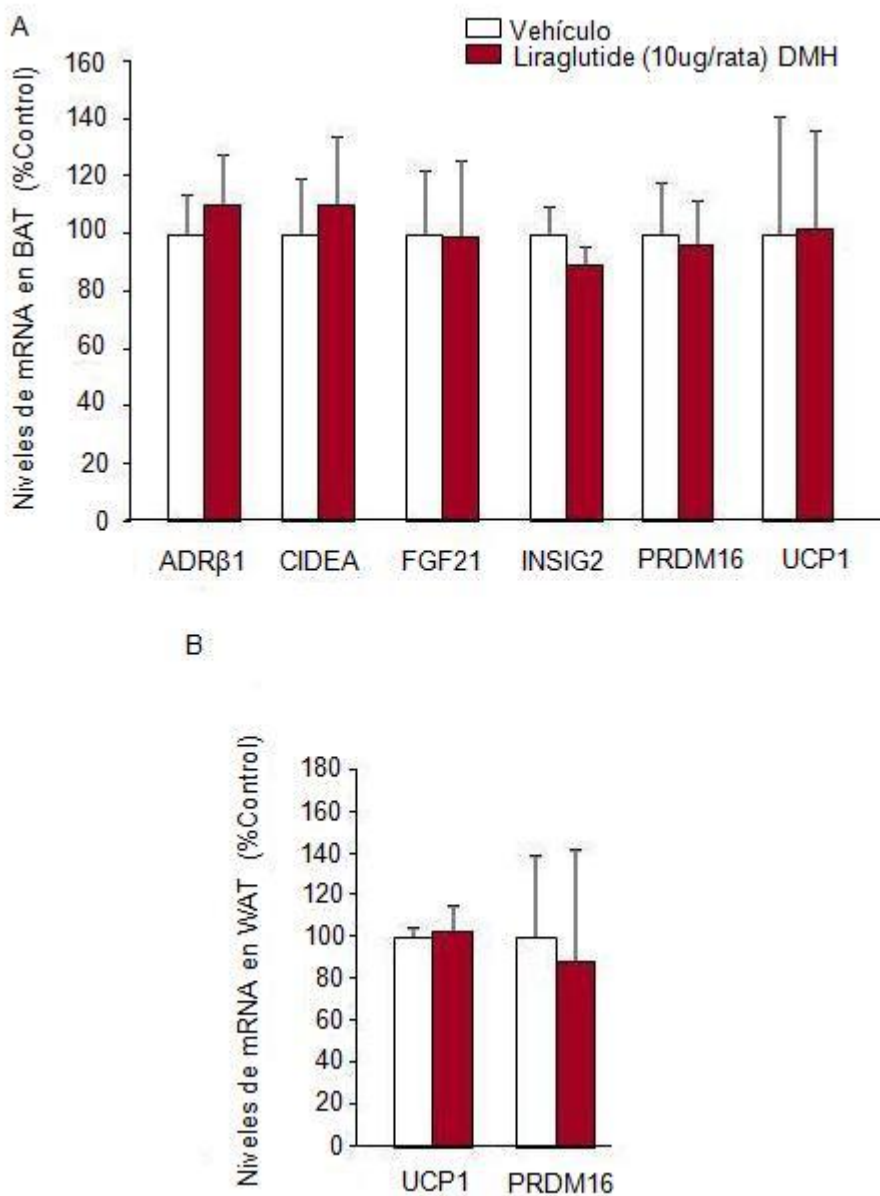


Figura 56: Niveles de RNAm en tejido adiposo pardo (A) y tejido adiposo blanco (B) tras la inyección de liraglutide en el núcleo dorsomedial. (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Cuando inyectamos el agonista de GLP-1 en el núcleo ventromedial observamos una pérdida de peso corporal significativa (**Figura 57.C**), esta pérdida de peso no lleva asociada un descenso significativo de la ingesta. (**Figura 57.B**)

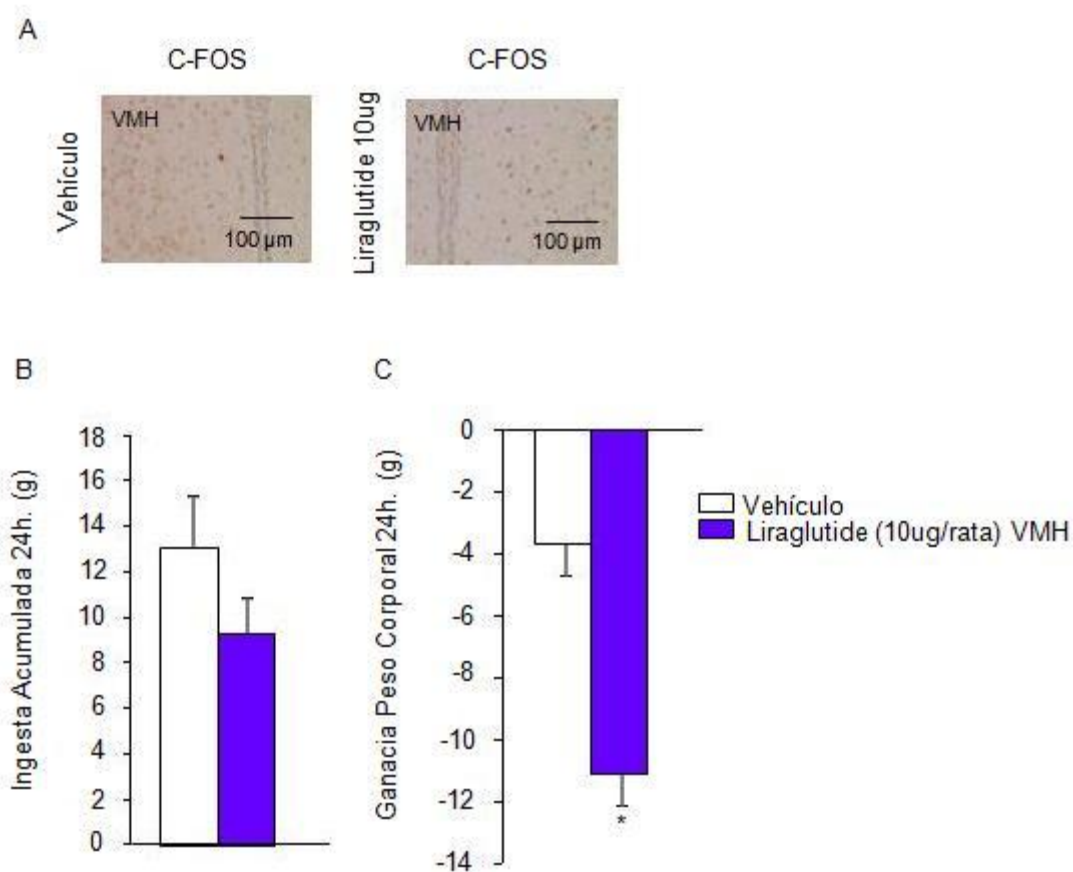


Figura57: Inyección nucleoespecífica en el núcleo ventromedial. Inmunohistoquímica c-FOS (A) ingesta acumulada (B) y peso corporal (C). (Test-t de Student n=8 cada grupo).

Además se observa un incremento en los niveles de expresión del RNA mensajero de UCP1 en el tejido adiposo blanco (**Figura58.C**) y un incremento en la expresión en UCP1 en el tejido adiposo pardo. (**Figura58.A**), dicho incremento también se observa en los niveles proteicos de UCP1 en el tejido adiposo pardo.

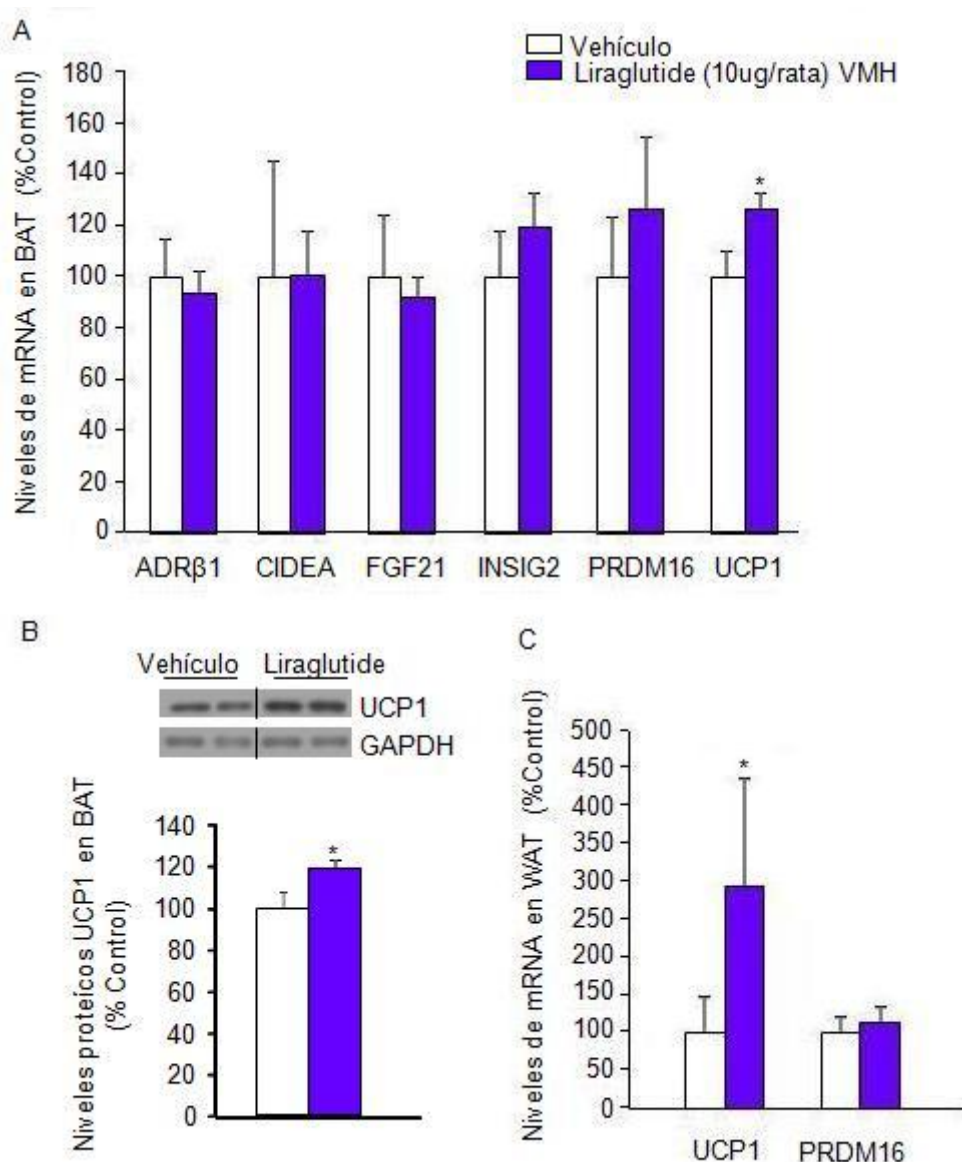


Figura58: Niveles de RNAm en tejido adiposo pardo (A) niveles proteicos de UCP1 en tejido adiposo pardo (B) niveles de RNAm en tejido adiposo blanco(C) tras la inyección de liraglutide en el núcleo ventromedial. * $P < 0,05$ vs control. (Test-t de Student $n=8$ cada grupo).

Ampk es esencial para las acciones de liraglutide en bat y wat.

En los resultados descritos hasta el momento describimos una serie de efectos en tejidos periféricos (tejido adiposo marrón y blanco) tras la inyección de liraglutide tanto a nivel específico de los núcleos hipotalámicos como en el ventrículo lateral.

Dado que AMPK en el núcleo ventromedial se ha descrito como un factor muy importante en la regulación del programa termogénico en el BAT(107, 191), estudiamos la posible implicación de esta quinasa en las acciones de liraglutide. Se observa un descenso en

los niveles de AMPK fosforilado (forma activa) y en pACC (forma inactiva) en el hipotálamo de ratones tratados con liraglutide. **(Figura59)**

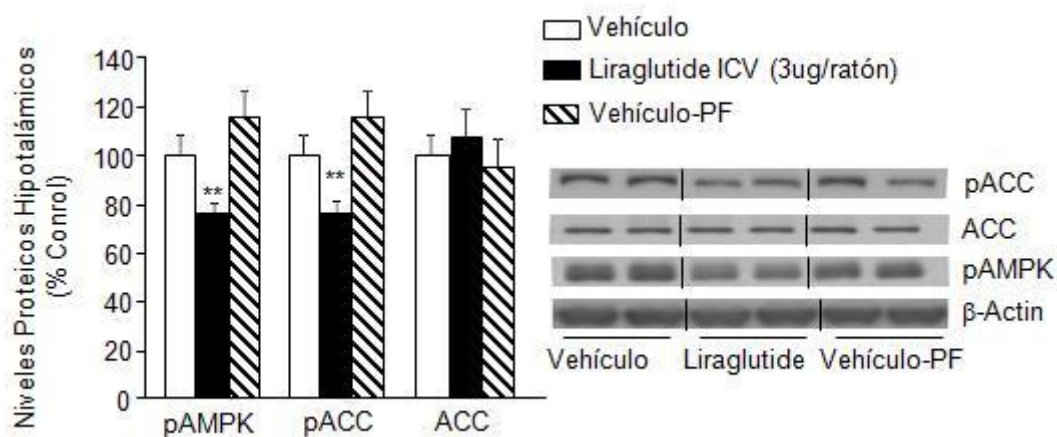


Figura59: Niveles hipotalámicos proteicos medidos mediante western blot ** P < 0,01 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

A continuación se llevó a cabo la activación farmacológica de AMPK mediante el uso del fármaco AICAR mediante la inyección ICV de ambos compuestos. Como resultado se ha encontrado que la activación de AMPK mediante AICAR bloquea la reducción del peso corporal inducida por liraglutide **(Figura60.B)**, si bien es incapaz de bloquear los efectos en la ingesta. **(Figura60.A)**

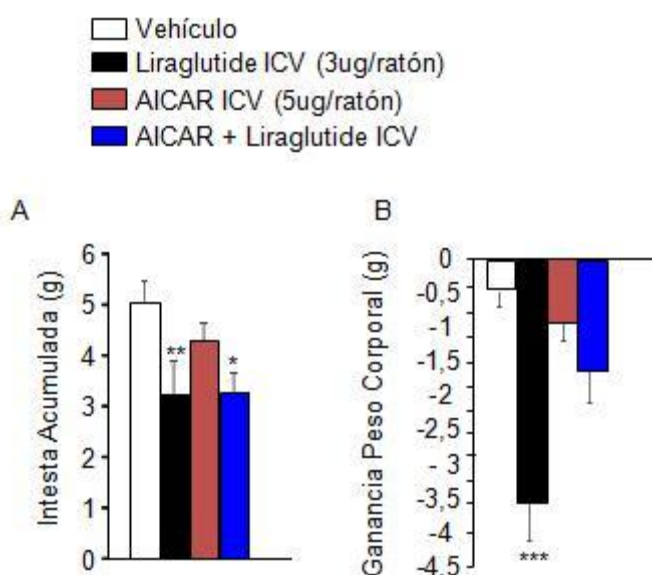


Figura60: A) Ingesta acumulada a 24 horas B) Ganancia de peso corporal a las 24 horas. * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P < 0,001 vs Vehículo. (Test-t de Student; Vehículo vs. Liraglutide; AICAR+ Vehículo vs AICAR vs. Liraglutide; n=8 cada grupo).

Según los datos obtenidos en los experimentos de inyecciones de liraglutide en núcleos concretos del hipotálamo, el núcleo ventromedial se presenta como el mejor candidato a la hora de explicar los efectos periféricos de liraglutide independientes de la ingesta. A continuación de la estimulación farmacológica de AMPK, se llevó a cabo una sobre-expresión de AMPK en el núcleo ventromedial mediante el uso de vectores adenovirales (AMPK-CA) los cuales expresan una isoforma de AMPK la cual carece de elementos reguladores lo que provoca que se exprese de forma constante.. Como resultado encontramos que la pérdida de peso producida por la actividad de liraglutide se ve completamente bloqueada cuando se activa AMPK de manera específica en el núcleo ventromedial. **(Figura61.B)**

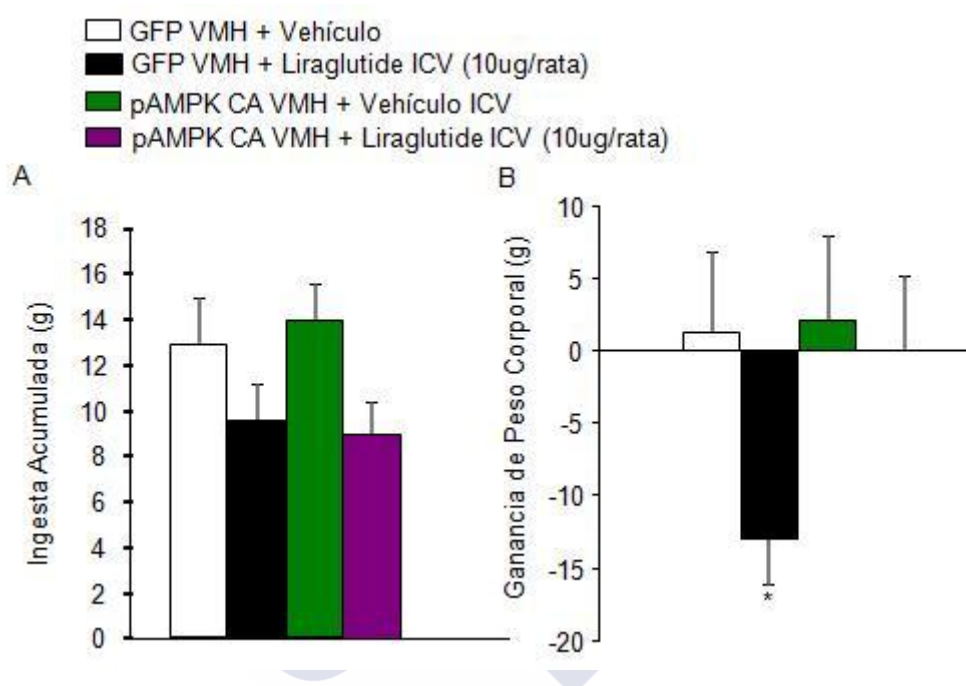


Figura61: Ingesta acumulada 24h. (A) ganancia de peso corporal 24h. (B). * P < 0,05 vs Vehículo (Test-t de Student; GFP+Vehículo vs. GFP+ Liraglutide; pAMPKCA+ Vehículo vs pAMPKCA vs. Liraglutide; n=8 cada grupo).

El estudio de los niveles proteicos de UCP1 revela que el incremento en la expresión de UCP1 debido a los efectos de liraglutide son bloqueados tanto en el tejido adiposo blanco **(Figura62.B)** como el tejido adiposo pardo **(Figura62.A)** del mismo modo que ocurre con el peso corporal cuando AMPK es activada en el núcleo ventromedial.

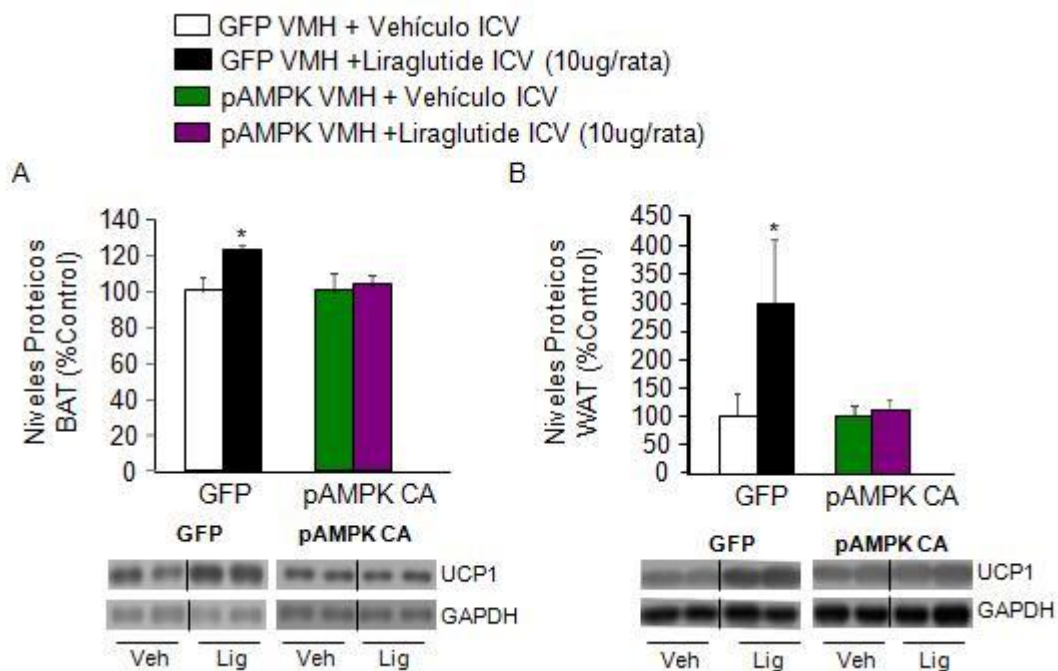


Figura62: Niveles de UCP1 en tejido adiposo pardo (A) y en tejido adiposo blanco (B) * P < 0,05 vs Vehículo. (Test-t de Studen; GFP+Vehículo vs.GFP+ Liraglutide; pAMPKCA+Vehículo vs pAMPKCA vs. Liraglutide; n=8 cada grupo)

A mayores en estas ratas se midieron algunos de los principales parámetros circulares de interés en el estudio de la homeostasis energética y la homeostasis metabólica. En ellas se observa un descenso de los niveles de leptina cuando llevamos a cabo el tratamiento con liraglutide en el ventromedial si bien el descenso de leptina no se observa en aquellos animales que sobreexpresan AMPK. (Tabla6)

	GFP Vehículo	GFP Liraglutide	AMPKCA Vehículo	AMPKCA Liraglutide
Leptina (ng/mL)	1,17±/0,44	0,66±/0,22*	0,48±/0,14	0,85±/0,49
FFA (µg/µL)	0,61±/0,01	0,62±/0,02	0,62±/0,02	0,62±/0,01
TAG (µg/µL)	30,71±/2,70	24,77±/3,06	28,14±/2,78	30,85±/4,57
Insulina (ng/mL)	3,14±/0,51	3,57±/0,51	2,60±/0,51	2,16±/0,18
Glucosa (mg/mL)	25,5±/0,40	25,27±/0,46	26,05±/0,55	25,14±/0,38
Colesterol (µg/µL)	0,94±/0,04	0,97±/0,03	1,01±/0,03	1,06±/0,03

Tabla6: Parámetros circulantes tratadas con vehículo o liraglutide y con GFP o con adenovirus de AMPK constitutivamente activo * P < 0,05 vs Vehículo. (Test-t de Studen; GFP+Vehículo vs.GFP+ Liraglutide; pAMPKCA+ Vehículo vs pAMPKCA vs. Liraglutide; n=8 cada grupo)

Previamente se ha observado que el sistema Sirt1/p53 interacciona con AMPK a nivel del sistema nervioso central siendo elementos fundamentales para el efecto orexigénico de ghrelin(106). Adicionalmente se ha observado que GLP-1 inhibe los efectos de ghrelin(192). Para estudiar la posible implicación del sistema SIRT1/p53 en las acciones de liraglutide administramos liraglutide en ratones Sirt1 transgénicos que presentan una sobreexpresión moderada de Sirt1 y los correspondiente controles de fenotipo normal. Observamos que tras 24h de la inyección ICV de liraglutide tanto los ratones normales como los SIRT1-tg disminuyen su ingesta(Figura63.A) y su peso corporal.(Figura63.B)

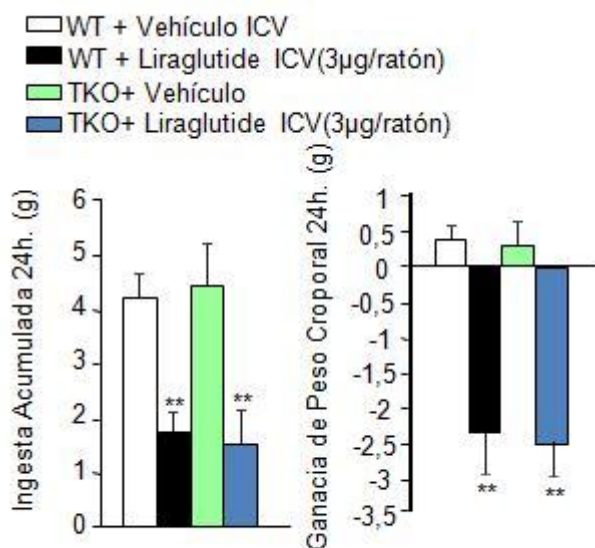


Figura63: Ingesta acumulada 24h. (A) ganancia de peso corporal 24h. (B). ** P < 0,01 vs Vehículo. (Test-t de Studen; WT+Vehículo vs.WT+ Liraglutide; TKO+ Vehículo vs TKO vs. Liraglutide; n=8 cada grupo)

Igualmente tras la inyección ICV de liraglutide en ratones p53 KO y sus respectivos controles se observa un descenso significativo de peso (**Figura64.B**) e ingesta (**Figura 64.A**) tanto en los KO como en los controles.

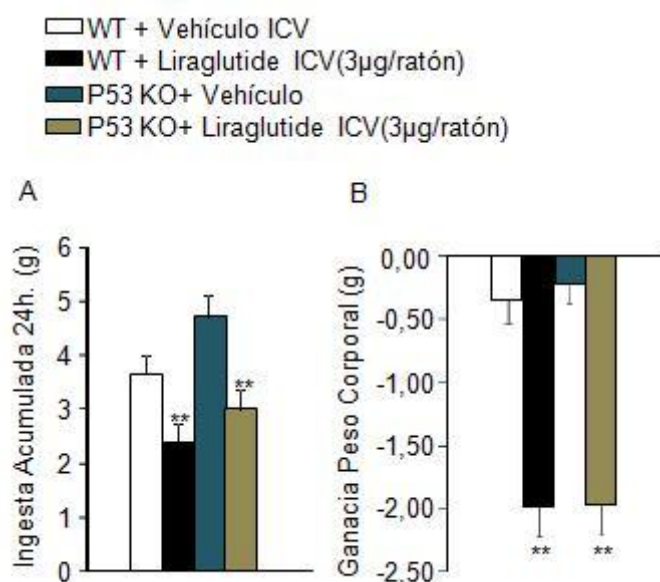


Figura64: Ingesta acumulada a 24h. (A) ganancia de peso corporal a 24h. (B). ** $P < 0,01$ vs Vehículo. (Test-t de Student; WT+Vehículo vs.WT+ Liraglutide; P53KO+ Vehículo vs P53KO vs. Liraglutide; n=8 cada grupo)

Efectos de liraglutide en modelos animales de obesidad inducida por dieta.

Para comprobar si los efectos descritos anteriormente se producen también en animales obesos, llevamos a cabo la administración ICV de liraglutide en ratones obesos inducidos por dieta. Observamos un descenso significativo en la ingesta (**Figura65.A**), y en el peso en los grupos tratado con liraglutide. Sin embargo, este descenso de la masa corporal también se observó en el grupo “pair feed” por lo que la pérdida de peso será debida únicamente a los efectos anorexigénicos de liraglutide. (**Figura65.B**)

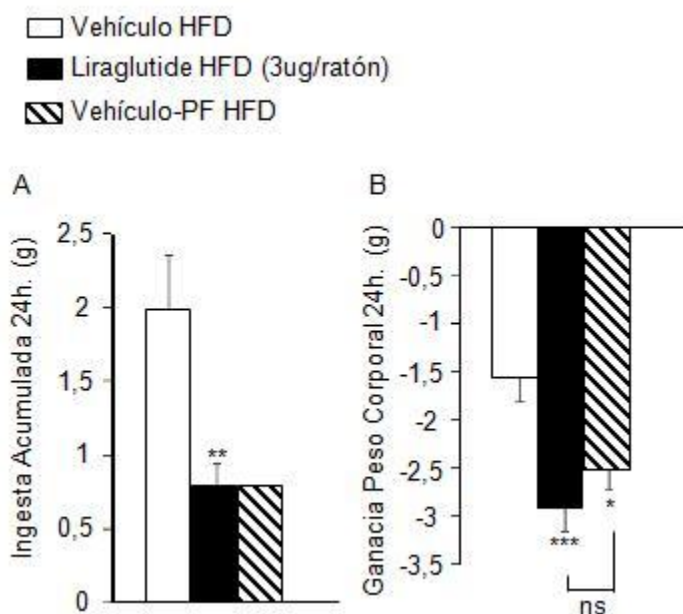


Figura66: Ingesta acumulada (A) y ganancia de peso corporal (B) en animales alimentados con dietas alta en grasa. . * P < 0,05, P < 0,001 vs Vehículo. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Consistente con estos resultados observamos que el liraglutide es incapaz de producir cambios en los niveles hipotalámicos de pAMPK. **(Figura66)**

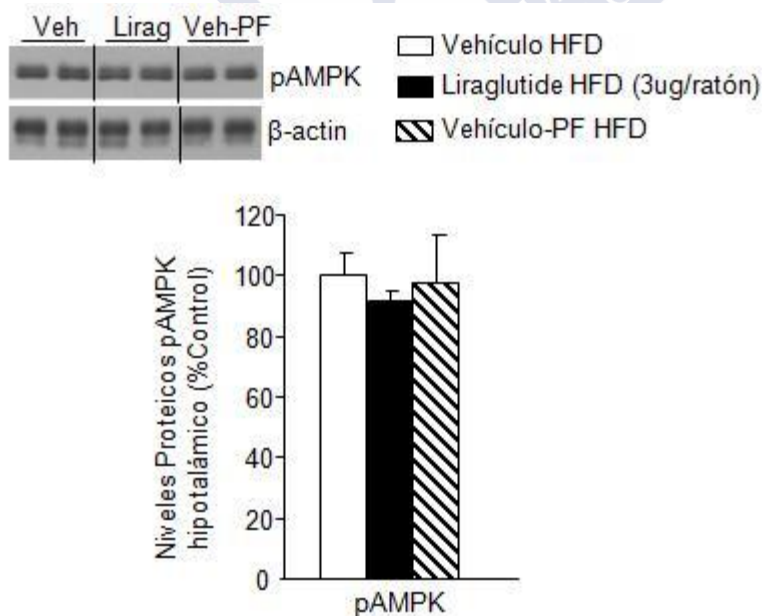


Figura67: Niveles proteicos hipotalámicos de pAMPK en animales alimentados con dieta alta en grasas. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

El siguiente paso fue comprobar que ocurre en la expresión de marcadores termogénicos en el tejido adiposo pardo y en el tejido adiposo blanco. A nivel periférico no se registra ningún cambio en los niveles de RNA mensajeros de los marcadores termogénicos en el tejido adiposo marrón. **(Figura68)**

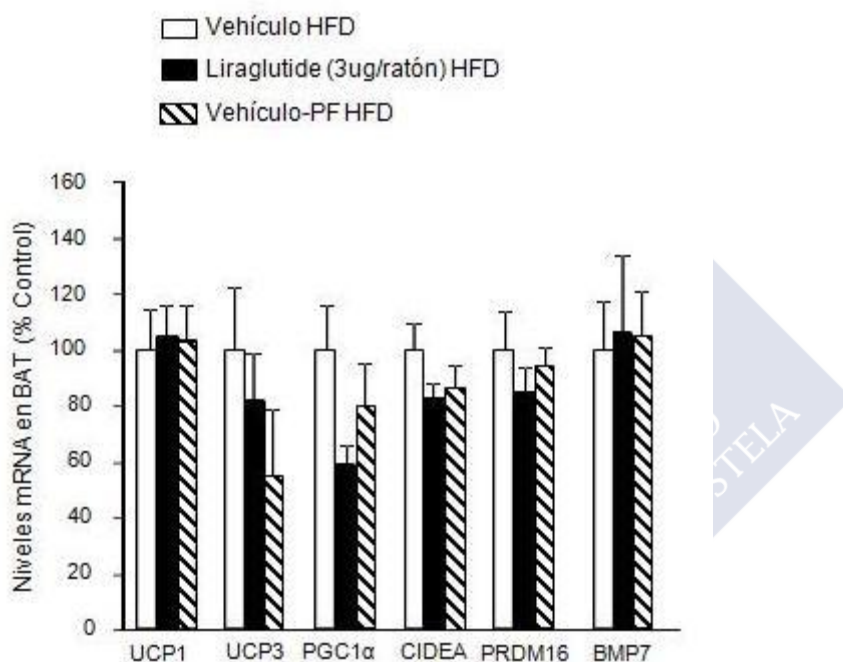


Figura68: Niveles de mRNA en el tejido adiposo marrón del animales alimentados con dieta alta en grasas. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Del mismo modo tampoco se producen cambios en los niveles de proteína de UCP1 ni en los niveles de RNA de PRDM16 en el tejido adiposo blanco. **(Figura69)**

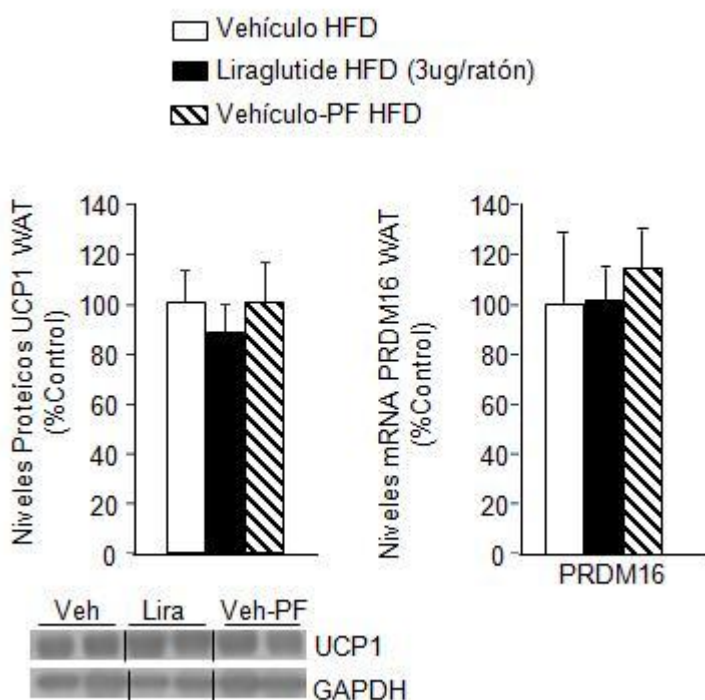


Figura69: niveles proteicos de UCP1 en tejido adiposo blanco (A) niveles de mRNA de PRDM16 (B). (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Esta falta de efectos termogénicos tras la inyección central de liraglutide también se va a observar cuando estudiamos el gasto energético.(Figura70)

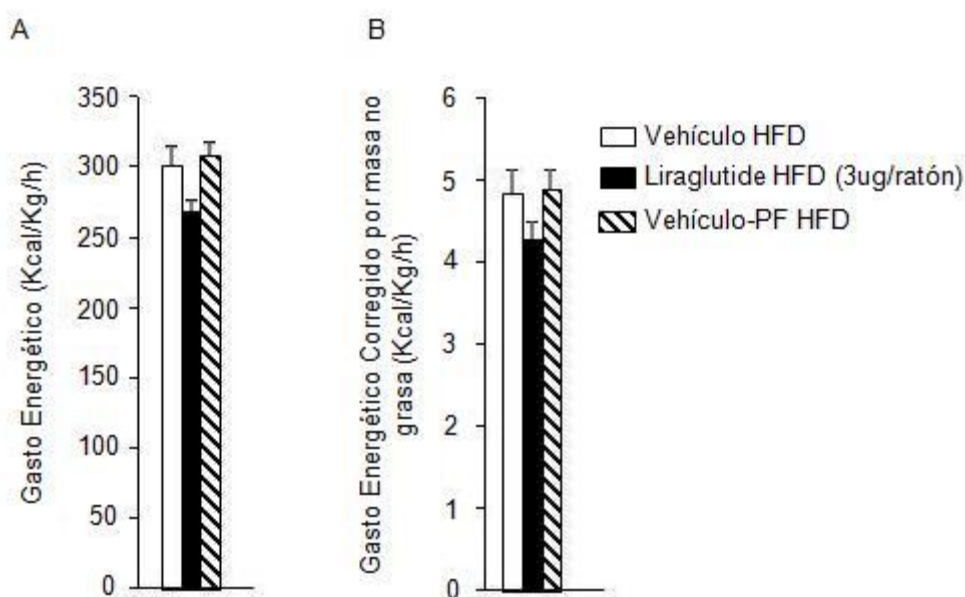


Figura70: Gasto Energético (kcal/g/h) total (A), gasto energético corregido por la masa no magra (B). (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Efectos de la administración de liraglutide de forma crónica.

Anteriormente hemos descrito toda una serie de efectos anorexigénicos y termogénicos asociados a la administración central de liraglutide, los efectos de la administración central sobre el peso y la ingesta se prolongan a lo largo de 48 horas, por lo que la administración crónica de liraglutide resulta de interés para comprobar si los efectos sobre la homeostasis térmica se mantienen a lo largo del tiempo.

La administración crónica durante 7 días de liraglutide a nivel central no produce ningún efecto significativo en el peso corporal o en la ingesta acumulada en animales alimentados con dieta estándar.(Figura71)

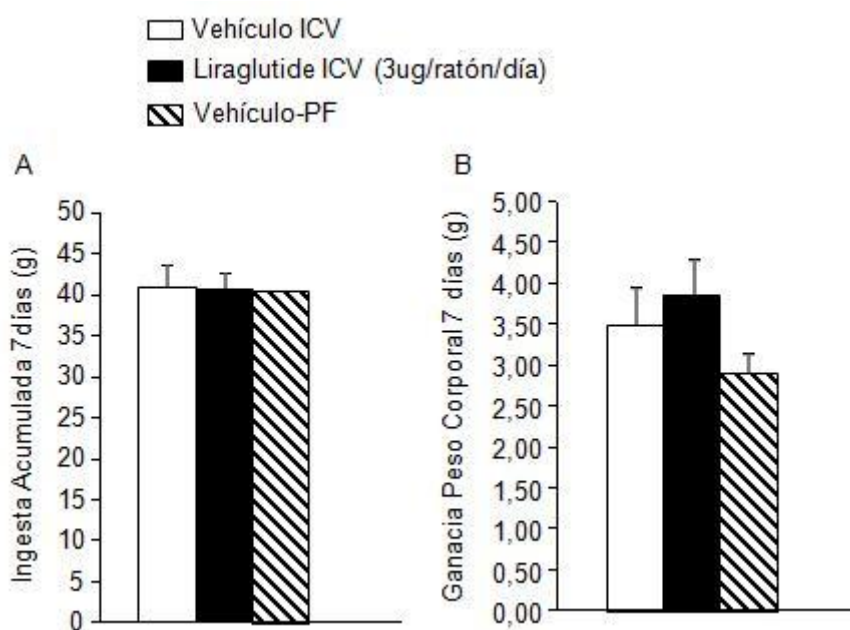


Figura71: Ingesta acumulada (A) y peso corporal (b) tras 7 días de tratamiento crónico con liraglutide ICV en ratones alimentados con dieta estándar . (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Igual que en el caso de los animales alimentados con dieta estándar observamos que el tratamiento crónico ICV mediante minibombas osmóticas no produce efectos sobre el peso y la ingesta de animales obesos.(Figura72)

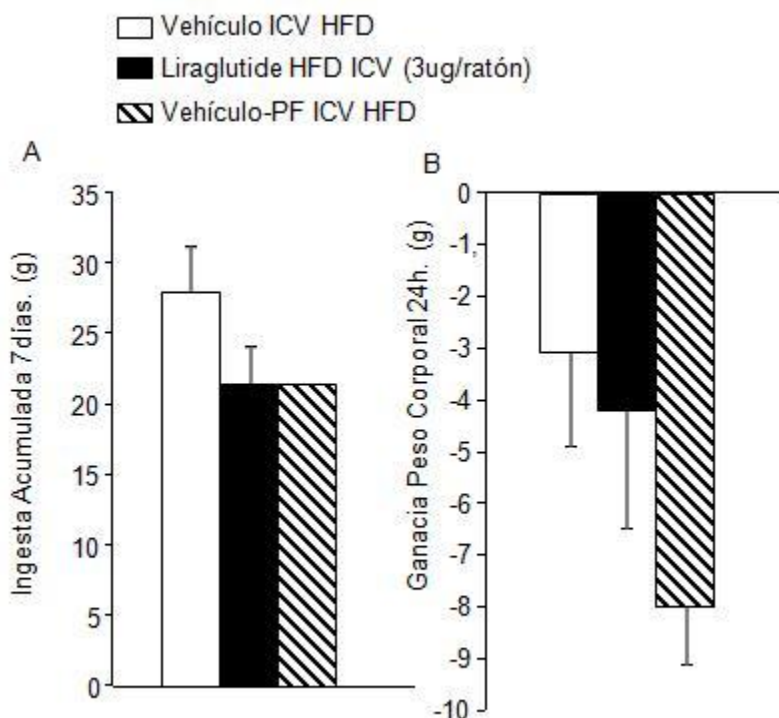


Figura72: Ingesta acumulada (A) y peso corporal (b) tras 7 días de tratamiento crónico con liraglutide ICV en animales obesos. (ANOVA de una vía n=8 cada grupo)

Los análogos de glp-1 incrementan el gasto energético en pacientes obesos con diabetes de tipo 2.

Como complemento a los datos mecanísticos obtenidos en ratones llevamos a cabo el estudio de una cohorte de pacientes obesos que presentan diabetes tipo 2 y que fueron tratados durante un año con dos análogos diferentes de GLP-1 (exenatide y liraglutide) en combinación con metformina. Durante el periodo de tratamiento no se observó ningún episodio de hipoglucemia ni tampoco se encontraron casos de pancreatitis. Al inicio del estudio, todos los grupos presentaban una distribución uniforme de sexos y edades, igualmente no se observaron diferencias significativas en cuanto al índice de masa corporal, contorno de la cintura, composición corporal, gasto energético, cociente respiratorio o variables bioquímicas u hormonales.

Tras un año de tratamiento se produjo un descenso en los niveles de glucosa e insulina tras el ayuno. Tras el año de tratamiento no se observaron cambios en los niveles de lipoproteínas de alta densidad o en los niveles de lipoproteínas de baja densidad. Los individuos tratados con análogos de GLP-1 junto a metformina presentan una reducción significativa en el índice de masa corporal y de la cantidad de masa corporal así como un aumento en la masa no grasa. No se produjeron tampoco cambios en el cociente respiratorio y los pacientes continuaron con sus hábitos sedentarios.

El gasto energético total no se encuentra alterado tras el año de tratamiento (Tabla.7), si bien cuando ajustamos dicho gasto energético a los niveles de masa no grasa observamos

como en aquellos individuos tratados con agonistas de GLP-1 se registra un incremento significativo del gasto energético (**Figura73.B-C**), mientras que en aquellos pacientes tratados con metformina (**Figura73.A**) no se registró el incremento en el gasto energético.

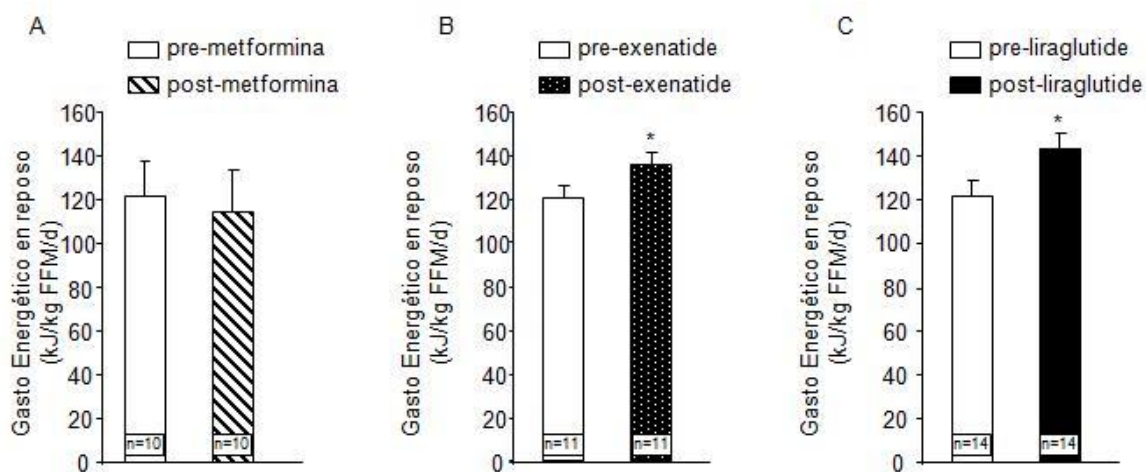
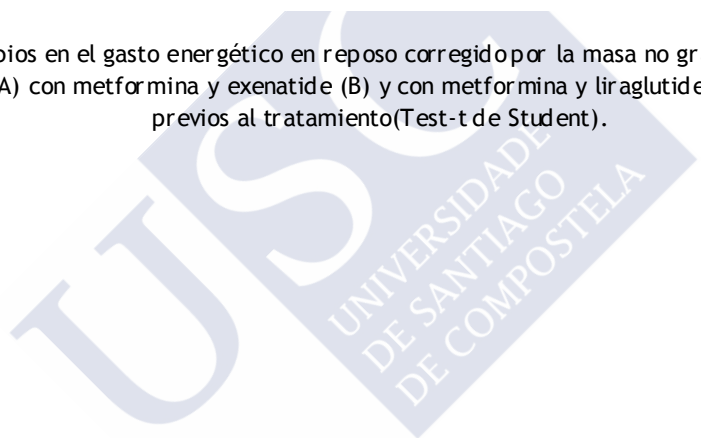


Figura73: Cambios en el gasto energético en reposo corregido por la masa no grasa en pacientes tratados con metformina (A) con metformina y exenatide (B) y con metformina y liraglutide (C). * P < 0,001 vs Datos previos al tratamiento (Test-t de Student).



TRATAMIENTO	METFORMINA		METFORMINA +EXENATIDE		METFORMINA+LIRAGLUTIDE		Significancia
	Pre-Metformina	Post-Metformina	Pre-Exenatide	Post-Exenatide	Pre-Liraglutide	Post-Liraglutide	
Género (m/f)	7/3	7/3	8/3	8/3	10/4	10/4	n.s.
Edad (years)	65 +/- 11	-	67 +/- 14	-	66 +/- 15	-	n.s.
IMC (kg/m ²)	33.0 +/- 6.6	31.4 +/- 9.5	34.9 +/- 2.6	32.1 +/- 1.8*	35.3 +/- 2.2	32.0 +/- 2.1*	*
Cintura (cm)	115 +/- 13	110 +/- 19	116 +/- 10	106 +/- 15	117 +/- 11	110 +/- 16	n.s.
Masa grasa (%)	39.0 +/- 16.9	37.9 +/- 9.4	39.5 +/- 4.3	35.8 +/- 3.7*	39.2 +/- 3.6	35.1 +/- 3.3*	*
FFM (%)	63.3 +/- 17.0	67.1 +/- 9.3	60.7 +/- 4.2	64.3 +/- 3.4*	60.8 +/- 3.1	64.9 +/- 3.0*	*
REE (kJ/d)	7670 +/- 1030	7469 +/- 1230	7595 +/- 832	8240 +/- 901	7623 +/- 1014	8326 +/- 1107	n.s.
REE (kJ/kg/d)	74.9 +/- 10.0	74.1 +/- 11.7	75.7 +/- 8.4	79.1 +/- 8.7	76.0 +/- 10.3	80.9 +/- 11.2	n.s.
REE (kJ/kg FFM/d)	121.0 +/- 16.7	114.3 +/- 18.8	120.6 +/- 5.1	135.7 +/- 6.0*	122.4 +/- 6.9	143.6 +/- 7.1*	*
RQ (vCO ₂ /vO ₂)	0.85 +/- 0.02	0.84 +/- 0.03	0.85 +/- 0.04	0.85 +/- 0.05	0.83 +/- 0.06	0.84 +/- 0.04	n.s.
PAL	1.47 +/- 0.11	1.46 +/- 0.08	1.45 +/- 0.15	1.48 +/- 0.12	1.46 +/- 0.13	1.47 +/- 0.16	n.s.

Tabla 7: IMC, índice de masa corporal; FFM, masa no grasa; REE, gasto energético en reposo; RQ, cociente respiratorio; PAL, nivel de actividad física. *p<0.05 comparador con los datos previos al tratamiento. (Test-t de Student Metformina n=10; Metformina + Exenatide n=11; Metformina + Liraglutide n=14)

DISCUSIÓN

BLOQUE I. EFECTO DE LA HAPLODEFICIENCIA DE ENDOGLINA SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.

Los animales que presentan una ausencia total de endoglina (Eng $-/-$) (181, 193) mueren durante la fase embrionaria debido a que el proceso de angiogénesis no ocurre de forma correcta. Los animales heterocigotos (Eng $+/-$) son perfectamente viables y no presentan problemas reproductivos y constituyen una herramienta útil para el estudio del papel fisiológico de la proteína endoglina.

La endoglina es una glicoproteína relacionada con numerosas acciones como la angiogénesis, fisiología vascular, preclampsia, etc. (150). La deficiencia de esta proteína produce un descenso en la síntesis de NO lo que produce que el endotelio deje de funcionar correctamente, (150) dicho proceso suele ir acompañado por alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la aparición de síndrome metabólico, (180, 194). Por tanto la endoglina podría tener un papel potencial en el proceso de regulación de la homeostasis energética.

La haploinsuficiencia para la endoglina no produce cambios importantes en la ingesta ni en el peso o la composición corporal. Del mismo modo el fenotipo metabólico tampoco presenta alteraciones en gasto energético, actividad locomotora o cociente respiratorio, sugiriendo que la hemideficiencia de endoglina no va a presentar un rol importante en aquellos aspectos relacionados con el control del peso corporal. Además es importante señalar que este fenotipo se observa tanto en animales alimentados con dieta alta en grasa como en animales alimentados con una dieta normal.

Los niveles circulantes de endoglina están correlacionados con los niveles basales de glucosa en pacientes con diabetes e hipertensión y con los niveles de hemoglobina glicosilada en pacientes con diabetes (179), por lo que decidimos estudiar los efectos que tiene la deficiencia de endoglina en el metabolismo de la glucosa. (179) Nuestros datos indican que la haploinsuficiencia de endoglina no produce cambios relevantes en la sensibilidad a la insulina en animales alimentados con dieta estándar. Cuando los animales son alimentados con dieta alta en grasa, que incrementa el riesgo de padecer obesidad y resistencia a insulina, sí encontramos que los niveles de glucosa se encuentran reducidos significativamente una hora después de la administración de la insulina con respecto a sus compañeros de camada de genotipo normal. Sin embargo, cuando se analiza el área bajo la curva no existen diferencias

en la sensibilidad a la insulina entre los animales haploinsuficientes con respecto a sus controles.

Los datos obtenidos en humanos previamente y los datos que obtuvimos en los ratones indican que la ausencia de endoglina presenta un rol importante en la regulación de los niveles de insulina, ya que la haploinsuficiencia de endoglina reduce la hiperinsulinemia inducida por la dieta alta en grasa.(179) Tenemos que resaltar que el descenso en los niveles de insulina se produce sin que existan alteraciones en el peso corporal lo que sugiere que de algún modo la endoglina presenta un rol en la síntesis y/o la liberación de insulina.

La vía de señalización de PI3K/Akt es una de las dianas sobre las que actúa la insulina y va a estar suprimida por las acciones de PTEN(195). Se ha encontrado que la inhibición de la vía de PI3K/Akt debido a la sobreexpresión de PTEN reduce los niveles de endoglina circulante debido a la inhibición de su liberación en las células endoteliales. Dada la relación existente entre la vía PI3K/Akt y la síntesis y liberación de endoglina decidimos determinar si los animales con deficiencia en endoglina presentan alteraciones en esta vía. Encontramos un descenso en los niveles proteicos de pAKT en el hígado de los animales haploinsuficientes, esta relación inversa entre el patrón de expresión de endoglina y la activación de la ruta de supervivencia promovida por AKT en el hígado encaja con la capacidad antiapoptótica y con las acciones en la proliferación celular endotelial debidas a las acciones de endoglina. La expresión de pAKT se encuentra inalterada en el tejido adiposo blanco y en el músculo. Además, la haploinsuficiencia no provoca alteraciones en los niveles de PTEN en hígado, tejido adiposo blanco o músculo. Estas evidencias observadas en conjunto evidencian una modulación diferencial de AKT y PTEN debida a la ausencia parcial de endoglina, siendo además la modulación de AKT dependiente del tipo de tejido que se estudie. Estudios tanto en cultivos celulares como en animales demuestran la importancia de NFκ-B en las patologías asociadas con la señalización de la insulina . (210) En este estudio no hemos conseguido encontrar alteraciones en los patrones de expresión de NFκ-B en tejido adiposo blanco, hígado o músculo, de tal modo que los niveles del factor de transcripción NFκ-B no están regulados por endoglina. A nivel celular la insulina estimula la captación de glucosa induciendo la translocación del receptor de glucosa 4 (GLUT4) desde sus lugares de almacenaje intracelular a la membrana celular, donde facilita el transporte de glucosa desde la matriz extracelular al interior de los adipocitos o de las fibras musculares(196). Así estudiamos los niveles del receptor de glucosa 4 y encontramos que en el tejido adiposo blanco los niveles de dicho receptor se encuentran incrementados en los animales deficientes en endoglina alimentados con HFD. La importancia del GLUT 4 en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y de la sensibilidad a la insulina ha sido demostrado en diferentes modelos animales(197). La sobre-expresión encontrada en GLUT4 en animales heterocigotos (Eng +/-) podría deberse a un mecanismo de compensación debido a los bajos niveles de insulina.

Otro aspecto clave en un estado de obesidad inducida por dieta es el incremento de los niveles de triglicéridos en el hígado(198). En el caso de los animales haploinsuficientes para

endoglina alimentados con dieta alta en grasa observamos que los niveles totales de triglicéridos hepáticos se encuentran reducidos.

Las personas afectadas por HHT (Telangiectasia hereditaria hemorrágica) presentan alteraciones en la expresión génica en sus células endoteliales de tal modo que un 20% de sus genes presentan patrones de expresión alterados con respecto a individuos sanos. Gran parte de estos genes pertenecen a la familia proteica SLC, que está formada por toda una serie de receptores de membrana entre los que se encuentran los transportadores de glucosa (GLUT1 y 4), el transportador de ácidos grasos FATP1, el transportador mitocondrial de fosfatos PiC y el transportador mitocondrial de glutamato GC-1, se ha demostrado que estos genes están involucrados en vías de señalización dependientes de insulina. Estos datos sirven como apoyo a la relación existente entre la endoglina y la regulación de la insulina.

En resumen los datos obtenidos sugieren que los animales haploinsuficiente para endoglina presentan alteraciones compatibles con un defecto en la producción y/o liberación de insulina por las células beta del páncreas cuando son sometidos a un periodo prolongado a comida alta en grasas. Además, cuando los animales son alimentados con una dieta alta en grasas, la endoglina también ejerce un papel regulador en el contenido lipídico del hígado.

BLOQUE II. EFECTO A NIVEL DEL SISTEMA CENTRAL DE GLP-1 SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y ADIPOSIDAD.

Los mecanismos centrales que convierten a GLP-1 en un potencial tratamiento contra el desarrollo de la obesidad son fundamentalmente tres: La reducción de la ingesta(134), el descenso en el almacenamiento lipídico(199) en el tejido adiposo blanco y, por último, un incremento en la actividad termogénica asociada al tejido adiposo pardo(142). La diversidad de estas acciones a nivel central es probablemente debida a la amplia distribución del receptor de GLP-1 en el sistema nervioso central. (200)

Actualmente se están utilizando una serie de terapias basadas en el uso de agonistas de GLP-1 junto con otro tipo de fármacos (normalmente metformina) como tratamiento de la diabetes tipo 2 en humanos(201). Liraglutide es un análogo de GLP-1 de actuación a largo plazo indicado para el tratamiento de la diabetes tipo 2(202, 203). A mayores de su capacidad anti diabética se ha demostrado que lleva asociada una reducción del peso tanto en roedores obesos(203) como en pacientes (201).

Estudios anteriores han demostrado la existencia de diferencias tanto en la intensidad del efecto anorexigénico como en la duración del mismo en las acciones centrales de GLP-1 con respecto a sus análogos cuando se administran en el sistema nervioso central (179) . En el presente estudio estudiamos los efectos producidos por la inyección de liraglutide en el sistema nervioso central sobre el tejido adiposo pardo y blanco.

En este trabajo demostramos que la administración de liraglutide en el sistema nervioso central estimula la termogénesis y la adquisición de características propias del tejido adiposo pardo por parte del tejido adiposo blanco, si bien no se encuentran efectos en el hígado. Según

nuestros datos estos efectos son debidos a la acción de AMPK hipotalámico en el núcleo ventromedial. Estos resultados evidencian un mecanismo central mediante el cual se explican las acciones de GLP-1 sobre el tejido adiposo independientemente de sus acciones sobre la ingesta. El descenso en el peso corporal se ha observado tanto en animales delgados como en animales obesos. El efecto termogénico se observa únicamente en animales alimentados con una dieta normal pero no en los alimentados con una dieta alta en grasa, lo que sugiere que los efectos derivados de la estimulación del receptor de GLP-1 son dependientes del estado metabólico del animal. De acuerdo con los datos conocidos hasta la fecha encontramos que la estimulación central aguda del receptor de GLP-1 produce un descenso de la ingesta y del peso corporal. (134, 142, 199) En nuestro caso encontramos que con una única inyección de liraglutide a nivel central los efectos biológicos de la estimulación del receptor de GLP-1 se mantienen hasta las 24 horas después de la inyección. Sin embargo, el tratamiento crónico (7 días) de liraglutide a nivel central no produce efectos significativos en el peso o la ingesta de los animales.

La pérdida de peso corporal provocada por liraglutide es independiente de la ingesta de alimentos. Nuestros datos muestran un aumento en el gasto energético 24 horas después de la inyección de liraglutide. Este incremento en el gasto energético es debido a un incremento en la actividad termogénica en el tejido adiposo pardo así como un incremento en la expresión de marcadores termogénicos en el tejido adiposo blanco. Estos cambios explicarían el descenso del peso corporal independiente de la reducción de la ingesta. El incremento de la termogénesis en BAT es un proceso que también se observa cuando se administra GLP-1, si bien no se han publicado efectos de GLP-1 sobre los marcadores termogénicos en tejido adiposo blanco.(142)

Dado que el receptor de GLP-1 se encuentra distribuido a lo largo de todo el sistema nervioso central, en este trabajo se determinaron los efectos de la estimulación del GLP-1R en diferentes regiones hipotalámicas(200). Observamos que la administración directa de liraglutide mediante inyección estereotáxica en los núcleos paraventricular, arcuato y lateral produce un descenso en la ingesta y/o en el peso corporal.

Los efectos registrados en el núcleo arcuato resultan controvertidos respecto a (136) estudios previos, ya que hasta el momento los datos conocidos sobre el rol de GLP-1R en el núcleo arcuato están relacionados con la homeostasis de la glucosa, si bien los procedimientos de dicho estudio divergen en gran medida de los llevados a cabo en este trabajo, ya que el compuesto utilizado para estimular el receptor de GLP-1 es diferente (liraglutide en nuestro caso frente a GLP-1 en estudios previos) y las mediciones de la ingesta fueron llevadas a corto plazo en estudios previos (2 horas) mientras que en este trabajo se lleva a cabo el control de ingesta hasta las 24 horas.

A diferencia de las regiones hipotalámicas anteriormente descritas, la inyección directa de liraglutide en el núcleo ventromedial produce un descenso significativo del peso corporal pero no de la ingesta. Estos cambios en el peso se correlacionan con un incremento en los

niveles de UCP1 tanto en el tejido adiposo pardo como el tejido adiposo blanco. A la vista de estos resultados, el núcleo ventromedial se postula como un elemento central en el desarrollo de los efectos producidos por liraglutide a nivel central, si bien no podemos obviar que aquellas regiones extra hipotalámicas que también expresan el receptor de GLP-1 podrían estar regulando los efectos centrales de liraglutide. A mayores de los resultados descritos en este trabajo, se ha descrito en trabajos previos el rol del núcleo ventromedial como regulador de la actividad termogénica en el tejido adiposo pardo(107), siendo la vía de AMPK un regulador de suma importancia en la disipación de la energía actuando como mediador de los efectos que tiene la inyección central de liraglutide en el tejido adiposo blanco y pardo.

Nuestros datos muestran que tras la inyección ICV de liraglutide se observa un descenso en la actividad de AMPK que se manifiesta como un descenso en los niveles de pAMPK presentes en el hipotálamo. Así el siguiente paso fue comprobar si la estimulación de la actividad de AMPK bloqueaba los efectos de liraglutide en el núcleo ventromedial. Para esto utilizamos vectores adenovirales que aumentan los niveles AMPK mediante la expresión constitutivamente activa de dicha proteína, observamos que el incremento de la actividad de AMPK en el núcleo ventromedial es suficiente para abolir los efectos de liraglutide sobre el tejido adiposo blanco y pardo. Los efectos observados *in vivo* se reproducen cuando activamos AMPK farmacológicamente utilizando AICAR. Este conjunto de datos evidencia que el AMPK presente en el núcleo ventromedial es responsable de los efectos en la termogénesis registrados en los tejidos adiposos blanco y pardo producidos por la estimulación del receptor de GLP-1 en el sistema nervioso central.

Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que la vía hipotalámica de Sirt1/p53 regula las acciones orexigénicas de ghrelin mediante la regulación del AMPK presente en el hipotálamo.(106) Así tras observar la importancia de AMPK sobre las acciones centrales de liraglutide decidimos evaluar los potenciales efectos de estas proteínas en dichas acciones. Sirt1 es una deacetilasa que regula una gran cantidad de procesos. A nivel metabólico Sirt1 se encuentra actuando en el hígado, el músculo, el tejido adiposo blanco6 y también en el sistema nervioso central. La ausencia de Sirt1 en los principales núcleos hipotalámicos encargados de la regulación de homeostasis energética genera profundas alteraciones en el organismo, así en el núcleo arcuato la eliminación de Sirt1 en neuronas POMC(205) o AgRP (206) origina trastornos en el balance energético. En el núcleo ventromedial la ausencia de Sirt1 produce una mayor sensibilidad a la obesidad inducida por dieta mientras que su sobre-expresión tiene un efecto protector sobre la obesidad inducida por dieta(207). La inyección ICV de liraglutide tanto en ratones que sobre-expresan Sirt1 como en animales KO para p53, produce hipofagia así como pérdida de peso corporal. Por tanto, las acciones de liraglutide mediadas por AMPK son independientes de la vía SIRT1/p53.

El tratamiento con liraglutide también produce el incremento de FGF21, que es un factor de transcripción que se sobre-expresa durante exposiciones a frío(208). Sin embargo la administración ICV de liraglutide en animales carentes de FGF21 provoca un descenso en peso e ingesta similar al que ocurre en los controles de fenotipo salvaje, de tal modo que los

niveles endógenos de FGF21 no influyen en los efectos de liraglutide sobre el gasto energético.

En animales obesos debido a la exposición a dieta alta en grasa durante 12 semanas, que representaría un modelo similar al tipo de obesidad más frecuente en humanos, observamos cómo la administración de liraglutide a nivel central produce un descenso de la masa corporal, si bien no existen alteraciones en los marcadores termogénicos o en el gasto energético que se encontraban alterados en los animales no obesos.(199) Estos resultados se corresponden con datos ya existentes en los que se evidencia que los animales obesos son resistentes a los efectos que se producen en el tejido adiposo blanco tras la administración central de GLP1 (199). La ausencia de efectos en el programa termogénico podría ser rescatada mediante un tratamiento más largo plazo o bien mediante el uso de dosis mayores de liraglutide, dado que el estudio de tratamientos crónicos ICV no producen cambios en el peso o la ingesta. En cualquiera de los escenarios posibles lo que sugieren nuestros datos es que los efectos en la ingesta y en el peso corporal van a estar regulados de forma independiente.

Se ha descrito que el tejido adiposo pardo puede estar activo en humanos (209-213) por lo que decidimos contrastar nuestros resultados en pacientes obesos con diabetes tipo 2. Estos pacientes fueron tratados exclusivamente con metformina o con metformina en combinación con los agonistas del receptor de GLP-1 exenatide y liraglutide. Nuestros datos indican que los pacientes con terapia combinada presentan un incremento en el gasto energético, algo que en estudios anteriores no se había publicado nunca. Las diferencias existentes entre nuestros datos con respecto a otros estudios pueden ser debidas a la duración del tratamiento ya que en estudios previos la duración de los tratamientos fue de 4,8 y 12 semanas (214-216) mientras que en nuestro trabajo la duración del tratamiento es de un año. Nuestros datos muestran que la reducción de Hb1Ac es similar a la descrita en estudios del mismo tipo con exenatide y liraglutide(201, 215, 216). Las dosis aplicadas a los pacientes son dosis conocidas sin que produzcan ningún efecto indeseable a nivel digestivo.(215, 216)

Los datos obtenidos en ratones obesos en los que los efectos sobre la termogénesis se encuentran bloqueados contrasta con los datos obtenidos en pacientes, esto puede ser debido a la duración del tratamiento o bien debido a que en humanos los análogos de GLP-1 son usados siempre junto a otras drogas. Con la tecnología vigente no podemos determinar si el incremento del gasto energético en los pacientes es debido a los efectos de liraglutide sobre la vía de AMPK por lo que no podemos excluir que dichos efectos puedan estar regulados parcialmente por mecanismos periféricos.

Así en este bloque se exponen una serie de evidencias tanto farmacológicas como genéticas que demuestran que la estimulación central del receptor de GLP-1 no solo produce un incremento en la termogénesis en el tejido adiposo pardo, sino que también produce la adquisición de características termogénicas del tejido adiposo blanco. El mecanismo que regula está específicamente localizado en el núcleo ventromedial, siendo la estimulación de

AMPK en dicho núcleo suficiente para el bloqueo de las acciones de liraglutide sobre el tejido adiposo blanco y pardo.

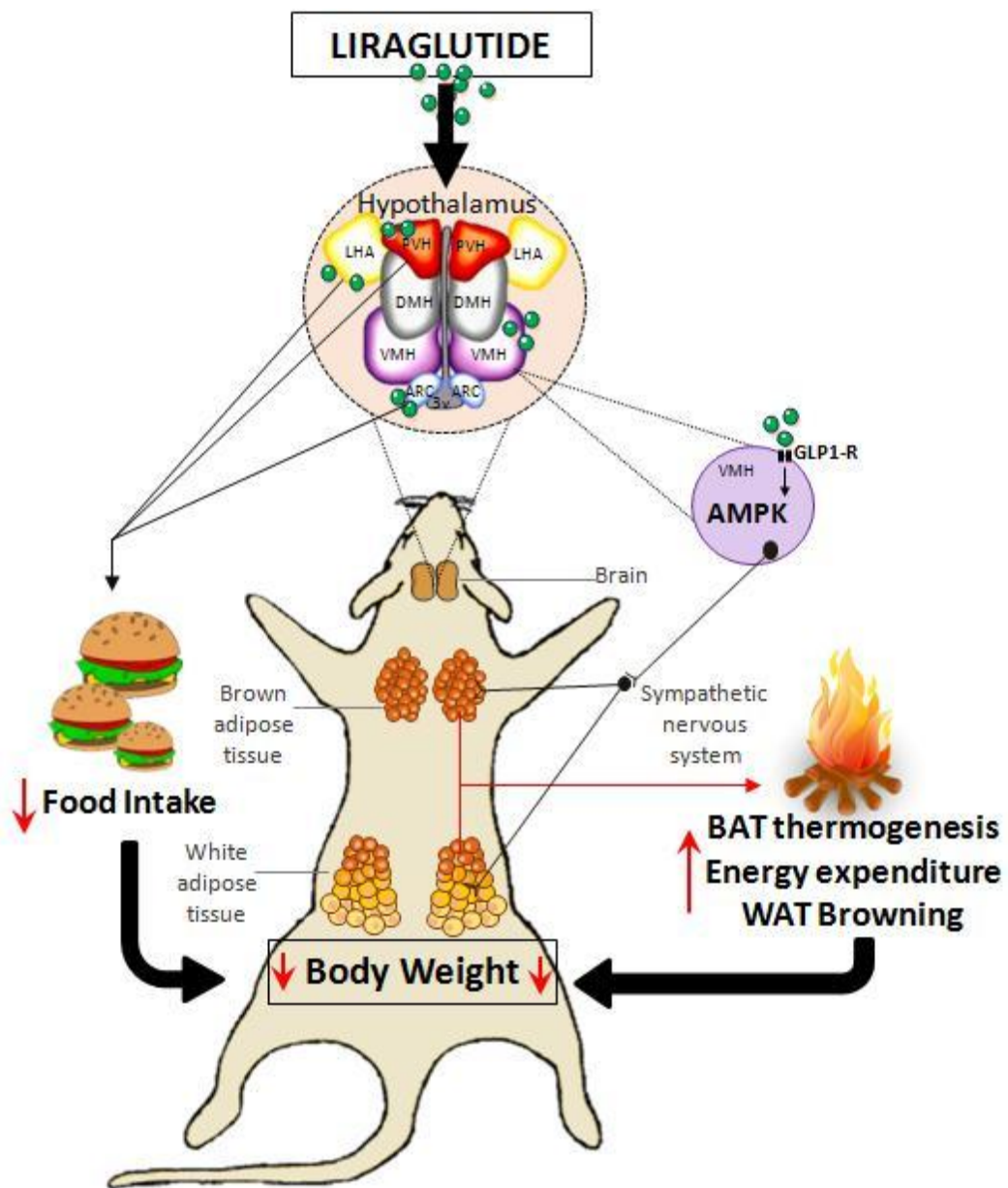


Figura74:Modelo propuesto para los efectos centrales de liraglutide.



CONCLUSIONES

La deficiencia de endoglina no influye sobre la homeostasis energética aunque desempeña un papel regulador sobre la homeostasis de la glucosa, posiblemente regulando la secreción pancreática de insulina y el contenido de lípidos en el hígado en ratones sometidos a dieta alta en grasas.

La estimulación central del receptor de GLP-1 regula la homeostasis energética actuando en distintos grupos neuronales del hipotálamo.

La estimulación central del receptor de GLP-1 estimula la termogénesis en el tejido adiposo pardo y la formación de adipocitos marrones en el tejido adiposo blanco de ratones alimentados con una dieta estándar pero no en animales obesos inducidos por dieta.

El efecto termogénico de liraglutide está mediado por la disminución de AMPK en el núcleo ventromedial, y es independiente de FGF21.

El tratamiento combinado de metformina con análogos del receptor de GLP1 durante 1 año incrementa el gasto energético en pacientes obesos con diabetes tipo 2.



BIBLIOGRAFÍA

1. E. T. Rolls, Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obes Rev* **8 Suppl 1**, 67-72 (2007).
2. E. Malecka-Tendera, A. Mazur, Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes (Lond)* **30 Suppl 2**, S1-3 (2006).
3. J. Himms-Hagen, Cellular thermogenesis. *Annu Rev Physiol* **38**, 315-351 (1976).
4. N. J. Rothwell, M. J. Stock, A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-35 (1979).
5. M. Saito, Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, T. Iwanaga, M. Miyagawa, T. Kameya, K. Nakada, Y. Kawai, M. Tsujisaki, High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531 (2009).
6. J. R. Arch, A. T. Ainsworth, M. A. Cawthome, V. Piercy, M. V. Sennitt, V. E. Thody, C. Wilson, S. Wilson, Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* **309**, 163-165 (1984).
7. P. Young, J. R. Arch, M. Ashwell, Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* **167**, 10-14 (1984).
8. K. Chechi, A. C. Carpentier, D. Richard, Understanding the brown adipocyte as a contributor to energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 408-420 (2013).
9. B. M. Spiegelman, Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* **62**, 1774-1782 (2013).
10. E. Stellar, The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev* **101**, 301-311 (1994).
11. M. Imbernon, D. Beiroa, M. J. Vazquez, D. A. Morgan, C. Veyrat-Durebex, B. Porteiro, A. Diaz-Arteaga, A. Senra, S. Busquets, D. A. Velasquez, O. Al-Massadi, L. Varela, M. Gandara, F. J. Lopez-Soriano, R. Gallego, L. M. Seoane, J. M. Argiles, M. Lopez, R. J. Davis, G. Sabio, F. Rohner-Jeanrenaud, K. Rahmouni, C. Dieguez, R. Nogueiras, Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* **144**, 636-649 e636 (2013).

12. R. D. Cone, M. A. Cowley, A. A. Butler, W. Fan, D. L. Marks, M. J. Low, The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25 Suppl 5**, S63-67 (2001).
13. M. Egawa, H. Yoshimatsu, G. A. Bray, Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* **260**, R328-334 (1991).
14. S. P. Kalra, M. G. Dube, A. Sahu, C. P. Phelps, P. S. Kalra, Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10931-10935 (1991).
15. A. Thorsell, M. Heilig, Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* **36**, 182-193 (2002).
16. A. Inui, Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol Sci* **20**, 43-46 (1999).
17. A. Kushi, H. Sasai, H. Koizumi, N. Takeda, M. Yokoyama, M. Nakamura, Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15659-15664 (1998).
18. A. O. Schaffhauser, A. Stricker-Krongrad, L. Brunner, F. Cumin, C. Gerald, S. Whitebread, L. Criscione, K. G. Hofbauer, Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* **46**, 1792-1798 (1997).
19. D. J. Marsh, G. Hollopeter, K. E. Kafer, R. D. Palmiter, Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* **4**, 718-721 (1998).
20. R. L. Mynatt, R. J. Miltenberger, M. L. Klebig, M. B. Zemel, J. E. Wilkinson, W. O. Wilkinson, R. P. Woychik, Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 919-922 (1997).
21. A. P. Goldstone, U. A. Unmehopa, S. R. Bloom, D. F. Swaab, Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 927-937 (2002).
22. B. D. Wilson, D. Bagnol, C. B. Kaelin, M. M. Ollmann, I. Gantz, S. J. Watson, G. S. Barsh, Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* **140**, 2387-2397 (1999).
23. Y. K. Yang, D. A. Thompson, C. J. Dickinson, J. Wilken, G. S. Barsh, S. B. Kent, I. Gantz, Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol* **13**, 148-155 (1999).

24. P. Chiche, A. Lellouch, J. P. Denizeau, Autonomic influences and cardiac conduction in patients with sinus node disease. *Cardiology* **61 suppl 1**, 98-112 (1976).
25. C. J. Small, M. S. Kim, S. A. Stanley, J. R. Mitchell, K. Murphy, D. G. Morgan, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* **50**, 248-254 (2001).
26. I. Swart, J. W. Jahng, J. M. Overton, T. A. Houpt, Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1020-1026 (2002).
27. H. Krude, H. Biebermann, W. Luck, R. Horn, G. Brabant, A. Gruters, Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* **19**, 155-157 (1998).
28. D. D. Pierroz, M. Ziotopoulou, L. Ungsuan, S. Moschos, J. S. Flier, C. S. Mantzoros, Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* **51**, 1337-1345 (2002).
29. T. Yasuda, T. Masaki, T. Kakuma, H. Yoshimatsu, Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 235-239 (2004).
30. I. S. Farooqi, G. S. Yeo, J. M. Keogh, S. Aminian, S. A. Jebb, G. Butler, T. Cheetham, S. O'Rahilly, Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* **106**, 271-279 (2000).
31. C. Lubrano-Berthelie, M. Cavazos, B. Dubern, A. Shapiro, C. L. Stunff, S. Zhang, F. Picart, C. Govaerts, P. Froguel, P. Bougneres, K. Clement, C. Vaisse, Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann N Y Acad Sci* **994**, 49-57 (2003).
32. C. R. Abbott, M. Rossi, M. Kim, S. H. AlAhmed, G. M. Taylor, M. A. Ghatei, D. M. Smith, S. R. Bloom, Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res* **869**, 203-210 (2000).
33. P. J. Larsen, N. Vrang, P. C. Petersen, P. Kristensen, Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* **8**, 590-596 (2000).
34. J. K. Elmquist, C. F. Elias, C. B. Saper, From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**, 221-232 (1999).
35. H. Zheng, M. M. Corkern, S. M. Crousillac, L. M. Patterson, C. B. Phifer, H. R. Berthoud, Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R1773-1781 (2002).

36. H. Y. Li, H. W. Hwang, Y. H. Hu, Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* **323**, 203-206 (2002).
37. M. L. Vetter, L. F. Faulconbridge, V. L. Webb, T. A. Wadden, Behavioral and pharmacologic therapies for obesity. *Nat Rev Endocrinol* **6**, 578-588 (2010).
38. J. K. Elmquist, CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab Anim Sci* **48**, 630-637 (1998).
39. J. J. Gooley, A. Schomer, C. B. Saper, The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* **9**, 398-407 (2006).
40. N. M. Neary, A. P. Goldstone, S. R. Bloom, Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**, 153-160 (2004).
41. L. Bellocchio, C. Cervino, R. Pasquali, U. Pagotto, The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol* **20**, 850-857 (2008).
42. L. de Lecea, T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, V. T. Gautvik, F. S. Bartlett, 2nd, W. N. Frankel, A. N. van den Pol, F. E. Bloom, K. M. Gautvik, J. G. Sutcliffe, The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 322-327 (1998).
43. R. J. Rodgers, Y. Ishii, J. C. Halford, J. E. Blundell, Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* **36**, 303-325 (2002).
44. T. Sakurai, A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, M. Yanagisawa, Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573-585 (1998).
45. S. Taheri, J. M. Zeitler, E. Mignot, The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu Rev Neurosci* **25**, 283-313 (2002).
46. A. C. Haynes, B. Jackson, P. Overend, R. E. Buckingham, S. Wilson, M. Tadayyon, J. R. Arch, Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* **20**, 1099-1105 (1999).
47. M. Lopez, L. Seoane, M. C. Garcia, F. Lago, F. F. Casanueva, R. Senaris, C. Dieguez, Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 41-45 (2000).

48. R. M. Chemelli, J. T. Willie, C. M. Sinton, J. K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J. A. Richardson, S. C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T. E. Fitch, M. Nakazato, R. E. Hammer, C. B. Saper, M. Yanagisawa, Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* **98**, 437-451 (1999).
49. A. L. Kirchgessner, M. Liu, Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* **24**, 941-951 (1999).
50. A. Sahu, Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Res* **944**, 232-238 (2002).
51. D. J. Marsh, D. T. Weingarth, D. E. Novi, H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, A. S. Chen, X. M. Guan, M. M. Jiang, Y. Feng, R. E. Camacho, Z. Shen, E. G. Frazier, H. Yu, J. M. Metzger, S. J. Kuca, L. P. Shearman, S. Gopal-Truter, D. J. MacNeil, A. M. Strack, D. E. MacIntyre, L. H. Van der Ploeg, S. Qian, Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3240-3245 (2002).
52. Q. Gao, T. L. Horvath, Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* **582**, 132-141 (2008).
53. B. Xu, E. H. Goulding, K. Zang, D. Cepoi, R. D. Cone, K. R. Jones, L. H. Tecott, L. F. Reichardt, Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* **6**, 736-742 (2003).
54. R. Lage, C. Dieguez, A. Vidal-Puig, M. Lopez, AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* **14**, 539-549 (2008).
55. J. Gray, G. S. Yeo, J. J. Cox, J. Morton, A. L. Adlam, J. M. Keogh, J. A. Yanovski, A. El Gharbawy, J. C. Han, Y. C. Tung, J. R. Hodges, F. L. Raymond, S. O'Rahilly, I. S. Farooqi, Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* **55**, 3366-3371 (2006).
56. G. S. Yeo, C. C. Connie Hung, J. Rochford, J. Keogh, J. Gray, S. Sivaramakrishnan, S. O'Rahilly, I. S. Farooqi, A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* **7**, 1187-1189 (2004).
57. Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J. M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
58. E. E. Kershaw, J. S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2548-2556 (2004).

59. L. A. Tartaglia, M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Woolf, C. A. Monroe, R. I. Tepper, Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263-1271 (1995).
60. H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper, J. P. Morgenstem, Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**, 491-495 (1996).
61. B. Burguera, M. E. Couce, J. Long, J. Lamsam, K. Laakso, M. D. Jensen, J. E. Parisi, R. V. Lloyd, The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* **71**, 187-195 (2000).
62. Y. Zhou, L. Rui, Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med* **7**, 207-222 (2013).
63. S. H. Bates, W. H. Steams, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz, M. G. Myers, Jr., STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* **421**, 856-859 (2003).
64. J. Y. Lee, H. Muenzberg, O. Gavrilova, J. A. Reed, D. Berryman, E. C. Villanueva, G. W. Louis, G. M. Leininger, S. Bertuzzi, R. J. Seeley, G. W. Robinson, M. G. Myers, L. Hennighausen, Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLoS One* **3**, e1639 (2008).
65. K. Rahmouni, C. D. Sigmund, W. G. Haynes, A. L. Mark, Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* **58**, 536-542 (2009).
66. C. Bjorbak, H. J. Lavery, S. H. Bates, R. K. Olson, S. M. Davis, J. S. Flier, M. G. Myers, Jr., SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* **275**, 40649-40657 (2000).
67. L. Jiang, J. You, X. Yu, L. Gonzalez, Y. Yu, Q. Wang, G. Yang, W. Li, C. Li, Y. Liu, Tyrosine-dependent and -independent actions of leptin receptor in control of energy balance and glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18619-18624 (2008).
68. D. Ren, M. Li, C. Duan, L. Rui, Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab* **2**, 95-104 (2005).
69. T. Kitamura, Y. Feng, Y. I. Kitamura, S. C. Chua, Jr., A. W. Xu, G. S. Barsh, L. Rossetti, D. Accili, Forkhead protein FoxO1 mediates AgRP-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med* **12**, 534-540 (2006).

70. L. Plum, H. V. Lin, R. Dutia, J. Tanaka, K. S. Aizawa, M. Matsumoto, A. J. Kim, N. X. Cawley, J. H. Paik, Y. P. Loh, R. A. DePinho, S. L. Wardlaw, D. Accili, The obesity susceptibility gene *Cpe* links FoxO1 signaling in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons with regulation of food intake. *Nat Med* **15**, 1195-1201 (2009).
71. C. M. Steppan, S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima, M. A. Lazar, The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312 (2001).
72. C. M. Steppan, E. J. Brown, C. M. Wright, S. Bhat, R. R. Banerjee, C. Y. Dai, G. H. Enders, D. G. Silberg, X. Wen, G. D. Wu, M. A. Lazar, A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci US A* **98**, 502-506 (2001).
73. J. S. Flier, Diabetes. The missing link with obesity? *Nature* **409**, 292-293 (2001).
74. R. Nogueiras, R. Gallego, O. Gualillo, J. E. Caminos, T. Garcia-Caballero, F. F. Casanueva, C. Dieguez, Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* **548**, 21-27 (2003).
75. S. Tovar, R. Nogueiras, L. Y. Tung, T. R. Castaneda, M. J. Vazquez, A. Morris, L. M. Williams, S. L. Dickson, C. Dieguez, Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol* **153**, R1-5 (2005).
76. M. J. Vazquez, C. R. Gonzalez, L. Varela, R. Lage, S. Tovar, S. Sangiao-Alvarellos, L. M. Williams, A. Vidal-Puig, R. Nogueiras, M. Lopez, C. Dieguez, Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* **149**, 4534-4543 (2008).
77. L. Patel, A. C. Buckels, I. J. Kinghorn, P. R. Murdock, J. D. Holbrook, C. Plumpton, C. H. Macphee, S. A. Smith, Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 472-476 (2003).
78. S. Ghosh, A. K. Singh, B. Aruna, S. Mukhopadhyay, N. Z. Ehtesham, The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene* **305**, 27-34 (2003).
79. T. Tomaru, D. J. Steger, M. I. Lefterova, M. Schupp, M. A. Lazar, Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* **284**, 6116-6125 (2009).
80. M. Qatanani, N. R. Szwegold, D. R. Greaves, R. S. Ahima, M. A. Lazar, Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* **119**, 531-539 (2009).

81. M. A. Lazar, Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Horm Metab Res* **39**, 710-716 (2007).
82. T. Kadowaki, T. Yamauchi, Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26**, 439-451 (2005).
83. J. M. Fernandez-Real, M. Broch, J. Vendrell, W. Ricart, Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* **26**, 1362-1368 (2003).
84. P. A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, G. Ranganathan, Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E745-751 (2001).
85. V. Wallenius, K. Wallenius, B. Ahren, M. Rudling, H. Carlsten, S. L. Dickson, C. Ohlsson, J. O. Jansson, Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* **8**, 75-79 (2002).
86. F. De Benedetti, T. Alonzi, A. Moretta, D. Lazzaro, P. Costa, V. Poli, A. Martini, G. Ciliberto, E. Fattori, Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* **99**, 643-650 (1997).
87. M. Kriegler, C. Perez, K. DeFay, I. Albert, S. D. Lu, A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**, 45-53 (1988).
88. S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, A. W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**, 1796-1808 (2003).
89. H. J. Harwood, Jr., The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **63**, 57-75 (2012).
90. H. Ruan, H. F. Lodish, Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 447-455 (2003).
91. R. P. Vincent, H. Ashrafian, C. W. le Roux, Mechanisms of disease: the role of gastrointestinal hormones in appetite and obesity. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **5**, 268-277 (2008).
92. M. W. Schwartz, R. N. Bergman, S. E. Kahn, G. J. Taborsky, Jr., L. D. Fisher, A. J. Sipols, S. C. Woods, G. M. Steil, D. Porte, Jr., Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J Clin Invest* **88**, 1272-1281 (1991).

93. D. G. Baskin, D. Figlewicz Lattemann, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, Jr., M. W. Schwartz, Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* **848**, 114-123 (1999).
94. J. C. Bruning, D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland, C. R. Kahn, Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-2125 (2000).
95. S. C. Benoit, E. L. Air, L. M. Coolen, R. Strauss, A. Jackman, D. J. Clegg, R. J. Seeley, S. C. Woods, The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* **22**, 9048-9052 (2002).
96. D. Ren, Y. Zhou, D. Morris, M. Li, Z. Li, L. Rui, Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* **117**, 397-406 (2007).
97. M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660 (1999).
98. A. M. Wren, C. J. Small, H. L. Ward, K. G. Murphy, C. L. Dakin, S. Taheri, A. R. Kennedy, G. H. Roberts, D. G. Morgan, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**, 4325-4328 (2000).
99. A. M. Wren, L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillo, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5992 (2001).
100. M. Tschop, D. L. Smiley, M. L. Heiman, Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908-913 (2000).
101. F. Picard, M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney, L. Guarente, Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429**, 771-776 (2004).
102. J. T. Rodgers, P. Puigserver, Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12861-12866 (2007).
103. L. Bordone, M. C. Motta, F. Picard, A. Robinson, U. S. Jhala, J. Apfeld, T. McDonagh, M. Lemieux, M. McBurney, A. Szilvasi, E. J. Easlson, S. J. Lin, L. Guarente, Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* **4**, e31 (2006).
104. C. Canto, Z. Gerhart-Hines, J. N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J. C. Milne, P. J. Elliott, P. Puigserver, J. Auwerx, AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056-1060 (2009).

105. I. Cakir, M. Perello, O. Lansari, N. J. Messier, C. A. Vaslet, E. A. Nillni, Hypothalamic Sirt1 regulates food intake in a rodent model system. *PLoS One* **4**, e8322 (2009).
106. D. A. Velasquez, G. Martinez, A. Romero, M. J. Vazquez, K. D. Boit, I. G. Dopeso-Reyes, M. Lopez, A. Vidal, R. Nogueiras, C. Dieguez, The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes* **60**, 1177-1185 (2011).
107. M. Lopez, R. Lage, A. K. Saha, D. Perez-Tilve, M. J. Vazquez, L. Varela, S. Sangiao-Alvarellos, S. Tovar, K. Raghay, S. Rodriguez-Cuenca, R. M. Deoliveira, T. Castaneda, R. Datta, J. Z. Dong, M. Culler, M. W. Sleeman, C. V. Alvarez, R. Gallego, C. J. Lelliott, D. Carling, M. H. Tschop, C. Dieguez, A. Vidal-Puig, Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* **7**, 389-399 (2008).
108. Z. B. Andrews, Z. W. Liu, N. Wallingford, D. M. Erion, E. Borok, J. M. Friedman, M. H. Tschop, M. Shanabrough, G. Cline, G. I. Shulman, A. Coppola, X. B. Gao, T. L. Horvath, S. Diano, UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454**, 846-851 (2008).
109. S. Ramirez, L. Martins, J. Jacas, P. Carrasco, M. Pozo, J. Clotet, D. Serra, F. G. Hegardt, C. Dieguez, M. Lopez, N. Casals, Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* **62**, 2329-2337 (2013).
110. T. H. Moran, Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* **16**, 858-865 (2000).
111. T. H. Moran, K. P. Kinzig, Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G183-188 (2004).
112. T. T. Zittel, J. Glatzle, M. E. Kreis, M. Starlinger, M. Eichner, H. E. Raybould, H. D. Becker, E. C. Jehle, C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res* **846**, 1-11 (1999).
113. C. Beglinger, L. Degen, D. Matzinger, M. D'Amato, J. Drewe, Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1149-1154 (2001).
114. C. A. Matson, D. F. Reid, T. A. Cannon, R. C. Ritter, Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R882-890 (2000).
115. J. Nyberg, M. F. Anderson, B. Meister, A. M. Alborn, A. K. Strom, A. Brederlau, A. C. Illerskog, O. Nilsson, T. J. Kieffer, M. A. Hietala, A. Ricksten, P. S. Eriksson, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci* **25**, 1816-1825 (2005).

116. D. J. Drucker, S. Asa, Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem* **263**, 13475-13478 (1988).
117. A. Perez-Castillo, E. Blazquez, Tissue distribution of glucagon, glucagonlike immunoreactivity, and insulin in the rat. *Am J Physiol* **238**, E258-266 (1980).
118. Y. Rouille, G. Westermark, S. K. Martin, D. F. Steiner, Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci US A* **91**, 3242-3246 (1994).
119. J. D. Tucker, S. Dhanvantari, P. L. Brubaker, Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. *Regul Pept* **62**, 29-35 (1996).
120. Y. K. Shin, B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan, S. D. Munger, Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* **106**, 455-463 (2008).
121. J. J. Holst, The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* **87**, 1409-1439 (2007).
122. A. S. Rocca, P. L. Brubaker, Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* **140**, 1687-1694 (1999).
123. C. Orskov, L. Rabenhoj, A. Wettergren, H. Kofod, J. J. Holst, Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* **43**, 535-539 (1994).
124. Y. S. Lee, H. S. Jun, Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism* **63**, 9-19 (2014).
125. G. G. Holz, C. A. Leech, R. S. Heller, M. Castonguay, J. F. Habener, cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem* **274**, 14147-14156 (1999).
126. J. Gromada, C. Anker, K. Bokvist, L. B. Knudsen, P. Wahl, Glucagon-like peptide-1 receptor expression in *Xenopus* oocytes stimulates inositol trisphosphate-dependent intracellular Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett* **425**, 277-280 (1998).
127. L. A. Scrocchi, T. J. Brown, N. McClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner, D. J. Drucker, Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* **2**, 1254-1258 (1996).
128. J. H. Park, S. J. Kim, S. H. Park, D. G. Son, J. H. Bae, H. K. Kim, J. Han, D. K. Song, Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic beta-cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A. *Endocrinology* **153**, 574-582 (2012).

129. J. Nie, C. Sun, O. Faruque, G. Ye, J. Li, Q. Liang, Z. Chang, W. Yang, X. Han, Y. Shi, Synapses of amphids defective (SAD-A) kinase promotes glucose-stimulated insulin secretion through activation of p21-activated kinase (PAK1) in pancreatic beta-Cells. *J Biol Chem* **287**, 26435-26444 (2012).
130. S. L. Hwang, O. Kwon, S. G. Kim, I. K. Lee, Y. D. Kim, B-cell translocation gene 2 positively regulates GLP-1-stimulated insulin secretion via induction of PDX-1 in pancreatic beta-cells. *Exp Mol Med* **45**, e25 (2013).
131. M. Nishizawa, H. Nakabayashi, K. Uehara, A. Nakagawa, K. Uchida, D. Koya, Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E376-387 (2013).
132. P. J. Larsen, M. Tang-Christensen, J. J. Holst, C. Orskov, Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* **77**, 257-270 (1997).
133. B. Li, X. Xi, D. S. Roane, D. H. Ryan, R. J. Martin, Distribution of glucokinase, glucose transporter GLUT2, sulfonylurea receptor-1, glucagon-like peptide-1 receptor and neuropeptide Y messenger RNAs in rat brain by quantitative real time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* **113**, 139-142 (2003).
134. M. D. Turton, D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, G. M. Taylor, M. M. Heath, P. D. Lambert, J. P. Wilding, D. M. Smith, M. A. Ghatei, J. Herbert, S. R. Bloom, A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **379**, 69-72 (1996).
135. S. Seo, S. Ju, H. Chung, D. Lee, S. Park, Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* **55**, 867-874 (2008).
136. D. A. Sandoval, D. Bagnol, S. C. Woods, D. A. D'Alessio, R. J. Seeley, Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* **57**, 2046-2054 (2008).
137. L. R. McMahon, P. J. Wellman, PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *Am J Physiol* **274**, R23-29 (1998).
138. M. Tang-Christensen, N. Vrang, P. J. Larsen, Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes* **47**, 530-537 (1998).
139. P. E. Poleni, S. Akieda-Asai, S. Koda, M. Sakurai, C. R. Bae, K. Senba, Y. S. Cha, M. Furuya, Y. Date, Possible involvement of melanocortin-4-receptor and AMP-

activated protein kinase in the interaction of glucagon-like peptide-1 and leptin on feeding in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **420**, 36-41 (2012).

140. A. M. Dossat, N. Lilly, K. Kay, D. L. Williams, Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake. *J Neurosci* **31**, 14453-14457 (2011

).

141. S. L. Dickson, R. H. Shirazi, C. Hansson, F. Bergquist, H. Nissbrandt, K. P. Skibicka, The glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue, exendin-4, decreases the rewarding value of food: a new role for mesolimbic GLP-1 receptors. *J Neurosci* **32**, 4812-4820 (2012).

142. S. H. Lockie, K. M. Heppner, N. Chaudhary, J. R. Chabenne, D. A. Morgan, C. Veyrat-Durebex, G. Ananthakrishnan, F. Rohner-Jeanrenaud, D. J. Drucker, R. DiMarchi, K. Rahmouni, B. J. Oldfield, M. H. Tschop, D. Perez-Tilve, Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* **61**, 2753-2762 (2012).

143. J. W. Neidigh, R. M. Fesinmeyer, K. S. Prickett, N. H. Andersen, Exendin-4 and glucagon-like-peptide-1: NMR structural comparisons in the solution and micelle-associated states. *Biochemistry* **40**, 13188-13200 (2001).

144. W. Crasto, K. Khunti, M. J. Davies, An update on exenatide, a novel therapeutic option for patients with type 2 diabetes. *Drugs Today (Barc)* **47**, 839-856 (2011).

145. L. B. Knudsen, P. F. Nielsen, P. O. Huusfeldt, N. L. Johansen, K. Madsen, F. Z. Pedersen, H. Thogersen, M. Wilken, H. Agerso, Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* **43**, 1664-1669 (2000).

146. K. Madsen, L. B. Knudsen, H. Agersoe, P. F. Nielsen, H. Thogersen, M. Wilken, N. L. Johansen, Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness. *J Med Chem* **50**, 6126-6132 (2007).

147. K. Niswender, X. Pi-Sunyer, J. Buse, K. H. Jensen, A. D. Toft, D. Russell-Jones, B. Zinman, Weight change with liraglutide and comparator therapies: an analysis of seven phase 3 trials from the liraglutide diabetes development programme. *Diabetes Obes Metab* **15**, 42-54 (2013).

148. J. B. Buse, J. Rosenstock, G. Sesti, W. E. Schmidt, E. Montanya, J. H. Brett, M. Zychma, L. Blonde, Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet* **374**, 39-47 (2009).

149. A. Gougos, M. Letarte, Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 8361-8364 (1990).
150. J. M. Lopez-Novoa, C. Bernabeu, The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H959-974 (2010).
151. S. Cheifetz, T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massague, M. Letarte, Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**, 19027-19030 (1992).
152. T. Bellon, A. Corbi, P. Lastres, C. Cales, M. Cebrian, S. Vera, S. Cheifetz, J. Massague, M. Letarte, C. Bernabeu, Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* **23**, 2340-2345 (1993).
153. L. Jovine, C. C. Darie, E. S. Litscher, P. M. Wassarman, Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* **74**, 83-114 (2005).
154. M. Guerrero-Esteo, T. Sanchez-Elsner, A. Letamendia, C. Bernabeu, Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* **277**, 29197-29209 (2002).
155. P. Lastres, A. Letamendia, H. Zhang, C. Rius, N. Almendro, U. Raab, L. A. Lopez, C. Langa, A. Fabra, M. Letarte, C. Bernabeu, Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* **133**, 1109-1121 (1996).
156. M. Guerrero-Esteo, P. Lastres, A. Letamendia, M. J. Perez-Alvarez, C. Langa, L. A. Lopez, A. Fabra, A. Garcia-Pardo, S. Vera, M. Letarte, C. Bernabeu, Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **78**, 614-623 (1999).
157. L. M. Botella, F. Sanz-Rodriguez, T. Sanchez-Elsner, C. Langa, J. R. Ramirez, C. Vary, P. J. Roughley, C. Bernabeu, Lumican is down-regulated in cells expressing endoglin. Evidence for an inverse relationship between Endoglin and Lumican expression. *Matrix Biol* **22**, 561-572 (2004).
158. L. Diez-Marques, R. Ortega-Velazquez, C. Langa, A. Rodriguez-Barbero, J. M. Lopez-Novoa, S. Lamas, C. Bernabeu, Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 36-44 (2002).
159. C. Li, I. N. Hampson, L. Hampson, P. Kumar, C. Bernabeu, S. Kumar, CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* **14**, 55-64 (2000).

160. X. She, F. Matsuno, N. Harada, H. Tsai, B. K. Seon, Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF-beta in suppression of growth of human endothelial cells. *Int J Cancer* **108**, 251-257 (2004).
161. C. Li, R. Issa, P. Kumar, I. N. Hampson, J. M. Lopez-Novoa, C. Bernabeu, S. Kumar, CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* **116**, 2677-2685 (2003).
162. R. H. Adams, K. Alitalo, Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464-478 (2007).
163. W. Risau, Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
164. P. Kumar, J. M. Wang, C. Bernabeu, CD 105 and angiogenesis. *J Pathol* **178**, 363-366 (1996).
165. P. Carmeliet, F. De Smet, S. Loges, M. Mazzone, Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 315-326 (2009).
166. R. K. Jain, Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-693 (2003).
167. A. Duwel, N. Eleno, M. Jerkic, M. Arevalo, J. P. Bolanos, C. Bernabeu, J. M. Lopez-Novoa, Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol* **28**, 1-8 (2007).
168. N. Lopez-Holgado, M. Alberca, F. M. Sanchez-Guijo, E. M. Villaron, J. V. Rivas, J. M. Lopez-Novoa, J. G. Brinon, M. A. Arevalo, E. Oterino, C. Santamaria, J. F. San Miguel, M. C. del Canizo, Prospective comparative analysis of the angiogenic capacity of monocytes and CD133+ cells in a murine model of hind limb ischemia. *Cytotherapy* **11**, 1041-1051 (2009).
169. P. Lastres, T. Bellon, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, A. Acevedo, A. Gougos, M. Letarte, C. Bernabeu, Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* **22**, 393-397 (1992).
170. L. W. van Laake, S. van den Driesche, S. Post, A. Feijen, M. A. Jansen, M. H. Driessens, J. J. Mager, R. J. Snijder, C. J. Westermann, P. A. Doevendans, C. J. van Echteld, P. ten Dijke, H. M. Arthur, M. J. Goumans, F. Lebrin, C. L. Mummery, Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* **114**, 2288-2297 (2006).
171. S. Post, A. M. Smits, A. J. van den Broek, J. P. Sluijter, I. E. Hoefler, B. J. Janssen, R. J. Snijder, J. J. Mager, G. Pasterkamp, C. L. Mummery, P. A. Doevendans, M. J. Goumans, Impaired recruitment of HHT-1 mononuclear cells to the ischaemic heart is due to an altered CXCR4/CD26 balance. *Cardiovasc Res* **85**, 494-502 (2010).

172. D. Luque Contreras, H. Vargas Robles, E. Romo, A. Rios, B. Escalante, The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. *Pharmacol Ther* **112**, 553-563 (2006).
173. M. Jerkic, J. V. Rivas-Elena, M. Prieto, R. Carron, F. Sanz-Rodriguez, F. Perez-Barriocanal, A. Rodriguez-Barbero, C. Bernabeu, J. M. Lopez-Novoa, Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* **18**, 609-611 (2004).
174. M. Jerkic, J. V. Rivas-Elena, J. F. Santibanez, M. Prieto, A. Rodriguez-Barbero, F. Perez-Barriocanal, M. Pericacho, M. Arevalo, C. P. Vary, M. Letarte, C. Bernabeu, J. M. Lopez-Novoa, Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* **99**, 248-256 (2006).
175. J. F. Santibanez, A. Letamendia, F. Perez-Barriocanal, C. Silvestri, M. Saura, C. P. Vary, J. M. Lopez-Novoa, L. Attisano, C. Bernabeu, Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**, 456-468 (2007).
176. M. Toporsian, R. Gros, M. G. Kabir, S. Vera, K. Govindaraju, D. H. Eidelman, M. Husain, M. Letarte, A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**, 684-692 (2005).
177. F. S. Govani, C. L. Shovlin, Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* **17**, 860-871 (2009).
178. L. A. Fernandez, E. M. Garrido-Martin, F. Sanz-Rodriguez, J. R. Ramirez, C. Morales-Angulo, R. Zarrabeitia, A. Perez-Molino, C. Bernabeu, L. M. Botella, Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thromb Haemost* **97**, 254-262 (2007).
179. A. M. Blazquez-Medela, L. Garcia-Ortiz, M. A. Gomez-Marcos, J. I. Recio-Rodriguez, A. Sanchez-Rodriguez, J. M. Lopez-Novoa, C. Martinez-Salgado, Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* **8**, 86 (2010).
180. A. Fornoni, L. Raij, Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* **7**, 88-95 (2005).
181. A. Bourdeau, D. J. Dumont, M. Letarte, A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**, 1343-1351 (1999).
182. A. Rodriguez-Pena, N. Eleno, A. Duwell, M. Arevalo, F. Perez-Barriocanal, O. Flores, N. Docherty, C. Bernabeu, M. Letarte, J. M. Lopez-Novoa, Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension* **40**, 713-720 (2002).

183. T. Jacks, L. Remington, B. O. Williams, E. M. Schmitt, S. Halachmi, R. T. Bronson, R. A. Weinberg, Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4**, 1-7 (1994).
184. P. T. Pfluger, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, M. Serrano, M. H. Tschop, Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9793-9798 (2008).
185. J. G. Barrera, D. A. D'Alessio, D. J. Drucker, S. C. Woods, R. J. Seeley, Differences in the central anorectic effects of glucagon-like peptide-1 and exendin-4 in rats. *Diabetes* **58**, 2820-2827 (2009).
186. J. J. Hwa, L. Ghibaudi, P. Williams, M. B. Witten, R. Tedesco, C. D. Strader, Differential effects of intracerebroventricular glucagon-like peptide-1 on feeding and energy expenditure regulation. *Peptides* **19**, 869-875 (1998).
187. J. Gomez-Ambrosi, J. Salvador, F. Rotellar, C. Silva, V. Catalan, A. Rodriguez, M. Jesus Gil, G. Fruhbeck, Increased serum amyloid A concentrations in morbid obesity decrease after gastric bypass. *Obes Surg* **16**, 262-269 (2006).
188. V. Catalan, J. Gomez-Ambrosi, B. Ramirez, F. Rotellar, C. Pastor, C. Silva, A. Rodriguez, M. J. Gil, J. A. Cienfuegos, G. Fruhbeck, Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes Surg* **17**, 1464-1474 (2007).
189. F. J. Muruzabal, G. Fruhbeck, J. Gomez-Ambrosi, M. Archanco, M. A. Burrell, Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen Comp Endocrinol* **128**, 149-152 (2002).
190. D. V. Chartoumpekis, I. G. Habeos, P. G. Ziros, A. I. Psyrogiannis, V. E. Kyriazopoulou, A. G. Papavassiliou, Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* **17**, 736-740 (2011).
191. P. B. Martinez de Morentin, N. Martinez-Sanchez, J. Roa, J. Femo, R. Nogueiras, M. Tena-Sempere, C. Dieguez, M. Lopez, Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Current molecular medicine*, (2013).
192. T. Riediger, N. Eisele, C. Scheel, T. A. Lutz, Effects of glucagon-like peptide 1 and oxyntomodulin on neuronal activity of ghrelin-sensitive neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1061-1067 (2010).
193. D. Y. Li, L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak, D. P. Wendel, Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**, 1534-1537 (1999).
194. W. A. Hsueh, C. J. Lyon, M. J. Quinones, Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med* **117**, 109-117 (2004).

195. M. Mahmoud, P. D. Upton, H. M. Arthur, Angiogenesis regulation by TGFbeta signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans* **39**, 1659-1666 (2011).
196. B. B. Kahn, J. S. Flier, Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 473-481 (2000).
197. J. E. Pessin, A. R. Saltiel, Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**, 165-169 (2000).
198. S. Carobbio, S. Rodriguez-Cuenca, A. Vidal-Puig, Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**, 520-526 (2011).
199. R. Nogueiras, D. Perez-Tilve, C. Veyrat-Durebex, D. A. Morgan, L. Varela, W. G. Haynes, J. T. Patterson, E. Disse, P. T. Pfluger, M. Lopez, S. C. Woods, R. DiMarchi, C. Dieguez, K. Rahmouni, F. Rohner-Jeanrenaud, M. H. Tschop, Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 5916-5925 (2009).
200. P. J. Shughnue, M. V. Lane, I. Merchenthaler, Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* **137**, 5159-5162 (1996).
201. A. Astrup, S. Rossner, L. Van Gaal, A. Rissanen, L. Niskanen, M. Al Hakim, J. Madsen, M. F. Rasmussen, M. E. Lean, Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* **374**, 1606-1616 (2009).
202. A. Garber, R. Henry, R. Ratner, P. A. Garcia-Hernandez, H. Rodriguez-Pattzi, I. Olvera-Alvarez, P. M. Hale, M. Zdravkovic, B. Bode, Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *Lancet* **373**, 473-481 (2009).
203. P. J. Larsen, C. Fledelius, L. B. Knudsen, M. Tang-Christensen, Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats. *Diabetes* **50**, 2530-2539 (2001).
204. R. Nogueiras, K. M. Habegger, N. Chaudhary, B. Finan, A. S. Banks, M. O. Dietrich, T. L. Horvath, D. A. Sinclair, P. T. Pfluger, M. H. Tschop, Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological reviews* **92**, 1479-1514 (2012).
205. G. Ramadori, T. Fujikawa, M. Fukuda, J. Anderson, D. A. Morgan, R. Mostoslavsky, R. C. Stuart, M. Perello, C. R. Vianna, E. A. Nillni, K. Rahmouni, R. Coppari, SIRT1 deacetylase in POMC neurons is required for homeostatic defenses against diet-induced obesity. *Cell metabolism* **12**, 78-87 (2010).

206. M. O. Dietrich, C. Antunes, G. Geliang, Z. W. Liu, E. Borok, Y. Nie, A. W. Xu, D. O. Souza, Q. Gao, S. Diano, X. B. Gao, T. L. Horvath, AgRP neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 11815-11825 (2010).
207. G. Ramadori, T. Fujikawa, J. Anderson, E. D. Berglund, R. Frazao, S. Michan, C. R. Vianna, D. A. Sinclair, C. F. Elias, R. Coppari, SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell metabolism* **14**, 301-312 (2011).
208. E. Hondares, R. Iglesias, A. Giralt, F. J. Gonzalez, M. Giralt, T. Mampel, F. Villarroya, Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **286**, 12983-12990 (2011).
209. M. E. Lidell, M. J. Betz, O. Dahlqvist Leinhard, M. Heglind, L. Elander, M. Slawik, T. Mussack, D. Nilsson, T. Romu, P. Nuutila, K. A. Virtanen, F. Beuschlein, A. Persson, M. Borga, S. Enerback, Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature medicine* **19**, 631-634 (2013).
210. J. Wu, P. Bostrom, L. M. Sparks, L. Ye, J. H. Choi, A. H. Giang, M. Khandekar, K. A. Virtanen, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W. D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerback, P. Schrauwen, B. M. Spiegelman, Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376 (2012).
211. K. A. Virtanen, M. E. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. J. Savisto, S. Enerback, P. Nuutila, Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* **360**, 1518-1525 (2009).
212. A. M. Cypess, S. Lehman, G. Williams, I. Tal, D. Rodman, A. B. Goldfine, F. C. Kuo, E. L. Palmer, Y. H. Tseng, A. Doria, G. M. Kolodny, C. R. Kahn, Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517 (2009).
213. W. D. van Marken Lichtenbelt, J. W. Vanhomerig, N. M. Smulders, J. M. Drossaerts, G. J. Kemerink, N. D. Bouvy, P. Schrauwen, G. J. Teule, Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* **360**, 1500-1508 (2009).
214. M. Horowitz, A. Flint, K. L. Jones, C. Hindsberger, M. F. Rasmussen, C. Kapitza, S. Doran, T. Jax, M. Zdravkovic, I. M. Chapman, Effect of the once-daily human GLP-1 analogue liraglutide on appetite, energy intake, energy expenditure and gastric emptying in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* **97**, 258-266 (2012).
215. H. Harder, L. Nielsen, D. T. Tu, A. Astrup, The effect of liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, on glycemic control, body composition, and 24-h energy expenditure in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* **27**, 1915-1921 (2004).

216. D. P. Bradley, R. Kulstad, N. Racine, Y. Shenker, M. Meredith, D. A. Schoeller, Alterations in energy balance following exenatide administration. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* **37**, 893-899 (2012).



AGRADECIMIENTOS

Escribo esto no día da Ascensión do ano 2014 gran parte da tese xa está entregada á espera das últimas correccións polo que creo que vai sendo un bo momento para mirar atrás e ver o comezo de este proceso e dar recoñecemento a toda a xente que estibo axudándome.

Comecemos polo principio , e seguramente o máis importante de todo, e non é máis que dar a grazas a toda a miña familia, a meu pai Antonio e miña nai Maricarmen por darme a oportunidade para poder emprender esta aventura, son consciente de todos os sacrificios tomados e creo que se merecen un lugar de honra en estas páxinas. Tamén debería menciona a Pedro meu irmán que aínda que somos moi distintos sempre esta por ahí para falar de calquera tontería.

Os seguintes serían os meus titores nesta tese. Agredecerlle a Rubén, Carlos e un pouco máis tarde a Sulay por permitirme traballar con eles o longo deste anos, case podería escribir outra tese de todas as cousas que puider aprender destes grandes científicos; os tres moitos grazas.

A toda a xente que pasou tempo comigo no laboratorio que son moitos : Chus por todas as clases de cirurxías e por facer moito máis amenas todas esas hora no animalario. A Douglas e Adenis por encamiñarme nos primeiros pasos neste grupo. Amparo exemplo de paciencia en constancia.

A Mónica porque pese a que xa hai un tempo que non imos de "Luna de Miel" sigues sendo a mellor compañeira de laboratorio que puider ter o largo de estes anos, un exemplo de constancia e sacrificio. Sigue así.

A Begoña (alias A Nena), aínda recordamos como cando nada mais chegar ela o laboratorio lle contestei medio durmido "non me gustan que me persigan", tres anos despois deixou de perseguirme pero o día que non enredo algo con ela no traballo e un día máis raro e aburrido que o resto. Non te estreses tanto que vas quedar sin dedos.

A Sonia, que mentres que eu acabo unha etapa de miña vida ela vai comezar outra moi importante na súa, moitos parabéns! Grazas por estar na pollata do lado e non enfadarte porque che colla reactivos sin avisar e por non darme moito chollo co sistema.

Estrella sempre disposta a falar de calquera cousa friki relacionada ca música ou co cine, aínda que non coincidamos moito, resúltame charlas moi entretenidas.

David aínda que no coincidimos demasiado no laboratorio sempre é divertido facerse os "machos" diante de todas estas señoritas.

A todos os que foron chegando co tempo Cintia causa da miña fama no Hospital, Mar,Omar, Eva;Bea, Gabriela, Pili.A Marisol pola paciencia cos pedidos, a Luz por todo o traballo cas In situs. A xente do grupo de Miguel López, empezando por el mesmo e os seus acertados consellos científicos, Pablo,Luis,Noelia, Diana,Is ma,Cris,Patrica,Ahmed.

Os de sempre (Antón, Toni, Gonzalo, Alejandro, Marcos,Jorge, Javi e Patri por todas as cartas baralladas, dados tirados,teclas pulsadas, os libros leídos e por todas esas miradas raras de camareros que nos escoitan falar, por ser un alivio sempre. A xente da sala de esgrima Iago, Javi e Jose.

A Vanesa por cargar gran parte da frustración derivada desta tese.

Seguro que me esquezo de alguén, pero creo que o principal está.

A todos vos MOITAS GRACIAS.

