

Tesis doctoral

**Efectos centrales de MCH
sobre el metabolismo
periférico**

Mónica Imbernón Piedra

Departamento de Fisiología

— CIMUS —

Programa de doctorado en Endocrinología

Santiago de Compostela

-2016-





Portada y contraportada: Corte sagital del tronco encéfalo de rata; se muestra una inmunohistoquímica de c-Fos sobre el núcleo dorsal del nervio vago, tras una semana de administración crónica central de MCH. Microfotografía realizada por la Profesora Rosalía Gallego.





DEPARTAMENTO DE FISIOLOXÍA

Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico

Tesis doctoral

Mónica Imbernón Piedra

Departamento de Fisiología

— CIMUS —

Programa de doctorado en Endocrinología

Santiago de Compostela 2016





DEPARTAMENTO DE FISIOLOXÍA

Dr. Rubén Nogueiras Pozo, Profesor Titular del 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.

Certifican que la tesis: “Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico” elaborada por Mónica Imbernón Piedra ha sido realizada bajo su dirección en el laboratorio de “Metabolismo Molecular” del Centro de Investigaciones en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente autorización:

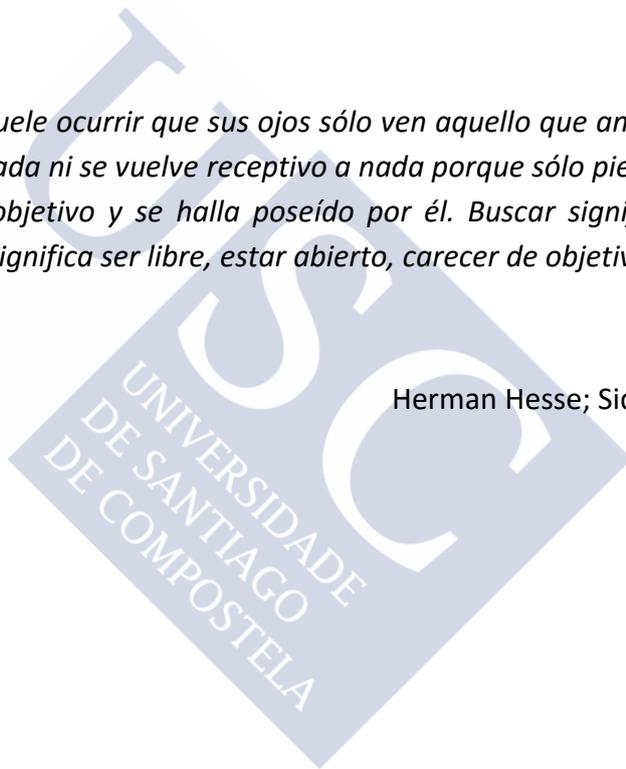
Fdo. Rubén Nogueiras Pozo

Fdo. Carlos Diéguez González



"Cuando alguien busca, suele ocurrir que sus ojos sólo ven aquello que anda buscando, y ya no logra encontrar nada ni se vuelve receptivo a nada porque sólo piensa en lo que busca, porque tiene un objetivo y se halla poseído por él. Buscar significa tener un objetivo, pero encontrar significa ser libre, estar abierto, carecer de objetivos..."

Herman Hesse; Siddharta, 1975







A mi padre

A Javier





ÍNDICE



ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN	25
Homeostasis energética	25
1.1 Balance nutricional.....	26
1. 1.2 Gasto energético	28
1.3 Partición nutricional.....	29
Regulación de la homeostasis energética	31
2. 2.1 Señales del tracto gastrointestinal al CNS.....	31
2.2 Señales del tejido adiposo blanco al CNS.....	35
Sistema nervioso central y regulación del metabolismo energético	38
3. 3.1 Regulación de la saciedad por el tronco-encéfalo	39
3.2 Regulación del metabolismo energético por el hipotálamo.....	39
3.3 Hormona concentradora de melanina (MCH)	44
3.4 Sistema opioide en el metabolismo energético.....	54
3.5 Sistema nervioso autónomo: conexión entre el CNS y el metabolismo periférico	56
4. Patologías hepáticas asociadas a la homeostasis energética	60
4.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).....	61
4.2 Esteato-hepatitis no alcohólica (NASH)	66
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
2. Animales de experimentación	79
Técnicas experimentales <i>in vivo</i>	81
2.1 Canulación intra cerebroventricular (ICV)	81
2.2 Bombas osmóticas	81
2.3 Estereotaxia.....	82
2.4 Administración viral en la vena de la cola.....	82
2.5 Canulación intravenosa (IV)	83
2.6 Vagotomía quirúrgica.....	83
2.7 Registro de la actividad de la inervación simpática del tejido adiposo blanco (SNA)	84

2.8	Fenotipado metabólico	85
2.9	Perfusión intracardiaca	87
	Técnicas experimentales <i>in vitro</i>	87
3.1	Análisis de RNA mensajero por PCR en tiempo real	87
3.	3.2 Análisis de proteína por <i>western blot</i>	92
	97	
	3.3 Análisis histológico de tejido central y periférico	98
	3.4 Inmunohistoquímica	99
	3.5 Análisis de metabolitos	102
	3.6 Actividad enzimática	102
	Análisis estadístico.....	104
4.	4.1 Test paramétricos.....	104
	Diseño experimental.....	106
5.	5.1 Administración crónica ICV de MCH	106
	5.2 Administración crónica ICV de MCH en modelos de ratón modificados genéticamente.....	106
	5.3 Administración periférica de MCH.....	107
	5.4 Estimulación de lipólisis por isoprotenol	108
	5.5 Bloqueo farmacológico del ER-stress.....	109
	5.6 Bloqueo genético del ER-stress hepático.....	109
	5.7 Efecto de la vagotomía sobre la acción central de MCH	110
	5.8 Sobre-expresión génica en núcleos hipotalámicos.....	111
	5.9 Administración crónica de MCH en núcleos hipotalámicos.	112
	5.10 Silenciamiento genético de MCH-R1 en el hipotálamo lateral (LHA)	113
	5.11 Silenciamiento genético de KOR en el hipotálamo lateral (LHA).....	114
1.	RESULTADOS.....	119
	MCH central modula el metabolismo lipídico periférico	119
	1.1 La administración central de MCH controla la adiposidad independientemente de la ingesta.	119
	1.2 La administración central de MCH regula el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco	121
	1.3 La administración central de MCH regula el metabolismo lipídico del hígado mediante el ER-stress y JNK1.	123

1.4	La administración central de MCH incrementa la absorción lipídica de la dieta	130
	La administración periférica de MCH no afecta al programa lipogénico de grasa e hígado.....	130
2.	MCH central realiza su efecto periférico mediante el sistema nervioso autónomo	131
3.	3.1 El sistema nervioso simpático modula los efectos centrales de MCH sobre el tejido adiposo blanco	131
	3.2 EL sistema nervioso parasimpático modula los efectos centrales de MCH sobre el hígado	133
	Los efectos periféricos de MCH en el CNS se modulan desde el núcleo arcuato y núcleo lateral del hipotálamo	135
4.	4.1 La acción de MCH y su receptor en el ARC, modulan el metabolismo lipídico del tejido adiposo	135
	4.2 La acción de MCH y su receptor en el LHA, modulan el metabolismo lipídico del hígado	137
	4.3 La inhibición genética del MCH-R1 en el LHA, reduce la esteatohepatitis inducida por dieta deficiente en colina-metionina, a través del nervio vago.....	140
5.	El sistema opioide, mediante el receptor <i>kappa</i> , media las acciones centrales de MCH sobre el metabolismo lipídico del hígado	143
	5.1 El MCH-R1 y el KOR co-localizan en el LHA, y MCH induce la producción de prodinorfina.....	143
	5.2 Los ratones KO para KOR son resistentes a los efectos centrales de MCH sobre el ER-stress y el metabolismo lipídico del hígado	144
	5.3 El silenciamiento genético de KOR en el LHA protege frente al efecto adipogénico y ER-stress hepático inducido por MCH mediante el ANS	145
	5.4 La inhibición génica de KOR en el LHA, reduce la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD.....	148
	5.5 La sobre-expresión de KOR en el LHA produce adiposidad hepática inducida por la activación de ER-stress.....	150
	DISCUSIÓN	155
	CONCLUSIONES.....	165
	BIBLIOGRAFÍA	169
	AGRADECIMIENTOS.....	195





ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AAV: adenovirus adeno-asociado

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACTH: hormona adrenocorticotropa (*adrenocorticotropic hormone*)

Ad: adenovirus

AGL: ácido graso libre

AgRP: péptido similar a agutí (*agouti related protein*)

ALT: alanina aminotransferasa

AMPK: proteína quinasa activada por AMP (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*)

ANOVA: análisis de la varianza

ANS: sistema nervioso autónomo (*autonomic nervous system*)

AP: antero-posterior

ARC: arcuato

ASK1: quinasa señalizadora de apoptosis 1

AST: aspartato aminotransferasa

ATF α/β : factor de transcripción activado α/β (*activated transcription factor*)

ATP: adenosín trifosfato

BAT: tejido adiposo marrón (*brown adipose tissue*)

BSA: sero-albúmina bovina

CAMKK: quinasa activada por calcio calmodulina (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*)

CART: transcrito relacionado a cocaína-anfetamina (*cocaine-amphetamine related transcript*)

CCK: colecistoquinina

Acrónimos y abreviaturas

CHOP: proteína homóloga C/EBP (*C/EBP homologous protein*)

ChREBP: proteína de unión en respuesta a carbohidratos (*carbohydrate-responsive element-binding protein*)

CIDEA: efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (*cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*)

CNS: sistema nervioso central (*central nervous system*)

CPT1: carnitina palmitoil transferasa 1

CVO: órgano circunventricular (*circumventricular organ*)

DAB: diaminobencidino

DEPC: dietilpirocarbonato

DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo (*dorsomedial hypothalamus*)

DMV: núcleo dorsal del nervio vago

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DOR: receptor opioide delta (*delta opioid receptor*)

DV: dorso ventral

EE: gasto energético (*energy expenditure*)

elf2 α : factor de iniciación eucariota 2 (*eukaryotic initiation factor 2*)

ER: retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

ER-stress: estrés del retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum stress*)

FQ: *food quotient*

FXR: receptor X farnesoide (*Farnesoid X receptor*)

GABA: ácido γ -aminobutírico (*Gamma-Aminobutyric acid*)

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

GHSR-1a: receptor 1a de ghrelina (*growth hormone secretagogue receptor*)

GIP: polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*)

GLP-1: péptido similar al glucagón 1 (*glucagon-like peptide-1*)

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone*)

GPCR: receptor 7 transmembrana asociado a proteína G (*G protein-coupled receptors*)

GPR78/BIP: proteína regulada por glucosa 78/chaperona de unión a inmunoglobulina (*G protein-coupled receptor 78/binding immunoglobulin protein*)

GTT: test de tolerancia a glucosa (*glucose tolerance test*)

H&E: hematoxilina y eosina

HSL: hormona sensible a lipasa

ICV: intra-cerebro ventricular

IKK- β : inhibidor de factor nuclear kinasa β (*inhibitor of nuclear factor kappa- β kinase subunit beta*)

IL: interleukina

IP: intraperitoneal

IR: receptor de insulina (*insulin receptor*)

IRE1 α : proteína requerida de inositol 1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*)

JNK: c-Jun N-terminal kinasa

KO: *knock out*

KOR: receptor opioide kappa (*kappa opioid receptor*)

L: lateral

LDLR: receptor de lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein receptor*)

LHA: hipotálamo lateral (*lateral hypothalamus*)

LPL: lipoproteína lipasa

LPS: endotoxina lipopolisacárido (*lipopolysaccharides endotoxin*)

LRH1: receptor de hígado homólogo 1 (*liver receptor homolog-1*)

MC3/4R: receptor de melanocortina 3/4 (melanocortin 3/4 receptor)

MCD: dieta deficiente en metionina y colina (*metionin and choline deficient diet*)

MCH: hormona concentradora de melanina (*melanin concentrating hormone*)

MCH-R1/2: receptor la de la hormona concentradora de melanina 1/2 (*melanin concentrating hormone receptor 1/2*)

Acrónimos y abreviaturas

MOR: receptor opioide mu (*mu opioid receptor*)

MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*

Nac: núcleo accumbens

NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico (*non alcoholic fatty liver disease*)

NASH: esteatohepatitis no alcohólica (*non alcoholic steatohepatitis*)

NEFAs: ácidos grasos libres no esterificados (*non-esterified fatty acids*)

NEI: neuropéptido E-I

NFK β : factor nuclear k β (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NGE: neuropéptido G-E

NPY: neuropéptido Y

NPYR: receptor del neuropéptido Y (*NPY receptor*)

NTS: núcleo del tracto solitario

Ob-R: receptor de leptina (*obese receptor*)

OGTT: test oral de tolerancia a glucosa (*oral glucose tolerance test*)

OXR1/2: receptor de orexina 1/2 (*orexin receptor*)

OXY: oxiomodulina

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PCG-1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time polimerase chain reaction*)

PEPCK: fosfoenol piruvato carboxikinasa (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PERK: kinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplásmico iniciador de la traducción eucariota (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*)

PI3K: fosfoinositol 3 kinasa (*phosphatidylinositide 3-kinases*)

PK: piruvato kinasa

PKA: proteína kinasa A

POMC: proopiomelanocortina

PPAR- γ : receptor del peroxisoma-proliferador activado gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PSNS: sistema nervioso parasimpático (*parasympathetic nervous system*)

PUFAs: ácidos grasos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*)

PVH: núcleo paraventricular (*paraventricular hypothalamus*)

PYY: péptido YY

RNA: ácido ribonucleico (*ribonuclei acid*)

ROS: especies reactivas de oxígeno

RQ: tasa de respiración metabólica (*respiratory quotient*)

SC: subcutáneo

SCARB1: *scavenger receptor class B member 1*

SCD-1: esteoril-CoA desaturasa

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SF1: factor esteroideogénico 1

shRNA: *short hairp ribonuclei acid*

SNA: actividad nerviosa del simpático (*sympathetic nervous activity*)

SNS: sistema nervioso simpático (*sympathetic nervous system*)

SOCS3: supresor de la señalización de la citokina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)

SREBP1: proteína de unión reguladora de esteroil tipo 1-c (*sterol regulatory element-binding transcription factor 1*)

STAT: transductor de señal activador de la transcripción (*signal transducer and activator of transcription*)

TG: triglicéridos

TKO: triple *knock out*

TLR-4: receptor kinasa tipo *Toll 4* (*toll like receptor 4*)

Acrónimos y abreviaturas

TNF- α : factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

TRH: hormona liberadora de tirotrópina (*thyrotropin-releasing hormone*)

TUDCA: ácido tauroso-deoxicólico (*tauroursodeoxycholic acid*)

TZDs: tiazolidinedionas

UCP: proteína desacoplante (*uncoupling protein*)

VGX: vagotomía

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)

VMH: núcleo hipotalámico ventromedial (*ventromedial hypothalamus*)

VTA: área ventral tegmental (*ventral tegmental area*)

WAT: tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*)

WT: fenotipo salvaje (*wild type*)

XBP-1: proteína de unión X-box (*X-box binding protein 1*)

ZI: zona *incerta*

α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos α (*α -Melanocyte-stimulating hormone*)

β -AR: receptor adrenérgico β (*β adrenergic receptors*)



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Homeostasis energética

La primera ley de la termodinámica establece que la energía de cualquier sistema cerrado ni se crea ni se destruye, simplemente se transforma. La variación de la energía interna de un sistema adiabático (sin intercambio de calor con otros sistemas o su entorno) viene determinado por la suma del calor y del trabajo (1). Un organismo vivo puede considerarse un sistema adiabático, puesto que incorpora nutrientes y transforma la energía química contenida en el organismo (por oxidación controlada de los combustibles) en otros elementos químicos mediante procesos anabólicos, o en energía mediante procesos catabólicos.

Siendo el organismo un sistema aislado, la energía química adquirida (tras la corrección de las pérdidas generadas como productos de deshecho) debe ser igual a la energía utilizada (en forma de calor, trabajo mecánico o biosíntesis), más la energía química almacenada; generando un balance energético equilibrado (2).

Ingesta de energía (alimento) = Energía consumida (calor, trabajo) + Energía almacenada

Esta equivalencia se refiere a un organismo adulto, estable y sin variación de peso. Sin embargo, esta ecuación no es adecuada, los organismos son variables entre sí y la ecuación no tiene en cuenta el incremento del gasto energético cuando se aumenta de peso y viceversa (3). La ecuación correcta es dinámica y determina que:

Variación de las reservas de energía = Energía ingerida – Gasto energético

Para simplificar nos referiremos al balance energético como la variación de las reservas de energía, equivalente a la diferencia entre la ingesta y el gasto de energía en individuos en los que se asume una absorción estándar de los nutrientes (Imagen 1). El balance energético de un organismo refleja la homeostasis energética; es decir, la capacidad del organismo para mantener su condición interna estable mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior (metabolismo). Un balance energético positivo refleja un fenotipo obeso mientras que el negativo un fenotipo anoréxico, ejemplos ambos de desequilibrio en el balance energético.

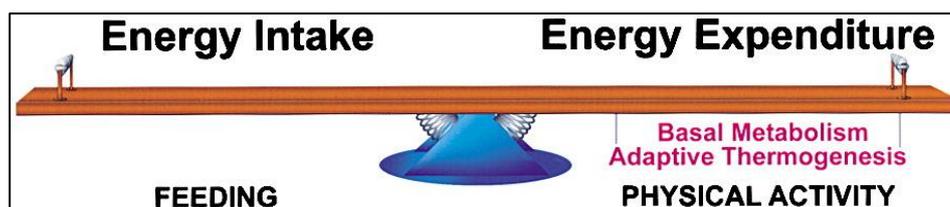


Imagen 1. Balance energético (4)

Introducción

La actividad física abarca los movimientos voluntarios, mientras que el metabolismo basal es el conjunto de los procesos bioquímicos necesarios para el mantenimiento de la existencia. La termogénesis adaptativa se refiere a la energía disipada por el calor en respuesta a cambios ambientales (4). A pesar de que la cantidad de alimento ingerido modula el balance energético, hay que tener en cuenta el contenido de macronutrientes de la dieta, es decir, el balance de carbohidratos, proteínas y grasa de la dieta. El almacenamiento del exceso de energía no es directamente proporcional al desequilibrio del balance energético sino que depende del combustible consumido (carbohidratos, aminoácidos o ácidos grasos) y su disponibilidad para ser movilizado, lo que se conoce como partición nutricional.

1.1 Balance nutricional

La cantidad de energía ingerida para producir ese desequilibrio no es el único parámetro de la ingesta a tener en cuenta. El balance nutricional no sólo determina la cantidad de energía contenida en cada nutriente, sino cómo se metaboliza en el cuerpo. Por tanto hay que considerar el balance nutricional a la hora de evaluar el impacto de la energía ingerida en el balance energético total (Imagen 2).

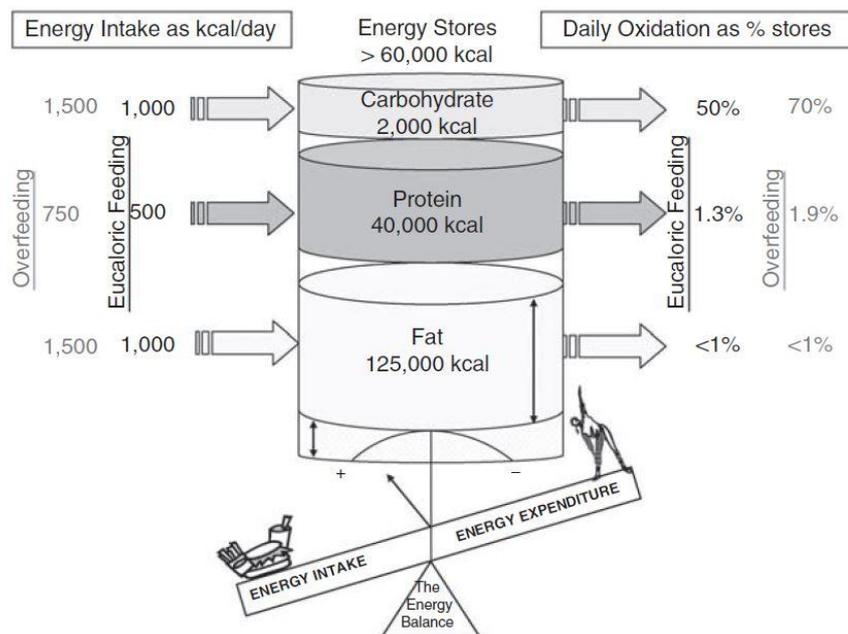


Imagen 2. Balance nutricional de la ingesta y almacenamiento de los principales macronutrientes (3)

1.1.1 Balance proteico

La ingesta de proteínas es alrededor de un 15% de la dieta y su reservorio representa un tercio del total de la energía almacenada en el ser humano. La ingesta diaria de proteínas equivale a un poco más del 1 % del total de las reservas de proteínas contenidas en el cuerpo (3). Las reservas de proteínas incrementan su tamaño sólo en respuesta a estímulos de crecimiento como la hormona de crecimiento, andrógenos, ejercicio físico o ganancia de peso. Así pues, el almacenamiento proteico está muy bien regulado y no afecta directamente al desequilibrio del balance energético (5).

1.1.2 Balance de carbohidratos

Los carbohidratos son la mayor fuente de energía en la dieta, sin embargo, debido a las características químicas del glucógeno (pesado y osmóticamente activo) su almacenamiento en hígado y músculo es muy limitado. La ingesta diaria de carbohidratos corresponde alrededor de 50-100 % de las reservas diarias (frente al 1% de la grasa o proteínas), lo que significa que en un corto periodo de horas o días los almacenes de glucosa fluctúan intensamente. Sin embargo, al igual que ocurre con las proteínas, el consumo y almacenamiento de carbohidratos está finamente regulado por mecanismos hormonales. Esto implica que el exceso de ingesta de carbohidratos no tiene por qué derivar en un aumento de peso puesto que su almacenamiento es limitado y controlado, sin embargo, cuando el exceso de ingesta de carbohidratos es muy elevado, la activación de la lipogénesis *de novo* en el hígado con los excedentes de carbohidratos, puede comprometer el balance energético (3).

1.1.3 Balance lipídico

A diferencia del resto de nutrientes las reservas de grasa pueden ser prácticamente ilimitadas (6,7). Como ocurre con las proteínas, la ingesta diaria de grasa representa menos del 1% del total del almacenamiento energético, sin embargo el almacenamiento de grasa contiene 6 veces más la energía contenida que el depósito proteico (8). El depósito graso tiene como función almacenar energía e informar sobre su variación energética mediante señales hormonales. En condiciones normales, es éste depósito el que determinará el balance energético total.

1.2 Gasto energético

Como previamente se ha mencionado, el gasto energético total comprende la actividad espontánea, el metabolismo basal y la termogénesis que realiza el individuo.

1.2.1 Actividad física

La actividad espontánea o física abarca entre un 8-15% del gasto energético total en humanos (9). Engloba tanto la actividad física involuntaria como voluntaria de cada organismo, siendo este último un factor muy variable si además le incluimos la actividad deportiva. El principal combustible que se utiliza para la contracción muscular es la glucosa, puesto que el músculo puede almacenarla limitadamente en forma de glucógeno. Sin embargo en ayuno o si el esfuerzo es considerado cuando se agota el glucógeno almacenado, el músculo comienza a consumir ácidos grasos provenientes del tejido adiposo blanco.

1.2.2 Metabolismo basal

Es la energía empleada para el sustento básico del organismo en un estado de reposo: metabolismo celular y mantenimiento fisiológico de las funciones orgánicas. Durante un día la tasa metabólica basal varía, siendo mayor durante el día que durante la noche. Durante el día también se detectan variaciones, aumentado tras la comida debido a un proceso denominado acción dinámica de la comida (termogénesis inducida por la dieta) (2). Este proceso está bajo control hormonal; de hecho, hace más de un siglo que se conoce la influencia de las hormonas tiroideas en la modulación del metabolismo basal; la desregulación del eje tiroideo conlleva importantes alteraciones en el balance energético (10,11)

1.2.3 Termogénesis

Si bien se podría considerar la termogénesis como parte del metabolismo basal, la importancia de este proceso en el mantenimiento de la temperatura en organismos homeotermos, merece un estudio aparte por la fina regulación del proceso, la cantidad de energía que se utiliza y su influencia sobre la variación del balance energético. El tejido adiposo marrón es el encargado de llevar a cabo el proceso de disipación de la energía en forma de calor. El desacoplamiento de la respiración mitocondrial, favorece que el gradiente de protones asociado a la fosforilación oxidativa pase por la proteína

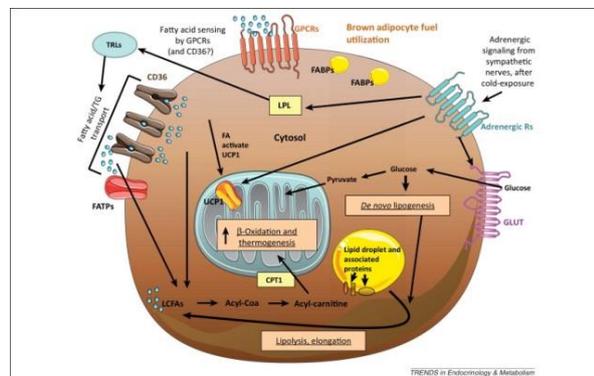


Imagen 3. Uso de los combustibles en tejido adiposo marrón. Tras la oxidación del combustible, se favorece el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, generando calor (12)

desacoplante 1 (UCP1), transformando la energía del gradiente en calor en vez de en ATP (12) (Imagen 3). La capacidad termogénica del tejido adiposo marrón es fundamental para la termorregulación corporal, producción de calor en neonatos, mamíferos hibernadores y probablemente ayuda a quemar el exceso de energía ante dietas hipercalóricas (13).

1.3 Partición nutricional

Es muy importante conocer cómo se regula el uso de combustibles que derivarán en el gasto o en el almacenamiento de la energía. Como se ha mencionado con anterioridad, los principales combustibles son el azúcar y los lípidos, que serán utilizados por cada tejido en diferentes estados nutricionales con diferentes finalidades.

Por lo tanto, si la glucosa es la primera fuente de energía para los tejidos tras una ingesta y tiene un almacenamiento limitado, sólo la grasa va a determinar la cantidad de energía almacenada en el cuerpo; el balance energético dependerá directamente de este factor. La grasa puede participar directamente en procesos oxidativos de músculo, tejido adiposo marrón, o formar parte del almacenamiento energético en el tejido adiposo blanco. La nutrición parcial establece la función metabólica de la grasa en los diferentes estados energéticos de un organismo (14) (Imagen 4).

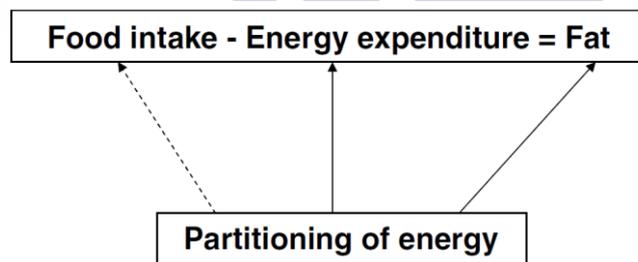


Imagen 4. La partición nutricional establece la función de la grasa en los diferentes estados energéticos, pudiendo ser almacenada u oxidada, modulando el balance energético (14).

El hígado juega un importante papel en la partición nutricional puesto que es el principal productor de combustibles. Tras la ingesta y en respuesta a la insulina, el hígado adquiere y almacena la glucosa en forma de glucógeno y usa la glucosa como combustible mediante la glucólisis. Tras la glucólisis las concentraciones de acetyl-CoA aumentan y gracias a la acción de la insulina se favorece la formación de la acetyl-CoA-carboxilasa (ACC) para producir malonil-CoA a partir de acetyl-CoA (15). El malonil-CoA es la molécula precursora de los ácidos grasos y señala la disponibilidad de nutrientes. Ante la abundancia de combustibles, la malonil-CoA se acumula e inhibe la carnitina palmitoil transferasa 1 A (CPT1-A), impidiendo el transporte de los ácidos grasos a la mitocondria para su β oxidación (16). Los ácidos grasos generados se empaquetan en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que serán transportados por la sangre hasta el tejido adiposo. Por otro lado, los lípidos adquiridos de la dieta se empaquetan en quilomicrones (lipoproteínas) que los transportan hacia los tejidos

Introducción

periféricos. En el tejido adiposo, la lipoproteína lipasa (LPL) incorpora a los adipocitos los TG de las VLDL y quilomicrones, almacenado los lípidos en un proceso dependiente de insulina (2).

Considerando que la cantidad de grasa que se puede almacenar en tejido adiposo es casi ilimitada, la glucosa sólo se puede almacenar en forma de glucógeno en cantidades relativamente pequeñas en el hígado y en el músculo. La consecuencia es que en condiciones de ayuno, la glucosa se guardará para los órganos que son dependientes de la misma como el cerebro. Tras agotar las reservas de glucógeno, el hígado sintetiza glucosa mediante la gluconeogénesis a partir de metabolitos residuales del metabolismo del músculo (lactato y alanina) y del glicerol, procedente de la lipólisis del tejido adiposo graso. Esta lipólisis de los TG almacenados en los adipocitos, liberará ácidos grasos al plasma que serán adquiridos por los tejidos periféricos para su oxidación, principalmente músculo esquelético, corazón e hígado (17).

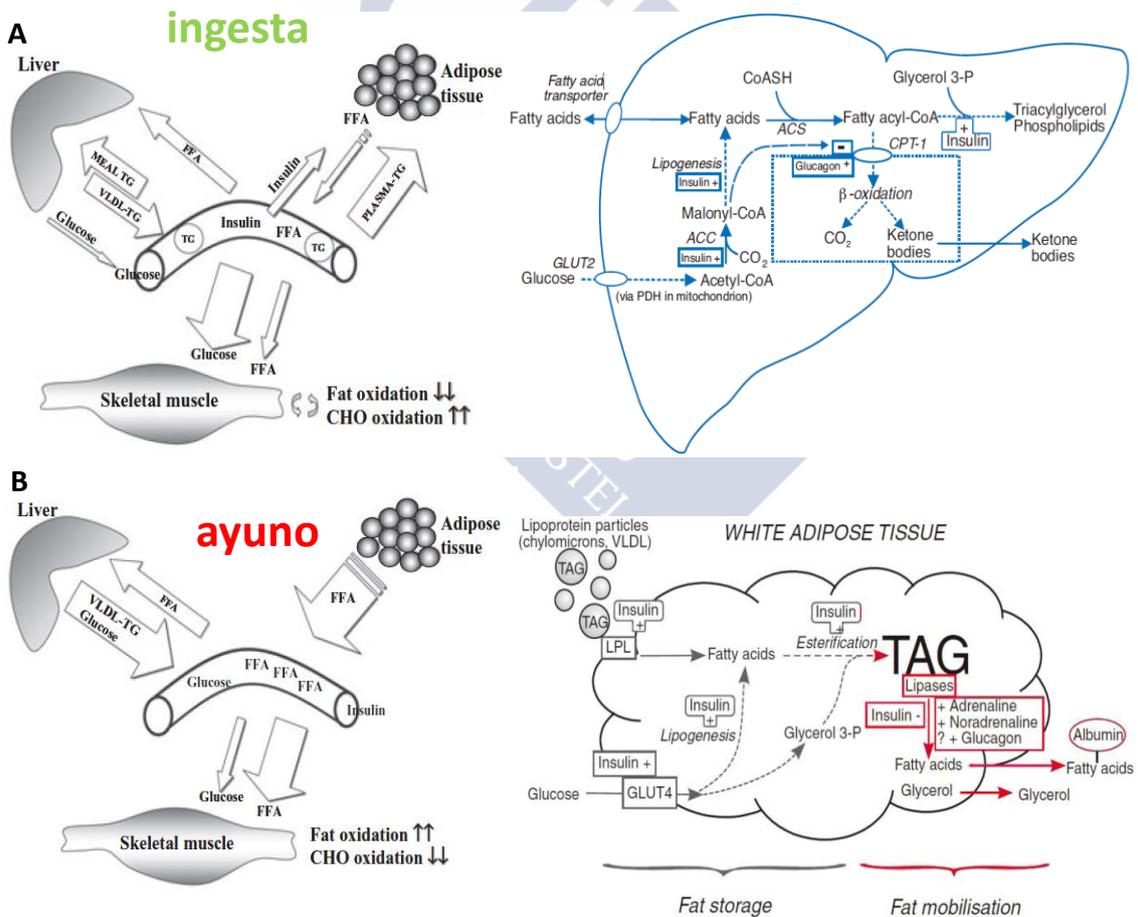


Imagen 5. Representación del metabolismo intermediario y la partición nutricional tras la ingesta (A) y en ayuno (B) en los diferentes estados energéticos. Adaptado de (2) y (17).

Regulación de la homeostasis energética

La homeostasis energética requiere de una fina regulación entre consumo, almacenamiento y gasto de energía. La ingesta, la partición nutricional, el uso de los combustibles y el almacenamiento energético, están controlados por circuitos neuroendocrinos que se localizan en diferentes áreas del sistema nervioso central (CNS) tales como el hipotálamo o el tronco encefálico. Este modelo se basa en un constante flujo de información desde los órganos periféricos con actividad metabólica (tracto gastrointestinal, tejido adiposo, páncreas, hígado, etc.) hacia el CNS. A continuación, se genera una respuesta que se transmitirá a los órganos periféricos implicados.

2.1 Señales del tracto gastrointestinal al CNS

Uno de los principales ejes para la regulación de la homeostasis energética es el circuito CNS-tracto gastrointestinal. Esta comunicación se consigue por la interacción neuronal y hormonal entre ambos sistemas (18,19). En cada tramo del tracto, diferentes estructuras secretan hormonas que irán o directamente al cerebro pasando la barrera hematoencefálica o activarán neuronas aferentes del sistema nervioso autónomo (ANS) que transmite la señal al CNS y/o directamente regularan el metabolismo de los órganos periféricos por el troco encefálico (Imagen 6)

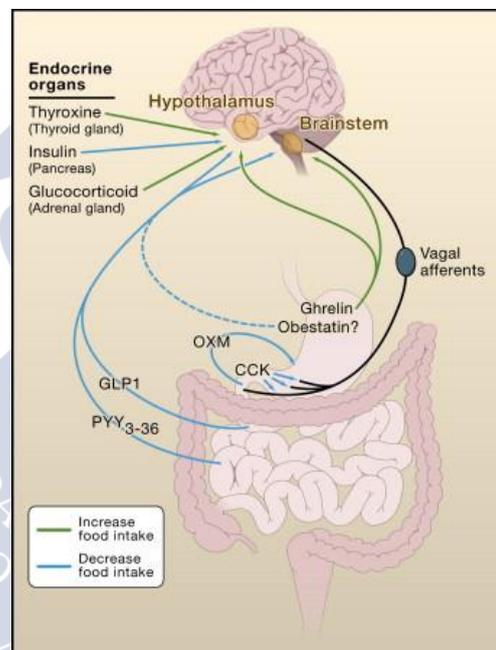


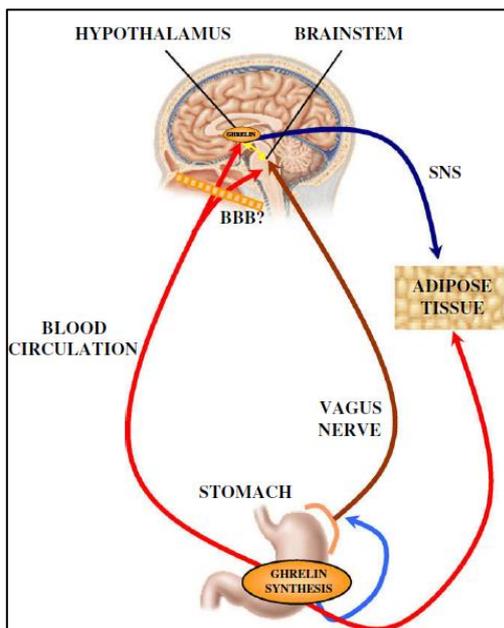
Imagen 6. Hormonas derivadas del tracto gastrointestinal moduladoras de la homeostasis energética (19).

2.1.1 Ghrelina

Se descubrió como ligando del receptor de los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR-1a) (20,21). Se trata de un péptido de 28 aminoácidos caracterizado por presentar un grupo O-n-octanoico en el residuo 3 de serina, que es producido y secretado por las células parietales del estómago (22). Sus niveles circulantes aumentan antes de la ingesta, disminuyendo a valores iniciales tras la comida en proporción a las calorías ingeridas (23). La expresión y secreción de la ghrelina varían según el estado energético; aumenta en ayuno, en pérdida de peso y en la hipoglicemia inducida por la insulina (24-26). La administración central o periférica de ghrelina estimula la ingesta y la adiposidad (27); por lo que se considera a la ghrelina una señal entérica moduladora de la homeostasis energética. La ghrelina es la única hormona peptídica que estimula el apetito (orexigénica) en lugar de actuar

Introducción

como una señal de saciedad (anorexigénica) (28). En el CNS, la ghrelina atraviesa la barrera hematoencefálica en un proceso aún sin definir y ejerce su acción sobre su receptor GHSR-1A hipotalámico. Este receptor se expresa predominantemente en las neuronas que co-expresan el péptido similar a Agutí y neuropéptido Y (AgRP/NPY) en el núcleo arcuato del hipotálamo y en neuronas del núcleo ventromedial (VMH). En estas neuronas, la ghrelina activa una ruta en la que participan SIRT1/AMPK/p53 y los ácidos grasos (29,30) que induce la expresión de ambos AgRP y NPY, los cuales median los efectos de ghrelina sobre el metabolismo lipídico (31,32). A nivel periférico, el efecto adipogénico sobre el tejido adiposo blanco es independiente del efecto orexigénico de la ghrelina a través de los receptores de melanocortinas del



hipotálamo; transmitiendo la señal a la grasa a través del sistema nervioso simpático (Imagen 7) (33-36). Se ha descrito que el efecto orexigénico de la ghrelina no sólo es modulado por las neuronas AgRP/NPY sino que también se regula en el tronco-encéfalo a través de su efecto hormonal (37) o a través de las señales aferentes del nervio vago activadas por la secreción de ghrelina en el estómago (38).

Imagen 7. Síntesis y acciones de ghrelina. La mayor parte de la ghrelina circulante se sintetiza en el estómago, modulando ingesta y peso corporal mediante la activación de neuronas AgRP/NPY en el núcleo arcuato del hipotálamo (36).

2.1.2 Insulina

Hormona secretada por las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos en respuesta a altas concentraciones de glucosa en sangre. Actúa por medio del receptor de insulina tirosin-kinasa (IR) activando la vía PI3K/AKT en tejidos periféricos como músculo esquelético, grasa e hígado para reducir los niveles de glucosa circulantes. La insulina es la hormona de mayor potencial anabólico, favoreciendo la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas (Imagen 8). A su vez, inhibe la degradación y liberación de ácidos grasos y glucosa al torrente sanguíneo inhibiendo la expresión de enzimas que favorece la degradación de los combustibles, favoreciendo, por tanto, el almacenamiento energético en los tejidos periféricos. (39).

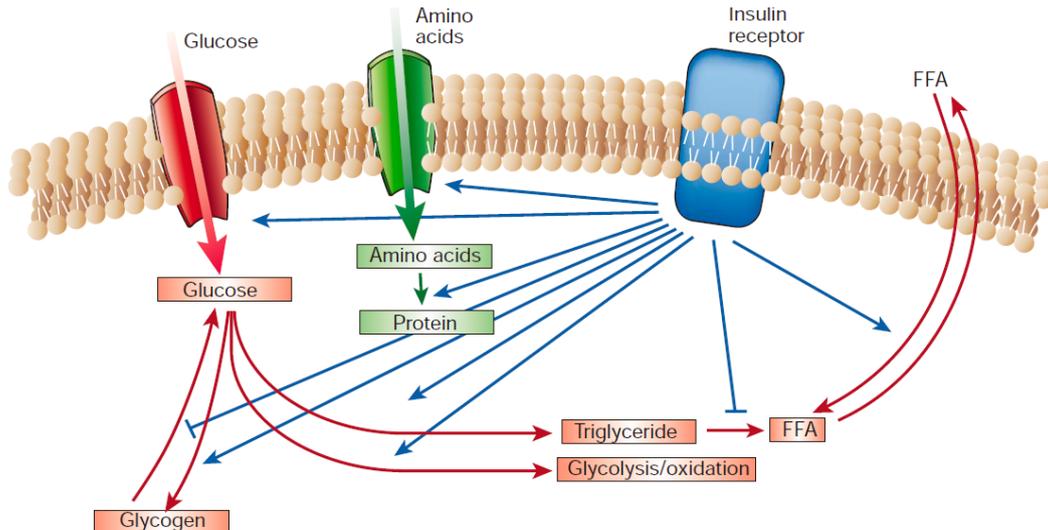


Imagen 8. Regulación del metabolismo por la insulina. La insulina estimula la captación de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos en las células, y aumenta la expresión o actividad de las enzimas que catalizan glucógeno, lípidos y la síntesis de proteínas, mientras que inhibe la actividad o expresión de los que cataliza la degradación. (39)

El descubrimiento de que la insulina modula la expresión de neuropéptidos en el hipotálamo y regula el metabolismo energético, ha puesto de manifiesto que el cerebro es un órgano sensible a la insulina. A nivel central, la insulina ejerce una función reguladora del balance energético, la reproducción y la supervivencia neuronal (40-42). La expresión del IR en el cerebro es muy dispersa con elevadas concentraciones en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo e hipocampo (43,44). La insulina, cuya secreción es dependiente de los niveles de glucosa en sangre y proporcional a la cantidad de grasa (45), atraviesa la barrera hematoencefálica en proporción a las concentraciones plasmáticas en un proceso de transporte saturable mediado por un transportador (46-48). En el ARC, la insulina actúa sobre las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART. La insulina, disminuye la producción y expresión de NPY, favoreciendo la de POMC; y por tanto activa la ruta de las melanocortinas produciendo una reducción de la ingesta (49,50). Además del efecto anorexigénico, la acción hipotalámica de la insulina modula también el metabolismo de la glucosa, incrementando la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y reduciendo la gluconeogénesis hepática (51). Por último, a través del CNS, la insulina también puede regular la cantidad de grasa de manera independiente a su efecto anorexigénico, ya que la insulina central disminuye la lipólisis en el tejido adiposo blanco (42).

2.1.3 Glucagón

Hormona secretada por las células alfa de los islotes de Langerhans pancreáticos derivado del gen pre-pro-glucagón, en respuesta a bajos niveles de glucosa plasmática (52). Esta hormona contrarresta la hipoglucemia y se opone a las acciones de la

insulina mediante la activación de la síntesis y movilización de la glucosa hepática (53). Sin embargo, además de su implicación en el metabolismo de la glucosa, se ha descrito que el glucagón también está involucrado en la regulación del metabolismo lipídico y gasto energético. Numerosos estudios han descrito que el efecto del glucagón sobre el metabolismo lipídico se traduce en una reducción de la síntesis y secreción de componentes implicados en el almacenamiento energético (triglicéridos, VLDL, colesterol) y en una movilización lipídica (54,55). A nivel central, el receptor de glucagón se distribuye en diversas regiones como el tálamo, bulbo olfatorio e hipotálamo (56). Se ha descrito que la administración periférica de glucagón reduce la ingesta pero este efecto es más acusado cuando la administración es central (57); la acción anorexigénica del glucagón implican la vía PKA/CAMKK/AMPK en el ARC (58).

2.1.4 Hormonas intestinales

En el intestino delgado, la digestión y absorción de nutrientes deriva en la secreción de señales intestinales de saciedad como la colecistoquinina (CCK), péptido YY (PYY) y como las incretinas polipéptido inhibidor gástrico (GIP), péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y la oxitomodulina (OXY) (59).

❖ **CCK:** péptido sintetizado en el yeyuno y duodeno en respuesta a la presencia de nutrientes. Tiene una vida media de entre 1-2 minutos, siendo su principal acción reducir el apetito activando aferencias del nervio vago. Tiene funciones locales como el retraso del vaciado gástrico, estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas y contracción de la vesícula biliar (59).

❖ **PYY:** este péptido se localiza a lo largo del intestino con una mayor concentración en el colón y en el recto. Aunque existe alguna controversia al respecto, la forma 1-36 es orexigénica mientras que PYY 3-36 ejerce un efecto anorexigénico. Sus efectos post-pandriales incluyen retraso del vaciado gástrico y reducción de la secreción gástrica. Se han detectado acciones sobre el metabolismo de la glucosa pero con un componente de dimorfismo sexual, que puede ser asociado a las diferencias de género sobre el eje hipotálamo-hipofisario (60).

❖ **GIP:** es un péptido incretina (hormona que activa la secreción de insulina en el páncreas tras la administración oral de glucosa) sintetizado en las células K del duodeno y yeyuno, activado por la presencia de glucosa y grasa. No se ha descrito que tenga un importante efecto anorexigénico, pero sí que promueve el almacenamiento energético, actuando directamente sobre el tejido adiposo, e incrementando su adiposidad. Además, recientemente se ha demostrado que la asociación de GIP, GLP-1 y glucagón en una quimera genera un potente triagonista con una potente acción anti obesidad (61).

❖ **GLP-1:** es una incretina derivada del procesamiento post-transcripcional del gen pre-pro-glucagón en las células L del intestino y en el CNS (62). Las acciones de GLP-1 abarcan diversos tejidos, estimulando la secreción de insulina en el páncreas, retrasando el vaciado gástrico e incrementando la presión sanguínea en el corazón. En

el cerebro, GLP-1 ejerce su acción metabólica entre otras zonas, en el hipotálamo, actuando como una hormona de saciedad y en el metabolismo de la glucosa. La activación central de GLP-1 estimula la incorporación de glucosa en el músculo y favorece la formación de glucógeno en el hígado (63). Las acciones centrales de GLP-1 también involucran al metabolismo lipídico en el tejido adiposo graso reduciendo el almacenamiento de TG independientemente de la ingesta (64). El tejido adiposo marrón está también regulado por los efectos centrales de GLP-1 incrementado el programa termogénico, favoreciendo también la transformación de los adipocitos del tejido adiposo blanco a un fenotipo de adipocito marrón (*browning*) (65,66).

❖ **OXM:** péptido que, como GLP-1, es el resultado del procesamiento post-transcripcional del gen pre-pro-glucagón que se libera tras la ingesta. Ejerce su acción mediante el receptor de GLP-1 pero con mucha menos afinidad. OXM reduce la secreción de ácido por el estómago y reduce ingesta.

2.2 Señales del tejido adiposo blanco al CNS

El tejido adiposo no es un órgano que solamente acumula y libera lípidos, es un importante órgano endocrino que secreta una gran variedad de sustancias incluyendo hormonas esteroideas, citoquinas y factores de crecimiento, reguladores del metabolismo lipídico, etc (67,68). Estos factores se denominan adipocinas, y funcionan como parte de un complejo conjunto de sistemas de control fisiológicos que regulan el tejido local y la fisiología del organismo completo (Imagen 9). Por tanto, las adipocinas contribuyen a la regulación de diversos procesos biológicos incluyendo inflamación y función inmune, biología vascular, hematopoyesis, proliferación celular y angiogénesis (69). En este caso, destacamos las adipocinas más directamente involucradas en la regulación del balance energético y el metabolismo.

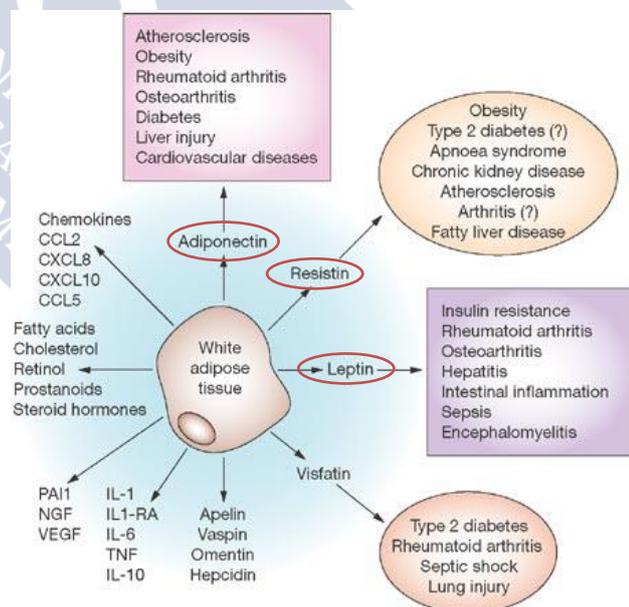


Imagen 9. Principales adipocinas y metabolitos sintetizados y secretados por el tejido adiposo blanco (67).

2.2.1 Leptina

El término leptina proviene del griego (*leptos*: delgado). Es una hormona secretada por el tejido adiposo blanco descubierta tras la caracterización del efecto de la ausencia del gen de la leptina y de su receptor en ratones (*ob/ob* y *db/db*

Introducción

respectivamente). Estas mutaciones recesivas del gen obeso (*ob*) y del gen diabetes (*db*) producen en esos ratones obesidad y diabetes tipo 2, generando un síndrome parecido a la obesidad mórbida en humanos (70,71). Los ratones *ob/ob* y *db/db* tienen idénticos fenotipos, pesando tres veces más que los ratones normales, mostrando un aumento de hasta en cinco veces del contenido de grasa corporal. Son hiperfágicos, apenas tienen actividad locomotora y son sexualmente inactivos debido a su hipogonadismo. La leptina funciona dentro de un sistema de regulación a largo plazo, modulando la cantidad de alimentos consumidos en relación con la cantidad de energía gastada (72). Se considera la principal hormona moduladora de energía, puesto que posee una función de retroalimentación negativa que mantiene constante la masa del tejido adiposo. La leptina se secreta por los adipocitos ya sea como péptido de 16 kDa como ligada a una forma soluble de su receptor (Ob-R). La cantidad de leptina secretada se correlaciona positivamente con la cantidad de masa grasa, sugiriendo que su regulación está ligada a un mecanismo sensible a los lípidos (73). Un aumento de los niveles plasmáticos genera un balance energético negativo, mientras que la reducción de los niveles de leptina circulante produce un balance energético positivo (ingesta > gasto energético). La leptina llega al CNS mediante el órgano circumventricular (CVO) atravesando la barrera hematoencefálica en un proceso dependiente de tanicitos (células de la glía especializadas), que translocan la leptina de la sangre al tercer ventrículo, y de ahí accede a los núcleos hipotalámicos (Imagen 10) (74,75). En el hipotálamo, la leptina ejerce su acción sobre neuronas que expresen su receptor mediante una ruta de señalización dependiente de STAT3 (76,77). Ya en el ARC, la leptina despolariza las neuronas POMC, cuya respuesta anorexigénica produce un descenso de la ingesta y un aumento del gasto energético (78). Por otro lado y de forma simultánea, la leptina inhibe en el núcleo arcuato a las neuronas de efecto orexigénico AgRP/NPY, potenciando el efecto saciante de la hormona (79).

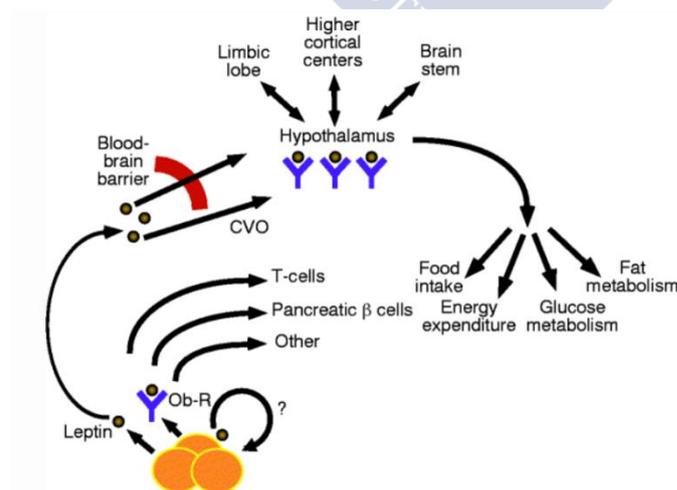


Imagen 10. Leptina y la regulación de la masa grasa. Se secreta por el tejido adiposo en proporción a la cantidad total de masa grasa, el tamaño de los adipocitos y su contenido en triglicéridos. La leptina actúa principalmente en el hipotálamo, produciendo un efecto anorexigénico (71).

2.2.2 Adiponectina

Es una proteína secretada y producida exclusivamente por los adipocitos, siendo una de las proteínas plasmáticas más abundantes en el torrente sanguíneo (80). Se considera un factor anti-inflamatorio, presentando una correlación negativa en su concentración plasmática respecto a la cantidad de tejido adiposo (81). Por ello, la producción de adiponectina es inhibida por factores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleukina 6, así como el estrés y la hipoxia (82). Numerosos estudios clínicos muestran una relación entre la adiponectina y obesidad: la adiponectina está reducida en pacientes obesos, siendo la elevada concentración de esta proteína en el plasma un factor protector frente a la diabetes. A nivel metabólico la adiponectina incrementa la oxidación de ácidos grasos en el músculo y reduce niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos libres y triglicéridos mediante la ruta de la AMP kinasa (AMPK) (83).

2.2.3 Resistina

La resistina es una adipokina perteneciente a un grupo de proteínas asociadas a procesos inflamatorios. A pesar de ser una adipokina, se ha descrito que esta proteína también es producida por otros tejidos como el tejido adiposo marrón, estómago, intestino y músculo (84). Su nombre proviene de su efecto sobre la resistencia a la insulina que produce en ratones (85); ratones knock-out para la resistina tienen menores niveles de glucosa post-prandial y menor gluconeogénesis hepática que los normales (86). La habilidad de la resistina para modular la resistencia a la insulina, está asociada con la activación del supresor de la señalización de la citokina 3 (SOCS3), inhibidor de la señalización de la insulina en adipocitos (87). En roedores, la resistina es regulada por el estatus metabólico y nutricional, disminuyendo en el ayuno y estando incrementado en estados de obesidad y diabetes tipo 2 (88). Al igual que la leptina, los principales efectos de la resistina sobre el metabolismo energético son mediados por el hipotálamo; la administración central de resistina reduce la ingesta y regula el metabolismo lipídico de tejidos periféricos (89,90).

Sistema nervioso central y regulación del metabolismo energético

- Hace más de un siglo, el renombrado fisiólogo francés Claude Bernard, además de acuñar el término de homeostasis para definir el mantenimiento del equilibrio interno, fue el primero en sugerir que el CNS regula los niveles de glucosa. Observó que la diabetes podía ser inducida en los animales por la punción sobre la base del cuarto ventrículo cerebral (91,92). Subsecuentes investigaciones realizadas desde mediados del siglo XX demostraron que, al igual que la glucosa, otras señales periféricas están involucradas en la regulación del CNS sobre la ingesta, gasto energético y en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (93). La hipótesis general es, que cuando el cerebro detecta que el contenido de energía del cuerpo y la disponibilidad de nutrientes son suficientes, el CNS inhibe la ingesta y la gluconeogénesis, simultáneamente al incremento del gasto energético y la movilización de las grasas (51,94). Contrariamente, la detección del CNS de una ausencia de energía/alimentos, genera una respuesta que promueven balance energético positivo (aumento de ingesta y disminución del gasto energético) y un incremento en la glucosa circulante (gluconeogénesis hepática). Las señales indicadoras del estado nutricional a largo plazo son producidos por el tejido adiposo (leptina y adiponectina) y el páncreas (insulina), mientras que las señales a corto plazo indicadoras de apetito (ghrelina) y saciedad (PYY, OXM) son producidas por el estómago e intestino respectivamente (Imagen 11) (95).

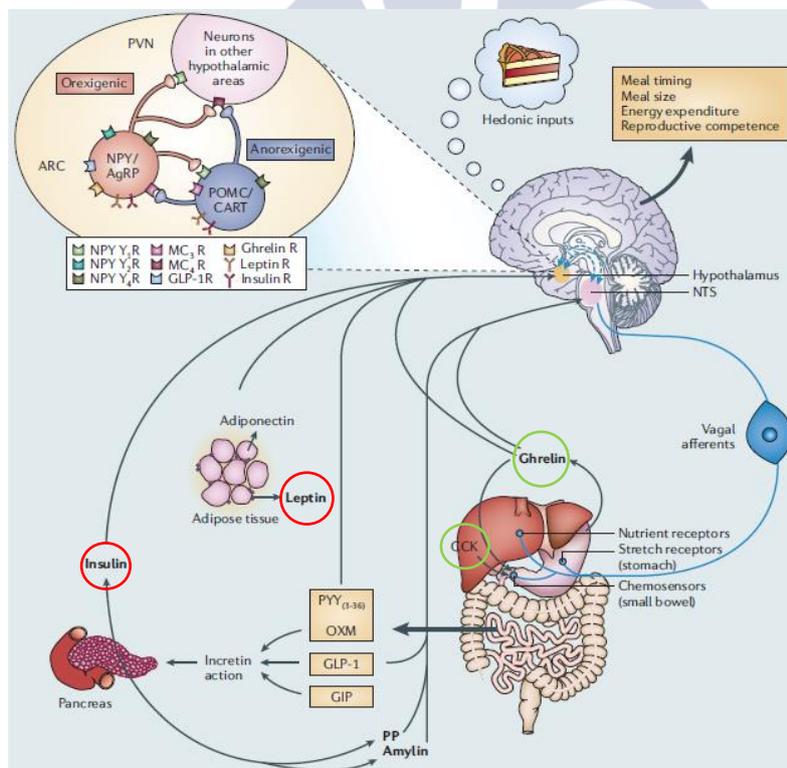


Imagen 11. Regulación central del apetito y la homeostasis energética. El cerebro integra múltiples señales centrales y periféricas, manteniendo un balance equilibrado entre la ingesta y el gasto de energía (94).

A pesar de que en este trabajo no se realiza hincapié sobre este aspecto, es importante destacar que, en la regulación del apetito también interviene el sistema hedónico. Las señales energéticas periféricas que llegan al cerebro, alcanzan el sistema de recompensa de la corteza límbica. Este sistema procesa la información tanto sobre la palatabilidad de los alimentos como el ambiente social en el que se realiza la ingesta, integrando la percepción de los sabores con el “gusto psicológico” sobre determinados alimentos. Las propiedades sugestivas y hedónicas que produce la comida, el olor, el gusto y la textura de los alimentos, se transmite al área cognitiva y emocional del cerebro modulando y anticipando la conducta alimentaria (96).

3.1 Regulación de la saciedad por el tronco-encéfalo

EL tronco-encéfalo proporciona una ruta anatómica que conecta el encéfalo con el resto del organismo. Sin embargo, también contiene muchos centros neuronales específicos que regulan la homeostasis de procesos fisiológicos vitales, incluyendo la ingesta. Las señales saciantes a corto plazo del tracto gastrointestinal, se procesan e integran en el tronco-encéfalo; concretamente en el complejo dorsal del nervio vago. Este complejo está constituido por el núcleo del tracto solitario (NTS), el área postrema (AP) y el núcleo dorsal del nervio vago (DMV). El NTS rostral, retransmite las señales gustativas procedentes del cerebro, mientras que el NTS caudal integra las señales sensoriales viscerales, modulando las señales de hambre y saciedad. La ingesta estimula las ramas aferentes del nervio vago hacia el tronco-encéfalo tanto por la distensión gástrica detectada por mecano-receptores, como por las hormonas gástricas (CCK, PYY, PP) a través de sus receptores específicos. Además, estas hormonas y nutrientes circulantes (glucosa, ácidos grasos libres) regulan directamente la actividad neuronal del NTS y el AP pasando a través de la débil barrera hematoencefálica que recubre esas zonas (97). El NTS recibe abundantes proyecciones eferentes del cerebro, incluyendo hipotálamo y sistema límbico (98,99). Estas características anatómicas permite al NTS actuar como un elemento clave entre el encéfalo y el tronco-encéfalo y en la regulación de los estados de apetito y saciedad mediante la integración de ambas señales, las ascendentes del tracto gastrointestinal y las señales moduladores provenientes del cerebro (100).

3.2 Regulación del metabolismo energético por el hipotálamo

El hipotálamo está constituido por poblaciones neuronales anatómicamente definidas, denominados núcleos hipotalámicos. Estos núcleos están interconectados entre sí a través de proyecciones neuronales. Las poblaciones hipotalámicas son sensibles a hormonas y nutrientes periféricos; en respuesta, modifican la expresión, secreción y actividad de neurotransmisores y neuromoduladores específicos, modulando la ingesta y el metabolismo energético (101). El hipotálamo tiene numerosas conexiones sinápticas recíprocas tanto con el sistema de recompensa como

con los centros de apetito/saciedad del NTS. Estas proyecciones ascendentes y descendentes proporcionan una estructura anatómica que coordina la regulación homeostática y hedonista del metabolismo (100). A continuación, se describen los núcleos hipotalámicos más relevantes en cuanto a la regulación del balance energético.

3.2.1 Núcleo Arcuato (ARC)

Se localiza en la parte inferior del hipotálamo, continuando rostralmente por la eminencia media, un órgano circunventricular (CVO). Esta eminencia media es una estructura constituida por un enriquecido plexo capilar y un endotelio defenestrado, considerándose una barrera-hematoencefálica laxa, característica de los CVO (102). Esta característica permite que el núcleo ARC sea expuesto a señales nutricionales y hormonales que determinan el estado energético del organismo. La población neuronal del ARC es heterogénea, distinguiéndose dos poblaciones principales: neuronas POMC y neuronas AgRP.

❖ **Neuronas POMC/CART:** esta población se define por la co-expresión de los neuropéptidos POMC y CART. La deficiencia genética de las neuronas POMC en roedores y humanos produce hiperfagia y obesidad (103,104), mientras que la excitación de las neuronas POMC disminuye la ingesta (105). Esta acción es debida a la secreción del producto proteolítico del POMC, la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH) mediante su unión a los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3R y MC4R). Los niveles de los transcritos del gen de la *POMC* y la α -MSH se incrementan durante la ingesta y disminuyen en el ayuno (106).

El transcrito relacionado con cocaína-anfetamina (CART), se expresa por todo el cerebro pero es especialmente abundante en el hipotálamo. La administración de CART inhibe la ingesta, mientras que la neutralización del mismo produce hiperfagia (107). También se ha descrito que estimula termogénesis en el tejido adiposo marrón (108). Estas observaciones sugieren la implicación de CART en los efectos anorexigénicos de POMC, sin embargo aún quedan muchos aspectos por elucidar.

❖ **Neuronas AGRP/NPY:** las neuronas AgRP se definen por la co-expresión de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY. La estimulación fármaco-genética u optogenética de este grupo neuronal estimula rápidamente la ingesta en ratones (105,109), mientras que la inhibición de las mismas disminuye la ingesta en ratones ayunados (109). La administración central de AgRP o su sobre-expresión genética estimula ingesta, reduce el gasto energético y causa obesidad debido a que el AgRP es un antagonista de los MC3R y MC4R (110-112).

El neuropéptido Y (NPY), se expresa ampliamente por el CNS, pero su concentración es más elevada en el ARC del hipotálamo, actuando mediante sus receptores (NPYR1-5). La expresión y secreción de NPY en el ARC responde a cambios en el estado energético, siendo reducida durante la ingesta e incrementada en el ayuno (113,114). NPY también está implicado en el metabolismo energético, su

administración central produce hiperfagia y reduce la termogénesis en el tejido adiposo marrón, efecto asociado a la reducción de la actividad del eje tiroideo (115).

En el núcleo ARC, las neuronas de primer orden, POMC y AgRP se localizan muy próximas entre sí y sus neuronas proyectan en paralelo a otras áreas hipotalámicas cuyas neuronas expresen los receptores de melanocortinas (neuronas de segundo orden). Ambas poblaciones son sensibles a multitud de señales periféricas (leptina, insulina, y ghrelina, etc.) y centrales (NPY, GABA, serotonina y α -MSH) mediante la presencia de sus respectivos receptores (Imagen 12). Estas señales son capaces de modular la actividad eléctrica y la secreción de neuropéptidos y neurotransmisores, regulando el apetito y el gasto energético y por tanto el metabolismo. En términos generales, las neuronas POMC (anorexigénicas) y las neuronas AgRP (orexigénicas) tienen funciones fisiológicas opuestas, consecuencia de las acciones de los péptidos α -MSH y AgRP sobre los receptores de melanocortinas; mientras que la α -MSH es agonista de MC3/4R, el AgRP es antagonista (116).

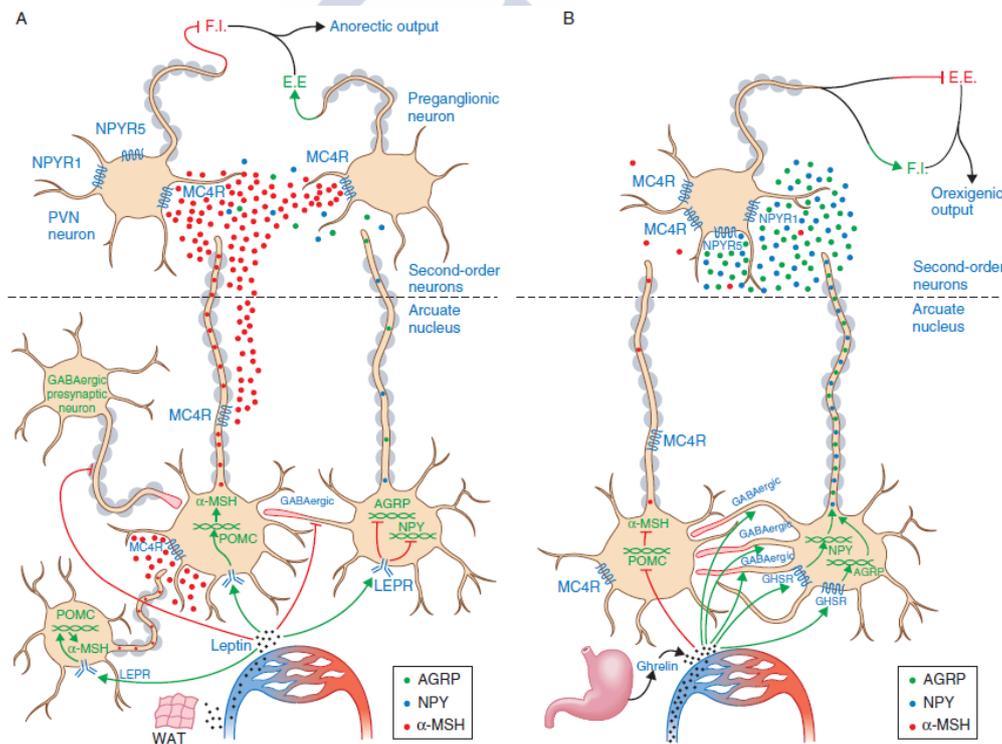


Imagen 12. Representación esquemática de los principales circuitos neuronales modulados por la leptina y la ghrelina. La leptina liberada por el tejido adiposo, estimula la actividad de las neuronas POMC en el ARC, mientras que inhibe las neuronas AgRP (A). La ghrelina ejerce sus efectos a través de las neuronas orexigénicas AgRP. La ghrelina incrementa las proyecciones GABAérgicas hacia las neuronas POMC e induce la expresión y liberación de NPY y AgRP (B) (115).

3.2.2 Núcleo Ventromedial (VMH)

Originariamente el VMH, fue identificado como “el centro de la saciedad” al observar que lesiones en dicho núcleo generaban hiperfagia y obesidad (117). El factor esteroideogénico 1 (SF1) es un factor de transcripción cuya expresión está limitada al núcleo ventromedial. Además de estar involucrado en el eje hipotálamo-pituitario en el desarrollo gonadal, la delección de este factor impide el desarrollo del VMH y genera un modelo obeso (118,119).

Además del carácter anorexigénico, el VMH es un sensor del estado nutricional y el centro de regulación de la termogénesis, en donde la inhibición de AMPK activa el programa termogénico del BAT (120-125). La localización anatómica del VMH le permite funcionar como un elemento integrador de señales periféricas, de otros núcleos hipotalámicos y el tronco-encéfalo, conectado a través de conexiones neuronales específicas (126,127) (Imagen 13).

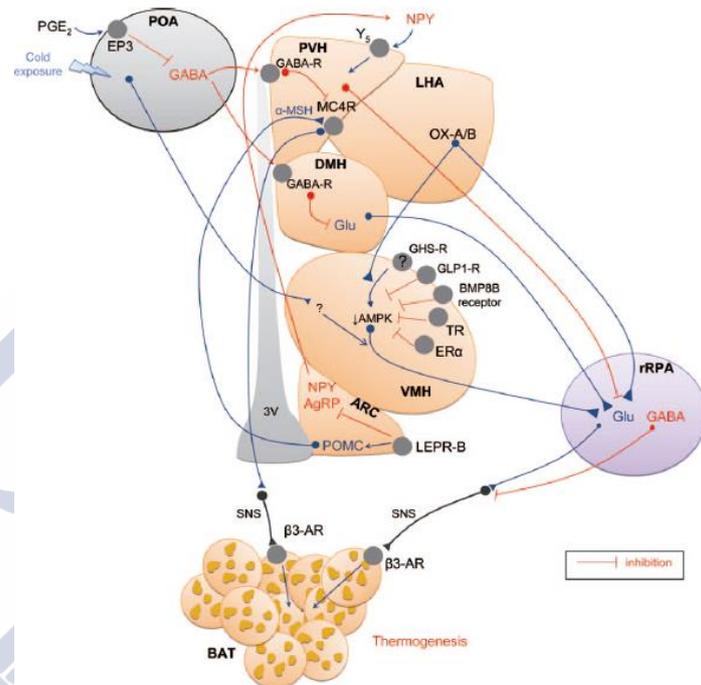


Imagen 13. Acción del VMH sobre la regulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (126).

3.2.3 Núcleo Dorsomedial (DMH)

Está involucrado en múltiples procesos fisiológicos, como el apetito, termorregulación, estrés y ritmos circadianos. Recibe proyecciones del ARC y manda proyecciones hacia los núcleos paraventricular y lateral (128). Las neuronas del DMH expresan NPY, y su expresión es mayor bajo condiciones crónicas de hiperfagia (p.ej. embarazo u obesidad inducida por dieta) (129). Al contrario que en las neuronas AgRP/NPY del ARC, las neuronas NPY del DMH no presentan receptor de leptina, pero sí de la incretina CCK, cuya administración en el DMH reduce la ingesta (129,130).

3.2.4 Núcleo Paraventricular (PVH)

Se localiza en el hipotálamo anterior, justo en la parte superior del tercer ventrículo, y sus neuronas expresan altos niveles de MC3R/4R. Recibe proyecciones de las neuronas AgRP y POMC del ARC (131), y proyecta hacia el NTS del tronco-encéfalo regulando la actividad apetito/saciedad (99). Es un importante núcleo integrador de la homeostasis energética, no solo por las proyecciones que recibe sino por la sensibilidad de las neuronas a importantes neuropéptidos moduladores del metabolismo como NPY, AgRP y α-MSH (131). El núcleo paraventricular controla el eje

hipotálamo-hipófisis-tiroides, mediante la secreción de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La actividad de las neuronas TRH se regula por señales nutricionales; el ayuno prolongado reduce la secreción de TRH y la α -MSH excita dichas neuronas favoreciendo la expresión de pro-TRH (132), mientras que las neuronas AgRP inhiben a las neuronas TRH (133). Estas neuronas proyectan también hacia el hipotálamo lateral inhibiendo con impulsos inhibitorios GABAérgicos a las neuronas orexigénicas secretoras de MCH (134).

3.2.5 Hipotálamo Lateral (LHA)

El hipotálamo lateral es históricamente considerado un centro de ingesta. Sus dos subpoblaciones neuronales secretan neuropéptidos orexigénicos que también intervienen en el sistema mesolímbico de recompensa modulando la parte hedónica de la ingesta. Las principales poblaciones del hipotálamo lateral son las neuronas orexina y las neuronas MCH.

❖ **Neuronas Orexinas.** La orexina, también denominada hipocretina, es un neuropéptido orexigénico presente en dos isoformas (A y B). Las neuronas orexigénicas proyectan a múltiple lugares, del mismo modo que la expresión de sus receptores OX1R y OXR2. La expresión de prepro-Orexina se incrementa en ayuno y la administración de ambas orexina-A y B aumenta la ingesta (135). En el hipotálamo lateral, inervan las neuronas MCH y las excita (136). Las neuronas orexina proyectan al área ventral tegmental (VTA), regulando la actividad neuronal por la activación de los receptores OXR1, promoviendo el apetito por la dieta alta en grasa (137). También es importante destacar el papel de las neuronas orexinas en la modulación de la tasa metabólica, termogénesis y actividad física (138). Las neuronas orexina proyectan desde el LH a las neuronas simpáticas premotoras en el núcleo raphe del tronco encéfalo, estimulando la termogénesis en ratas (139). También se ha descrito que la activación de las neuronas orexinas incrementan la actividad física espontánea (140).

❖ **Neuronas MCH:** son neuronas productoras de la hormona-concentradora de melanina (MCH), y se localizan exclusivamente en el LHA pero realizan proyecciones por diferentes áreas del cerebro (141). Debido a la relevancia de esta hormona en el presente trabajo, trataremos la hormona secretada por dichas neuronas en una sección específica.

3.3 Hormona concentradora de melanina (MCH)

Esta hormona deriva su nombre de la capacidad para agregar gránulos llenos de melanina en la piel de los peces teleósteos, localizando la pigmentación en un área concreta clareando el color del resto del pez (142,143). La alteración del color de la piel de estos peces permite al animal que se confunda con el fondo, haciéndolo menos visibles ante un depredador (144).

Tras el aislamiento inicial del MCH en la hipófisis del salmón (145), se identificó una secuencia de 17 aminoácidos (146) con un puente de cisteína entre las posiciones 5 y 14 formando una estructura anillar, imprescindible para su función biológica (147).

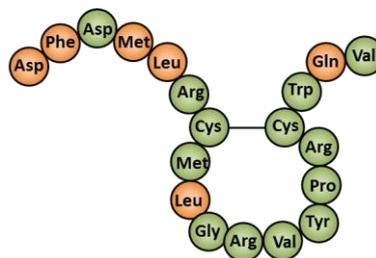


Imagen 14. Secuencia de aminoácidos de la hormona MCH de mamíferos. Los aminoácidos en verde son residuos conservados entre mamíferos y el salmón; los naranjas son diferentes respecto al salmón (153).

Posteriormente, MCH fue identificado en el hipotálamo de rata como un péptido cíclico de 19 aminoácidos con una elevada homología con la del salmón (Imagen 13). Los análisis del mRNA revelaron que el transcrito (tanto en humanos, rata y ratón) produce una preprohormona de 165 aminoácidos. De esta preprohormona se pueden producir dos péptidos además del MCH, neuropéptido E-I (NEI) y neuropéptido G-E (NGE) (148). MCH es traducido como una prohormona; procesamientos proteolíticos en dos residuos de arginina genera el péptido MCH maduro generando una estructura primaria se mantiene conservada en los mamíferos (Imagen 15). De igual modo se conserva la estructura de NEI, pero sin embargo, hay variaciones en la estructura de NGE. El papel de los otros dos péptidos codificados del gen *Promch* se desconocen; la administración de péptidos sintéticos de NEI y NGE sólo o en combinación con MCH, no produce ningún efecto en ingesta (149). Sin embargo, se ha descrito que NEI incrementa la actividad locomotora, induce la secreción de la hormona luteinizante y está involucrado en la secreción de la hormona adenocorticotropa inducida por estrés (150-152). Por otro lado se ha descrito que MCH, NEI y NGE interactúan en modelos células mediante mecanismos paracrinos y autocrinos (153,154).

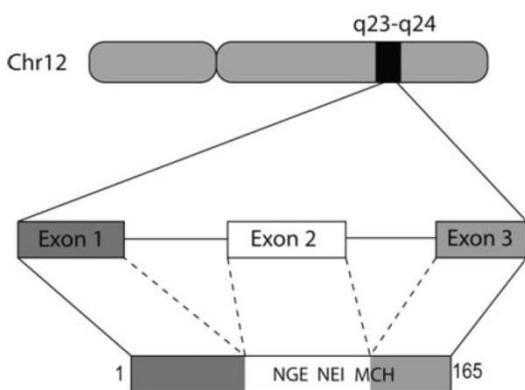


Imagen 15. Esquema representativo de la estructura del gen *Promch*. El gen MCH humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q23-24). EL gen contiene dos intrones y tres exones. Los péptidos NGE, NEI y MCH se codifican de los exones 2 y 3 (153).

3.3.1 Neuronas MCH

En el sistema nervioso central, la expresión de MCH se limita a las células magnocelulares en el hipotálamo lateral y en la denominada *zona incerta* (ZI) (141). Las neuronas MCH en el LHA, juegan un papel integrador entre señales de la periferia, (actuando vía las neuronas de primer orden en el ARC y señales desde áreas extra-hipotalámicas), modulando ingesta, bebida, y comportamientos de búsqueda de alimentos y sistema hedónico. Neuronas del ARC detectan variaciones en los parámetros homeostáticos y transmiten la información a otras áreas incluyendo el núcleo lateral. Las neuronas MCH de segundo orden del LH, realizan múltiples proyecciones a lo largo del cerebro, modulando y coordinando el comportamiento alimentario (155). El registro de la actividad de las neuronas MCH, muestran un bajo nivel de actividad comparado con neuronas orexinas o GABAérgicas (156,157). Por tanto, la actividad de la neuronas MCH depende de su activación por neuromoduladores relacionados con señales de hambre-saciedad provenientes de la periferia o de otras zonas hipotalámicas involucradas en la modulación de la ingesta, principalmente en condiciones de privación energética (4,158). Las neuronas MCH responden a diversos factores y neuromoduladores como glucosa, neurotransmisores como glutamato y GABA; neuropéptidos excitatorios como serotonina, dopamina, noradrenalina y cannabinoides; y péptidos hipotalámicos como NPY, α -MSH (155). Sin embargo, la acción de hormonas como leptina, ghrelina e insulina sobre MCH, es controvertida y se piensa que sus efectos son principalmente indirectos. En el LHA, las neuronas MCH co-existen con otra población similar, las neuronas orexinas; con características similares pero no coincidentes. Sin embargo, una característica común a ambas poblaciones, es su conexión monosináptica con otras áreas del encéfalo. Las neuronas MCH proyectan a múltiples áreas como el córtex prefrontal, eminencia media, núcleo accumbens (Nac), núcleo estriado dorsal y ventral, córtex piriforme y en tronco encéfalo (141,159). Sin embargo, es importante tener en cuenta, que la expresión y proyección de neuronas MCH varía entre rata y ratón (160).

3.3.2 MCH-R y su distribución encefálica

MCH activa a su receptor MCH-R1 (161), una proteína G transmembrana, con una secuencia muy conservada entre ratas, ratones y humanos (162). En líneas celulares recombinantes, se ha descrito que MCH se une a su receptor MCH-R1, con una afinidad de aproximadamente 1 nM (163). Una vez unido el MCH a su receptor MCH-R1 tipo 7 transmembrana GPCR Gi/Gq, se activan múltiples rutas de señalización. La activación del MCH-R1 incrementa la concentración del Ca^{2+} intracelular libre, se inhibe la adenilato ciclasa y se estimula el metabolismo del fosfatidilinositol y la ruta de ERK1/2 (164). Los RNA mensajeros del receptor MCH-R1 presentan en el cerebro una distribución similar a las proyecciones de la neuronas MCH-inmunoreactivas, como 1) córtex piriforme y el bulbo olfativo, 2) Nac y el VTA, y 3) todos los núcleos hipotalámicos; es decir lugares que señalan la implicación del MCH sobre el

Introducción

comportamiento, sistema de recompensa y metabolismo energético (165-167) (Imagen 16). Tras la identificación del MCH-R1 se identificó un segundo receptor para MCH; MCH-R2 detectado en humanos y primates, pero no presente en roedores, con un 38% de homología con el MCH-R1 (168-170). La distribución del MCH-R2 en el cerebro de los primates casi se superpone a la del MCH-R1, mostrando este último una expresión más elevada y una distribución más amplia (171). EL MCH-R2 se expresa en diversas zonas del cerebro incluyendo la amígdala y el hipocampo.(170,172).

La distribución anatómica de neuronas que expresan en MCH-R1 se ha realizado mediante la detección de su mRNA mediante técnicas de hibridación *in situ*, debido a la dificultad por encontrar un anticuerpo adecuado para los análisis anatómicos. Esto limita el estudio sobre las características de las neuronas que contengan el MCH-R1, como la co-expresión con neurotransmisores o la caracterización del tipo neuronal en el que se expresa. En un reciente estudio, Chee et al. (173), generaron un modelo en el que las neuronas que expresan el MCH-R1 se identifican por la co-expresión de una proteína fluorescente dependiente de la expresión de cre-recombinasa (*ratón Mchr1-cre/tdTomato*). Las neuronas MCH-R1 en el hipotálamo constituyen una población muy heterogénea y co-expresan múltiples neuropéptidos implicados en la homeostasis energética. En el hipotálamo paraventricular, las neuronas MCH-R1 se expresan en las poblaciones que expresan dinorfina, enkefalina, factor liberador de corticotropina y factor liberador de tirotrópina. En el núcleo arcuato, el MCH-R1 co-expresa con el 35% de las neuronas NPY sensibles a leptina y más del 70% de neuronas POMC sensibles a leptina (165,166).

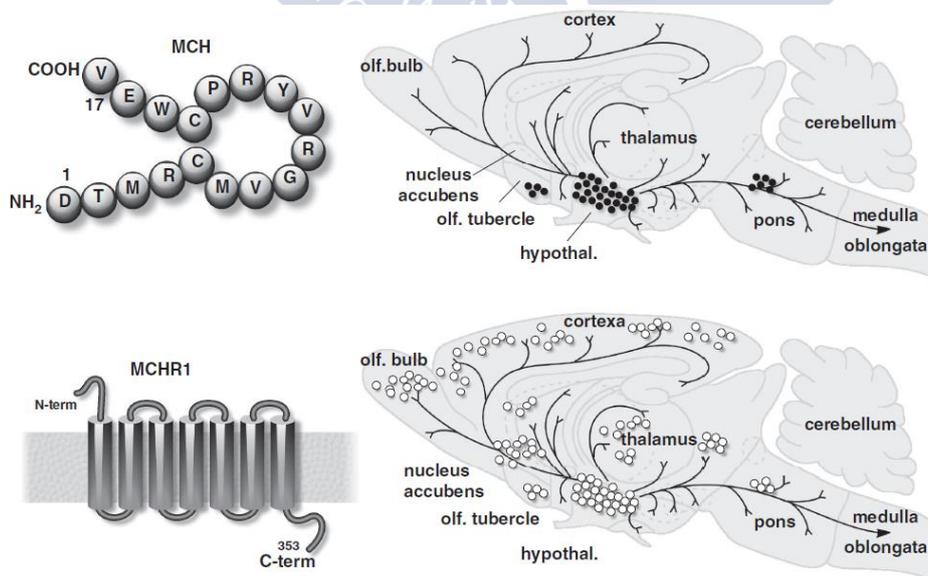


Imagen 16. Estructura (derecha) y distribución (izquierda) de MCH y MCH-R1 en el cerebro de rata. Los puntos negros indican localización de los cuerpos neuronales productores de MCH, y las líneas las proyecciones de dichas neuronas. Los puntos blancos indican las zonas del cerebro donde se detectó expresión del ARNm de MCH-R1 (166).

3.3.3 MCH, comportamiento y sistema de recompensa

Como se ha mencionado anteriormente, las neuronas MCH proyectan a diferentes áreas del comportamiento. Ratones deficientes en MCH presentan anomalías en el comportamiento olfativo, los machos presentan más agresividad y las hembras tienen deficiencias en la sincronización del ciclo hormonal e instinto maternal (174). Por otro lado, MCH está también involucrado en el sueño, siendo la secreción de MCH mucho más elevada en las fases profundas de sueño, y apenas detectadas en vigilia, involucrando su acción en desórdenes de sueño (175). Tras su administración en la amígdala e hipocampo, se ha observado que MCH también está involucrado en la memoria cognitiva en ratas (176). Mediante el uso de un modelo de ratones con depresión inducida por estrés, se ha observado que existe un incremento de la expresión de MCH-R en el hipocampo. Este hecho es coincidente con el fenotipo ansiolítico generado por el déficit de MCH-R, sin embargo el efecto anti-depresivo de esta ablación sólo era detectada en hembras. Este estudio muestra la potencial acción de antagonistas de MCH para el tratamiento de desórdenes del comportamiento y depresión (177,178).

Además de los núcleos hipotalámicos, el Nac es importante en la regulación de la ingesta. El Nac contiene elevadas concentraciones de MCH-R1 (173) y las neuronas MCH que proyectan hacia el VTA están involucradas en la regulación hedónica del apetito (179). La ausencia del gen *Promch* disminuye la apetencia por la dieta alta en grasa y el azúcar (149,180). Registros in vivo demuestran que MCH reduce la actividad neuronal del Nac en animales en movimiento (181); en concordancia con otros estudios farmacológicos y electrofisiológicos, la reducción de la excitación neuronal del Nac incrementa la ingesta (182,183). A su vez, el Nac proyecta recíprocamente hacia el LHA modulando su actividad neural (184). Los circuitos generados por las conexiones de neuronas Orexina-VTA y la conexión de las neuronas MCH-Nac generan importantes estructuras anatómicas que conectan las acciones homeostáticas del hipotálamo con los circuitos límbicos de recompensa.

3.3.4 MCH y el metabolismo energético

En el hipotálamo, los MCH-R1 se expresan en el ARC, VMH, PVH y en el LH, mostrando la relevancia de la MCH sobre la regulación de la ingesta y el metabolismo energético (165). Los niveles centrales del RNA mensajero de MCH son elevados en modelos deficientes de leptina (*ob/ob*) en comparación con los controles delgados durante el ayuno (185). Esta idea preliminar del MCH como péptido orexigénico se confirmó cuando se observó un rápido incremento de la ingesta en ratas tras la administración intracerebro-ventricular (ICV) de MCH (185,186). Desde el LH, las neuronas MCH proyectan al núcleo vago dorsal (DMV) en el NTS del tronco encefálico (187), y para determinar los efectos de MCH sobre el NTS se administró MCH en el cuarto ventrículo (187). No se observaron efectos en la ingesta, pero sí una disminución en la temperatura corporal y una tendencia a la disminución de la

actividad física, sugiriendo que el MCH actúa también sobre el tronco-encéfalo en línea con su acción hipotalámica de conservación de la energía. Por otro lado, la administración de ICV de MCH incrementa la ingesta de agua independientemente de la ingesta de pienso (188). Por otro lado, la administración ICV de MCH, aumenta la ingesta de alcohol y sacarosa, pero estos efectos deben estar asociados a la relación de MCH con el sistema de recompensa (189). Se han generado múltiples modelos de animales modificados genéticamente para explorar las funciones de MCH en el metabolismo energético y demás funciones sobre el comportamiento. Los modelos murinos deficientes en algún gen (KO) incluyen múltiples constructos que previenen la síntesis de MCH o del MCH-R, modelos transgénicos incluyen la sobre-expresión del gen *Promch*. Los estudios resultantes de estos modelos muestran que la pérdida de la funcionalidad de MCH produce fenotipos delgados y resistentes a la obesidad (190) (Tabla 1).

3.3.5 Modelos genéticos de MCH

→ Ratones KO para MCH

La eliminación del gen *Promch* en ratones con una cepa mixta de C57BL/6 X 129SvJ, genera un ratón hipofágico y con un aumento del gasto energético (191). Pesan entre un 25-30% menos que los controles, junto con una reducción de los niveles de leptina y del contenido en grasa corporal. Esta disminución de la leptina se traduce en una disminución central de POMC, pero no en un aumento de AgRP o NPY. Cuando ratones deficientes en MCH, tanto de la cepa C57BL/6 X 129SvJ y la C57BL/6 X 129/SvEv (menos susceptible al engorde por dieta alta en grasa) se exponen a dieta alta en grasa, presentan una resistencia a la obesidad, gracias a su elevado gasto energético (191,192). La alimentación de ratones *Promch*^{-/-} C57BL/6 con HFD durante 15 semanas, pone de manifiesto no sólo una resistencia a la acumulación lipídica, sino una mejora en la inflamación y adiposidad hepática así como una mejora en la sensibilidad a la insulina (193). La evaluación de la ausencia del gen *Promch* en cepas puras confirma su incremento en el gasto energético, y favorece una mayor carrera sobre rueda de roedor (192,194).

Una de las características del envejecimiento es la acumulación lipídica en el tejido adiposo visceral que contribuye a un aumento en la resistencia a la insulina asociada al envejecimiento (195). Los ratones KO para el gen *Promch*, persisten con su fenotipo delgado a los 19 meses de edad, siendo los machos un 30% y las hembras un 25% más delgados que sus controles, efecto debido a una disminución de la masa grasa (196). Estos ratones, mejoran el test a la tolerancia a la glucosa oral (OGTT) por una mayor sensibilidad a la insulina, cuyos niveles plasmáticos son menores que los controles de fenotipo salvaje. Además la disminución en la actividad locomotora asociada al envejecimiento se revierte en estos ratones.

Para evitar los efectos compensatorios en el desarrollo neuronal en los ratones *Promch*^{-/-} que puedan interferir en el fenotipo desarrollado en adultos, se generó otro ratón que presentara en su desarrollo embrionario neuronas MCH activas. Usando la

cepa de ratón FVB/n, se generó modelo genético inducible mediante el uso de la toxina ataxin-3, eliminándose las neuronas MCH en ratones con 4 semanas de edad. Estos ratones muestran un fenotipo prácticamente similar a los ratones *Promch*^{-/-} (delgados, hipofágicos y con un incremento del gasto energético), pero con actividad locomotora normal (197). Debido a los altos niveles de MCH detectados en ratones *ob/ob*, se generó un ratón con doble deleción de leptina y MCH, en espera de resolver el fenotipo obeso de los *ob/ob* (198). En términos de ingesta no se observan diferencias entre los *ob/ob* y los *Promch*^{-/-} *ob/ob*. pero estos últimos son más delgados debido a un aumento de hasta 3 veces en la actividad locomotora y un 25% más de gasto energético. Al cruzar tanto el modelo inducible *Promch*^{-/-} ataxin-3, como los *Promch*^{-/-} con los *ob/ob*, se observó una mejora de la diabetes, la esteatosis y la obesidad inducido por la ausencia de leptina (197,198). Los efectos de la MCH sobre el metabolismo no sólo se limitan a la modulación de la ingesta y el gasto energético, influye también en la modulación del metabolismo periférico, ratones deficientes en el gen *Promch* expuestos a una dieta alta en grasa, están protegidos ante la hepatoesteatosis (acumulación lipídica en el hígado) inducida por dieta (193).

→ **Ratones transgénicos para MCH**

El fenotipo producido por ratones transgénicos que sobre-expresan MCH, también confirma el papel endógeno de MCH en la homeostasis energética. Utilizando la cepa FVB, se generó un ratón que sobre-expresaba el gen *Promch* en el hipotálamo lateral dos veces más que un ratón normal (199). Este ratón transgénico come un 10% más de la dieta alta en grasa y es un 12% más pesado que los WT. Los niveles de glucosa eran más elevados respecto a los controles tanto en estado post prandial, como durante el test de tolerancia a la glucosa (GTT), siendo resistentes a la insulina. Los *Promch* transgénicos heterocigotos de la cepa C57BL/6, son hiperfágicos con dieta normal, más pesados y resistentes a insulina; sin embargo, no presentan variación en los niveles de glucosa (199).

→ **Ratones KO para el MCH-R**

Estudios con ratones KO *Mchr1*, aclara y confirma el papel de MCH en el metabolismo energético. Usando una cepa mixta de C57BL/6 X 129SvJ, la ausencia del gen *Mchr1* en ratones también produce un fenotipo delgado presentado resistencia a la administración exógena de MCH (200). Sin embargo son hiperfágicos comparados con el control. Cuando se exponen a dieta alta en grasa, ganan menos peso que los controles a pesar de la hiperfagia; este hecho se puede explicar por el elevado tono simpático (aumento de la lipólisis) y su hiperactividad (200). Casi simultáneamente, otro grupo generó el mismo ratón, observando los mismos resultados frente a la dieta alta en grasa (resistentes a la ganancia de peso inducida por la dieta) (201). Detectaron que los niveles de insulina y leptina eran menores que en los controles, pero no observaron diferencias en los niveles de glucosa. El modelo heterocigoto no presentaba diferencias de ningún tipo respecto del control (201). Estudios posteriores

Introducción

mostraron que los ratones *Mchr1*^{-/-} presentan un 250% más actividad locomotora en la rueda acompañado de hiperfagia (202); mayor tasa metabólica, hiperactividad y mayor actividad cardíaca sin cambios en la presión arterial (203). El modelo de *Mchr1*^{-/-} con un fondo genético de C57BL/6 muestra menores niveles de insulina y mayor temperatura corporal (204,205). Ratones deficientes de leptina *ob/ob*, la ausencia de *Mchr1*, reduce la adiposidad (aunque no el peso corporal), mejora la respuesta al OGTT, incrementa la actividad locomotora espontánea y mejora la termorregulación tras la exposición a frío, mostrando de nuevo que MCH es un importante mediador de la respuesta al déficit de leptina (205).

Recientemente, para estudiar los efectos del MCH-R2 característico de humanos, se ha generado un modelo de ratón específico para su estudio en el que se co-expresaban ambos receptores, determinado que la expresión del MCH-R2 tiene un efecto protector frente a la obesidad inducida por dieta alta en grasa, abriendo nuevas posibilidades a nuevos agonistas sobre el MCH-R2 para el tratamiento de la obesidad (206). Se ha descrito que el MCH-R1 se expresa también en tejido periféricos como el tejido adiposo, próstata e intestino (168). En relación a este punto, en ratones KO para el gen de *Promch* a los que se le indujo químicamente colitis, presentan menores niveles de inflamación que el fenotipo salvaje, sugiriendo el papel de MCH en la respuesta inmune intestinal (207). De hecho, estos ratones deficientes de MCH son más susceptibles a la morbilidad cuando se infectan con *Salmonella*, presentando una inflamación más severa y más mortalidad (208). Por otro lado MCH y su receptor están presentes en la piel de humanos (209); además, en el cultivo primario de melanocitos humanos, MCH parece bloquear las acciones melanogénicas de α -MSH (209). De esta propiedad de MCH ha surgido la idea del uso de anticuerpos anti MCH-R1 para el tratamiento del vitíligo, enfermedad de la piel caracterizada por la pérdida de pigmentación (210).

Tabla 1 | Modelos genéticos de ratón que muestran la relevancia de MCH en la homeostasis energética.

Genotipo	Fenotipo	Referencia
<i>Promch</i> ^{-/-} C57BL/6 x 129SvJ	Hipofagia, adiposidad reducida, incremento de la tasa metabólica y bajo peso	Shimada et al., 1998 (191)
<i>Promch</i> ^{-/-} C57BL/6	Normofagia, adiposidad reducida, incremento de actividad y tasa metabólica, y bajo peso	Zhou et al., 2005 Kokkotou et al., 2005 (194-192)
<i>Promch</i> ^{-/-} C57BL/6	Ancianos, adiposidad reducida, glucosa reducida, sensibilidad a la insulina	Jeon et al., 2006 (196)
<i>Promch</i> ^{-/-} C57BL/6	Alimentados con HFD, resistentes a hepatoesteatosis inducida por dieta, mejora sensibilidad a glucosa	Wang et al., 2010 (193)
<i>Promch</i> ^{-/-} C57BL/6 x 129SvEv	Hiperfagia, adiposidad reducida, incremento de la tasa metabólica y bajo peso	Kokkotou et al., 2005 (194)
<i>Promch</i> ; <i>ataxin-3</i> FVB/n	Hipofagia, adiposidad reducida, incremento tasa metabólica y bajo peso	Alon y Friedman ., 2006 (197)
<i>Promch</i> ; <i>ataxin-3</i> ; <i>ob/ob</i> (FVB/n x C57BL/6)	Hiperfagia, adiposidad reducida, glucosa reducida, esteatosis reducida y bajo peso	Alon y Friedman ., 2006 (197)
<i>Promch</i> ^{-/-} ; <i>ob/ob</i> C57BL/6	Adiposidad reducida, glucosa reducida, incremento de actividad y tasa metabólica, y bajo peso	Segal-Lieberman et al., 2003 (198)
<i>Promch</i> tg/tg FVB	Sobrepeso, hiperfagia en HFD, incremento de glucosa y resistencia a insulina	Ludwig et al., 2001 (199)
<i>Promch</i> tg/+ C57BL/6	Sobrepeso, hiperfágico con estándar, normo-glucosa y resistente a insulina	Ludwig et al., 2001 (199)
<i>Mchr1</i> ^{-/-} C57BL/6 x 129SvJ	Adiposidad reducida, hiperfagia, hiperactividad, bajo peso, incremento de actividad y tasa metabólica, y resistencia a insulina	Marsh et al., 2002 Chen et al., 2002 Astrand et al., 2004 Zhou et al., 2005 (200, 203, 318)
<i>Mchr1</i> ^{+/+} C57BL/6 x 129SvJ	Sin diferencias frente al control	Chen et al., 2002 (104)
<i>Mchr1</i> ^{-/-} C57BL/6	Hipoinulinemia, mejora al OGTT y elevada temperatura corporal	Bjursell et al., 2006 Ahnaou et al., 2011 (205, 204)
<i>Mchr1</i> ^{-/-} ; <i>ob/ob</i> C57BL/6	Adiposidad reducida, hipoinulinemia, mejora al OGTT e incremento de actividad	Bjursell et al., 2006 (205)

Origen: Adaptado de MacNeil et al., 2013

3.3.6 Estudios farmacológicos de MCH

La hormona concentradora de melanina, y en ocasiones derivados de MCH, se han utilizado para evaluar la acción de MCH en la homeostasis energética. La administración aguda en el ventrículo lateral (ICV) de MCH (5-30 µg) en ratas Long Evans incrementa ingesta (185), efecto que también se produce en ratas Sprague-Dawley (185,211), con un efecto máximo a las 2 horas de su administración (211).

Introducción

Utilizando una solución enriquecida con sacarosa, la administración ICV de MCH incrementa su bebida (212); también ocurre utilizando bebida con glucosa pero no con sacarina, indicando que la acción dipsogénica de MCH está más relacionada con el contenido calórico que con el sabor (213). En una comparación en paralelo, MCH es el péptido con menor intensidad orexigénica respecto a AgRP y NPY (214). Respecto a la acción núcleo específica de MCH, su administración en el núcleo paraventricular del hipotálamo y en el Nac incrementa ingesta en las 4 horas posteriores a su administración; sin embargo, la administración directa sobre el ARC incrementa ingesta tras una hora después de su infusión(215,216).

La administración crónica de MCH en roedores no sólo incrementa ingesta, sino que favorece la obesidad (211,217,218). La administración crónica de MCH durante 12 días incrementa peso en ratas (211). El uso crónico de análogos de MCH, también incrementa el peso e ingesta tras su administración crónica ICV en comparación con los controles (219). En ratones, la administración crónica durante 14 días no se incrementa ingesta en dieta estándar, pero sí lo hace con una dieta moderadamente alta en grasa; no obstante, con ambas dietas, la acción crónica ICV de MCH incrementa el peso de los ratones sin variación en la actividad locomotora (217,218). Este efecto produce en los ratones un incremento en los depósitos grasos, leptina, TG hepáticos, glucosa plasmática e insulina (217). Este efecto sobre el metabolismo de la glucosa, también se ha observado en ratones tras la administración ICV de MCH durante 4 días (220). Aunque la ingesta no terminó de producir un incremento significativo, la administración ICV de MCH produjo resistencia a la insulina y un incremento de la glucosa plasmática en ayuno.

3.3.7 Estudios farmacológicos sobre el MCH-R1

El estudio de análogos de MCH, dejó al descubierto los aminoácidos clave para la activación del MCH-R1, por lo que se comenzaron a producir péptidos antagonistas para el receptor, como el Ac-(Ava9-10, Ava14-15)-MCH (6-16)-NH₂ (221-223). Su administración ICV aguda bloquea las 2 horas iniciales de hiperfagia inducida por MCH (219,224), mientras que su administración crónica durante 14 días reduce ingesta y peso (219). En ratones C57BL/6 alimentados con dieta moderadamente alta en grasa, la administración ICV del péptido durante 28 días reduce peso, ingesta, glucosa en plasma, colesterol, y los depósitos grasos y el peso del hígado (224). Este péptido no ejercía su acción en ratones *Mchr1*^{-/-}, corroborando su especificidad. Ratones obesos alimentados durante un año con dieta alta en grasa (peso corporal de aproximadamente 60 g), se trataron ICV durante 4 semanas con el péptido antagonista del MCH-R1(225). Los ratones perdieron peso y se redujeron los niveles de leptina e insulina. EL hígado de estos ratones perdieron un 50% de peso y disminuyeron los marcadores hepáticos en suero. Continuado con el estudio sobre la esteatosis hepática y MCH, se trataron ICV ratones alimentados con dieta deficiente en colina y metionina que produce esteatohepatitis (226). El tratamiento redujo drásticamente la acumulación de triglicéridos en el hígado. La habilidad del antagonista del MCH-R1 de

mejorar la esteatosis hepática, se comprobó en un modelo de hembras ovariectomizadas alimentadas con dieta estándar. Treinta semanas después de la ovariectomía, presentan un incremento de peso respecto a los controles. Tras el tratamiento de las mismas con el antagonista de MCH-R1 durante 4 semanas, se observó senda disminución de peso y TG hepáticos (227).

Estos modelos genéticos y farmacológicos, evidencian la relevancia de MCH como señal moduladora de los estados fisiológicos con balance energético negativo. Existen evidencias que muestran que las neuronas MCH responden a señales metabólicas periféricas en el hipotálamo. Diferentes estados fisiológicos tales como la restricción de alimentos, el ayuno y el déficit génico de leptina, provocan aumentos significativos del mRNA de MCH (185,228); la administración ICV de leptina reduce los niveles mRNA de MCH (229). Además de la leptina, la glucosa es un nutriente que activa o inhibe la actividad neuronal en los núcleos hipotalámicos (230). La modulación de las concentraciones plasmáticas de la glucosa, se realiza mediante la secreción de insulina por el páncreas, pero el cerebro también está involucrado en dicha modulación (231-233). Las neuronas MCH, responden a las concentraciones fisiológicas de glucosa mediante una despolarización de la membrana, que produce su activación en un mecanismo dependiente de canales de K^+ dependientes de ATP y UCP2 (234,235). La excitación de las neuronas MCH inducido por glucosa, tiene un efecto en la modulación del metabolismo periférico sobre el mantenimiento del estado euglicémico; sugiriendo que las neuronas MCH controlan el metabolismo de la glucosa favoreciendo su síntesis por el hígado y/o incrementando la incorporación de glucosa al músculo o la grasa (235). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos bajo los cuales se modula la expresión de MCH en el LH con detalle, están aún por elucidar.

3.3.8 MCH y el eje hipotálamo-hipofisario

Además de los amplios estudios sobre la relación de MCH en la homeostasis energética, también se ha descrito una relación entre MCH y la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, y por tanto con el eje hipotálamo-hipofisario. La administración de MCH en la eminencia media y el área preóptica (zonas donde se localizan las neuronas GnRH) en modelos ovariectomizados, adrenalectomizados y privados de testosterona, produce la liberación de la hormona luteinizante (LH), no siendo así cuando MCH se administra en otras áreas hipotalámicas como el VMH. Este estudio fue el primero que relacionó MCH con el eje hipotálamo-hipofisario (236). Posteriormente, estudios neuroanatómicos mostraron que en aproximadamente el 50-55% de las neuronas GnRH presentan el MCH-R1, y que las neuronas MCH realizan sinapsis con el 85% de las neuronas GnRH (237). Esta liberación de GnRH aparentemente inducida por MCH, coincide con la disminución significativa de los niveles del mRNA de MCH durante la preñez y lactancia; el incremento de prolactina disminuye los niveles de MCH, puesto que puede estar modulando tanto la secreción de GnRH y de la hormona corticotropa (ACTH) durante

el embarazo (238). También se ha descrito que MCH reduce la liberación de la hormona estimulante del tiroides por el PVN, lo que es coincidente con su acción sobre la reducción del gasto energético inducido por MCH (239). Sin embargo, MCH estimula el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, favoreciendo la liberación de la ACTH (240).

3.4 Sistema opioide en el metabolismo energético

Dentro del gran número de acciones biológicas del sistema del sistema opioide como mediador en el proceso de recompensa y de procesos adictivos, se ha descrito que los opioides también están involucrados en los procesos hedónicos y homeostáticos que regulan el comportamiento alimenticio (241). Los efectos del sistema opioide sobre el balance energético se vienen demostrando desde hace tres décadas. Agonistas y antagonistas de los tres principales receptores opioides (μ , κ y δ) aumentan y disminuyen respectivamente el consumo de alimentos, cuando se administran en diversas zonas del cerebro (242). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los opioides modulan la ingesta no están bien establecidos, pero se ha demostrado una relación entre el sistema opioide y el sistema de melanocortinas. Las neuronas POMC, además de producir el α -MSH, secretan β -endorfinas, expresan el receptor μ (MOR) en terminales post-sinápticos, produciendo una retroinhibición en las neuronas POMC y disminuyendo la ingesta (243). Por otro lado, la supresión simultánea de MOR y el receptor κ opioide (KOR) suprimen la acción orexigénica de las neuronas AgRP, no siendo así en la delección de los receptores individualmente (244). Además, un estudio más reciente demostró que la acción orexigénica de la ghrelina es dependiente de KOR en el ARC y no en el VTA (245). En el hipotálamo lateral, la administración de orexina incrementa la concentración de la encefalina, agonista natural del receptor opioide δ (DOR), en el VTA, PVH y en el núcleo central de la amígdala (246); de hecho, el tratamiento con naloxtrona (antagonista general de todos los receptores opioides) bloquea la acción orexigénica de la orexina. Por otro lado, la estimulación de la preferencia por comida calórica inducida por MOR mediante su agonista DAMGO en el Nac, requiere que el sistema de señalización de orexina se mantenga intacto en el VTA, evidenciado la interacción entre el sistema hedónico y homeostático (Imagen 17) (137).

Los efectos hedónicos de la alimentación, implican la activación del sistema dopaminérgico del área mesolímbica, mediado por las proyecciones dopaminérgicas de VTA al Nac, siendo probablemente, el circuito de recompensa de alimentos más importante. Los opioides regulan la vía dopaminérgica del área mesolímbica, tanto en el VTA como en el Nac (247), modulando la palatabilidad del sabor tanto de bebidas como de alimentos (248,249).

Estudios recientes sugieren que los receptores opioides también pueden regular el metabolismo energético en los tejidos periféricos; ratones deficientes en cada uno de los receptores demostraron su resistencia a la dieta alta en grasa (250-252). Por ejemplo, los ratones que carecen de MOR presentan en el músculo esquelético un

aumento de expresión de enzimas mitocondriales involucradas en la oxidación de los ácidos grasos (252). Los que carecen del DOR presentan una activación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (251). La expresión de dinorfina (ligando natural de KOR) aumenta en el PVH y en el LH de ratas que ingirieron dieta alta en grasa durante una semana (253). Otros estudios ligaron a KOR con los neuropéptidos hipotalámicos clásicos; como ya se ha mencionado, uno de ellos demostró que KOR modula el efecto orexigénico de la ghrelina en el núcleo ARC, en una ruta independiente de AMPK (245). En otro estudio se demostró que KOR está involucrado en el efecto orexigénico y hedónico del MCH (254), apoyando la evidencia anatómica de la interacción de MCH y el sistema opioide en el LH (255). Estos estudios podrían explicar el fenotipo observado en ratones KO para KOR alimentados con dieta alta en grasa; muestran una reducción en los niveles de triglicéridos hepáticos y un aumento de la oxidación de los lípidos en el tejido adiposo y en el hígado (250). KOR y el precursor de su ligando endógeno, pro-dinorfina, se expresan ampliamente en todo el sistema nervioso central incluyendo la corteza cerebral ventral, el tálamo, el mesencéfalo y el hipotálamo.

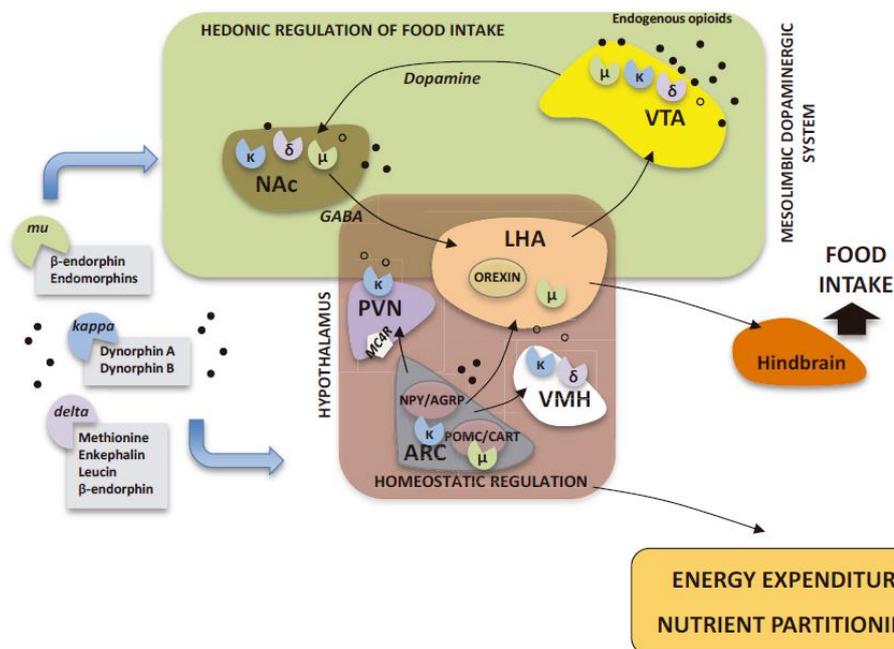


Imagen 17. Efectos del sistema opioide en el balance energético. Los receptores opioides se localizan en el hipotálamo modulando señales homeostáticas, y en zonas extrahipotalámicas como el sistema mesolímbico dopaminérgico donde regula el sistema hedónico (240).

3.5 Sistema nervioso autónomo: conexión entre el CNS y el metabolismo periférico

Tras recibir la información sobre el estado nutricional mediante nervios aferentes y señales periféricas (nutrientes y hormonas), el hipotálamo manda la respuesta integrada a los órganos periféricos para la modulación de la homeostasis energética. Hay dos formas por las que el hipotálamo se conecta con la periferia: mediante la estimulación del sistema nervioso autónomo y la liberación de hormonas desde la hipófisis. El sistema nervioso autónomo incluye el sistema nervioso simpático (SNS), que promueve de la movilización de combustibles almacenados, y el sistema nervioso parasimpático (PSNS), involucrado en procesos principalmente anabólicos opuestos a los del SNS. El sistema nervioso autónomo desempeña un papel clave en la respuesta a las señales centrales, inervando tejidos metabólicos periféricos incluyendo el tejido adiposo blanco y marrón, hígado, páncreas y músculo esquelético (256). El SNS actúa mediante la transmisión de la noradrenalina (o norepinefrina) que actuará en tejidos que presenten los receptores estimuladores β -adrenérgicos tipo 1, 2 y 3 o sobre los receptores inhibitorios α -adrenérgicos. El principal neurotransmisor postganglionar del PSNS es la acetil-colina, produciendo, p.ej. la liberación de insulina a través de los receptores muscarínicos M3 (257).

3.5.1 Inervación autónoma del tejido adiposo blanco

Históricamente, el control de la lipólisis del tejido adiposo blanco, se ha focalizado sobre factores circulantes, principalmente en las catecolaminas secretadas por la glándula adrenal y la inhibición de la lipólisis a la insulina pancreática. Sin embargo, usando elegantes modelos de virus trazadores (258), se ha determinado que existe una comunicación nerviosa bidireccional entre el tejido adiposo y el CNS. La comunicación entre el CNS y el tejido adiposo blanco es mediada por el SNS (259). El origen de la señal que transmite la información al tejido adiposo, proviene de múltiples zonas centrales, como desde el PVH, ARC en el hipotálamo y desde el NTS y las regiones raphe del tronco encéfalo (260). Está demostrado que el sistema de las melanocortinas es activado por la acción central de leptina sobre las neuronas POMC, incrementando el gasto energético independientemente de su efecto anorexigénico y disminuyendo la masa grasa (261). Las neuronas del SNS que inervan el tejido adiposo, presentan mRNA del MC4R (260), mostrando que la activación del SNS por leptina media la lipólisis del tejido graso. Además la denervación del SNS en el tejido adiposo, impide la inhibición de la lipogénesis inducida por la administración central de leptina (262). El tejido adiposo blanco expresa los tres tipos de receptores β -adrenérgicos tipo 1, 2 y 3 y el receptor inhibitorio α 2-adrenérgico. La activación de los receptores β -adrenérgicos en el tejido adiposo estimula la lipólisis, iniciando el proceso de hidrólisis de los triglicéridos almacenados en un proceso catalizado por la forma fosforilada de la hormona sensible a lipasa (HSL) para generar monoacilglicéridos que serán liberados al torrente sanguíneo para ser consumido por los tejidos periféricos (263,264). Mediante

el uso de ratones deficientes para los tres receptores β -adrenérgicos, se ha demostrado que éstos receptores son imprescindibles para mediar el metabolismo adipocitario inducido por el sistema central de melanocortinas; así mismo, estudios de electrofisiología mostraron que la estimulación de las neuronas POMC aumenta el tono simpático del tejido adiposo blanco y por tanto la movilización de grasas, mientras que el bloqueo del sistema de melanocortinas produce el efecto contrario (33).

3.5.2 Inervación autónoma del tejido adiposo pardo

Como se ha mencionado anteriormente, el tejido adiposo marrón es el encargado de modular la temperatura corporal y el gasto energético, regulado principalmente desde el VMH ante señales periféricas. La decisión integrada por el CNS a las señales periféricas se transmite al tejido adiposo marrón mediante el SNS (124). Gracias al uso de virus de transmisión trans-neural, se ha descrito que el tejido adiposo marrón está conectado al diferentes núcleos hipotalámicos (PVH, VMH y LHA) (259,265). El VMH, fue el primer núcleo hipotalámico en ser identificado como regulador en la termogénesis del tejido adiposo marrón. La estimulación eléctrica del VMH, aumenta la temperatura interescapular del tejido adiposo marrón y dicho efecto es abolido tras el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos (266-268). A su vez, el VMH está conectado con el encéfalo para la transmisión del impulso simpático al tejido adiposo marrón, concretamente con el núcleo raphe y la oliva inferior (269,270). Recientemente se ha descrito los mecanismos moleculares por los que el VMH regula el tejido adiposo marrón por medio del SNS. En el VMH, la modulación de AMPK regula de la termogénesis; su activación conlleva a una inhibición de la actividad simpática y viceversa por señales periféricas como hormonas tiroideas, estradiol, leptina y proteína morfogénica ósea, y drogas como la nicotina y el liraglutide (66,122,123,125,271,272).

3.5.3 Inervación autónoma del hígado

El hígado es un órgano clave en el control del metabolismo de lípidos y glucosa durante la alimentación y el ayuno. Además de hormonas y nutrientes, las aportaciones del sistema nervioso autónomo también participan en afinar la regulación del metabolismo hepático. La inervación eferente hepática está constituida por nervios simpáticos y parasimpáticos. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, el uso de virus trazadores ha permitido determinar la anatomía de esta inervación; los nervios simpáticos del hígado se originan en los ganglios mesentéricos y celiacos, que provienen de la zona intermediolateral de la médula; mientras que los nervios parasimpáticos proviene del núcleo motor dorsal del nervio vago (DMV) localizado en el tronco encéfalo (59). Tras la inyección de virus tipo pseudo-rabia en hígado, permiten una infección neuronal multi-sináptica, se han detectado múltiples áreas hipotalámicas como el origen de la inervación autónoma del

Introducción

hígado, como el VMH, el LHA, el PVH y el área retro-quiasmática (273,274). Así pues el hipotálamo modula el metabolismo de la glucosa y el metabolismo lipídico hepático por medio de la inervación autónoma (Imagen 18).

❖ Modulación autónoma del metabolismo hepático de la glucosa.

Desde el VMH, descienden proyecciones simpáticas por la médula espinal hasta el ganglio celiaco, y de ahí neuronas post-sinápticas inervan el hígado con la vasculatura aferente (274). La estimulación de esta ruta, genera hiperglucemia, por la activación de enzimas clave en la glucógenolisis y en la gluconeogénesis, como en la glucógeno fosforilasa y la fosfoenol piruvato carboxikinasa (PEPCK) respectivamente; por otro lado se suprime la glucólisis por la inhibición de la piruvato kinasa (PK) (275). Las conexiones eferentes del LH están dirigidas a los grupos celulares parasimpáticos del DMV. Desde el DMV nervios post-sinápticos proyectan hacia el hígado, en lo que se denomina la rama hepática del

nervio vago (274). La estimulación del LH activa rutas de almacenamiento energético en el hígado como la glucógenogénesis, activando la glucógeno sintasa; también se disminuye la gluconeogénesis por la inhibición de la PEPCK y la PK y potencia la sensibilidad a la insulina. Las rutas descendientes desde el PVH hacia el hígado se han descrito vía la médula espinal y por el DMV desde en tronco encéfalo (276). Por lo tanto la ruta desde el PVH involucra ambos sistemas simpáticos y parasimpáticos en la modulación del metabolismo de la glucosa hepática. Usando trazadores para determinar la inervación autónomo-hepática desde el PVH se ha descrito que existen conexiones entre el VMH y el PVH, y desde el ARC hasta el PVH (276,277). Por tanto, el PVH integra la información de otros núcleos hipotalámicos y el control autónómico del hígado (275).

❖ Modulación autónoma de metabolismo hepático de los lípidos. Existen evidencias que muestran que el sistema simpático y parasimpático representan fuerzas complementarias, modulando el metabolismo lipídico en el hígado en diferentes estados nutricionales. EL ARC y el sistema nervioso simpático son imprescindibles para estimular la secreción de lipoproteínas de baja densidad (VLDL) transportadores de TG

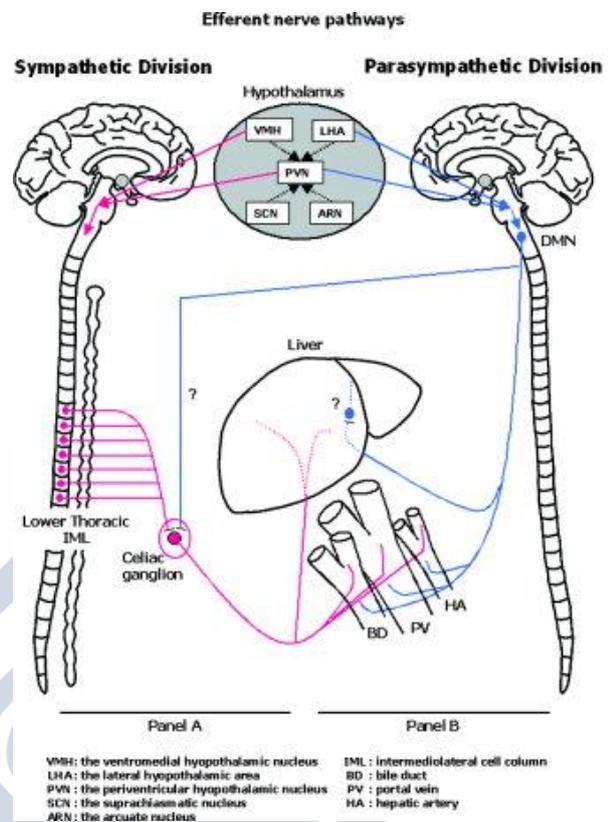


Imagen 18. Rutas eferentes del sistema nervioso autónomo hacia el hígado. Las líneas rojas representan la inervación simpática y las azules la parasimpática (274).

hacia el tejido adiposo durante el ayuno, en un proceso dependiente de NPY (278-280). Sin embargo, los efectos del parasimpático ocurren en el estado post-prandial, indicado que la ingesta activa el sistema nervioso parasimpático (281); la administración intravenosa de *D*-glucosa favorece el estímulo de la rama hepática del nervio vago (282). Como se ha mencionado anteriormente, la activación parasimpática favorece la acumulación energética, activa la formación de glucógeno e inhibe la secreción de las VLDL, favoreciendo el almacenamiento de los triglicéridos (283). En base a lo dicho, se ha propuesto un complejo modelo sobre el rol del sistema autónomo sobre el metabolismo lipídico en el hígado (Imagen 19) (284). En un estado “entre comidas” existe un tono simpático basal, mientras que la actividad parasimpática es reducida. Durante el ayuno, la actividad simpática se incrementa estimulando la secreción de TG en las VLDL, por tanto movilizando el almacenamiento energético hepático. Durante la ingesta, el incremento de la actividad parasimpática y la reducción de la simpática produce la inhibición de la secreción de las VLDL, favoreciendo el almacenamiento lipídico. Sin embargo, hasta el momento no está claro a través de qué mecanismo la inervación autónoma se regula la secreción de las VLDL.

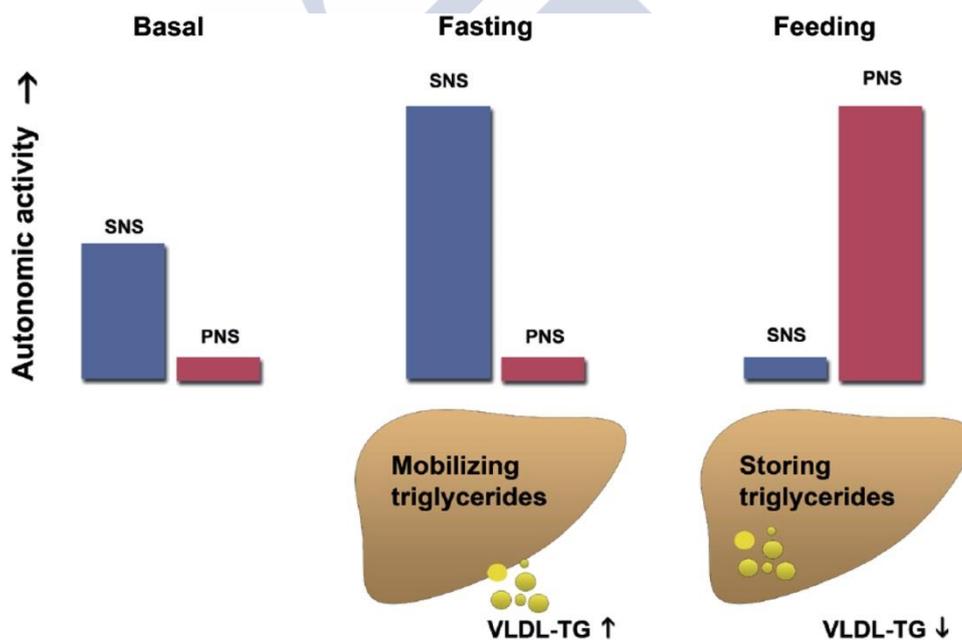


Imagen 19. Esquema que representa la actividad del SNS y PNS sobre el metabolismo lipídico del hígado, en respuesta al ayuno y la ingesta (283).

Patologías hepáticas asociadas a la homeostasis energética

Dependiendo del aporte nutricional, el hígado puede cambiar desde almacenar glucosa en forma de glucógeno a fabricarla y liberarla al torrente sanguíneo, siendo por tanto el árbitro del consumo de energía del resto de tejidos dependientes de glucosa. También es el centro encargado del metabolismo de los aminoácidos y de la detoxificación amónica, siendo el único capaz de generar un compuesto soluble, la urea, para la liberación del amonio derivado del metabolismo proteico. Es importante destacar también su papel en el metabolismo lipídico, sintetiza y degrada lipoproteínas y convierte el exceso de carbohidratos en ácidos grasos para su almacenamiento, además de fabricar cuerpos cetónicos, sustrato que consume el cerebro ante la ausencia de glucosa en estados de inanición. Otras muchas y vitales funciones además de las enumeradas, hacen que el hígado constituya el principal integrador periférico del metabolismo intermediario. El hígado es esencial para mantener el equilibrio metabólico a través del almacenamiento o liberación de grandes cantidades de energía según el estado nutricional del organismo. La función principal del hígado es la del mantenimiento de la concentración de glucosa sanguínea constante a pesar del estado nutricional, y de gestionar el almacenamiento energético. En un estado post-pandrial el hígado centra su actividad en el almacenamiento energético, en forma de glucógeno y triglicéridos, en un proceso dependiente de insulina y del sistema nervioso parasimpático (15,283).

Hay tres maneras por las que los triglicéridos pueden formar parte de las reservas hepáticas: lipogénesis *de novo*, ácidos grasos libres provenientes principalmente del tejido adiposo y triglicéridos de lipoproteínas remanentes (Imagen 20) (285). De todas ellas, la lipogénesis *de novo* contribuye a una pequeña parte de los TG constituyentes de las VLDL hepáticas (286,287). Los lípidos que provienen de la dieta se empaquetan en el intestino en lipoproteínas denominadas quilomicrones, que los transportan a través de la linfa hacia el hígado, donde se incorporan al mismo por la acción de la LPL. Durante la fase post-pandrial, estos lípidos son almacenados en el

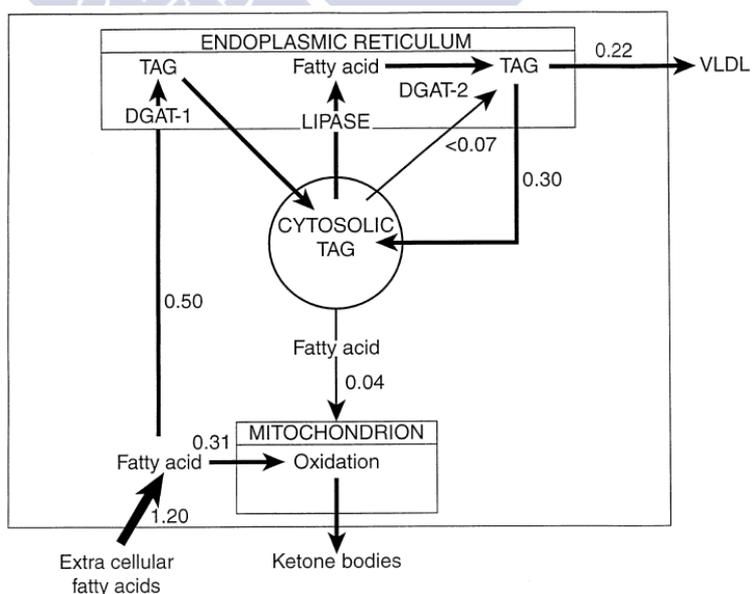


Imagen 20. Rutas metabólicas de ácidos grasos libres y TG involucradas en la oxidación, almacenamiento y secreción de las VLDL en el hígado (284).

hígado, donde serán acoplados a la apoproteína Apo B100 para formar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que serán secretadas y distribuidas por el tejido adiposo. La contribución de TG por parte de lipoproteínas remanentes es importante. En el caso de los remanentes de quilomicrones, existe una rápida eliminación de la sangre por parte del hígado, sobre todo en estado post-prandial (288,289). En ratones neonatales, la sobreexpresión de la LPL hepática aumenta la secreción de las VLDL con TG provenientes de lipoproteínas remanentes (290); además, estudios in vitro han determinado que los TG aportados por los remanentes contribuyen en la ruta secretora de los mismos (291). Sin embargo, en circunstancias normales, los ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs) son los que contribuyen en su mayoría al reservorio hepático de triglicéridos (292).

La elasticidad hepática en relación con su capacidad de almacenamiento de triglicéridos, le permite acomodarse a las concentraciones plasmáticas de NEFAs, que, cuando se acumulan en exceso, pueden ser oxidados y/o empaquetados en VLDL por el hígado. Esta flexibilidad en el almacenaje lipídico, permite neutralizar la toxicidad generada por los NEFAs provenientes de la lipólisis del tejido adiposo blanco (293).

4.1 Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)

NAFLD es el término clínico-patológico que abarca un espectro de enfermedades hepáticas que van desde la simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática), a la esteatosis inflamatoria (esteato-hepatitis), fibrosis y cirrosis (285). La enfermedad fue descrita por primera vez en 1980 (294) y está dividida en diferentes categorías histológicas; 1) esteatosis hepática con o sin una ligera inflamación y 2) esteato-hepatitis no alcohólica (NASH) que se diferencia de la anterior por la presencia de un importante daño en los hepatocitos con o sin fibrosis pudiendo derivar en hepato-carcinoma (Imagen 21) (295). La presencia de fibrosis hepática, es uno de los signos más importantes en la determinación de un pronóstico hacia el desarrollo de cirrosis. Dado que la mayoría de pacientes que progresan a estados avanzados de fibrosis tenían en origen esteato-hepatitis (296), la morbilidad hepática atribuida a pacientes con NASH que desarrollaran finalmente cirrosos es de un 20% (296). Sin embargo, la esteatosis no alcohólica tiene un curso más benigno, con un estimado riesgo de progresión a cirrosis de menos del 4%, siendo aun así, los que presentan una ligera inflamación, aquellos con un mayor riesgo (296-298).

Introducción

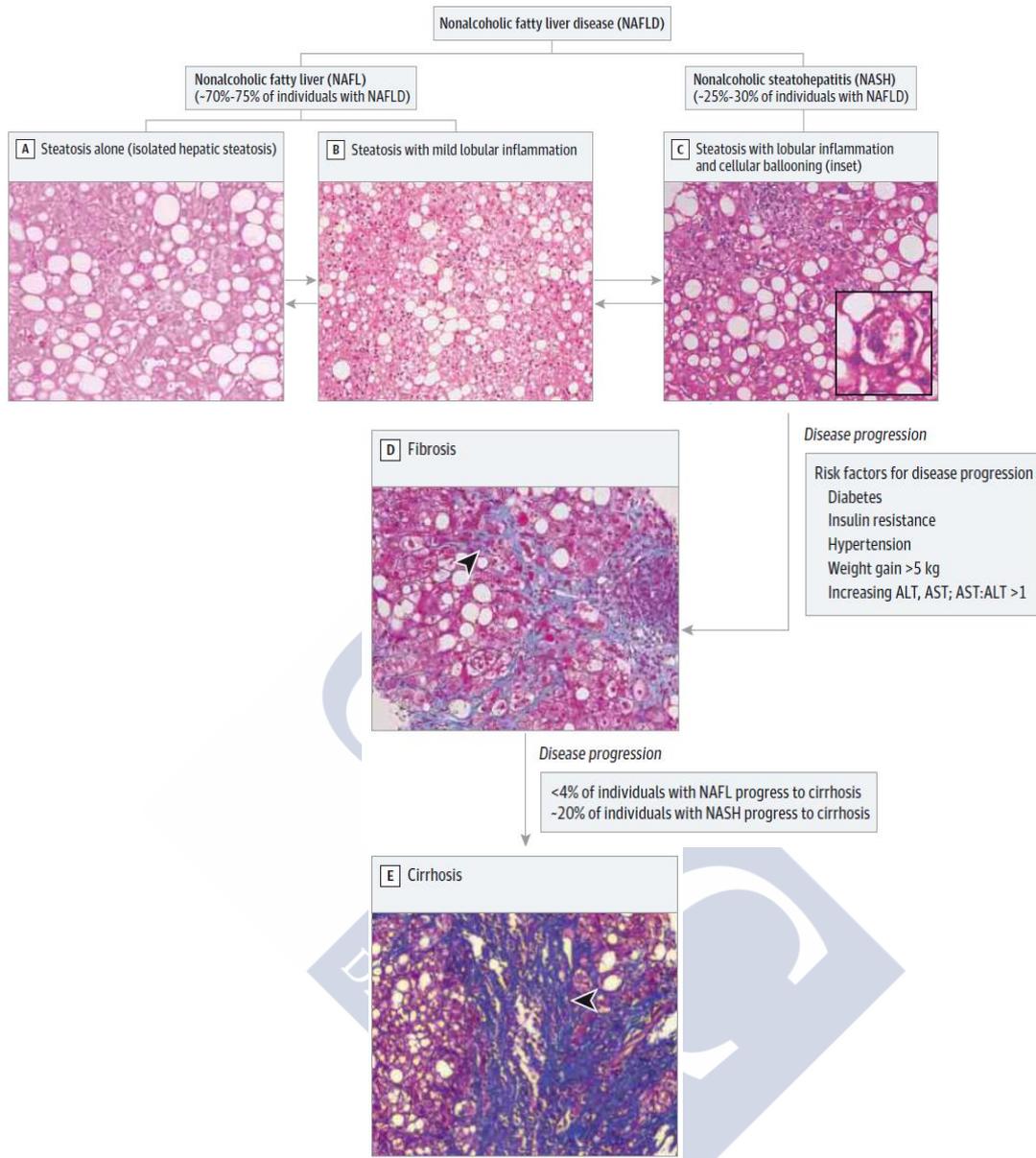


Imagen 21. A grandes rasgos, la enfermedad de hígado graso no alcohólico se divide entre las que no desarrollan inflamación (NAFLD) (paneles A-B) y las que presentan diversos grados de inflamación (NASH) (panel C); pudiendo llegar incluso a fibrosis hepática (panel D), donde se observa que el colágeno invade los sinusoides hepáticos. Si la enfermedad continúa se acaba desarrollando cirrosis hepática (panel E) donde el colágeno ya empieza a formar nódulos (punta de flecha) (294).

4.1.1 Epidemiología

La prevalencia del NAFLD en la población general se estima que es alrededor de entre un 14 y 24 % (15,299-301). Normalmente se ha tratado como una enfermedad específica de adultos, pero la prevalencia de la enfermedad ha aumentado intensamente en todas los segmentos de la población incluidos los niños. EL incremento de la prevalencia de la obesidad y la diabetes tipo 2 en la población es seguramente el responsable del floreciente número de individuos con esteatosis hepática (302).

4.1.2 Fisiopatología de la esteatosis hepática

El desarrollo de la esteatosis está modulado por diversos mecanismos metabólicos, genéticos, ambientales e incluso dependientes de la microbiota intestinal (303). La sobre-nutrición y la obesidad observada en pacientes con NAFLD está acompañado de hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina, de hecho se ha considerado la NAFLD como parte del síndrome metabólico, siendo la resistencia a la insulina un requisito para su desarrollo (304,305); la prevalencia de esteatosis en pacientes con obesidad es alrededor del 75% (15).

Los mecanismos por los que el hígado acumula lípidos y genera un desequilibrio en el almacenamiento graso reflejado en grandes gotas lipídicas pueden ser 1) incremento de incorporación de lípidos, 2) aumento en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, 3) desajuste en la síntesis o secreción de lipoproteínas y 4) una reducción de la oxidación de los ácidos grasos (306). La sobre-nutrición implica un mayor almacenamiento lipídico derivado de las lipoproteínas, así como un aumento de la biosíntesis *de novo* inducido por insulina derivado del exceso de carbohidratos y grasas contenidos en las dietas de altas calorías (Imagen 22).

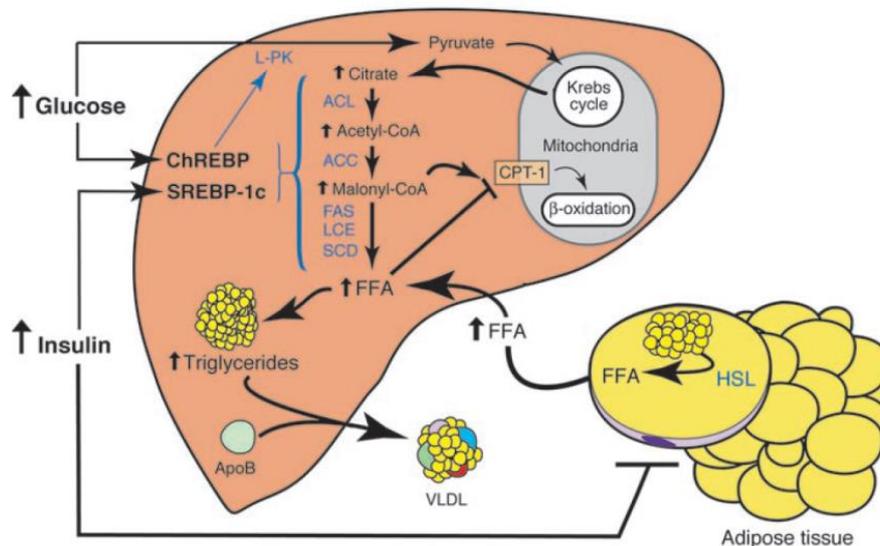


Imagen 22. Alteraciones metabólicas hepáticas derivadas de la acumulación de triglicéridos en estados de resistencia a la insulina (15).

En pacientes con NAFLD, los triglicéridos intra-hepáticos provienen en su mayoría de NEFAs circulantes tanto de origen exógeno como endógeno (lipólisis) (307). Los pacientes con diabetes tipo 2 incorporan al hígado ácidos grasos libres provenientes de la dieta un 50% más rápido que los controles (308). Estos pacientes presentan elevados niveles de ácidos grasos circulantes, debido a que la resistencia a la insulina impide la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo (309). Sin embargo también se ha descrito que existe una mayor ratio de biosíntesis *de novo* de lípidos en pacientes con

Introducción

NAFLD y resistencia a insulina (307,310). En un estado de hiper-insulinemia e hiperglicemia la insulina y la glucosa induce la expresión hepática de los factores de transcripción denominados proteína de unión reguladora de esterol tipo 1-c (SREBP1-c) y la proteína de unión en respuesta a carbohidratos (ChREBP) respectivamente, activadores de enzimas implicadas en la biosíntesis *de novo* de lípidos (311). Sorprendentemente, incluso bajo un importante estado de resistencia a la insulina, ésta es capaz de continuar estimulando la SREBP-1c, activando la biosíntesis lipídica *de novo* contribuyendo a la formación de un hígado graso (312).

La composición de los ácidos grasos del hígado también influye en la cantidad de triglicéridos que se acumulan mediante la alteración de la actividad de AMPK. La delección genética de la esteroil CoA desaturasa (SCD-1), una enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, protege contra el desarrollo de hígado graso y la resistencia a la insulina en ratones (313,314). En ausencia de SCD-1, la AMPK se activa (315), lo que resulta en la fosforilación y la inhibición de ACC (316) y ChREBP (317), así como una reducción en los niveles de expresión de SREBP-1c (318). El fármaco antidiabético metformina también activa la AMPK hepática (318). El tratamiento de ratones *ob/ob* con metformina reduce notablemente la esteatosis hepática (319), y su administración a seres humanos con esteato-hepatitis mejora la funcionabilidad hepática y la disminución de tamaño del hígado (305).

Una segunda clase de fármacos antidiabéticos, las tiazolidinedionas (TZDs), se reconocen principalmente como fármacos que activan el receptor del peroxisoma-proliferador activado gamma (PPAR- γ). Sin embargo, existen estudios que sugieren que también pueden activar AMPK (320,321). Los estudios piloto en humanos utilizando la pioglitazona (322,323) y la rosiglitazona (324) han demostrado la eficacia de estos agentes en la reducción de la grasa hepática, presumiblemente como consecuencia de los acontecimientos moleculares que resumidos en la imagen 23.

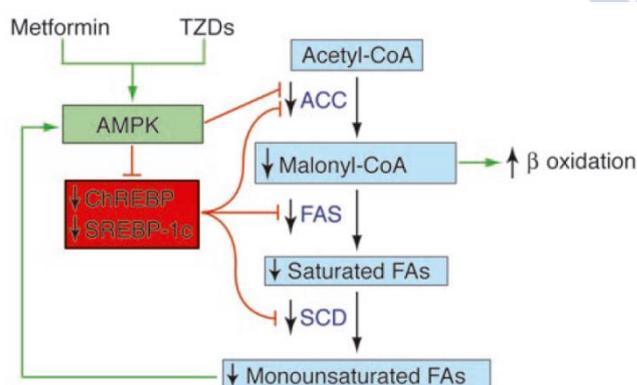


Imagen 23. Consecuencias de la activación de AMPK en el hígado. LA metformina y los TZDs, activan AMPK, reduciendo la lipogénesis por tres mecanismos diferenciados. Como resultado disminuye la concentración de malonil-CoA, activándose la CPT1A, incrementando, por tanto, la oxidación de los ácidos grasos libres. (15).

En conjunto, estos estudios sugieren que el aumento de la lipogénesis hepática es una importante alteración metabólica subyacente en la patogénesis de la esteatosis en hígados resistentes a la insulina. Este aumento de la lipogénesis, en realidad puede generar alteraciones metabólicas que conducen a un mayor contenido de triglicéridos hepáticos. La primera la alteración es directa, a través del aumento de la síntesis de triglicéridos. El segundo es una alteración indirecta, a través de una mayor producción de malonil-CoA, que al inhibir el CPT-1A impide la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria, y por tanto, reduce la β -oxidación (Imagen 22).

En el desarrollo de la esteatosis, además de la influencia del tejido adiposo como fuente de ácidos grasos, el intestino delgado también puede intervenir. Estudios realizados en ratones libres de gérmenes demuestran el papel de la microbiota intestinal en la absorción y almacenamiento energético derivado de la ingesta de alimentos. El trasplante de la microbiota intestinal de ratones normales a aquellos libre de gérmenes (proceso conocido como convencionalización) da lugar a un aumento de peso, de masa grasa y resistencia a la insulina (325); lo que sugiere que la microbiota intestinal influye en la absorción de energía adiposidad, inflamación y resistencia a la insulina. La endotoxina lipopolisacárido (LPS) es un constituyente principal de muchas de las bacterias constituyentes de la microbiota. La manipulación de la microbiota intestinal, incluso mediante el uso de determinados ingredientes en la alimentación, puede afectar al metabolismo de los LPS incrementando sus niveles circulantes. Una dieta alta en grasa o en carbohidratos en humanos, incrementa los niveles circulante de LPS en tan sólo tres días (326). La endotoxemia por LPS empeora la obesidad en si misma pero no genera procesos inflamatorios. En ratones con endotoxemia inducida el aumento de tejido adiposo y la esteatosis resistencia hepática a la insulina se desarrolló de igual manera que tras la ingesta de una dieta alta en grasa (327). Estos estudios muestran que la endotoxemia induce acumulación lipídica en el hígado pero no esteato-hepatitis.

4.2 Esteato-hepatitis no alcohólica (NASH)

A pesar de la alta prevalencia del hígado graso no alcohólico y su potencialidad para dejar graves secuelas, los factores etiológicos subyacentes que determinan la progresión de la enfermedad a esteatohepatitis, fibrosis e incluso cirrosis siguen siendo poco conocidos. Existen limitaciones para estudiar los cambios moleculares y fisiológicos que favorecen la transición de esteatosis a NASH por varios factores. En primer lugar no hay modelos animales que incorporen todas las características del NASH humano; en segundo lugar, las técnicas no invasivas disponibles para estudiar el metabolismo hepático en humanos es limitado. Por lo tanto, nuestra comprensión actual de los mecanismos por los que la esteatosis hepática progresa a NASH se basa exclusivamente en los datos relativos modelos animales. La progresión de esteatosis a esteato-hepatitis se asocia a una lipotoxicidad que genera una disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplasmático (ER-stress), formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) y activación de rutas inflamatorias; es decir c-Jun N-terminal kinasa (JNK), el inhibidor de factor nuclear $\kappa\beta$ (IKK- β) y receptor kinasa tipo *Toll* 4 (TLR-4) (Figura 24) (328,329).

La β -oxidación mitocondrial es la principal ruta de degradación de los ácidos grasos bajo condiciones fisiológicas normales, pero también puede ser la mayor fuente de ROS (330). En pacientes con NAFLD se han detectado anomalías en la ultraestructura mitocondrial hepática (331), lo que explica la reducida tasa de respiración mitocondrial de los mismos (332). Una de las razones de esa disfunción está en la lipotoxicidad, generada por la acumulación de lípidos saturados como el palmitato en la esteatosis. Su oxidación genera la acumulación de metabolitos tóxicos

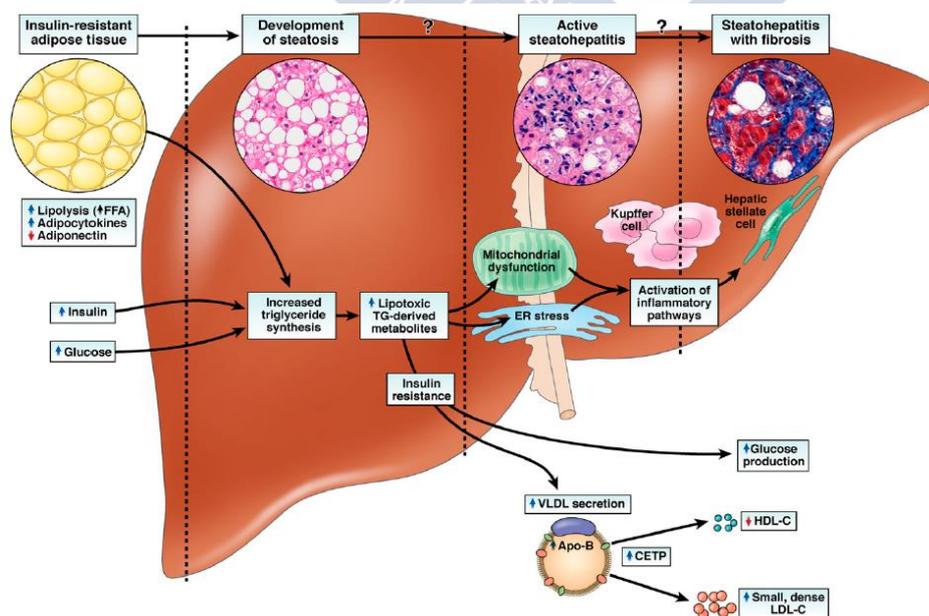


Imagen 24. Representación esquemática de la fisiopatología de la esteato-hepatitis no alcohólica (327).

derivados de los mismos, produciendo la disfunción mitocondrial y lipotoxicidad (328,329). La disfunción y la reducción en tasa de respiración mitocondrial dan lugar a la generación de ROS (Imagen 25). Si la capacidad oxidativa de las mitocondrias se reduce, los ácidos grasos citosólicos se acumulan y se activan vías alternativas de oxidación en peroxisomas y microsomas, resultando en una mayor acumulación de ROS debido a que dichas oxidaciones son menos efectivas (333,334). La acumulación de ROS y de ácidos grasos mitocondriales producirá la peroxidación lipídica (335), debido a la reacción entre los ROS y los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs), generando aldehídos de PUFAs con un vida media más longeva que los ROS amplificando los efectos del estrés oxidativo. Adicionalmente, la peroxidación de los PUFAs amplifica la proteólisis de la ApoB en el retículo endoplasmático, reduciendo la secreción de VLDL en roedores (336), contribuyendo a una mayor acumulación lipídica en el hígado. En este contexto de lipotoxicidad y estrés oxidativo se generan importantes daños en la homeostasis del hepatocito, afectando de forma negativa en la síntesis de nucleótidos y proteínas; se agota el glutatión como anti-oxidante y aumenta la producción de la citokina pro-inflamatoria TNF- α facilitando la entrada de células inflamatorias al hígado y activando las células Kupffer a células estrelladas, promoviendo el depósito de colágeno, fibrosis y perpetuación de la respuesta inflamatoria (15).

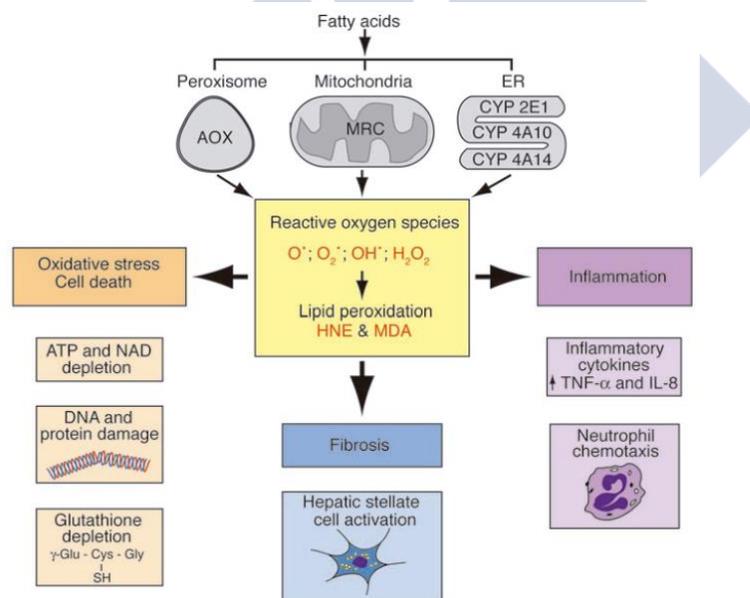


Imagen 25. Mecanismos de generación de ROS en hepatocitos derivados del metabolismo lipídico en NAFLD (16).

4.2.1 Acción del tejido adiposo blanco sobre el desarrollo de NASH

La hipertrofia del tejido adiposo en organismos obesos, también contribuye a la generación del NASH. Existe una estrecha relación entre los adipocitos hipertróficos resistentes a la insulina, la inmunidad desregulada tanto en la grasa como en el hígado y la esteato-hepatitis inducida por lipotoxicidad. Los adipocitos y la fracción vascular del tejido graso (estroma) segregan una serie de hormonas, factores del complemento, citocinas (TNF- α , interleukinas), quimiocinas y adipocinas funcionando como un tejido endocrino. Como se ha mencionado con anterioridad, la adiponectina es una de estas adipocinas, cuya reducida secreción de la misma en obesidad altera el metabolismo de lípidos y la sensibilidad de la insulina en el hígado; la administración de adiponectina en ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa alivia espectacularmente la hepatomegalia, esteatosis e inflamación (337). En la esteatohepatitis, la disminución de la secreción de adiponectina por los adipocitos disfuncionales contribuye a la formación de NASH (338).

Los macrófagos del tejido adiposo son una importante fracción del estroma (339,340). La activación de los macrófagos del tejido adiposo, juegan un importante papel en la disfunción de la grasa generando resistencia a la insulina, liberación de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo y la deposición grasa ectópica en el hígado (328). En el estroma hay dos tipos de macrófagos: 1) los macrófagos M1 o macrófagos de activación clásica que juegan un papel clave en la inmunidad humoral y en la respuesta a patógenos; secretan grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12...) y bajos niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-10); y 2) macrófagos M2 o de activación alternativa con función anti-inflamatoria (341). Un aumento de macrófagos M1 respecto a M2 es característico de roedores alimentados con dieta alta en grasa (341,342) y humanos obesos (343). Las células Kupffer son el equivalente a los macrófagos del tejido adiposo. En primer lugar son promocitos y monoblastos de la médula ósea que se diferencian en monocitos en la sangre periférica, localizándose en las sinusoides hepáticas como macrófagos especializados del sistema retículo-endotelial del hígado. Como se observa en la imagen 24, las células Kupffer (células estrelladas al activarse) son la mayor fuente de citocinas inflamatorias y su interacción con las células B y T produce una función similar a los macrófagos M1 en el desarrollo de resistencia a la insulina, inflamación y apoptosis hepática (344,345). La activación de los macrófagos del tejido adiposo precede a la activación de las células Kupffer. En ratones alimentados con dieta alta en grasa, la activación de macrófagos y la expresión de citocinas inflamatorias en el tejido adiposo sucede rápidamente y eventualmente generan esteato-hepatitis (346,347). Sin embargo, la infiltración de macrófagos M1 y la esteato-hepatitis ocurre semanas después de la desregulación del tejido adiposo. Teniendo en cuenta estos estudios, el desequilibrio entre macrófagos M1/M2 y la liberación de factores inflamatorios por las células Kupffer son importantes factores para el desarrollo de NASH (Imagen 26).

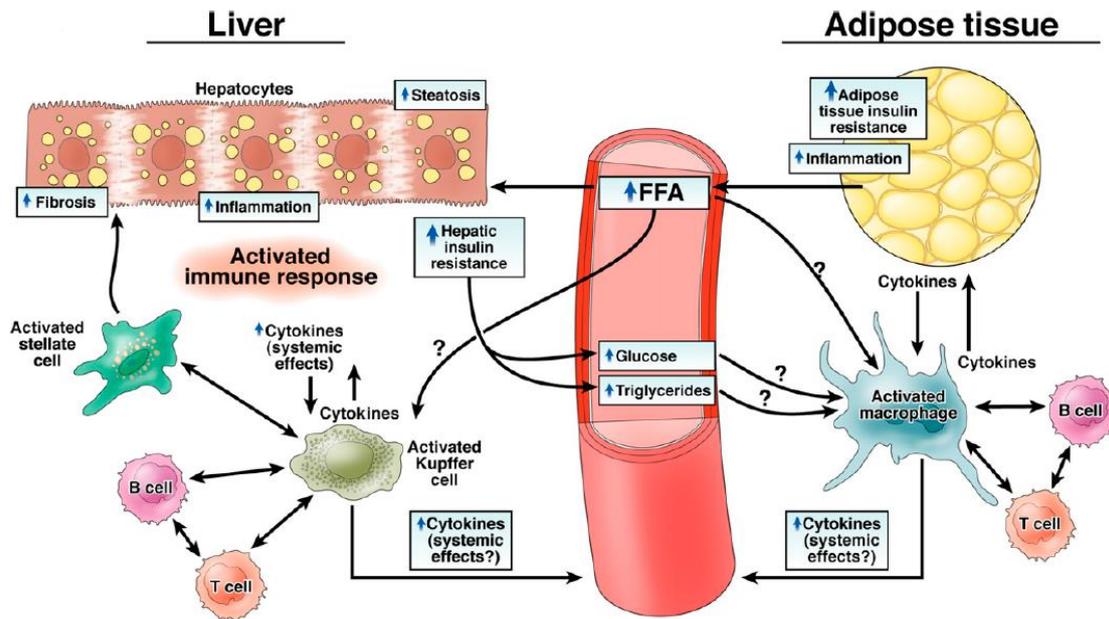


Imagen 26. En el tejido adiposo, la fracción vascular estromal incluye células inmunitarias. En la obesidad, la activación de los macrófagos contribuye al desarrollo de adipocitos disfuncionales resistentes a la insulina; éstos liberan cantidades excesivas de ácidos grasos libres, generando resistencia a la insulina y lipoapoptosis en tejidos periféricos como el hígado. La acumulación de metabolitos tóxicos derivados de los lípidos, activa las vías inflamatorias de los hepatocitos y células Kupffer que deriva en daño hepático (327).

4.2.2 Efecto del estrés del retículo endoplasmático en NASH

El desequilibrio crónico del balance energético entre la oferta y la demanda de nutrientes, como se observa en la obesidad, expone a las células a sucesos lipotóxicos que, como consecuencia, activan vías de estrés celular. Numerosos estudios han señalado la estrecha relación entre el metabolismo lipídico y el estrés del retículo endoplasmático (Estrés-RE) en el desarrollo de NASH (348-352). El ER-stress es una consecuencia de la acumulación de proteínas mal desplegadas en el lumen del retículo endoplasmático producidas por estímulos biológicos, fisiológicos o patológicos (353). El retículo endoplasmático es exquisitamente sensible a las alteraciones en la homeostasis celular detectado por la chaperona de unión a inmunoglobulina/proteína regulada por glucosa 78 (BIP/GRP78) (353). La acumulación de las proteínas desplegadas en el lumen del retículo secuestra GPR78 apartándolo del dominio que constituye GPR78 con los tres sensores, cuya consecuencia es la activación de los mismos. La activación de los tres sensores de estrés por la disociación de GPR78 ante la acumulación de proteínas defectuosas en el lumen del retículo desencadena la denominada “respuesta ante proteínas mal plegadas” (UPR) para restaurar el correcto funcionamiento de retículo endoplasmático. El desencadenante de la UPR por GPR78 activa 3 de vías de transducción de señales diferentes; 1) proteína requerida de inositol (IRE) 1 α , 2) kinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplasmático

Introducción

iniciador de la traducción eucariota (PERK) y 3) el factor de transcripción activado (ATF) 6α . Para intentar resolver el mal plegamiento proteico pPERK induce la fosforilación del factor de transcripción pancreático del retículo endoplásmico iniciador de la traducción eucariota (eIF2 α) y una procesada ATF6 α heterodimeriza con la isoforma de la proteína de unión X-box (XBP-1) previamente procesada por IRE1- α para generar su forma activa, XBP1s; todo ello conduce a una reducción de la transcripción. Por otro lado p-eIF2 α activa al factor de transcripción ATF4. ATF4 induce la expresión de varios genes incluidos transportadores de aminoácidos, chaperonas, y la proteína homóloga C/EBP (CHOP). CHOP a su vez induce la expresión de GADD34 que se asocia con proteínas fosfatasa 1 (PP1) para desfosforilar eIF2 α en un bucle de retroalimentación negativa, reanudando así la traducción (349). El prolongado mantenimiento del ER-stress traducido en una elevada acción de CHOP da lugar a la inhibición del factor de transcripción C/ebp α , activador de importantes reguladores del metabolismo lipídico; reduciéndose la oxidación lipídica, secreción de lipoproteínas y lipogénesis, participando por tanto en la generación de la esteatosis hepática (Imagen 27) (348).

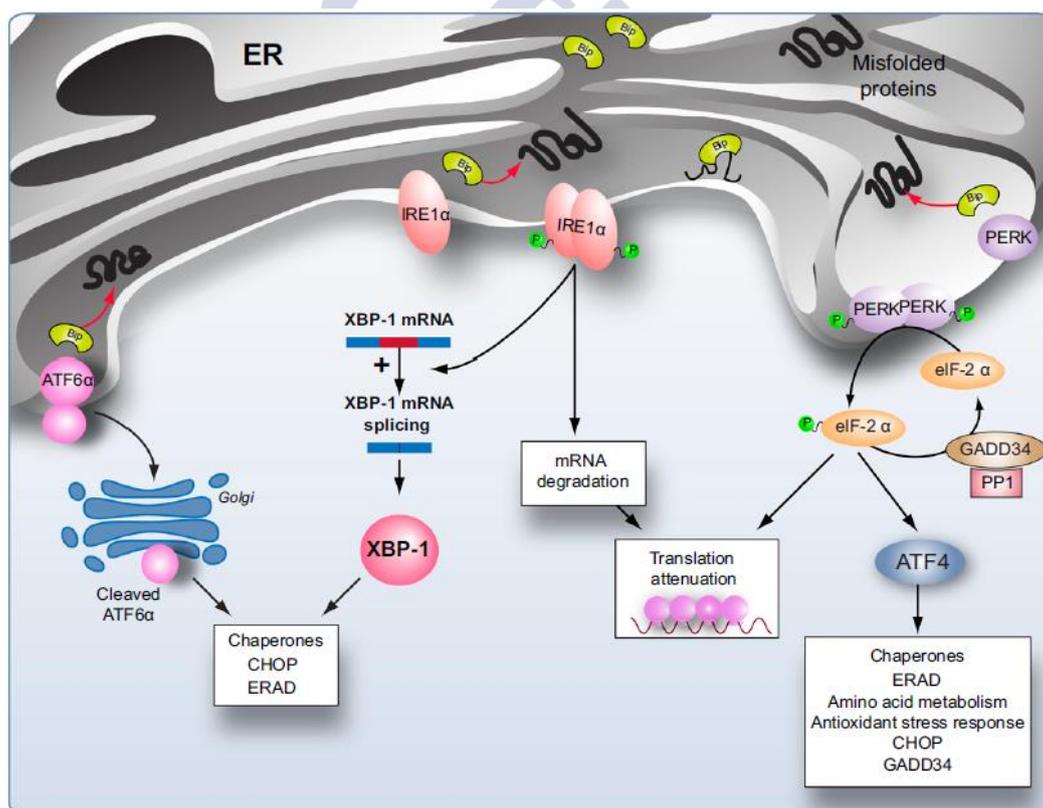


Imagen 27. Respuesta celular a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. Detalles en el texto (348).

Sin embargo, el ER-stress no sólo está implicado en el metabolismo lipídico, también interactúa con cascadas inflamatorias que participan activamente en el desarrollo de NASH; 1) el IRE1 α activado recluta al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR2) y a la kinasa señalizadora de apoptosis (ASK1) activando a ambos JNK1 y NF κ B-IKK (354,355), y 2) activación de ROS como consecuencia del estrés del retículo endoplasmático (356). Una de las consecuencias de la activación de sendas señales inflamatorias en el hígado (JNK1 e IKK), es su participación en la resistencia a la insulina (356,357) fosforilando los residuos de serina de los receptores de insulina (IRS) 1 y 2 desactivándolos (Imagen 28). Por otro lado, la acción de JNK tanto por su activación inducida por ER-stress o por lipotoxicidad (358), también participa en la activación de cascadas de señalización proapoptóticas con la activación de sendas caspasas 3 y 7 (349).

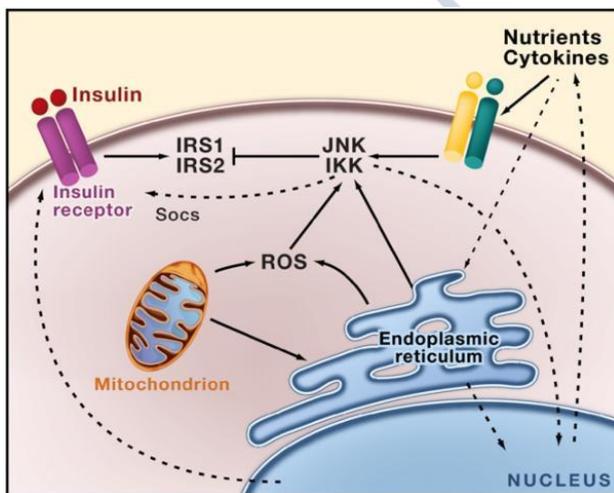


Imagen 28. Mediadores de la inflamación y del estrés-RE como los lípidos, activan una cascada de señalización que desencadena quinasas inflamatorias tales como JNK e IKK. La activación de JNK e IKK resulta en la inhibición de la acción de la insulina (355).

El ER-stress, además de participar en la acumulación de ácidos grasos y en procesos inflamatorios, también está implicado en la formación de las VLDL; el ER-stress inducido por ácidos grasos inhibe el ensamblaje proteico de la ApoB bloqueando la formación y secreción de VLDLs (352). Es importante destacar que la asociación entre el ER-stress inducido por ácidos grasos y la formación de ApoB es paradójica: un suave ER-stress está en un principio asociado con un incremento en ApoB (puesto que la activación de la formación de ApoB por la elevada presencia de ácidos grasos es mayor que la inhibición mediada por el ER-stress); mientras que un ER-stress más acusado da lugar a una reducción de la activación inducida por ácidos grasos por lo que se inhibe la secreción de las VLDL. Este modelo experimental es acorde con el desarrollo real de la esteatosis; inicialmente hay un incremento en la secreción de VLDL por la acumulación de ácidos grasos gracias a la activación de lipogénesis y reducción de oxidación lipídica, debido principalmente a la resistencia a la insulina hepática. Sin embargo, debido al ER-stress y a la UPR, la secreción de TG no es proporcional al continuo acumulo de ácidos grasos. Debido a ello, el aumento de la UPR terminará por reducir la secreción de VLDL, y activando rutas inflamatorias,

Introducción

umentando la lipotoxicidad y sustituyendo la esteatosis hepática por esteatohepatitis (Imagen 29) (359).

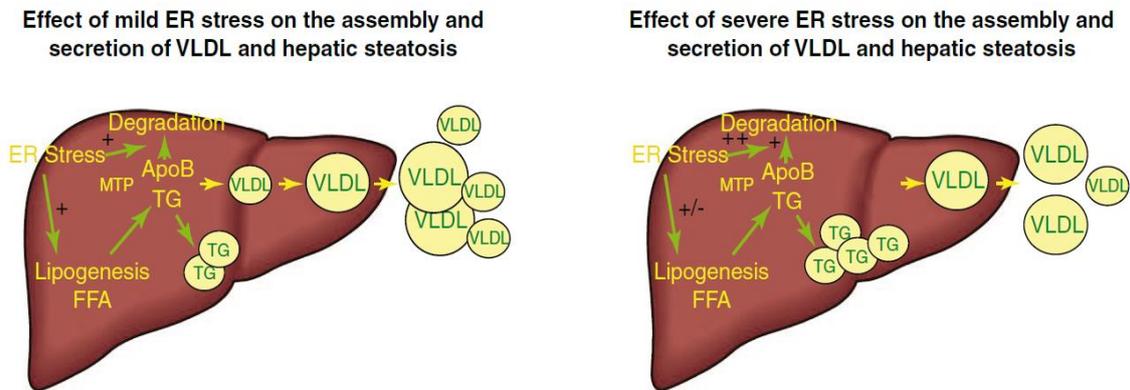


Imagen 29. El estrés-RE puede resultar de una sobre-nutrición celular, principalmente debido a los lípidos. El estrés-RE en sí mismo, puede estimular la lipogénesis *de novo*, causando un incremento en la acumulación hepática de lípidos, favoreciendo el desarrollo de esteatosis (358).





OBJETIVOS



OBJETIVOS

Para el desarrollo del proyecto propuesto para la realización de esta tesis, se plantearon los siguientes objetivos:

- ➔ Estudiar los efectos de la administración central de MCH sobre el metabolismo lipídico de grasa e hígado.
- ➔ Estudiar en qué núcleos hipotalámicos MCH modula el metabolismo lipídico periférico.
- ➔ Estudiar la relación entre el sistema kappa opioide y MCH en el hipotálamo y su efecto sobre el metabolismo lipídico hepático.







MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

1. Todos los experimentos con animales fueron revisados y aprobados por el comité ético de la universidad de Santiago de Compostela (procedimientos del Prof. Rubén Nogueiras Pozo; 1500AE/12/FUN01/FIS02/RNP2 y 15005AE/12/FUN01/FIS02/RNP1) de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal; realizado, por tanto, en cumplimiento de la directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; real decreto de España 1201/2005, del 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y bajo el real decreto de España 296/2008 del 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia.

En vista de las consideraciones éticas asociadas con el uso de animales, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento). En base a estos principios, durante la realización de esta tesis doctoral, se aseguró que los procedimientos realizados fueran aquellos que implicaran el uso mínimo de animales para alcanzar los objetivos; afectara lo mínimo a la capacidad de sentir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero; y, por tanto, tuvieran mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios.

Debido a la naturaleza intrínseca de la tesis (objetivos y perspectiva fisiológica del estudio) se limitó seriamente la posibilidad de reemplazar el uso de animales. La homeostasis energética implica la comunicación de los tejidos periféricos (hígado, tracto gastrointestinal, tejido adiposo) con el CNS a través de señales que llegan al cerebro por el torrente sanguíneo; por ello, la sustitución de los modelos animales por modelos celulares o tejidos aislados no se consideró factible. Sin embargo, sí se realizaron esfuerzos con el fin de reducir lo máximo posible el número de roedores utilizados en los procedimientos. Con este objetivo, se estudiaron las diferentes variables a evaluar en cada experimento y se coordinó su diseño. La metodología empleada permitió la recolección de múltiples muestras de tejidos y la realización de distintos análisis sobre los mismos animales siempre que fuera posible. La experiencia adquirida permitió refinar los procedimientos experimentales a fin de eliminar o reducir al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero como se ha mencionado previamente.

En todos los procedimientos experimentales se usaron ratas (cepa Sprague-Dawley) o ratones (cepas C57-BL6 o Swiss) macho de entre 8 a 10 semanas de edad, con pesos comprendidos entre 200-250 gr en ratas y entre 25-30 gr en ratones. Los animales se estabularon bajo condiciones controladas de luz (12 horas luz/ 12 horas

Material y métodos

oscuridad) y temperatura, con un periodo de adaptación, previo a los procedimientos experimentales, de entre 5 a 7 días. Los animales se mantuvieron con acceso libre a comida y agua, excepto en los procedimientos experimentales que requieran un control de ingesta.

Con el fin de reducir el estrés causado por el procedimiento experimental y para acostumbrarlos al manejo por el personal del laboratorio, durante el periodo de adaptación se monitorizó periódicamente la ingesta y el peso. Cuando se requería de una cirugía que implicara un procedimiento invasivo o potencialmente doloroso, los animales deben encontrarse bajo los efectos de una anestesia general. Para ello, se administró intraperitonealmente (IP) una solución anestésica disuelta en suero fisiológico, consistente en 80 mg/kg de ketamina (Imalgene 1000, Merial) y 8 mg/kg de xilacina (Rompun, Bayer HealthCare) para rata, y 100 mg/kg de ketamina, 20 mg/kg de xilacina para ratón. Tras la intervención se administró subcutáneamente (SC) suero fisiológico para evitar la deshidratación causada por la anestesia, y ketoprofeno (Orudis 100 mg, Sanofi Aventis) a una dosis de 2,5 mg/kg como analgésico para rata y ratón. Tras la cirugía, con el fin de realizar un seguimiento exhaustivo de la ingesta y el peso corporal, los animales se estabularon individualmente. Las dietas utilizadas se detallan en los diseños experimentales. Se utilizó dieta estándar y dieta deficiente en metionina y colina (MCD).

Al final de los procedimientos, cuando se requería la colección de muestras/tejidos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Las muestras de tejido obtenidas por disección, se exponían a rápida congelación en anhídrido carbónico sólido (nieve carbónica) y posteriormente almacenadas a -80°C (análisis de RNA, proteína, valores séricos); para análisis histológicos se les introducía en paraformaldehído 10% para su posterior inclusión en parafina. Para estudios a nivel central, las ratas se anestesiaban y se procedía a su perfusión intracardiaca con suero salino para eliminar toda la sangre del torrente y posteriormente con paraformaldehído 10%.

Técnicas experimentales *in vivo*.

2.1 Canulación intra cerebroventricular (ICV)

2.

Esta intervención se realiza para tener acceso al ventrículo lateral del cerebro de rata o ratón. La inyección de diversas sustancias en dicho ventrículo, permite el acceso de las mismas al hipotálamo.

Para ello se utilizaron cánulas fabricadas a partir de un tubo de polietileno de 20 y 22 *gauges* para rata o ratón respectivamente (PE-20 y PE 50, Becto-Dickinson). El extremo de la cánula se realiza de forma biselada con un tamaño de bisel de 0,5 mm y una distancia desde el extremo a un tope incorporado previamente de 4 mm para rata y 2,5 mm para ratón. El otro extremo de la cánula queda sellado hasta el día del experimento. El procedimiento requiere anestesia general. A continuación se realiza un corte en sagital en la piel que recubre la cabeza, dejando la parte superior del cráneo al descubierto. Se limpia bien la zona hasta que el bregma queda al descubierto, siendo éste el punto de origen para la implantación de la cánula. La cánula se implanta en el lado derecho o izquierdo (asignado aleatoriamente) del ventrículo lateral [desde el bregma: -0,9 mm anteroposterior (AP), $\pm 1,5$ mediolateral (L), -3,50 mm dorsoventral (DV) en ratas; -0,6 mm AP, $\pm 1,2$ mm L, 2 mm DV en ratones]. Una vez implantada se adhiere al cráneo con cianocrilato. Una vez se haya secado, se cierra la abertura cosiendo con seda quirúrgica o cianocrilato según convenga.

2.2 Bombas osmóticas

Para la administración crónica de un compuesto en el cerebro, se utilizaron bombas osmóticas de 7 días (modelo 2001 para ratas, 1007D para ratones, Alzet Osmotic Pumps) que liberan de forma continua y constante la sustancia. Entre 4-8 horas antes de la intervención, las bombas deben prepararse e hidratarse con el compuesto en un baño a 37 °C; de esta forma se asegura que la sustancia ya se esté liberando al implantarlo. Se realizaron dos tipos de infusión crónica: en el ventrículo lateral y núcleo-específica.

- **Infusión en el ventrículo lateral:** tras colocar la cánula ICV como se ha descrito previamente, la bomba se une a la cánula mediante un tubo de silicona de grado médico (Degania) y se sella la unión con cianocrilato. La bomba se coloca bajo la piel del animal en la zona retrocervical y se cose con seda quirúrgica.

- **Infusión núcleo-hipotalámica:** en este caso, se realiza una administración bilateral del compuesto al núcleo específico de la rata, mediante dos bombas osmóticas modelo 1007D. Para ello, se implantaron unas cánulas a medida (Plastic One) que consisten en un pedestal con dos entradas en dirección posterior, una para cada bomba, y dos salidas en dirección ventral hacia cada núcleo. Para el núcleo arcuato la medida entre las salidas ventrales fue de 0,6 mm y una longitud DV de 10,1

Material y métodos

mm, implantándose a -2,8 mm respecto al bregma. Para el núcleo lateral, la medida entre las salidas ventrales era de 4 mm y una longitud DV de 8 mm, implantándose a -2,9 mm respecto al bregma. Las bombas se unen al conector mediante tubo de silicona y se sella la unión con cianocrilato. La incisión se sutura con seda quirúrgica.

2.3 Estereotaxia

Tanto para la implantación de bombas núcleo específicas, como para la administración directa de algún compuesto, se utiliza un aparato estereotáxico. Este instrumento permite localizar tridimensionalmente una zona para realizar una administración localizada de cualquier sustancia en el cerebro.

En este caso, la administración se realiza bilateralmente en diferentes núcleos hipotalámicos. Cada núcleo tiene una coordenada concreta, utilizando el bregma como punto de referencia para la obtención de las coordenadas estereotáxicas antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV), siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico del cerebro de rata y de ratón (360,361). El bregma es el punto craneal en el que confluyen las suturas del hueso frontal con los dos temporales. Siguiendo las indicaciones del atlas, las coordenadas de los núcleos hipotalámicos estudiados fueron las siguientes:

- Núcleo arcuato en rata: -2,8 mm AP; $\pm 0,3$ mm L y 10,2 mm DV.
- Núcleo lateral en rata: -2,85 mm AP; ± 2 mm L; -8,1 mm DV.
- Núcleo ventromedial en rata: -2,85 mm AP; $\pm 0,6$ mm L; 10,1 mm DV.
- Núcleo lateral en ratón: -1,3 mm AP; $\pm 1,1$ mm L; -5,2 mm DV.

Una vez anestesiado el animal, se coloca en el estereotáxico y se fija el cráneo en los planos vertical y horizontal. Se realiza una incisión sobre la piel en dirección sagital. Tras rebatir la piel se localiza el bregma, y se determinan las tres coordenadas del punto de referencia (AP, L y DV). A estas coordenadas les serán sumadas o restadas las coordenadas de cada núcleo hipotalámico a estudio. Una vez localizada la zona se procederá a realizar el orificio y la posterior administración de una sustancia utilizando una jeringa Hamilton 7001 KH 25 gauges o implantando las cánulas núcleo específicas para la implantación de bombas de bombas osmóticas explicado anteriormente. Tras ello, se sutura la abertura con seda quirúrgica.

2.4 Administración viral en la vena de la cola

Para poder modular la expresión génica en el hígado, la administración de vectores adenovirales se realiza desde la vena de la cola de ratones. La administración por esta vía asegura la infección del virus en el hígado con una elevada especificidad (362,363). Este procedimiento no requiere de anestesia al no ser una intervención invasiva. El ratón se inmoviliza en un cepo especial que deja la cola libre. Para visualizar la vena con más claridad, se empapa con un algodón la zona con alcohol de 96 °. Con una aguja de 27 gauges, se administra el adenovirus a una dosis de $1 \cdot 10^8$ unidades virales

(UV) en un volumen de 100 μ L. Tras el pinchazo, se presiona la zona hasta que no se observe ningún sangrado.

2.5 Canulación intravenosa (IV)

Esta técnica está indicada para poder administrar directamente al torrente sanguíneo sustancias cuyo efecto se ve reflejado en la composición del suero sanguíneo; nos permite administrar y tomar muestra sanguínea con el animal en libre movimiento. La canulación se realiza en la vena yugular como la correcta vía de acceso al sistema cardiovascular, debido a la proximidad de la vena a la piel del cuello, facilidad de disección y gran calibre. Para ello se fabrican cánulas de la siguiente forma: cánula de polietileno PE-50 (Clay-Adams, Becton-Dickinson) y con una longitud de 8 cm; el extremo que será introducido en la vena, lleva acoplado un tubo de silástico de 4,5 cm para facilitar su entrada. Dentro de la cánula se inserta una guía de nylon de calibre 30 y diámetro de 0,32 ajustándose perfectamente al diámetro interno de la cánula. Esta guía evita el sangrado y la obturación de la cánula. El espacio residual interno se rellena con un aceite vegetal mineral inerte (Sigma) que, por su viscosidad, evita la entrada de sangre en la cánula ya colocada.

Tras anestesiar la rata, se fija el animal en posición supino y se disecciona la zona derecha de la piel del cuello y el músculo hasta ver la vena yugular externa. Una vez descubierta, se anuda con seda la parte cervical de la misma para evitar el posterior sangrado. A continuación se hace un pequeño corte en la pared de la vena con una micro-tijera y se introduce el extremo de silástico hasta llegar a la confluencia de la vena cava superior y la aurícula derecha. Se fija la cánula a la vena y a los músculos colindantes con seda quirúrgica. Para evitar molestias en la rata y facilitar su uso de la cánula, se hace pasar la misma por un trayecto subcutáneo hasta la zona retrocervical. De esta forma el extremo de la cánula externa queda libre para la administración de sustancias o extracción de muestra de sangre.

2.6 Vagotomía quirúrgica

El procedimiento se realiza en ratas previamente anestesiadas. La rata se inmoviliza en posición supina y se realiza una incisión abdominal en la línea media. El hígado se mueve cuidadosamente a la derecha para exponer el esófago. Alrededor del mismo se localizan las ramas dorsales y ventrales del nervio vago y cuidadosamente se diseccionan ambas. Posteriormente se le realiza un punto de sutura al extremo de cada rama seccionada para evitar sangrados. Una vez finalizada la vagotomía, los músculos abdominales y la piel se suturan con seda. Los músculos abdominales y la piel se suturan con seda quirúrgica. La eficacia de la vagotomía se evaluó una semana después de la cirugía por la observación de hipertrofia del estómago en ratas *post mortem*. Sólo las ratas que mostraron un aumento evidente en el tamaño del

estómago después de la vagotomía se incluyeron en el análisis. El grupo control de la cirugía se realiza bajo el mismo procedimiento, pero una vez expuesto el esófago con las ramas del vago se sutura la abertura.

2.7 Registro de la actividad de la inervación simpática del tejido adiposo blanco (SNA)¹

El registro de la actividad nerviosa del simpático (SNA) se realizó en ratones C57 BK/6J (Jackson Laboratories) con una edad comprendida entre las 14 y 16 semanas. Se les realizó una canulación ICV y se dejaron recuperar 7 días. Tras la recuperación, los ratones se re-anestesiaron e inmediatamente se intubaron por la tráquea con un tubo de polietileno PE-50 para realizar un intercambio de flujo de aire ambiental enriquecido con O₂. A continuación se realiza una canulación intravenosa en la vena yugular derecha y en la arteria carótida izquierda para realizar la perfusión de α -cloralosa como sedante (dosis inicial de 12 mg/kg, dosis de mantenimiento 6.25 mg/kg/hora) por la yugular y para las mediciones hemodinámicas por la carótida. La temperatura se monitoriza mediante medición rectal, manteniéndola a 37°C con ayuda de una mesa quirúrgica con control de temperatura y una lámpara de infrarrojos. Con el ratón en la misma posición, se hace una incisión en la zona inguinal para acceder al tejido adiposo blanco perigonadal del lado izquierdo. Una vez expuesta la grasa se identifica un solo nervio multifibroso y se genera un charco de aceite mineral de elevado peso molecular. A continuación se precede a su aislamiento y disección lejos de tejido conectivo y de los vasos sanguíneos. El nervio ya aislado se coloca cuidadosamente en un bipolar de calibre 36 con electrodos de hilo de platino-iridio y se sella con gel de silicona (Kwik-Sil; WPI, Sarasota, FL). La señal de la SNA se amplificó hasta 105 veces con un preamplificador Grass P5 y filtrado por un corte de baja (100hz) y alta (1000 Hz) frecuencia respectivamente. Estas señales amplificadas y filtradas se dirigen: i) un sistema de altavoces y a un osciloscopio (modelo 54501A, Hewlett-Packard Co) para la observación auditiva y visual de la SNA del tejido adiposo y ii) por un convertidor análogo-digital de MacLab (modelo 8S, ADInstruments), dónde se localizó la señal de ruido de fondo, colocando el cursor de medición para detectar el número de picos por segundo por encima de ese umbral (histograma de frecuencias). Tras todo el procedimiento quirúrgico, y la puesta a punto del registro del SNA, al ratón se le deja estabilizar durante 15-20 minutos. La actividad basal del nervio simpático del tejido adiposo se registró durante un periodo control de 10 minutos seguido de una inyección ICV del vehículo (solución salina, 2 μ l) o MCH (dosis de 5 o 10 μ g, 2 μ l). La medición de SNA de la grasa se registró de forma continuada durante las

¹ Procedimiento realizado por el Dr. Donald A. Morgan y el Dr. Kammal Rahmouni, en el departamento de farmacología del Caver College of Medicine de la Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa, EEUU.

siguientes 4 horas. Para evaluar el efecto de la administración ICV de MCH (10 µg) en la actividad del nervio eferente respecto al nervio aferente, en algunos ratones, los nervios se cortaron en la parte distal y proximal respectivamente en el lugar de registro antes del tratamiento. Cualquier tipo de actividad de fondo detectado en estos ratones de nervios seccionados se resta a la SNA del tejido adiposo gonadal.

2.8 Fenotipado metabólico

Para el fenotipado metabólico durante los tratamientos, se determinó la composición corporal utilizando un aparato de resonancia magnética nuclear para roedores (NMR, Echo Medical Systems) y el gasto energético, ingesta, actividad locomotora y tasa de respiración metabólica (RQ) utilizando un sistema de 12 cajas con medición simultánea de calorimetría indirecta (LAbMaster TSE Systems). El sistema permite que se puedan medir los parámetros de forma continua y simultáneamente en un máximo de 12 animales.

❖ **Composición corporal.**

Antes y después de los procedimientos experimentales, la composición corporal fue estimada mediante el NMR para determinar la variación de masa grasa y magra.

❖ **Sistema de calorimetría indirecta**

Para el estudio de los factores que regulan la partición nutricional, se utilizan sistemas de fenotipado indirecto o sistemas de calorimetría indirecta. Este tipo de sistema nos permite reflejar el estado nutricional del organismo en estudio bajo diferentes condiciones genéticas, farmacológicas u usando distintos tipos de dieta. El calcula de forma simultánea la actividad locomotora, la ingesta y la tasa de respiración metabólica. Con estas variables se puede hallar el gasto energético y establecer patrones de partición nutricional en las diferentes condiciones de estudio.

Este aparato registra el gasto energético, actividad locomotora, ingesta y tasa de respiración. Cada 20 minutos, durante 48 horas, el LabMaster toma medidas de ingesta, consumo de O₂ (vO₂), producción de CO₂ (vCO₂) y actividad locomotora entre otros. Los animales se adaptaron al nuevo tipo de ambiente instalándolos en cajas de adaptación durante 48 horas antes de las mediciones. Con los valores obtenidos, se calculó la RQ de cada individuo durante cada medición dividiendo el vCO₂ entre el vO₂ (vCO₂/vO₂). El valor de gasto energético (EE) resultante (kcal/48h) fue también normalizado con el peso total del animal o con la masa magra, medido al final del proceso con NMR (EE/g masa magra). La actividad locomotora se detecta utilizando unos sensores de luz infrarroja que registran el movimiento en sentido horizontal y vertical.

- **Tasa de respiración metabólica (*respiratory quotient*; RQ)**

Nos permite detectar cuál es el principal combustible oxidado en el organismo estudiado. La RQ es, en términos de medición, la relación entre el volumen de CO₂

producido como residuo oxidativo entre el O_2 consumido para la respiración (VCO_2/VO_2). Los valores de la ratio nos van a determinar cuál es el macronutriente preferente para realizar la oxidación (Tabla 2) (364).

Tabla 2 | Valores de RQ para cada macronutriente.

Macronutriente	RQ	Energía liberada (kcal)
Carbohidrato	1	5,047
Proteína	0,718	4,735
Ácido graso	0,802	4,735

Sin embargo, los valores mostrados en la tabla 2 son obtenidos a partir de la oxidación de un mol de cada uno de los macronutrientes. En la medición de la RQ para realizar estudios comparativos o determinar el valor obesogénico de una dieta es necesario tener un valor de referencia asociado a la composición nutricional de la dieta (*food quotient*; FQ) puesto que en cada tipo de dieta, la RQ basal puede diferir de los valores absolutos mostrados en la tabla y al relativizarlo con el valor FQ de la dieta nos puede dar una idea de estado del balance energético (365). Así pues, en un estudio de 24 horas, donde la ingesta y el gasto energético están equilibrados, no hay variación de su masa y los valores de RQ y FQ son iguales. La sobre alimentación favorece la ganancia de peso aumentando el almacenamiento de grasa, desplazando la RQ por encima del valor de la FQ indicando un balance energético positivo (se favorece la oxidación de la glucosa). De manera opuesta, un defecto en la alimentación desencadena pérdida de peso mediante la oxidación de lípidos, desplazando el valor de la RQ por debajo del FQ indicando un balance energético negativo (366).

- **Determinación del gasto energético**

Se establece por las kilo-calorías consumidas en las 24 horas de medición utilizando la RQ. En los estudios metabólicos es importante relativizar los parámetros de la variación del gasto energético, con la variación del peso y composición corporal. Estos parámetros pueden variar o no ante determinados tratamientos, manipulaciones génicas o estados metabólicos. Para poder aislar el efecto de la variación metabólica por las manipulaciones anteriormente mencionadas es necesario normalizar el gasto energético. El método más extendido es la corrección sobre el peso total del individuo a estudio. Sin embargo dividir el gasto energético entre el peso corporal no tiene en cuenta las diferencias sobre la composición corporal. Los diferentes tejidos tienen tasas metabólicas distintas, la medición de la composición corporal es importante a la hora de analizar el gasto energético entre animales delgados y obesos. En animales obesos, el incremento del peso corporal es debido a un aumento de la masa grasa, tejido que tiene una actividad metabólica menor que tejidos libre de masa grasa (masa magra) (367,368). Si bien esta relación nos puede dar una mayor sensibilidad a la hora de analizar el gasto energético utilizando la composición corporal, en ocasiones puede que esta división puede sobre compensar el efecto de la masa libre de grasa. Para

asegurar el ajuste entre el gasto energético y la masa magra, se recomienda enfrentar en un gráfico de dispersión la masa magra (eje X) y el gasto energético (eje Y) dónde se observará el efecto de la composición corporal sobre el metabolismo basal. Esta observación requiere de un análisis estadístico que pueda reflejar el efecto y para ello se recomienda un análisis de la covarianza (ANCOVA) que elimina la heterogeneidad generada sobre gasto energético por la influencia de la masa magra (variable independiente continua) y el genotipo, tratamiento o estado metabólico (variable discreta independiente) (369).

2.9 Perfusión intracardiaca

Para la realización de inmunohistoquímica sobre tejido animal, es necesario obtener el tejido *post-mortem* preservando sus características morfológicas y moleculares lo más parecido posible a las que poseía en estado vivo. Para ello se debe inocular una solución fijadora en el sistema circulatorio del animal con el fin de preservar los tejidos para su posterior estudio histológico.

En este caso, se realizó la perfusión de gran circuito en rata y ratón. Tras una anestesia general, se disecciona el animal y se abre la caja torácica con el fin de exponer el corazón. Previo a la canulación cardiaca se inyecta unos 200 µl de heparina (Heparina sódica 5%, Mayne pharma) para evitar la coagulación en el procedimiento. Tras una pequeña incisión en ventrículo izquierdo, se introduce una cánula hasta la entrada de la aorta. Tras inmovilizar la cánula se secciona la aurícula derecha para abrir el circuito y se bombea suero fisiológico isotónico (Physan) para eliminar la sangre del sistema circulatorio. Cuando el hígado se observa más clareado y la salida de la aurícula derecha sólo expulsa suero salino, se procede a la infusión de la solución de fijado, formalina 10% en tampón fosfato. La completa rigidez del animal indica la total fijación. Al finalizar, se extraen los tejidos de interés manteniéndolos en solución de fijado durante 24 horas. Tras la fijación, los tejidos se pasan a alcohol al 70% para inclusión en parafina, o a solución fosfato para inmunohistoquímica en fresco cortado

3. con vibrotomo.

Técnicas experimentales *in vitro*

3.1 Análisis de RNA mensajero por PCR en tiempo real

3.1.1 Purificación de RNA

- Extracción de RNA del tejido

Para la extracción total del contenido de RNA de cada tejido, se utiliza el reactivo Trizol (Invitrogen), compuesto que contiene tiocinato de guanidinio para la degradación proteica y fenol-cloroformo para el aislamiento de ácidos nucleicos. Todo el H₂O que se utiliza en este protocolo debe ser pre-tratado a 37°C en agitación

Material y métodos

durante una hora con dietilpírocabonato 0,1 % (DEPC) para inactivar RNAsa. Posteriormente, para desactivar los restos del DEPC se autoclava la mezcla. Se corta el tejido previamente congelado con nieve carbónica y se homogeniza junto con el Trizol en una máquina de homogenización mecánica (Tissue Lyser, Quiagen) con ayuda de una bola de acero añadida al tubo de polipropileno de 2 ml. Para la extracción de RNA en grasa e hígado se añade 1 ml y para hipotálamo 250 μ l de Trizol. A continuación se centrifuga 5 minutos a 13200 rpm y se pasa todo el homogenizado a otro tubo de 2 ml.

- **Aislamiento de RNA**

A continuación se aísla en RNA añadiendo 250 μ l de cloroformo, se agita vigorosamente y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar a 4°C durante 15 minutos para que se separen la fase acuosa (RNA) de la orgánica (proteínas y lípidos) quedando el DNA en la interfase. Se toma la fase acuosa enriquecida de RNA y se añaden 3 volúmenes más de isopropanol. Se agita vigorosamente y se mete a -20°C durante 10 minutos para que el RNA. A continuación se centrifuga a 13.200 rpm a 4°C durante otros 10 minutos.

- **Lavado del RNA**

Una vez eliminado el sobrenadante, se lava el precipitado de RNA añadiendo 1 ml de etanol al 70% (disuelto con H₂O DEPC), se agita y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 13200 rpm a 4°C. Se elimina el etanol y para purificar más aún el precipitado, se centrifuga de nuevo durante un minuto para eliminar todo el etanol residual posible. Para finalizar, se resuspende el precipitado en H₂O DEPC (RNA de grasa: 40 μ l; RNA de hígado: 300 μ l; RNA de hipotálamo: 30 μ l) calentándolo a 60°C durante 15 minutos.

- **Cuantificación de RNA**

Para determinar la pureza del contenido de RNA de la muestra se utiliza un espectrofotómetro que determine el cociente de la absorbancia del RNA (260 nm) y la de las proteínas (280 nm). Se considera una pureza aceptable la relación 260/280 de entre 1,8 y 2.

Una vez determinada la pureza, se toma el valor de absorbancia de 260 nm para determinar la cantidad de RNA extraído. Se realizan alícuotas de cada muestra para la retrotranscripción a una concentración de 50 ng/ μ l para grasa y 10 ng/ μ l para hígado e hipotálamo.

3.1.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en una amplificación del RNA extraído en forma de DNA complementario (DNAC). De esta forma se amplifica la cantidad de RNA contenido en la muestra y al convertir la secuencia de RNA a DNA se asegura la estabilidad de la molécula durante la PCR en tiempo real. La reacción se realiza en un volumen final de 30 μ l con las siguientes proporciones:

→ H₂O DEPC: 3,58 μ l

- Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer; Invitrogen): 6 μ l
- Mezcla de dNTPs (dTTp, dCTp, dGTP, dATp a 10 mM cada uno): 6 μ l MgCl₂ de 50 mM: 1,5 μ l
- Cebadores aleatorios (Random primers; Invitrogen): 0,17 μ l
- Inhibidor de RNAsa (RNAsaOUT®; Invitrogen): 0,25 μ l
- Reverso transcriptasa (m-MLV; Invitrogen): 1 μ l
- Muestra: 10 μ l

La mezcla se incuba en un termociclador con un programa de pasos consecutivos de: 1 hora a 37°C; 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. Una vez finalizado las muestras se almacenan a 4°C.

3.1.3 PCR en tiempo real

Esta técnica permite la cuantificación de la expresión génica en términos relativos. En nuestro caso consiste en expresar el cambio en los niveles de expresión de mRNA de un gen en forma de DNAc comparándolo con los niveles de expresión de mRNA de un gen control o normalizador. La RT-PCR es un sistema basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre dos moléculas contenidas en una sonda. El proceso consiste en el diseño de cebadores para amplificar el DNAc del gen de estudio y una sonda cebadora TaqMan®. Esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso. Cuando la polimerasa detecta los cebadores y amplifica, se topa con la sonda degradando por el extremo 5' una de las moléculas (quencher) que impedía la emisión de la fluorescencia de la molécula del extremo 3'. El aparato debe ser sensible al fluoróforo y tras cada ciclo de amplificación, detecta la intensidad de fluorescencia emitida permitiendo la cuantificación del material amplificado. En nuestro caso el fluorescente para sonda TaqMan elegido es el TAMRA con una absorción máxima de 560 nm y un máximo de emisión de 580 nm.

Para determinar la concentración de DNAc en cada muestra se analiza el valor CT. El CT es el ciclo a partir del cual se amplificado la mitad del contenido del DNAc. El valor del CT es inversamente proporcional a la cantidad de DNAc. Utilizando la curva patrón con una mezcla del DNAc de todas las muestras, se relativiza la cantidad de mRNA de cada gen contenido en la muestra (normalizado con el gen de referencia *HPRT*). La mezcla de la reacción de la RT-PCR se realiza en un volumen final de 12 μ l y contiene:

- H₂O-MQ: 2,82 μ l
- Cebadores directo (10 mM): 0,36 μ l
- Cebador reverso (10 mM): 0,36 μ l
- Sonda Taqman®: 0,36 μ l
- TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems): 6 μ l
- Muestra resultado de la retrotranscripción (0,01 μ g): 2 μ l

Material y métodos

EL protocolo usado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en un aparato PCR en tiempo real 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Todas las muestras se analizan por duplicado incluyendo un control blanco (sin muestra) y seis muestras más para hacer una curva patrón para cada gen analizado incluyendo el gen normalizador. La curva patrón consiste en diluciones seriadas a partir de del primer punto consistente en la mezcla del resultado de la retrotranscripción de todas las muestras. EL análisis de los datos se realiza analizando los CT del valor de cada gen (Tabla 3) normalizado a los CT del gen control (*HPRT*) y se expresa comparando la media de los valores entre cada grupo experimental.



Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico

Tabla 3 | Lista de cebadores y sondas para el análisis de la expresión de ARNm de los genes detallados por PCR en tiempo real.

GEN	IDENTIFICACIÓN	CEBADOR	SECUENCIA
ACCα	NM_022193	Directo	5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT-3'
		Reverso	5'-AGTCGCAGAAGCAGCCATT-3'
		Sonda	FAM-5'-ACTTTGAAGATTCGTCAGGATCTTTGATGA-3'-TAMRA
FAS	NM_017332	Directo	5'-GACATTTTCATCAGGCCACC-3'
		Reverso	5'-CCTCTAGCAGCCGCACCTC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGCCAGGACAGGAACCG-3'-TAMRA
SCD-1	NM_139192.2	Directo	5'-TGCCAGAGGGAATAGGGAAA-3'
		Reverso	5'-CTCTCCATCCTTACTTACAAACCA-3'
		Sonda	FAM-5'-TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCACGCACGG-3'-TAMRA
CPT-1L	NM_031559	Directo	5'-ATGACGGCTATGGTGTCTCC-3'
		Reverso	5'-TCATGGCTTGTCTCAAGTGC-3'
		Sonda	FAM-5'-TGAGACAGACTCAGACCGCT-3'-TAMRA
LPL	NM_012598	Directo	5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCTTCA-3'
		Reverso	5'-CCGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'
		Sonda	FAM-5'-CCTGCCGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA
CPT1-M	NM_013200.1	Cebadores comerciales de Applied Biosystems (Ref. Rn01407782_g1)	
HPRT	NM_012583	Directo	5'-AGCCGACCGGTTCTGTATC-3'
		Reverso	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Sonda	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCAGCGTCGTGAT-TAMRA
ADRβ1	NM_012701	Directo	5'-TCTACGTGCCCTGTGCAT-3'
		Reverso	5'-GCTGTGATCTTCTTACCTGTTT-3'
		Sonda	FAM-5'-TGTACCTCCGGGTGTTCCGCGA-3'-TAMRA
ADRβ2	NM_012492	Directo	5'-CTTCCAGGTGGCCAAAAG-3'
		Reverso	5'-GCTGAGGTTTTGGGCATGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-TGCAGAAGATAGACAAATCCGAGGGCAG-3'-TAMRA
ADRβ3	NM_013108	Directo	5'-CCTTCCAGCTAGCCCTGTT-3'
		Reverso	5'-TGCTAGATCTCCATGGCTCTTCA-3'
		Sonda	FAM-5'-AACTCACGCTCAACAGGTTTGATGGC-3'-TAMRA
UCP1	NM_012682	Directo	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Reverso	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAM
LIPIN	NM_001012111	Directo	5'-CCTTACTTCTGGCGATGCA-3'
		Reverso	5'-CATCTTATCTCTCATGATGGATTCC-3'
		Sonda	FAM-5'-TCCAGAAACCTTTGCCAAAGGCCA-3'-TAMRA
Perilipin	NM_013094	Directo	5'-GCATCGAGAAGGTGGTAGAATATCTC-3'
		Reverso	5'-TGGGAGCCTTCTGCGTCTT-3'
		Sonda	FAM-5'-AGTCAGCCCTTCTTCTCAGGACGGCA-3'-TAMRA
MTP	NM_227765	Directo	5'-CACCTGGCCACCACTGTTCT-3'
		Reverso	5'-GGTGGTATATCCTGTTCAAGGTCTTC-3'
		Sonda	FAM-5'-ATGTCTCTTTCATCACAGATGAGGTG-3'-TAMRA
Scarb 1	NM_031541.1	Cebadores comerciales de Applied Biosystems (Ref. Rn00580588_m1)	
FXR	NM_021745	Cebadores comerciales de Applied Biosystems (Ref. Rn00572658_m1)	
LRH1	NM_021742.1	Cebadores comerciales de Applied Biosystems (Ref. Rn00572649_m1)	
LDLR	NM_175762.2	Cebadores comerciales de Applied Biosystems (Ref. Rn00598442_m1)	
PPARα	NM_013196	Directo	5'-TGGAGTCCACGCATGTGAAG-3'
		Reverso	5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGCAAGGGCTTCTTTCGGCGA-3'-TAMRA
PGC1α	NM_031347	Directo	5'-CGATCACCATATCCAGGTCAAG-3'
		Reverso	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGATG-3'
		Sonda	FAM-5'-AGGTCCCAGGCGTAGATCCTTCAAGA-3'-TAM
SREBP1	NM_011480	Directo	5'-CTCATCAACAACCAAGACAG-3'
		Reverso	5'-TGTTGCCATGGAGATAGCATCTC-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCAGCTGCATGCCATGGGCAAGTA-3'-TAMRA

3.2 Análisis de proteína por *western blot*

Para determinar los niveles de expresión proteica de los diferentes experimentos, realizamos la técnica de *western blot* de la que se obtiene como resultado una imagen fotográfica en la que sólo se disciernen aquellas proteínas contra las que se haya añadido un anticuerpo por inmunodetección indirecta. La imagen se obtiene por la impresión en una placa radiográfica de la quimioluminiscencia proveniente de una membrana en la que se inmovilizaron las proteínas de una muestra, separadas por su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a una proteína constitutiva usada como control de carga proteica.

3.2.1 Extracción de proteína

De las muestras de tejido conservadas a -80°C , se obtuvo una pequeña porción para su procesado. Durante todo el proceso las muestras se deben de mantener en hielo durante el para evitar la degradación de las proteínas. El tejido y el tampón de lisis se colocan junto con una bolita de acero en un tubo de polipropileno de 2 ml y se homogeniza en el *Tissue lyser*. El tampón de lisis (Tabla 4) facilita, junto con la homogenización mecánica, la rotura del tejido y los componentes celulares disolviéndose las proteínas del tejido en el mismo.

Tabla 4 | Componentes del tampón de lisis disuelto en agua destilada.

Tampón de lisis	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Tritón X-100	1% vol/vol
Ortovanadato Sódico	1 mM
Fluoruro Sódico	50 mM
Pirofosfato Sódico	5 mM
Sacarosa	0,27 M
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	1 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE)	1 pastilla/50 mL

Tras las homogenización las muestras se centrifugan a 13200 rpm a 4°C durante 30 minutos. A continuación el sobrenadante (extracto proteico) se alicuotea a un tubo nuevo, descartando el precipitado (núcleos y artefactos de tejido) y la posible capa superior de grasa. En el caso de las muestras de tejido adiposo e hígado esteatósico se deben de realizar varias centrifugaciones sobre el extracto inicial para descartar la grasa.

3.2.2 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas contenidas en el extracto realizamos un método colorimétrico con la solución de Bradford (Bio-rad Protein Assay Kit). El método se basa en el cambio del color marrón del colorante azul comassie G250 en un medio con ácido fosfórico (absorbancia 466 nm) al azul en presencia de proteínas. El colorante es de naturaleza hidrofóbica y se introduce en el interior de las estructuras proteicas, evitando su contacto en el ácido fosfórico de la solución tomando su original tonalidad azul (595 nm). Para la determinación en nuestras muestras realizamos una curva patrón de sero-albúmina bovina (BSA), realizando una curva de diluciones seriadas a partir de la máxima concentración (1 mg/mL). Realizamos una dilución de las muestras para poder realizar la cuantificación de 1:50 para el hígado y 1:25 para la grasa. Todas las muestras se miden por duplicado junto con la recta patrón, el punto 0 y la solución de Bradford en un espectrofotómetro a 550 nm. Previamente la mezcla de las muestras con el Bradford se incubaba a 37 °C durante 7 minutos.

3.2.3 Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Tras la cuantificación debemos preparar las muestras junto con el tampón de carga (tampón de Laemmli, tabla 5). Este tampón permite dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño gracias al dodecil-sulfato sódico (SDS), y permite la desnaturalización de las proteínas con el β -mercaptoetanol, eliminando los puentes disulfuro. Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga en la electroforesis (16 μ l) haya 20 μ g de proteína de hígado, 30 μ g de proteína de grasa y 12 μ g de proteína de cerebro. Tras añadir el tampón de carga y siempre previamente a realizar la electroforesis, las muestras deben calentarse a 95 °C durante 5 minutos para su completa desnaturalización. Una vez utilizadas se almacenan a -20 °C. El extracto original de proteínas sin tampón de carga se debe almacenar a -80 °C.

Tabla 5 | Composición del tampón de Laemmli disuelto en agua destilada.

Tampón Laemmli	
Tris-HCl pH 6,7	250 mM
Glicerol	50% vol/vol
SDS	10% peso/vol
β -Mercaptoetanol	5% vol/vol
Azul de bromofenol	0,0005 % peso/vol

La electroforesis SDS-PAGE consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular. Se incluyen las proteínas desnaturalizadas y de carga negativa en un gel de acrilamida-bisacrilamida. Al aplicarle una corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo de la corriente, separándose por su peso molecular en gradiente de mayor a menor.

3.2.4 Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE consiste en la separación de las proteínas por su peso molecular. Se incluyen las proteínas desnaturalizadas y de carga negativa en un gel de acrilamida-bisacrilamida (30% Acrilamida/Bis 29:1; Bio-Rad). Al aplicarle una corriente eléctrica, las proteínas migran a través del gel hacia el polo positivo de la corriente, separándose por su peso molecular en gradiente de mayor a menor. La concentración de acrilamida-bisacrilamida determinará el tamaño del poro de la malla formada por el gel, y por tanto el grado de separación de las proteínas según su tamaño. El gel está formado por dos fracciones:

- **Gel concentrador:** se localiza en la parte superior sobre el que se incluye un peine para formar pocillos y poder introducir la muestra. Este gel de 5% permite homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador (Tabla 6).
- **Gel separador:** que permite la separación de las proteínas por el peso molecular. El porcentaje de acrilamida-bisacrilamida varía en función del tamaño de las proteínas que queramos estudiar. En nuestro caso los porcentajes rondan entre el 8% y el 12% (Tabla 7).

Tabla 6 | Composición del gel SDS-PAGE concentrador.

Gel concentrador 5%	
H₂O destilada	4,1 mL
30% Acrilamida/Bis	1 mL
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0,75 mL
10% SDS	0,06 mL
10% persulfato amónico	0,06 mL
TEMED	0,006 mL

Tabla 7 | Composición de geles SDS-PAGE separador a porcentajes 8, 10 y 12.

Gel separador	8%	10%	12%
H₂O destilada	11,5 mL	9,9 mL	8,2 mL
30% Acrilamida/Bis	6,7 mL	8,3 mL	10 mL
Tris-HCl 1 M pH 6.8	6,3 mL	6,3 mL	6,3 mL
10% SDS	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
10% persulfato amónico	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,015 mL	0,01 mL	0,01 mL

Los geles se montan en la cubeta de electroforesis junto con el tampón de electroforesis (Tabla 8) que permite la transmisión del voltaje. Se añaden las muestras junto con un marcador de proteínas coloreadas de peso molecular conocido (Bio-rad) y se conecta a la fuente de alimentación a un voltaje de entre 80-100 V.

Tabla 8 | Composición del tampón de electroforesis disuelto en agua destilada.

Tampón de electroforesis	
Tris-HCl	200 mM
Glicina	20 mM
SDS	1% peso/vol

3.2.5 Transferencia semi-húmeda

Una vez que las proteínas se separaron en el SDS-PAGE, las proteínas contenidas en el gel se transfieren a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; Immobilon-P, Millipore) permitiendo que las proteínas queden fijadas y quedan inmobilizadas que permite el proceso de inmunodetección. El proceso de transferencia del gel a la membrana es de nuevo dependiente del voltaje, en este caso se realiza en un soporte horizontal donde se ponen ambos en contacto acotados por papel absorbente empapado de tampón de transferencia (Tabla 9) que favorece la transmisión de la corriente en el proceso. Las proteínas pasan del gel de acrilamida a la membrana de PVDF donde quedan inmobilizadas. El proceso se realiza a amperaje constante 0,8 mA por cm² durante una hora y 40 minutos.

Tabla 9 | Composición del tampón de transferencia disuelto en agua destilada.

Tampón de transferencia	
Tris-HCl	40 mM
Glicina	40 mM
SDS	0,36% peso/vol
Metanol	20% vol/vol

3.2.6 Inmunodetección

- **Bloqueo:** en primer lugar, se realiza el bloqueo de la membrana recién transferida. Este proceso consiste en incubar la membrana durante una hora a temperatura ambiente en agitación con una solución de BSA al 5% disuelto en tampón de lavado (TBS-T, Tabla 10). El BSA en disolución se une a todos aquellos lugares de la membrana que no estén ocupados por las transferidas desde el gel. De esta forma, los anticuerpos sólo podrán unirse a su antígeno específico, reduciendo el ruido de fondo y las inespecificidades. En ocasiones, hay anticuerpos que son más inespecíficos y en estos casos se bloquea con leche en polvo desnatada al 5%.

Tabla 10 | Composición del tampón de lavado de membranas disuelto en agua destilada.

Tampón de lavado (TBS-T)	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	146 mM
Tween-20	0,1% vol/vol

- **Anticuerpo primario:** tras el bloqueo de la membrana se incuba con el anticuerpo específico contra la proteína de estudio (Tabla 11). El anticuerpo se diluye según las instrucciones del fabricante (1:500/1:1000) en TBS-T al 3% y se deja incubando en agitación una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Tras la incubación se retira el anticuerpo y se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T.

- **Anticuerpo secundario:** para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario, se incuba la membrana con un anticuerpo secundario

Material y métodos

asociado a peroxidasa que reconoce la parte constante del primario. Se diluye en solución de incubación a una concentración de 1:5000. El tipo de secundario utilizado vendrá determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario.

- **Quimioluminiscencia:** para detectar el anticuerpo secundario, se incuba la membrana con el sustrato de la peroxidasa y un potenciador de quimioluminiscencia (Pierce® ECL western blot substrate, Thermo Scientific) a volúmenes iguales (1:1) incubándose en agitación 1 minutos en oscuridad. Inmediatamente después, para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coloca la membrana en un casete de autorradiografía y se expone a una película fotográfica (Fujifilm). Tras el revelado a distintos tiempos utilizando líquidos de revelado y fijado en una sala oscura, se observa el resultado de la interacción de los anticuerpos con la proteína de la muestra.

- **Análisis de resultados:** para analizar los datos, se digitalizan las imágenes de las placas fotográficas mediante un escáner de alta resolución. Para determinar la cantidad relativa de proteína en cada muestra, se utiliza el programa ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>), que detecta la cantidad de píxeles de la imagen de la proteína en todas las muestras de una misma placa radiográfica. El área de medición debe ser igual para todas las muestras. Estos valores se relativizan respecto al control constitutivo (β -actina), que debe ser detectada por cada gel de electroforesis. El valor final es normalizado y porcentuado respecto al grupo control de cada experimento.

Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico

Tabla 11 | Lista de anticuerpos utilizados para la inmunodetección por *western blot* o inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	TAMAÑO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
ACC	265 kDa	1:5000	Millipore	#04-322
fosfo-ACC (Ser79)	257 kDa	1:1000	Millipore	#07-303
AMPKa1	63 kDa	1:1000	Millipore	#07-350
AMPKa2	63 kDa	1:1000	Millipore	#07-363
fosfo-AMPKalfa (Thr172)(40H9)	63 kDa	1:1000	Cell Signalling	#2535
Lipoprotein-lipasa (LPL)	56 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-32885
HSL (lipe)	90-117 kDa	1:1000	Abcam	ab-45422
fosfo HSL (ser 680)	81-83 kDa	1:1000	Cell Signalling	4126
UCP 1	33 kDa	1:1000	Abcam	ab23841
CPT1M (H-120)	75 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-20670
FAS (H-300)	270 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-20140
PGC-1 (H-300)	90 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-13067
CIDE-A (N-19)-R	26 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-8730-R
JNK1/3 (C-17)	46-54 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-474
fosfo-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)	46-54 kDa	1:1000	Cell Signalling	#4671
Caspasa-3 (8G10)	17, 19, 35 kDa	1:1000	Cell Signalling	9665
Cleaved Caspasa 3 (ASP 173)	17, 19 kDa	1:1000	Cell Signalling	9664
BIP(GRP78)	78 kDa	1:1000	Cell Signalling	#3183
XBP1	29 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-7160
CHOP (GADD R-20)	26 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-793
IRE 1	110 KDa	1:1000	Abcam	ab-37073
fosfo-IRE1 (Ser724)	110 kDa	1:1000	Novus Biologicals	NB100-2323
elf2 α	36 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-11386
fosfo-elf2 α	36 kDa	1:500	Santa cruz biotechnology	sc-101670
β Actin	42 kDa	1:5000	Sigma	A 5316
phospho-PERK (Thr 981)	125 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-32577
GFP	30 kDa	1:5000	Abcam	ab290
pro-MCH	40-54 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-28931
MCH-R1	45 kDa	1:1000	Abnova	PAB16225
AGRP	14 kDa	1:500	Abcam	ab32882
kappa-opioide Receptor 1	42 kDa	1:1000	Sigma	SAB2501442
Prodinorfina	35 kDa	1:1000	Abcam	ab11137
c-Fos	50 kDa	1:1000	Santa cruz biotechnology	sc-52
anti-DSRed Express	37 kDa	1:5000	Clontech	#632496
IgG-CY5 cabra	secundario	1:5000	Jackson labs	705-175-147
IgG-CY3 conejo	secundario	1:5000	Jackson labs	711-165-152
IgG-HPRT ratón	secundario	1:5000	Dakocytomation	P0260
IgG-HPRT conejo	secundario	1:5000	Dakocytomation	P0448
IgG-HPRT cabra	secundario	1:5000	Dakocytomation	P0449

3.3 Análisis histológico de tejido central y periférico

Para determinar cómo los diferentes tratamientos y dietas afectan a la morfología y contenido de grasa del hígado y del tejido adiposo blanco, se realizaron tres técnicas histológicas: *Oil-red O*, hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Para observar la distribución anatómica de los grupos neuronales en las secciones de tronco encéfalo se realizó la tinción de Nissl. Tras las tinciones se observaron y fotografiaron los cortes con un microscopio (Zeiss) utilizando los objetivos de 10, 20 y 40 aumentos.

3.3.1 Tinción *Oil-red O*

Esta tinción colorea las gotas lipídicas del tejido en un tono rojizo. Para ello secciones congeladas de hígado se cortaron en un criostato (8 μm) y se colocaron en portas. Estos portas se sumergieron en tinción *Oil-Red O* durante 10 minutos. Después se lavaron en H_2O destilada y se contratiñeron con hematoxilina Meyers durante 3 minutos. Los portas se montaron en medio de montaje acuoso. Tinción hematoxilina/eosina.

Esta técnica tiñe las estructuras celulares mostrando de forma general, la estructura del tejido. La hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica) por lo que tiñe de azul estructuras basófilas (de naturaleza ácida) como los núcleos celulares. Por otro lado, la eosina es de naturaleza ácida tiñendo de rosa estructuras de naturaleza básica (acidófilas) como el citoplasma. Para la tinción, el tejido debe de estar incluido en parafina previa perfusión del animal. Los cortes de parafina son preparados con xilol para eliminar los excesos de la misma. Después se pasan los cortes por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100°, 95° y 70°). Tras un lavado con H_2O destilada se sumerge en hematoxilina durante 10 minutos, se lava e inmediatamente se pasa por un alcohol ácido. Tras lavarlo se sumerge 30 segundos en eosina. Para deshidratar la muestra se pasan los cortes por mismo los alcoholes en graduación creciente, y antes de montar se deja sumergido 10 minutos en xilol.

3.3.2 Tinción tricrómica de Masson

En este caso, la tinción es una combinación de tres tinciones que remarca los depósitos de colágeno al mismo tiempo que la estructura del tejido, en este caso el hígado. La estructura celular se observa rojo/rosado, los núcleos de violeta y el colágeno azul intenso. Para la tinción, el tejido debe de estar incluido en parafina previa perfusión del animal. Los cortes del tejido parafinado (8 μm) se desparafinan sumergiéndolos en xileno en durante unos 10-15 minutos. Las secciones posteriormente se hidratan con lavados seriados en alcoholes de 100°, 96°, 70°, y 50°; después se lavan con agua destilada. Tras el lavado, se sumergen los cortes en hematoxilina durante 3 minutos, se lava e inmediatamente y se sumerge en rojo Masson durante 5 minutos. Para retirar el exceso de rojo, se incuban con ácido fosfomolibdico durante 6 minutos. Tras un lavado en agua destilada, se tiñe con azul

de anilina durante 2 minutos. Se vuelven a lavar los cortes, y se procede a deshidratar con alcohol, se aclara con xileno y se montan los portas con los cubres y aceite balsámico sintético.

3.3.3 Tinción de Nissl

La tinción de Nissl del tronco encéfalo, se realizó siguiendo el protocolo de Bielschowsky-Plien añadiendo un 0,1% de violeta de cresilo. El colorante violeta de cresilo, es una anilina básica (con carga positiva) que se une a las regiones basófilas de las células del tejido nervioso. Esta tinción fue elegida por su idoneidad para el estudio de detalles citológicos y citoarquitectónicos.

Se extrae el tronco-encéfalo situado en la base del cerebro de la rata perfundida. EL tejido queda en formalina 10% durante 24 horas. A continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1 M durante 1 hora. Mediante el uso de un vibrotomo (Vibratome Series 1000, The Vibratome Company) se realizan secciones de 50 μm de grosor y se recogen en el tampón fosfato 0,1 M.

Tras un par de lavados con agua destilada, se sumerge carbonato de litio 5% durante 10 minutos. Tras tres varios lavados con alcohol 70°, se realizó otro final con agua destilada. Los cortes se incubaron durante 6 minutos en una solución 0,1% de violeta de cresilo. Tras 3 lavados con alcohol a 96° seguido de otros tres lavados con alcohol 100°, los cortes se aclararon con xilol y se montaron en portas con aceite balsámico sintético.

3.4 Inmunohistoquímica

Con esta técnica se pretende detectar en el propio tejido la presencia y localización de determinadas proteínas. En ocasiones también se requiere determinar la co-localización celular de dos proteínas diferentes. El proceso dependerá no sólo del tipo de tejido, sino también del tipo de método para revelar la señal (diaminobenzidina (DAB), fluorescencia), de las características del anticuerpo. En este trabajo se realizó inmunohistoquímica en cerebro e hígado de rata y ratón. Para el revelado de la señal se utilizó tanto DAB como fluorescencia. Para realizar las inmunohistoquímicas, el animal debe de ser previamente perfundido con formalina al 10% tal y como se ha descrito con anterioridad.

3.4.1 Detección de c-Fos en el tronco-encéfalo

Se extrae el tronco-encéfalo situado en la base del cerebro de la rata perfundida. El tejido queda en formalina 10% durante 24 horas. A continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1 M durante 1 hora. Mediante el uso de un vibrotomo (Vibratome Series 1000, The Vibratome Company) se realizan secciones de 50 μm de grosor y se recogen en el tampón fosfato 0,1 M.

Para la detección inmunohistoquímica de la expresión de c-Fos, se incubaron secciones con anticuerpo primario c-Fos en flotación en dilución 1:1000 durante toda

Material y métodos

la noche a 4 °C; al finalizar se hicieron 2 lavados de 10 minutos con tampón fosfato 0,1 M. Para inhibir la peroxidasa endógena, y evitar que el sistema de detección muestre falsos positivos, se incubaron los cortes con H₂O₂ al 3% en agua destilada durante 10 min y se hicieron nuevamente 2 lavados con tampón fosfato 0,1 M de 10 minutos.

Como sistema de detección se utilizó el kit *EnVision policlonal* (polímero de dextrano conjugado con anticuerpos anti-conejo y con peroxidasa; Dako,) durante 30 minutos. Se prepara el DAB para la detección por reacción con peroxidasa según las instrucciones del fabricante (1 gota de DAB en 1 mL del disolvente suministrado; Dako). Tras el *EnVision*, se hicieron 2 lavados de 10 minutos y se incubó con DAB durante 10 minutos. Al finalizar la reacción, las secciones se extienden en portas xilanizados (Histobond, Marienfield-Superior) hasta que estén secos. Posteriormente se deshidrataron en etanol, se aclararon en xileno y se montaron con un medio de montaje permanente. La reacción fue observada y fotografiada bajo un microscopio de fluorescencia Provis AX70 (Olympus Corporation). Previa identificación del núcleo dorsal del nervio vago en el tronco encéfalo, identificado por la tinción de Nissl, se determinó mediante el uso del programa ImageJ, el número de células teñidas en cada sección como número representativo de células con inmuno-reactividad positiva a c-Fos.

3.4.2 Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) en el cerebro

Los cerebros perfundidos se sumergen en formalina al 10% durante 24 horas y continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1 M. Se cortaron secciones de 50 µm de grosor en el vibratomo. Para la inmunofluorescencia, las secciones se incubaron en flotación durante toda la noche a 4°C con anti-GFP de conejo diluido 1:1000 en PBS. Tras dos lavados de 5 minutos en tampón fosfato 0,1 M las secciones se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, con anti-fragmento F (ab')₂ AlexaFluor® 488 (Molecular Probes) en una dilución 1:200. Las secciones se montaron en portas y se cubrieron con medio de montaje fluorescente. La fluorescencia fue observada y fotografiada bajo un microscopio de fluorescencia Provis AX70 (Olympus Corporation).

3.4.3 Inmunohistoquímica en muestras parafinadas.

Se extrae el hígado de ratones y el cerebro de ratas previamente perfundidos y se sumerge en formalina 10% durante 24 horas. Tras la completa fijación, se parafina el tejido y se corta en secciones de 8 µm. A continuación se elimina la parafina y se rehidrata. Para finalizar, se procede a la exposición o recuperación antigénica sometiendo las secciones durante dos minutos y por dos veces a microondas de 800w.

Tras un pretratamiento con citrato 10 mM para el análisis de BIP y MCH-R1 y Tris-EDTA 10 mM para el GFP, las secciones se incuban consecutivamente en 1) anti-GRP78 de conejo, anti-MCH-R de conejo o anti-GFP de conejo a la dilución de 1:200 1:300 o 1:1000 respectivamente toda la noche a 4 °C para GRP78 y MCH-R1, y 1 hora a temperatura ambiente para GFP; 2) para bloquear la peroxidasa endógena y evitar falsos positivos, se incubó peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos; 3) se

incuba con el anticuerpo secundario durante 30 minutos (Envision® HRP anti-rabbit, Dakocytomation); 4) se incuba con el sistema DAB de inmunodetección (3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride; Dako) durante 10 minutos. Entre cada uno de los pasos de incubación, las secciones se lavan dos veces durante 10 minutos en tampón fosfato salino (PBS; 100 mM tampón fosfato, 0,656 M NaCl) y tras el DAB el lavado se realiza con agua destilada. Para finalizar, los cortes incubados se deshidratan lavando dos veces con xileno y se cubren con medio DePex Gurr® (VWR). Tras las tinciones se observaron y fotografiaron los cortes con un microscopio (Zeiss) utilizando os objetivo de 10, 20 y 40 aumentos.

3.4.4 Doble Inmunohistoquímica en cerebro de ratón²

La doble inmunohistoquímica se realizó sobre cerebros previamente perfundidos de ratones transgénicos de genotipo *Mchr1-cre/tdTomato*³. Para exponer los lugares antigénicos y reducir la unión no específica de los reactivos inmunohistoquímicos, las secciones se trataron con H₂O₂ al 0,5% disuelto en PBS 0,1 M durante 10 minutos; y con una solución de pepsina (10 mg/ml en solución 0,2 M HCl) durante 5 minutos a 37 °C. Después, las secciones se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 30 minutos para evitar la unión inespecífica de anticuerpos. Tras el pretratamiento, se incubaron en una solución con la mezcla del anti-KOR de cabra (2 µg/mL) y anti-DSRed Express de conejo (1:1000) durante 24 horas a 4 °C. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se incubaron con los respectivos secundarios anti-cabra IgG CY5-mono (1:2000) y anti-conejo IgG CY3-mono (1:3000). Los cortes se montaron en portas de cristal, se cubrieron y visualizaron en un microscopio confocal (Nikon A1R).

² Procedimiento realizado por el Dr. Imre Kalló y el Dr. Zsolt Liposits en el laboratorio de Neurobiología endocrina, Instituto de Medicina experimental, Academia húngara de ciencia, Budapest, Hungría.

³ Ratones generados y cedidos por la Dra. Melissa J Chee y la Dra. Eleftheria Maratos-Flier del departamento de Endocrinología, Centro médico Beth Israel Deaconess, departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Harvard, Boston, EEUU.

3.5 Análisis de metabolitos

3.5.1 Extracción de grasa hepática y fecal

Fragmentos de aproximadamente 0,1 g de hígado/hez de rata o ratón se homogenizaron en el Tissue Lyser en una solución 2:1 vol/vol de cloroformo-metanol tubo de polipropileno de 2 ml junto con una bola de acero. La proporción es de 1mL de solución por 0,1 g de hígado/hez. Tras homogenizar se mantuvieron en rotación orbital durante tres horas para facilitar la disolución de la grasa en el disolvente orgánico. Tras la rotación se añadió 0,3 mL de agua destilada y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se descarta la fase orgánica superior y se colecta la fase orgánica inferior a un tubo de polipropileno de 1,5 mL nuevo. Se deja evaporar el disolvente orgánico, dejando los tubos de polipropileno abiertos bajo una campana de extracción de gases durante unas 8 horas, para obtener el pellet con la parte grase del tejido extraído.

3.5.2 Determinación en extractos grasos de tejido

La detección de triglicéridos y ácidos grasos libres no esterificados (AGL) se realiza mediante una detección colorimétrica en un espectrofotómetro (Thermo Fisher), mediante el uso de un kit específico (TG, Spinreact; AGL, Wako). La detección de TG o AGL del extracto graso, se determina la concentración tras la evaporación de una parte de la fase orgánica obtenida. Se añade al pellet el reactivo y luego, por duplicado, se lee en el espectrofotómetro tras repartir las muestras con el reactivo en una placa de 96 pocillos acompañado de la recta patrón. El resultado final se corrige por el peso del fragmento usado en la extracción.

3.5.3 Determinación en suero de triglicéridos, ácidos grasos libres y transaminasas

Para la detección en suero de triglicéridos, AGL y las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) se determinaron mediante el uso de unos kits específicos en una reacción colorimétrica, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (TG, ALT, AST, Spinreact; AGL, WAKO).

3.6 Actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo en extractos grasos y hepáticos, homogenizados en el *Tissue Lyser* (0,1 g en 1 mL tampón lisis) con un tampón de lisado específico para mediciones de actividad enzimática (Tabla 12). A continuación se cuantificó la concentración proteica del extracto como se mencionó en la sección 3.2.2. Durante el proceso de extracción las muestras deben mantenerse en hielo.

Tabla 12 | Composición del tampón de lisis para medir actividad enzimática, disuelto en agua destilada.

Tampón de lisis para actividad enzimática	
Tris-HCl pH 7,5	20 mM
EDTA	1 mM
Fluoruro Sódico	100 mM
Ditiotreitol (DTT)	100 mM
Sacarosa	250 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE)	1 pastilla/50 mL

3.6.1 Actividad enzimática de la ácido graso sintasa (FAS) en tejido adiposo graso

Consiste en la medición de la desaparición NADPH durante la reacción enzimática. El NADPH es el sustrato consumido en la reacción:



En una placa de 96 pocillos, se añaden 100 μL de proteína a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por muestra y por duplicado. Se incorpora a cada muestra 200 μL de la solución NADPH/acetil-CoA (Tabla 13) y se deja incubar durante 10 a 37 $^{\circ}\text{C}$. Para comenzar la reacción se añaden 30 μL la solución malonil-CoA (Tabla 14). La absorbancia se mide a 340 nm durante 20 minutos y se calcula el gradiente de la absorbancia a 340 nm (A_{340}). La conversión del NADPH (en pmol) es $A_{340} \text{ nm} / (6,22 * 10^3) * 0,857$; siendo 0,857 la longitud de paso de la reacción en cm.

Tabla 13 | Composición solución de reacción NADPH/Acetil-CoA, disuelto en agua destilada.

Solución de reacción NADPH/Acetil-CoA	
NADPH	200 μM
Acetil-CoA	100 μM
Fosfato dipotásico	33 mM
Fosfato monopotásico	67 mM

Tabla 14 | Composición solución de reacción malonil-CoA, disuelto en agua destilada.

Solución de reacción malonil-CoA	
Malonil-CoA	600 μM
Fosfato dipotásico	33 mM
Fosfato monopotásico	67 mM

3.6.2 Actividad enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) hígado

En este caso, la medición de la actividad enzimática se realiza con el uso de un kit comercial (Confluolip, PROGEN), mediante la detección fluorimétrica de un pireno añadido a un triglicérido, siendo susceptible a ser detectado tras la hidrolización del sustrato. Siguiendo las instrucciones del manual, se añade la muestra a una placa de medición fluorimétrica (Corning plates) y se realizan mediciones cada minuto durante

15 minutos en un espectrofotómetro de fluorescencia con una Ex 342 nm y una Em 400 nm.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos tras los procedimientos experimentales *in vivo* e *in vitro*, se presentan como la media de los grupos \pm la desviación típica. El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados, siendo de un mínimo de 6 y de un máximo de 10. Para el análisis, se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba ± 2 veces la desviación estándar (370), o cuando se observara un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental. En todos los análisis, se considera una diferencia estadísticamente significativa a partir de la probabilidad $p \leq 0,05$.

Previo al análisis estadístico se realiza un test de normalidad que contrasta la normalidad de un conjunto de datos. En este caso, se plantea como hipótesis nula que una muestra del conjunto de datos proviene de una población normalmente distribuida; siendo el test Shapiro-Wilks utilizado para conjuntos de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 , y el test Kolgomorov-Smirnof cuando el $n \leq 6$ (371,372). Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal se realizan test estadísticos paramétricos. Cuando la población no pasa el test de normalidad, se considera que dicha población no siguen una distribución normal y se realizaría test estadísticos no paramétricos, evento no ocurrido durante el análisis de los datos de la presente tesis .

4.1 Test paramétricos

Se realizan sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales sigan una distribución Gaussiana (normal).

4.1.1 ANOVA de una vía

El análisis de la varianza (ANOVA) determina si hay diferencia entre las medias de tres o más poblaciones que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Una vez realizado el test, en caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, es necesario realizar un test a posteriori para comprobar qué medias son las que causan significación. Para ello se utilizó el Tukey test con corrección de Kramer que permite que los diferentes grupos tengan diferente tamaño muestral (373). A diferencia del test a posteriori Bonferroni, con el test Tukey-Kramer, se comparan dos a dos los grupos experimentales de forma simultánea.

4.1.2 T-test

Compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ (374,375). En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones

correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (una cola) la desigualdad en la hipótesis señala en una sola dirección (Imagen 30).

Hipótesis nula H_0	Hipótesis alternativa H_a	Tipo de contraste	Estadístico del contraste	Región de aceptación
$\mu = \mu_0$	$\mu \neq \mu_0$	bilateral	$z = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$ sigue una $N(0, 1)$	
$\mu \leq \mu_0$	$\mu > \mu_0$	unilateral		
$\mu \geq \mu_0$	$\mu < \mu_0$	unilateral		

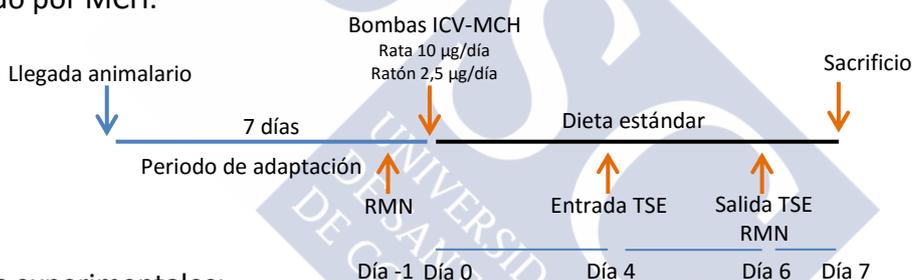
Imagen 30. Representación de los diferentes contrastes de hipótesis en el análisis de diferencias entre medias.

En esta tesis, se utilizó t-test de una y dos colas, detallado en los pies de figura de los resultados. La elección del t-test de una cola, se debe a que se realizaron análisis sobre el mecanismo de acción de una hormona cuyo efecto ya está definido. Por ello las cuestiones realizadas sobre cada experimento recaen sobre una premisa ya evaluada. Así pues, el uso de una cola ofrece un test estadístico con mayor potencia y aumenta la sensibilidad para detectar efectos fisiológicos. Sin embargo, cuando los efectos de la variable se desconocían o no existía una evidencia previa, se utilizó t-test de dos colas (376-378).

Diseño experimental

5.1 Administración crónica ICV de MCH

5. Para la determinación de los efectos periféricos de MCH, se realiza una administración crónica ICV durante 7 días mediante el uso de bombas osmóticas. Después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada al animalario se realiza la intervención. La dosis de MCH para rata es de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ y de ratón 2,5 $\mu\text{g}/\text{día}$; el vehículo y disolvente de MCH es suero fisiológico. En caso de la rata se realizó un grupo *pair-fed*, este grupo permite determinar si los efectos inducidos por la administración de MCH son independientes de la ingesta. Como MCH es una hormona de acción orexigénica, el grupo *pair-fed* recibe administración ICV crónica de MCH, pero tienen restricción calórica a la cantidad de comida ingerida por el grupo control el día anterior. La dieta utilizada es la estándar. El primer día tras la intervención el grupo *pair-fed* recibió alimentación *ad-libitum*. Para el fenotipado metabólico, las ratas entraron en el sistema de calorimetría indirecta (TSE) el cuarto día tras la intervención, hasta el sexto. El día antes de la intervención y tras la salida del TSE se realizó una resonancia magnética nuclear para estudiar la variación en la composición corporal inducido por MCH.



Grupos experimentales:

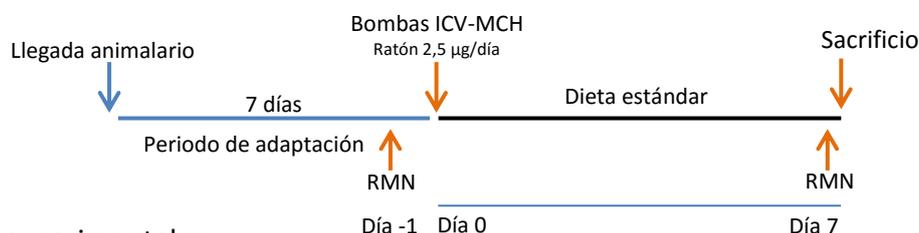
- ICV-Salino *ad libitum*
- ICV-MCH *ad libitum*
- ICV-MCH *pair-fed*

Tras la intervención, los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.2 Administración crónica ICV de MCH en modelos de ratón modificados genéticamente

Para estudiar si los efectos de periféricos de la administración central ICV crónica de MCH, eran bloqueados por diferentes factores, se administró MCH ICV a ratones KO para:

- Ratones KO para los 3 receptores β -adrenérgicos (TKO)⁴.
- Ratones KO para JNK1⁵.
- Ratones KO para el receptor kappa opioide (KOR).



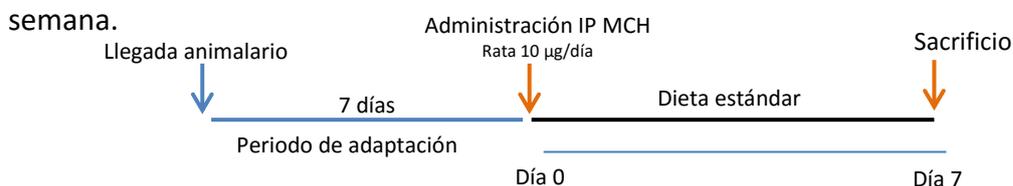
Grupos experimentales:

- ICV-Salino + WT
- ICV-MCH + WT
- ICV-Salino + KO
- ICV-MCH + KO

Tras la intervención, los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.3 Administración periférica de MCH

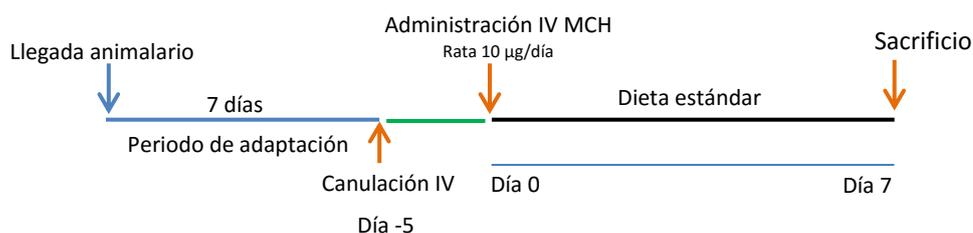
Para corroborar que los efectos periféricos inducidos por la administración central ICV-MCH son específicos del cerebro y no por una acción de MCH en sus receptores periféricos, se administró MCH de forma crónica en la periferia usando dos estrategias: administración intraperitoneal y administración intravenosa en ratas. La dosis es la misma que la de central (10 $\mu\text{g}/\text{día}$). Cada día durante siete días se administró los 10 μg bien por pinchazo intraperitoneal (IP), bien por administración intravenosa (IV) a la yugular. Debido a que la dosis de MCH en vía IV pueda ser mucho más activa en su posible acción con respecto al efecto de MCH vía IP, se hizo un grupo *pair-fed* para el experimento IV. De este modo se puede determinar si los posibles efectos de la administración IV de MCH en el metabolismo se deban a un efecto de la ingesta. Cinco días después de la canulación IV, se administró el MCH diariamente durante una semana.



⁴ Ratones cedidos por la Dra. Cristelle Veyrat-Durebex y la Dra. Françoise Ronher-Jeanrenaud; Laboratorio de metabolismo, división de endocrinología, diabetología y nutrición, Departamento de medicina interna, Universidad de Ginebra, Ginebra, Suiza

⁵ Ratones cedidos por la Dra. Guadalupe Sabio y el Dr. Roger J Davis; Departamento de biología vascular e inflamación, CNIC, Madrid, España e Instituto médico Howard Hughes, programa de medicina molecular, Universidad de Massachusetts, Worcester, EEUU.

Material y métodos



Grupos experimentales IP:

- IV-Salino
- IV-MCH
- IV-MCH *pair-fed*

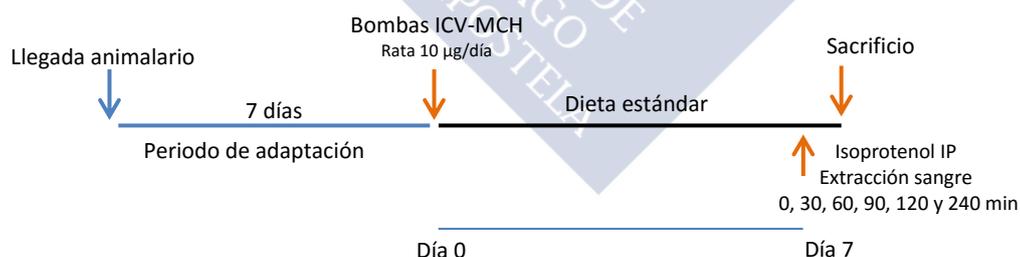
Grupos experimentales IP:

- IP-Salino
- IP-MCH

Tras la intervención IV y durante la administración IP, los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso durante la administración de MCH.

5.4 Estimulación de lipólisis por isoprotenol

Para determinar si la administración crónica ICV de MCH mediaba la lipólisis periférica del tejido adiposo en rata, se administró intraperitonealmente (IP) isoprotenol (10 mg/kg) (Sigma Aldrich) a ratas tras 7 días con tratamiento crónico ICV de MCH (10 µg/día). Tras la administración IP de isoprotenol, se extrajo una muestra de sangre por capilaridad de la vena de cola a 0, 30, 60, 90, 120 y 240 minutos. Tras aislar el suero se determinó la concentración de ácidos grasos libres (AGL).



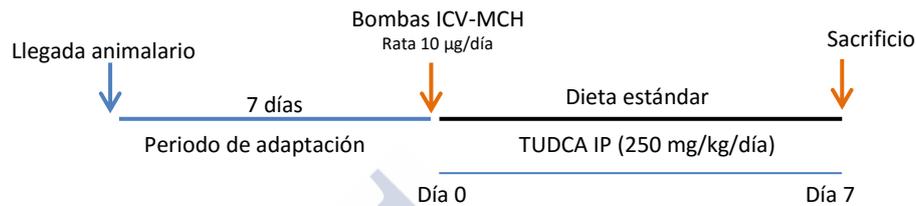
Grupos experimentales:

- ICV-Salino *ad libitum* + isoprotenol IP
- ICV-MCH *ad libitum* + isoprotenol IP
- ICV-MCH *pair-fed* + isoprotenol IP

Tras la intervención, los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.5 Bloqueo farmacológico del ER-stress

Para esclarecer el papel del ER-stress como mediador de los efectos de MCH en el metabolismo lipídico del hígado en rata, junto con la administración crónica ICV de MCH (10 µg/día), se co-administró cada 12 horas IP una chaperona química que resuelve el ER-stress, el ácido tauroso-deoxicólico (TUDCA). La dosis diaria de TUDCA fue de 250 mg/kg, el vehículo del TUDCA es tampón fosfato salino (PBS). El TUDCA se administró durante 7 días desde la implantación de las bombas osmóticas ICV.



Grupos experimentales:

- ICV-Salino + PBS IP
- ICV-MCH + PBS IP
- ICV-Salino + TUDCA IP
- ICV-MCH + TUDCA IP

Tras la intervención los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.6 Bloqueo genético del ER-stress hepático

Otra aproximación más exacta para la inhibición del ER-stress el hígado, consistió en la administración por la vena de la cola, de un vector adenoviral que sobre-exprese la chaperona GPR78 ($1 \cdot 10^8$ UV/100 µl) (ViraQuest). Debido a las características biológicas del adenovirus, la infección y sobre-expresión del gen que porta es de acción inmediata, pero el efecto es transitorio, durando unos 7 días. El mismo día que la implantación de bombas osmóticas ICV para la administración crónica de MCH (2,5 µg/día). La especificidad de la técnica se demuestra por una mayor infección en el hígado respecto a otros órganos como el bazo o la grasa epididimal (Imagen 31).

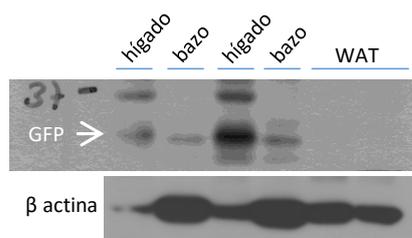
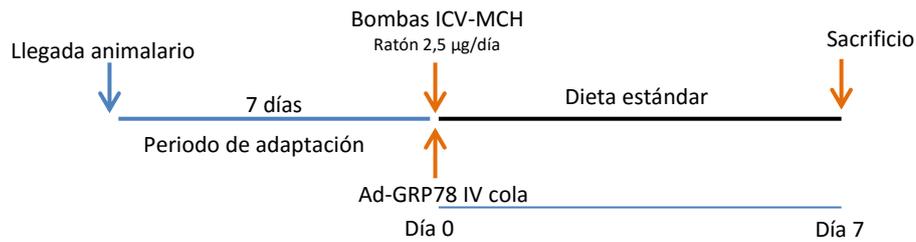


Imagen 31. Expresión de GFP en extractos proteicos de hígado, bazo y grasa epididimal de ratones, una semana después de la administración por la vena de la cola de adenovirus que sobre-expresan GFP.

Material y métodos



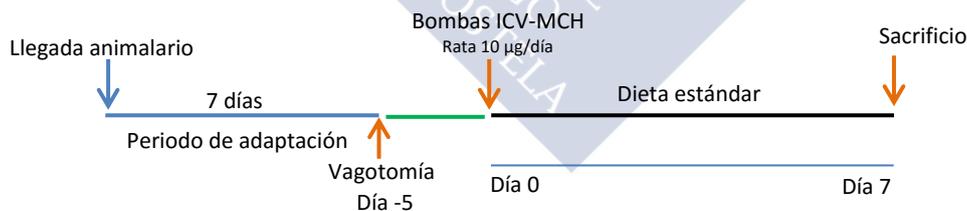
Grupos experimentales:

- ICV-Salino + Ad-GFP
- ICV-Salino + Ad-GRP78
- ICV-MCH + Ad-GFP
- ICV-MCH + Ad-GRP78

Tras la intervención los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.7 Efecto de la vagotomía sobre la acción central de MCH

Para determinar si el sistema nervioso parasimpático modula los efectos periféricos inducidos por MCH, se secciona el nervio vago en ratas (VGX). Al grupo control de la vagotomía se le denomina *sham*, al cual se le realizó la intervención invasiva, pero sin seccionar el vago. Una semana después de la intervención, se implantan bombas osmóticas para la administración crónica ICV de MCH durante una semana (10 µg/día). La comprobación de la eficacia de la vagotomía se comprobó por la hipertrofia estomacal tras su sacrificio, descartando del experimento aquellas cuya vagotomía no se realizó con éxito.



Grupos experimentales:

- *Sham* + ICV-salino
- *Sham* + ICV-MCH
- VGX + ICV-salino
- VGX + ICV-MCH

Tras la vagotomía, los animales se estabularon en individual; tras la implantación de las bombas y monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.8 Sobre-expresión génica en núcleos hipotalámicos

Para esclarecer qué núcleo hipotalámico era el encargado de producir los efectos periféricos debido a la administración central ICV de MCH, se administró estereotáxicamente y de forma bilateral, 1 μ l de vector adenoviral por núcleo (10^7 UV/mL), que sobre-expresaba el MCH-R1 durante 7 días (Signagen, SL100704) en los núcleos arcuato, lateral y ventromedial del hipotálamo de rata.

Para estudiar la acción del KOR sobre el metabolismo periférico en rata, se administró estereotáxicamente y de forma bilateral en el LHA, 1 μ l de vector adenoviral por núcleo (10^7 UV/mL), que sobre-expresaba el KOR (Signagen, SL100702) durante 7 días.

En el grupo control se administra de forma bilateral, 1 μ l un adenovirus que sobre-expresa GFP en cada uno de los núcleos mencionados (Signagen, SL100708). Con la detección de GFP se visualiza el lugar de administración, comprobando la eficacia de la administración (Imagen 32).

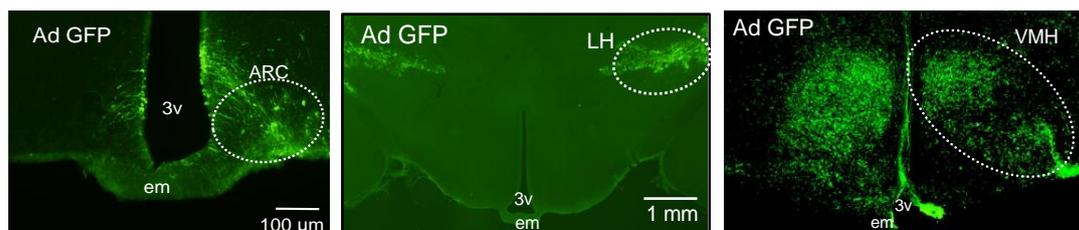
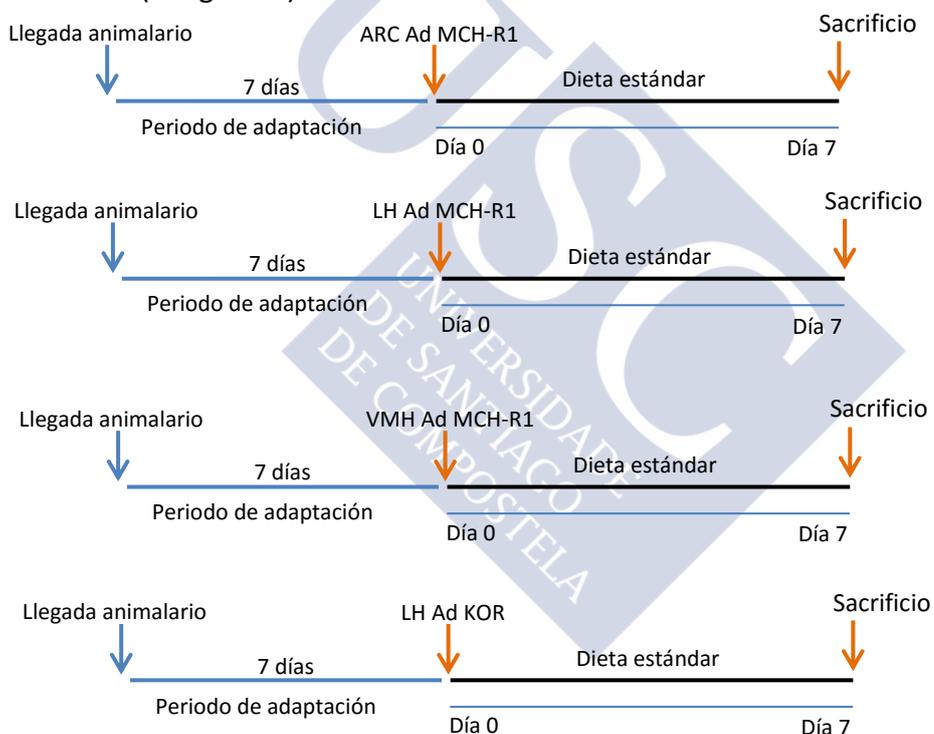
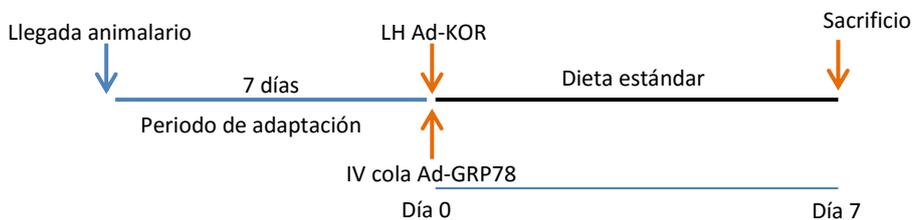


Imagen 32. Expresión de GFP en diferentes núcleos hipotalámicos tras la administración núcleo específica de adenovirus que sobre-expresan GFP.

Material y métodos

Para determinar si el efecto hepático de la sobre-expresión de KOR en el LHA está modulado por el ER-stress en ratón, simultáneamente a la administración estereotóxica bilateral de Ad KOR en el LHA, se administró en la vena de la cola el adenovirus que sobre-expresa la chaperona GRP78 y se sacrificó a la semana de administración de ambos virus.



Grupos experimentales:

- ARC Ad GFP
- ARC Ad MCH-R1
- LHA Ad GFP
- LHA Ad MCH-R1
- VMH Ad GFP
- VMH Ad MCH-R1

Grupos experimentales:

- LHA Ad GFP
- LHA Ad KOR

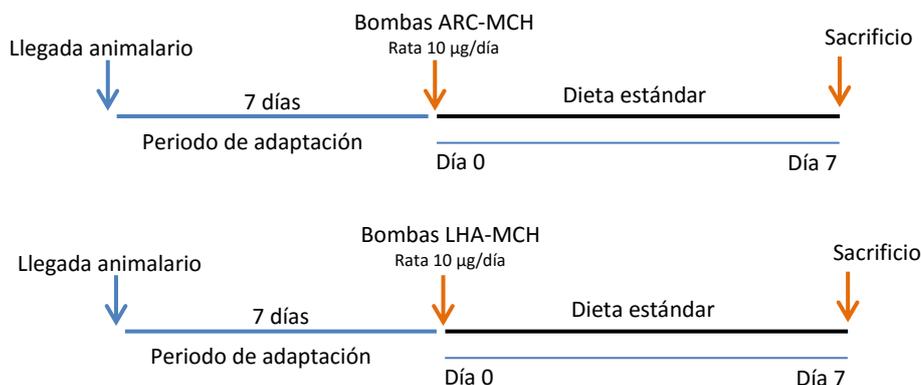
Grupos experimentales:

- LHA Ad GFP + IV Ad GFP
- LHA Ad GFP + IV Ad GRP78
- LHA Ad GFP + IV Ad GRP78
- LHA Ad GFP + IV Ad GRP78

Tras la intervención los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.9 Administración crónica de MCH en núcleos hipotalámicos.

Para corroborar los efectos periféricos inducidos por la sobre-expresión del MCH-R1 en los núcleos ARC y LHA del hipotálamo, mediante el uso de cánulas núcleo-específicas hechas a medida, se administró MCH de forma crónica y bilateral en el núcleo arcuato y en núcleo lateral del hipotálamo.



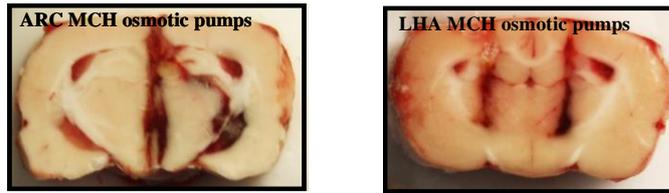


Imagen 33. Marcas de las guías de las cánulas núcleo específicas para la administración crónica de MCH.

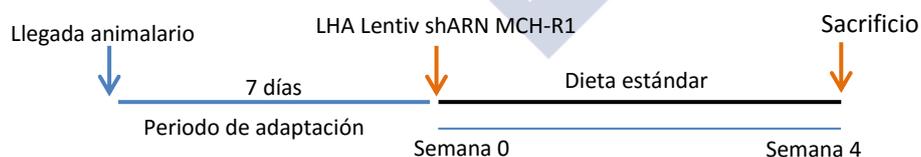
Grupos experimentales:

- ARC-Salino
- ARC-MCH
- LHA-Salino
- LHA-MCH

Tras la intervención los animales se estabularon en individual y se monitorizó diariamente la ingesta y el peso.

5.10 Silenciamiento genético de MCH-R1 en el hipotálamo lateral (LHA)

Para determinar la acción de la inhibición del MCH-R1 sobre el metabolismo periférico, se administró estereotáxicamente y de forma bilateral en el LHA, 1 μ l de vector lentiviral (1×10^7 UV/mL) con un shRNA para inhibir la traducción del mRNA del MCH-R1 (Sigma, SHCLNV, TRCN0000028357). Debido a la naturaleza del virus, el efecto de la inhibición no aparece hasta 3 semanas después de la infección, pero el efecto es permanente. En el grupo control se administra de forma bilateral, 1 μ l un lentivirus Turbo-GFP (Sigma, SHCLNV, SHC003 Turbo-GFP) en cada uno de los núcleos mencionados. Con la detección de GFP se visualiza el lugar de administración, comprobando la eficacia de la administración.



Tras la intervención los animales se estabularon 3 individuos por caja y se monitorizó semanalmente la ingesta y el peso.

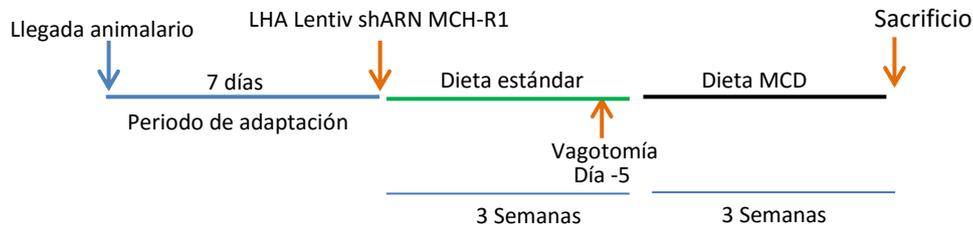
Grupos experimentales:

- LHA Lentivirus Turbo-GFP
- LHA Lentivirus shRNA MCH-R1

Para determinar el efecto de la inhibición del MCH-R1 en el LHA sobre el metabolismo hepático, se alimentó a las ratas con dieta deficiente en metionina y

Material y métodos

colina (MCD) durante tres semanas tras el inicio del efecto del lentivirus. Al mismo tiempo, para determinar si la interrupción del PSNS mediaba la acción hepática del bloqueo del MCH-R1 en el LHA, se vagotomizaron las ratas al comienzo del efecto del virus y de la acción de la dieta. La dieta MCD se intercambió por la estándar 5 días después de la cirugía para facilitar la recuperación de las ratas.



Grupos experimentales:

- Sham + LHA Lentivirus Turbo-GFP
- Sham + LHA Lentivirus shRNA MCH-R1
- VGX + LHA Lentivirus Turbo-GFP
- VGX + LHA Lentivirus shRNA MCH-R1

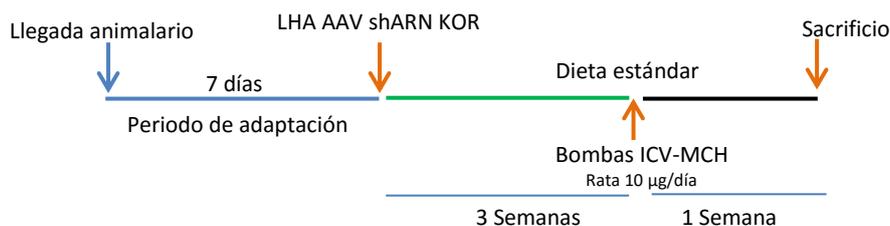
Tras la administración de los lentivirus en el LHA los animales se estabularon 3 ratas por caja y se monitorizó semanalmente la ingesta y el peso. Tras la vagotomía, los animales se estabularon en individual y se monitorizó semanalmente la ingesta y el peso.

5.11 Silenciamiento genético de KOR en el hipotálamo lateral (LHA)

Para determinar si el receptor KOR en el hipotálamo lateral media las acciones periféricas de MCH, se silenció la expresión del hipotálamo lateral simultáneamente a la administración crónica ICV de MCH en ratas. Para el silenciamiento de KOR se utilizó un adenovirus adeno-asociado (AAV) de serotipo 1, que codifica un shRNA para inhibir la transcripción de KOR (245). Se administró estereotáxicamente y de forma bilateral en el LHA, 1 μ l del AAV shRNA KOR⁶ ($1 \cdot 10^9$ UV /mL). Tres semanas después de la administración de los AVV (tiempo necesario para realizar la infección) se implantaron bombas osmóticas ICV para la infusión crónica de MCH durante una semana (10 μ g/día). En el grupo control se administra de forma bilateral, 1 μ l de AAV-GFP en el LHA. Con la detección de GFP se visualiza el lugar de administración, comprobando la eficacia de la administración.

⁶ AAVs (AAV1 shARN KOR y AAV1 GFP) cedidos por el Dr. Roger A. Adan, Departamento de Neurociencia y Farmacología, Instituto Rudolf Magnus, Universidad de Utrecht, Utrecht, Holanda.

Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico



Tras la administración del AAV, los animales se estabularon 3 ratas por caja y se monitorizó semanalmente la ingesta y el peso. Tras la implantación de las bombas osmóticas, se estabularon los animales en cajas individuales y se monitorizó diariamente peso e ingesta.

Grupos experimentales:

- AAV GFP + ICV-Salino
- AAV GFP + ICV-MCH
- AAV shRNA KOR + ICV-Salino
- AAV shRNA KOR + ICV-MCH

Finalmente, para determinar si los efectos del silenciamiento de KOR en el LHA afecta al metabolismo hepático, se alimentó a las ratas con dieta deficiente en metionina y colina (MCD) durante tres semanas tras el inicio del efecto del AAV.



Grupos experimentales:

- AAV GFP + dieta MCD
- AAV shRNA KOR + dieta MCD



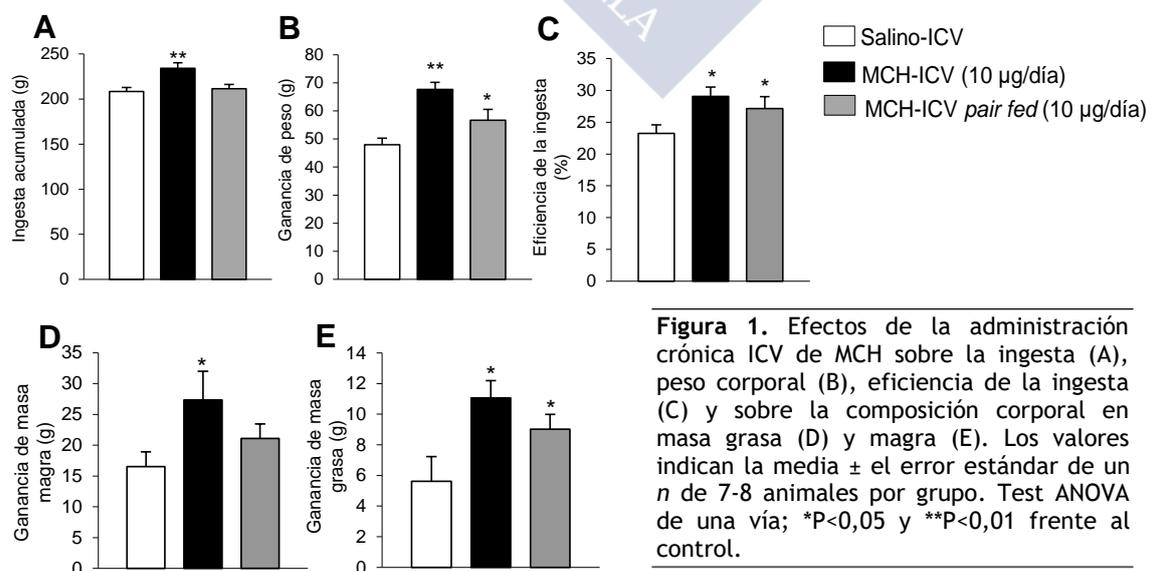


RESULTADOS



RESULTADOS**MCH central modula el metabolismo lipídico periférico****1.1 La administración central de MCH controla la adiposidad independientemente de la ingesta.**

La administración central de MCH mediante el uso de bombas osmóticas al ventrículo lateral del cerebro de rata durante una semana a una dosis de 10 µg/día, incrementó la ingesta y el peso corporal (Figura 1A-B). Para determinar si el incremento de peso inducido por MCH es independiente de su efecto orexigénico, a un tercer grupo de ratas con administración crónica de MCH, se le restringió la ingesta a la misma cantidad de comida ingerida por el grupo control (*MCH-pair fed*). Como se observa en las gráficas, el aumento de peso y la eficiencia de la ingesta inducida por MCH son independientes de la ingesta (Figura 1B-C). El incremento de peso en ambos grupos *MCH-ad lib* (libre acceso a la comida) y *MCH-pair fed* se debió a un aumento de masa grasa, mientras que un aumento en la masa magra sólo se detectó en el grupo *MCH-ad lib* (Figura 1D-E). El análisis metabólico obtenido del sistema de calorimetría indirecta, mostró que la administración central de MCH no cambió el gasto energético ni la actividad locomotora, tanto en la fase diurna como nocturna (Figura 2A-C). Este hecho se confirmó por la ausencia de diferencias sobre la expresión proteica de UCP1 y de los transcritos de PCG-1α y PPAR-γ en el tejido adiposo marrón tras el tratamiento MCH (Figura 2D-E). Sin embargo, MCH incrementó el cociente de respiración (RQ) independiente de la ingesta (Figura 2F). La administración central de MCH no modificó los niveles séricos de glucosa, insulina, TG o colesterol, pero descendió los valores de ácidos grasos libres y de corticosterona independientemente de la ingesta (Tabla 15).



Resultados

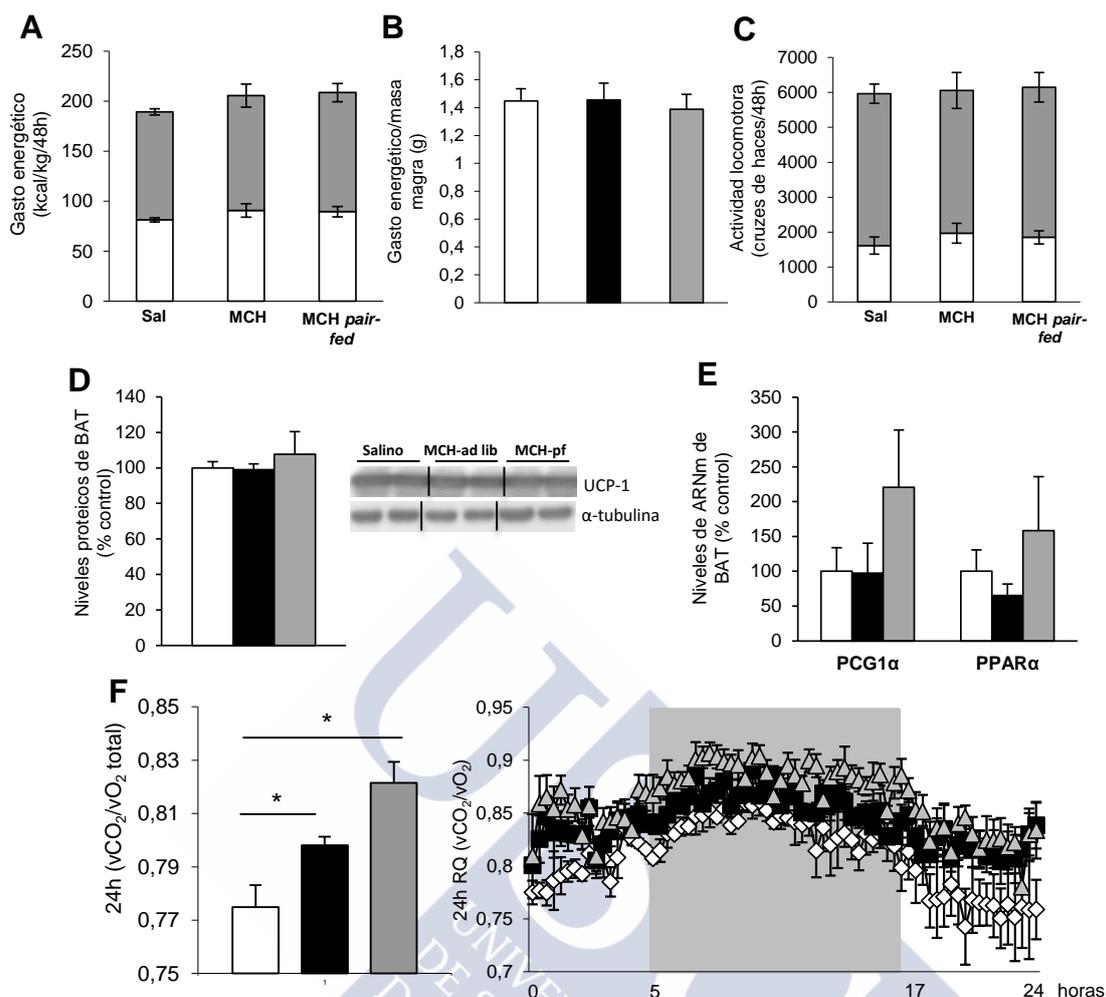


Figura 2. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el ventrículo lateral sobre el gasto energético total (A) y respecto a la masa magra (B), actividad locomotora (C), niveles proteicos y de mRNA del tejido adiposo marrón de UCP1(D), PGC-1 α y PPAR γ (E) y sobre la tasa de respiración (F). Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7-8 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * $P < 0,05$ frente al control.

Tabla 15 | Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el ventrículo lateral sobre los valores en suero de glucosa, insulina, triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y corticosterona. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

Tabla 15	Salino	MCH-Ad libitum	MCH-Pair fed
Glucosa (mg/dL)	168,1 \pm 20,0	167,96 \pm 17,9	157,3 \pm 13,0
Insulina (ng/mL)	1,17 \pm 0,14	1,41 \pm 0,17	1,48 \pm 0,09
Triglicéridos (mg/dL)	62,7 \pm 4,9	54,7 \pm 5,0	68,9 \pm 6,5
Ácidos grasos libres (mg/dL)	23,56 \pm 2,29	17,5 \pm 2,17**	13,57 \pm 1,38**
Colesterol (mg/dL)	110,89 \pm 4,97	117,32 \pm 6,73	135,71 \pm 13,99
Corticosterona (ng/mL)	43,16 \pm 6,60	14,56 \pm 4,92**	19,31 \pm 5,45*

1.2 La administración central de MCH regula el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco

El peso de los diferentes depósitos grasos de las ratas tratadas crónicamente con MCH se observaron incrementados con respecto al grupo control (Figura 3A). Además, la estimulación de lipólisis inducido por la administración isoprotenol (382), mostró que en los niveles de ácidos grasos libres (AGL) en ratas tratadas con MCH, son menores tras 30 y 60 minutos desde la administración del isoprotenol (Figura 3B); sugiriendo que el MCH reduce la tasa lipolítica. Coincidiendo con ello el tamaño de los adipocitos se observó mayor en aquellas ratas tratadas con MCH independientemente de la ingesta (Figura 3C).

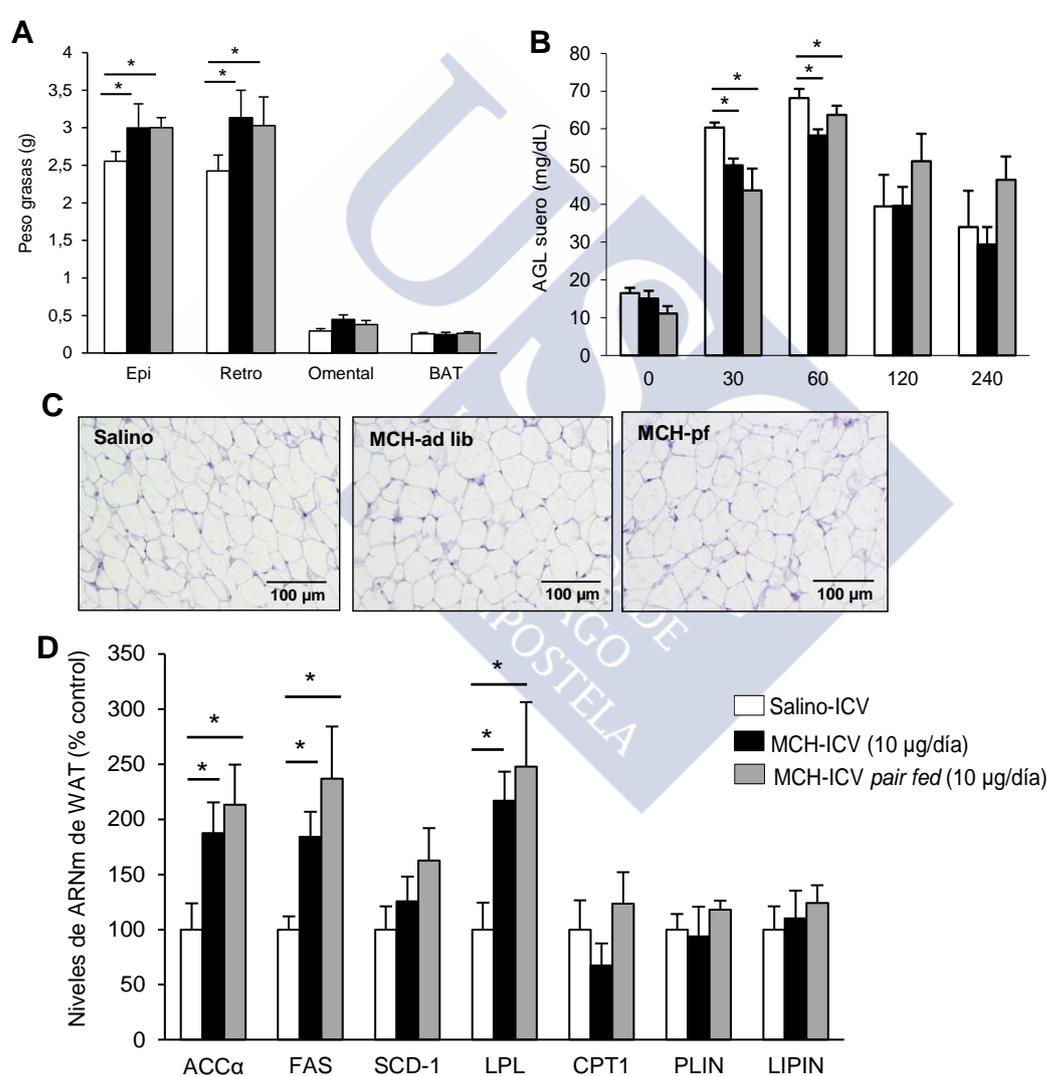


Figura 3. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el tejido adiposo blanco sobre el peso de los depósitos de grasa epididimal, retroperitoneal, omental y tejido adiposo marrón (A), contenidos de ácidos grasos libres en suero tras la administración IP de isoprotenol (B), tamaño de adipocitos del tejido adiposo blanco con tinción H&E (C) y sobre los niveles de mRNA de ACCα, FAS, SCD-1, LPL, CPT1, PLIN y LIPIN (D). El *HPRT* se utilizó para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 7-8 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; **P*<0,05 frente al control.

Resultados

Independientemente de su efecto orexigénico, MCH aumentó la expresión génica de genes clave en el metabolismo lipídico como ACC, FAS y LPL, pero no se observaron diferencias en CPT-1, PLIN, LIPIN y SRBEP1 (Figura 3D). A nivel proteico, este resultado se reprodujo sólo en ACC (Figura 4A). Sin embargo, tanto el incremento de proteína como la actividad enzimática de LPL es dependiente de ingesta (Figura 4B). Acorde con los resultados reflejados en tratamiento con isoprotenol, la forma activa (fosforilada) de la hormona sensible a lipasa (pHSL) se mostró disminuida (Figura 4A).

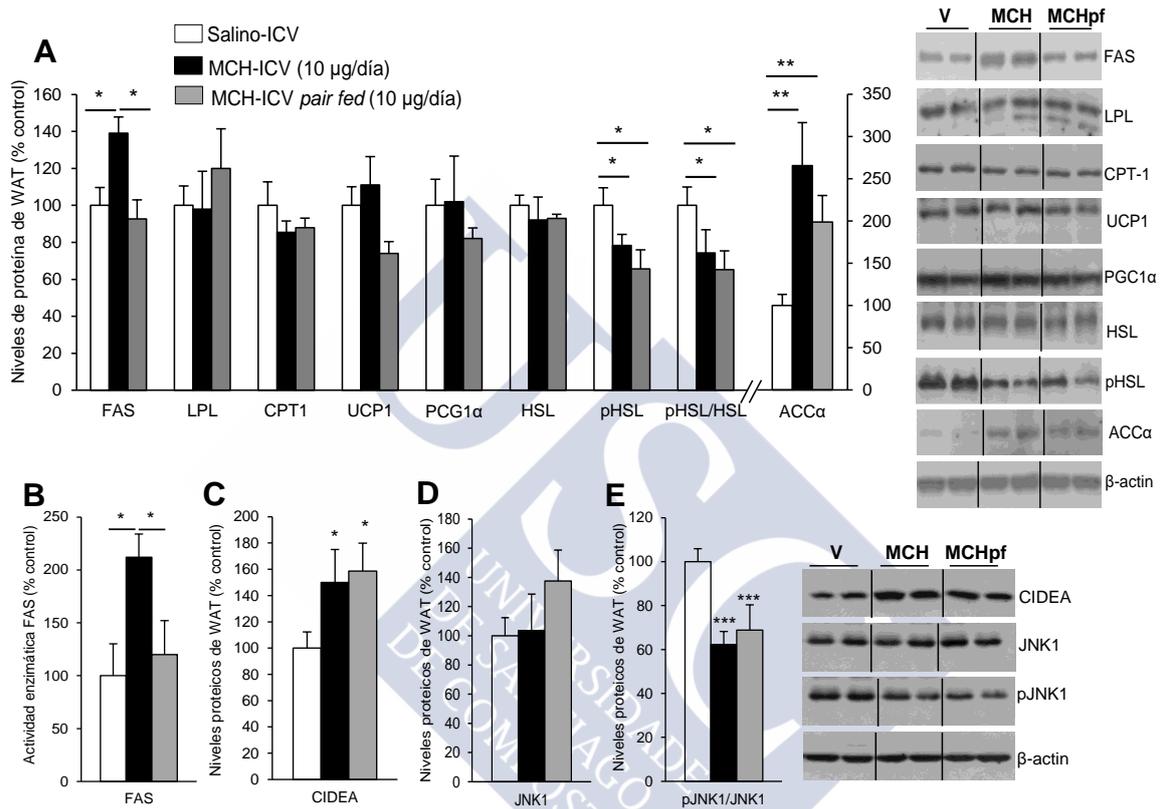


Figura 4. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el tejido adiposo blanco sobre los niveles proteicos de FAS, LPL, CPT1, UCP1, PCG-1α, HSL, pHSL, ACC (A); sobre la actividad enzimática de FAS (B) y sobre los niveles proteicos de CIDEA (C), JNK1 (D) y la ratio pJNK/JNK1 (E). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; *P<0,05; **P<0,01 y ***P<0,001 frente al control.

Los cambios observados a nivel proteico de las enzimas implicadas en el almacenamiento lipídico, no pudieron explicar en su totalidad el incremento en masa grasa inducido por la administración central de MCH. Por ello, se optó por investigar otro mecanismo. Los niveles proteicos del efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA), se observaron elevados tras la administración central de MCH indicando una reducción en la oxidación lipídica (Figura 4C) (383). A su vez, la expresión de CIDEA es modulada negativamente por JNK1 (383). La infusión central de MCH no varió los niveles proteicos de JNK1 en el tejido adiposo blanco (Figura 4D), pero sí su actividad, presentando la ratio de la forma activa pJNK1 con JNK1 una disminución significativa respecto al control (Figura 4E).

1.3 La administración central de MCH regula el metabolismo lipídico del hígado mediante el ER-stress y JNK1.

La administración crónica de MCH en el ventrículo lateral incrementó el contenido lipídico del hígado, como se observó en las gotas lipídicas rojas de la tinción Oil-red O sobre cortes histológicos hepáticos (Figura 5A) y en los niveles de triglicéridos hepáticos (Figura 5B). El incremento de los triglicéridos coincidió con una disminución de los ácidos grasos libres hepáticos (Figura 5C).

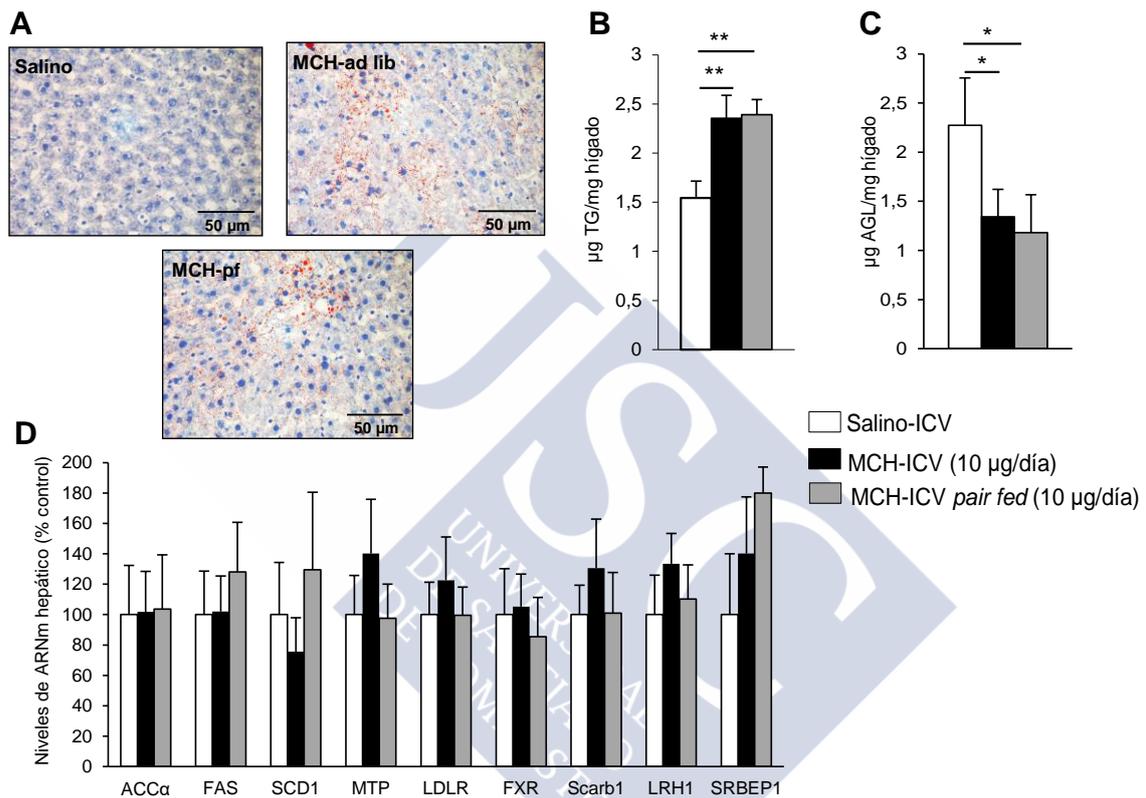


Figura 5. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el hígado sobre la acumulación lipídica representado en los cortes histológicos teñidos con *Oil-Red O* (A) y en los niveles de triglicéridos (B) y ácidos grasos libres (C) en el hígado. El HPRT se utilizó para normalizar los niveles de ARNm. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ frente al control.

A nivel transcripcional no se observó ninguna diferencia en genes involucrados en el metabolismo lipídico (Figura 5D). Sin embargo, a nivel proteico, pAMPK, pACC y ACC α presentaron reducciones significativas (Figura 6A); mientras que LPL aumentó tanto a nivel proteico (Figura 6A), como en su actividad enzimática (Figura 6B). Respecto al metabolismo de la incorporación de lipoproteínas remanentes del plasma (SCARB1, LDLR, FXR, LRH1) y el empaquetamiento de lipoproteínas para su secreción (MTP) no se han observado diferencias a nivel transcripcional (Figura 5D). Como se ha descrito detalladamente en la introducción, JNK1 está involucrada en la esteatosis hepática (356-358); la administración crónica ICV de MCH produjo una disminución los niveles proteicos de JNK1, pero un incremento de su actividad, debido a una mayor presencia de su forma fosforilada respecto al total (Figura 6C-D).

Resultados

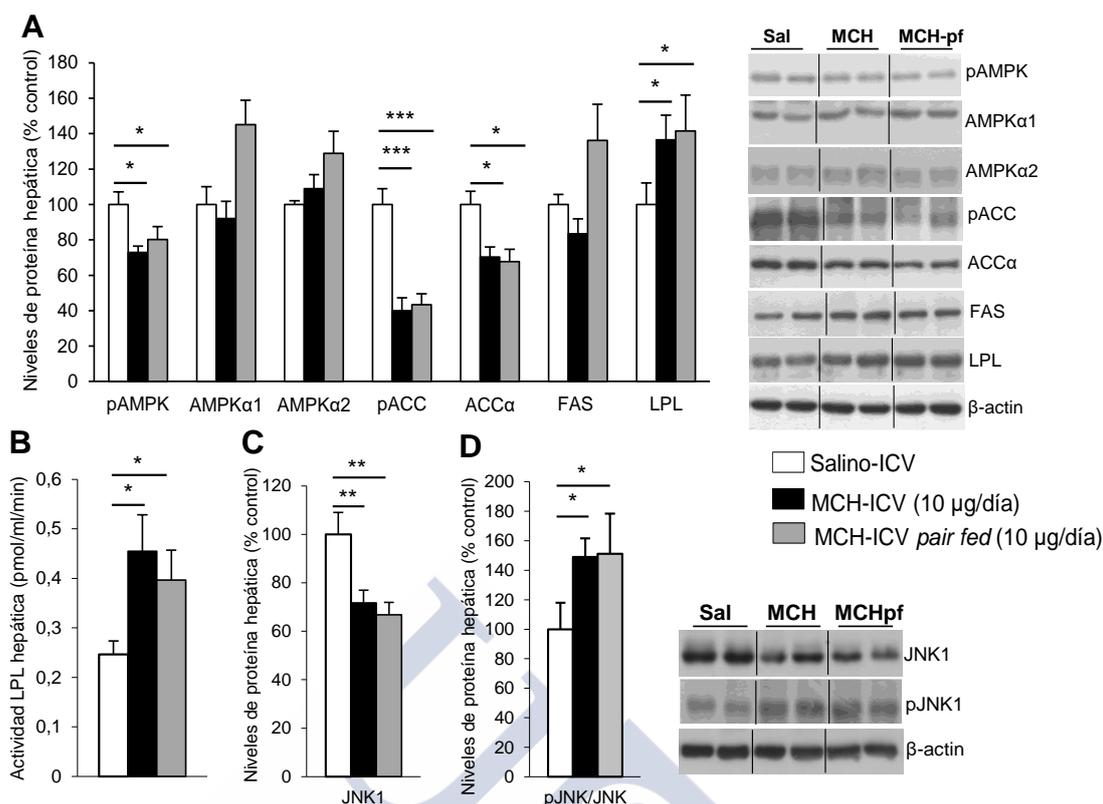


Figura 6. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en los niveles de proteína hepática de pAMPK, AMPK α 1, AMPK α 2, pACC, FAS y LPL (A), sobre la actividad enzimática de LPL en el hígado (B) y sobre los niveles proteicos de JNK1 y pJNK1 en el hígado (C-D). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * P <0,05; ** P <0,01 y *** P <0,001 frente al control.

La fosforilación de JNK en el hígado está asociada al desarrollo de esteatohepatitis y resistencia a la insulina. Debido a los resultados observados sobre el efecto adipogénico de MCH en el hígado, estudiamos el efecto central de MCH en ratones KO para JNK1. La administración central de MCH (2,5 µg/día) en ratones KO para JNK1 y salvajes (WT) durante una semana, incrementó la ingesta en ambos genotipos (Figura 7A). Sin embargo en los ratones JNK1-KO, MCH no fue capaz de inducir el aumento de peso esperado (Figura 7B) ni de disminuir los AGL plasmáticos (Figura 7C). Sin embargo, la administración ICV de MCH si fue capaz de modular el metabolismo lipídico del tejido adiposo graso en ratones JNK-KO, puesto que hay un incremento en CIDEA (Figura 7D). A nivel hepático MCH es moduló la expresión proteica de pAMPK y pACC en ratones JNK1-KO, pero no indujo un aumento en LPL (Figura 7E).

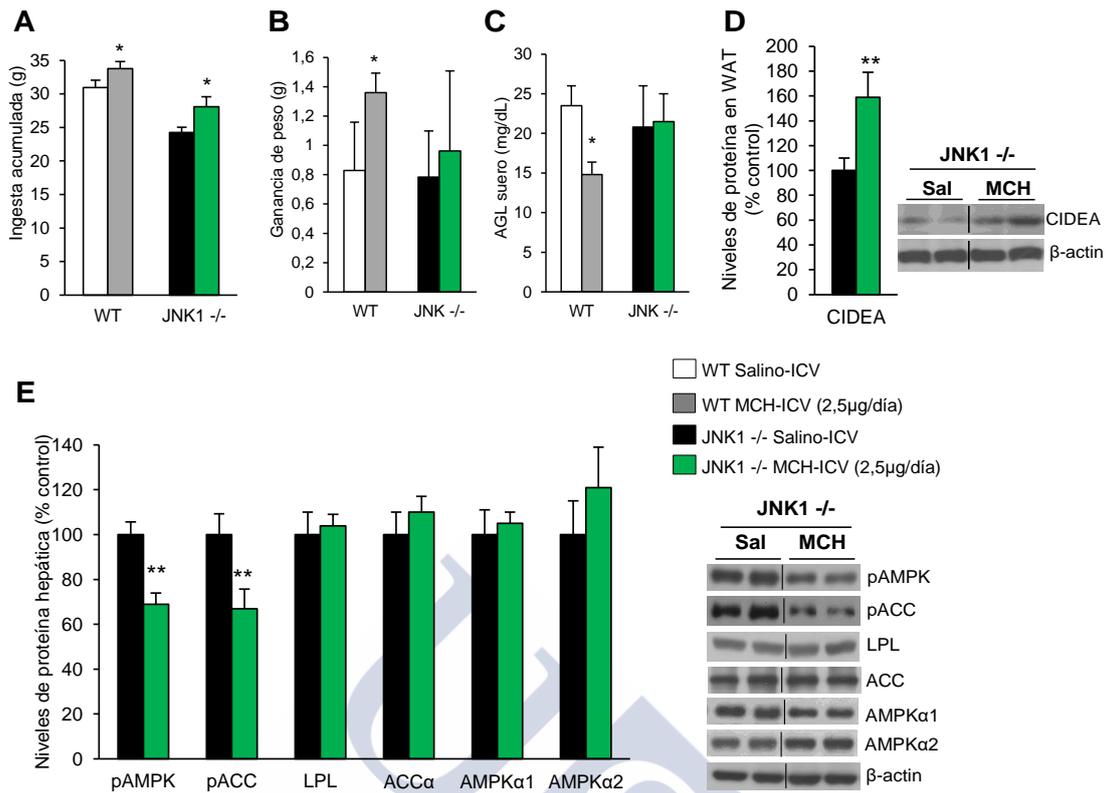


Figura 7. Efectos de la administración crónica ICV de MCH (2,5 µg/día) en la ingesta (A), peso (B), niveles de AGL séricos (C) y niveles proteicos de CIDEA (D) en grasa epididimal de ratones WT y JNK1-KO. Efecto de la infusión central de MCH sobre niveles proteicos de pAMPK, pACC, LPL, ACC, AMPKα1 y AMPKα2 en hígado de ratones JNK1-KO (E). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n 7-6 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05 y **P<0,01 frente al control.

Para corroborar que estos mismos efectos se reproducen en rata, se realizó una aproximación farmacológica mediante una co-administración periférica intraperitoneal (IP) cada 12 horas, del inhibidor de JNK1 SP-600125 (384) (20 mg/kg/día), al mismo tiempo que las bombas ICV administrando MCH a nivel central (10µg/día). El inhibidor de JNK1 bloqueó tanto el efecto orexigénico como el incremento de peso inducido por MCH (Figura 8A-B). El descenso de los AGL séricos inducido por MCH, también se bloqueó con la co-administración del inhibidor de JNK1 (Figura 8C). En el tejido adiposo blanco, el fármaco también inhibió la sobre-expresión de CIDEA inducida por MCH (Figura 8D). En el hígado, la única proteína cuyo efecto inducido por MCH fue bloqueado por la co-administración del fármaco es LPL (Figura 8E).

Como previamente se ha descrito en la introducción, la respuesta a la presencia de proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático inducido por el ER-stress hepático, está estrechamente relacionado con un desarrollo en la adiposidad hepática y una activación de JNK1 (354,356,357). Por ello se ha estudiado la ruta UPR inducida por ER-stress en los hígados de ratas a los que se les administró MCH-ICV durante una semana. MCH central, indujo una activación de las proteínas involucradas en el ER-stress (pIRE1α, pPERK, pelf2α, XBP1-S, CHOP) y apoptosis (caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3) independientemente de la ingesta (Figura 9A).

Resultados

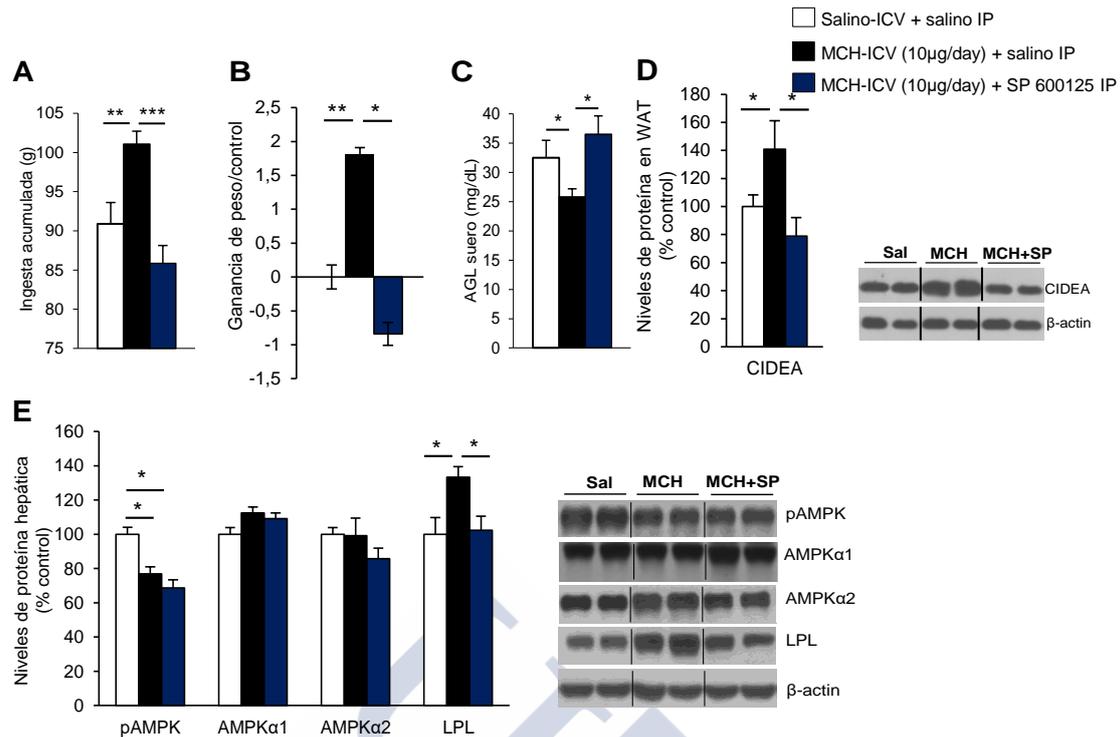


Figura 8. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en el ventrículo lateral y la administración IP del inhibidor de JNK1 SP600125 sobre la ingesta (A), peso corporal (B) y AGL en el suero de ratas (C), y sobre los niveles proteicos de CIDEA en grasa epididimal (D), de pAMPK, AMPK α 1, AMPK α 2 y LPL en hígado de ratas (E). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

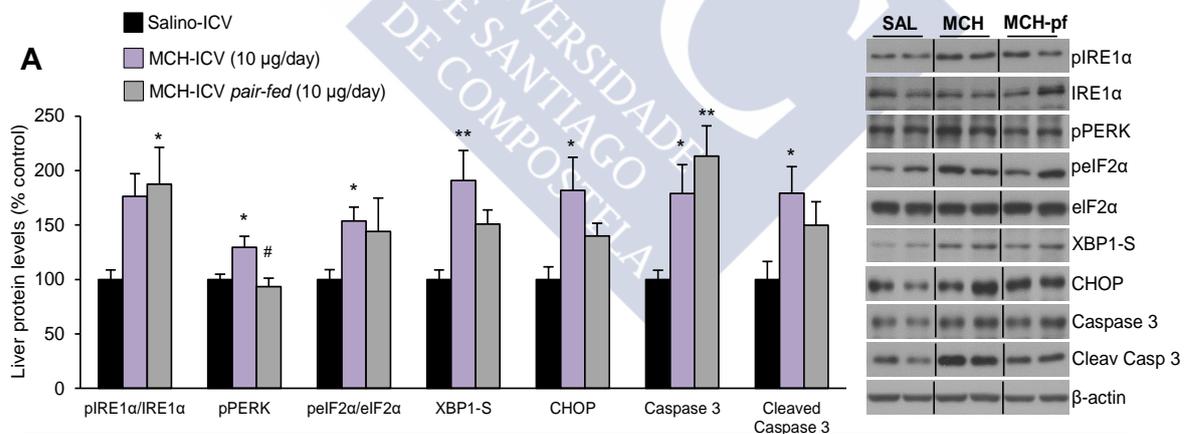


Figura 9. Efectos de la administración ICV crónica de MCH en ratas (10 μ g/día) sobre los niveles de proteínas hepáticas de pIRE1 α , pPERK, pelf2 α /eIF2 α , XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (A). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

Para determinar la relevancia del efecto del ER-stress sobre los efectos de MCH en la acumulación de lípidos en el hígado, simultáneamente a la administración crónica ICV de MCH en ratas, se co-administró de manera intraperitoneal una chaperona química que resuelve la UPR (351,385), el ácido tauroso-deoxicólico (TUDCA). Para determinar la dosis de TUDCA adecuada, aquella más alta que no induzca cambios en ingesta y peso, se realizó una dosis respuesta mediante la administración IP de TUDCA cada 12 horas (Figura 10). Tras este ensayo se determinó que la dosis adecuada de TUDCA es de 250 mg/kg/día.

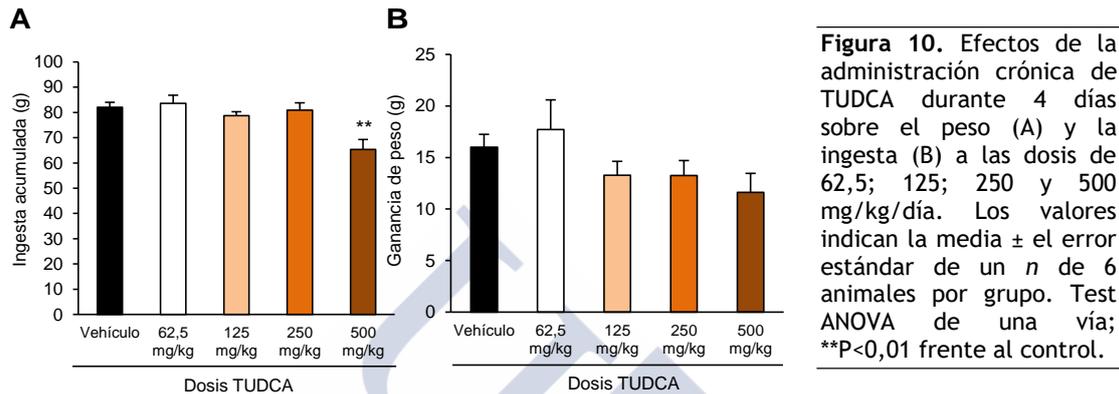


Figura 10. Efectos de la administración crónica de TUDCA durante 4 días sobre el peso (A) y la ingesta (B) a las dosis de 62,5; 125; 250 y 500 mg/kg/día. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 6 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; ** $P < 0,01$ frente al control.

Como se observa en la Figura 11, la administración IP de TUDCA durante una semana, simultáneamente a la infusión ICV de MCH, bloqueó la acumulación de lípidos en el hígado inducido por MCH. La administración central de MCH no indujo un incremento en la concentración de TG hepáticos (Figura 11A) ni gotas lipídicas (Figura 11B) en ratas co-administradas con TUDCA.

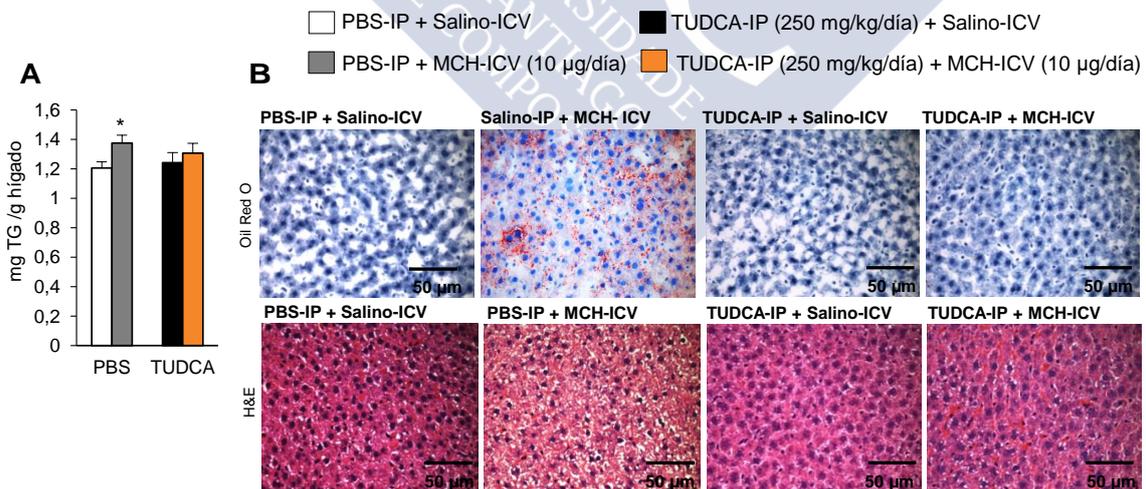


Figura 11. Efectos de la administración crónica ICV de MCH (10 μ g/día) y de TUDCA IP (250 mg/kg/día), sobre los triglicéridos hepáticos (A) y sobre la acumulación lipídica vista como gotas rojas en cortes histológicos de hígado con tinción de *Oil Red O* y como acumulación citoplasmática de grasa en la tinción hematoxilina-eosina (H&E) (B). Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. PBS es tampón fosfato salino, vehículo de TUDCA. Test t-student de una cola; * $P < 0,05$ frente al control.

Resultados

Los efectos sobre el bloqueo de la adiposidad hepática inducido por MCH mediante el uso de TUDCA, se tradujo a nivel proteico en un bloqueo del incremento de los niveles de LPL y de pJNK (Figura 12A). Consecuentemente, TUDCA bloqueó el incremento del ER-stress hepático inducido por MCH (Figura 12A).

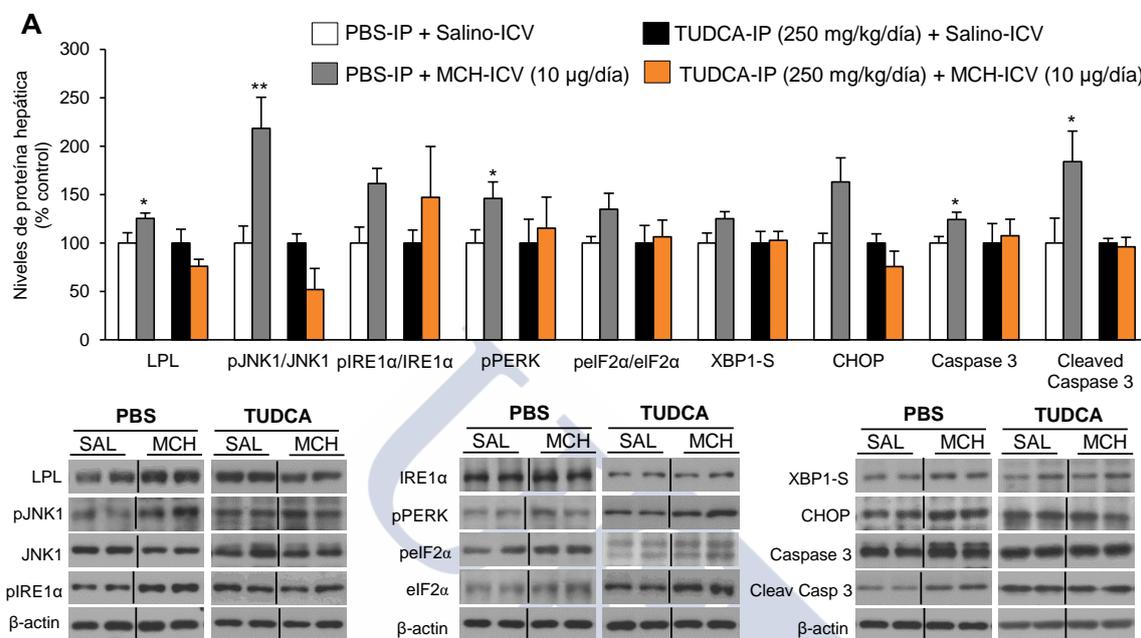


Figura 12. Efectos de la administración crónica ICV de MCH (10 µg/día) y de TUDCA (250 mg/kg/día) sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pelf2α/elf2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (A). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 7 animales por grupo. Test t-student de una cola; **P*<0,05 y ***P*<0,01 frente al control.

En una segunda aproximación, se estudió a GRP78, la chaperona del retículo endoplasmático que facilita en adecuado plegamiento de las proteínas, actuando previamente a la UPR (386-388). Utilizando esta propiedad, se realizó una sobre-expresión de GRP78 en el hígado. Para ello se administró en la vena de la cola de ratones C57BL/6, adenovirus que contienen el gen salvaje (WT) de GRP78 o GFP (proteína verde fluorescente) (121) al mismo tiempo que la administración crónica ICV de MCH (2,5µg/día) durante una semana. La eficiencia de la infección se corroboró mediante una inmunohistoquímica de GFP o GRP78 sobre cortes de hígado prefijados (Figura 13A). La sobre-expresión hepática de GRP78, no bloqueó los efectos orexigénicos ni la ganancia de peso inducida por MCH (Figura 13B-C), pero si la adiposidad hepática favorecida por MCH (Figura 13D-E). A nivel de proteína hepática, la sobre-expresión de GRP78 bloqueó el incremento de la expresión de LPL, pJNK1, marcadores de ER-stress y apoptosis en ratones tratados ICV con MCH (Figura 13F).

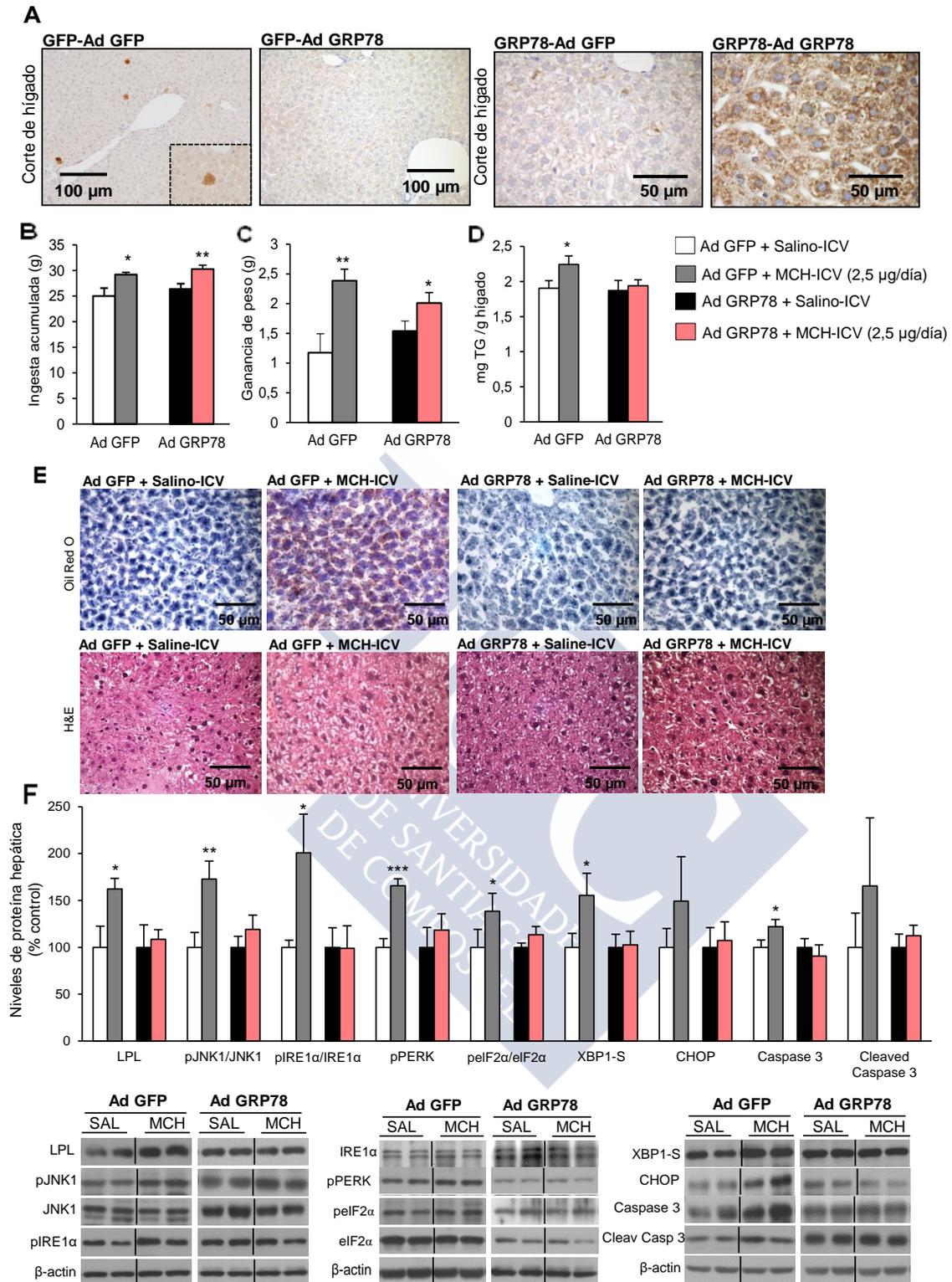
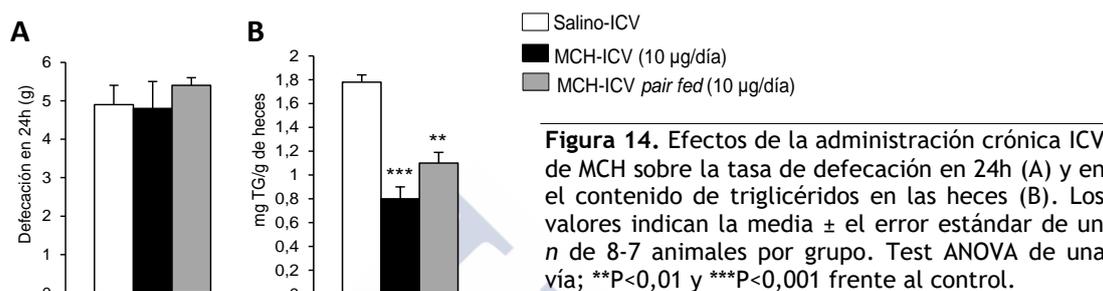


Figura 13. Efectos de la administración crónica de MCH (2,5 µg/día) y de la sobre-expresión hepática de GRP78 en la inmunohistoquímica de IGF y GRP78 sobre cortes histológicos (A), ingesta (B), peso (C), TG hepáticos (D), histología de *Oil-red O* y H&E (E), y sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pelF2α/eIF2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (F). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 7 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05; **P<0,01 y ***P<0,001 frente al control.

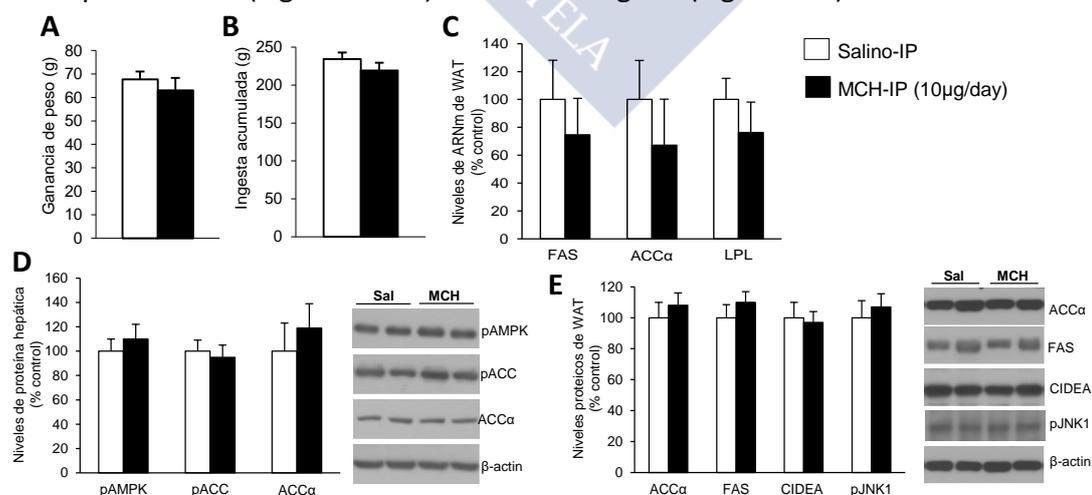
1.4 La administración central de MCH incrementa la absorción lipídica de la dieta

Además de la adiposidad generada por la administración central de MCH en tejido adiposo y en hígado, se estudió si a nivel intestinal hubiera algún efecto mediado por MCH. Aunque no se hayan detectado diferencias en los niveles de defecación (Figura 14A), el contenido en TG de las heces de ambos grupos MCH y MCH *pair-fed* fue significativamente mayor que el grupo control (Figura 14B).



2. La administración periférica de MCH no afecta al programa lipogénico de grasa e hígado

Para descartar la posibilidad de que el MCH difunda desde el CNS hacia la periferia y produzca su acción lipogénica por una acción directa, se realizó una administración periférica intra-peritoneal (IP) de MCH durante 7 días en rata. La dosis administrada en la periferia fue la misma que en ICV (10 μ g/día). La administración IP de MCH no incrementó peso ni ingesta (Figura 15A-B); en la periferia, no moduló la expresión génica o proteica de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico tanto en el tejido adiposo blanco (Figura 15C-D) como en el hígado (Figura 15E).



Sin embargo, la administración IP de MCH no asegura que sea completamente absorbida por el torrente sanguíneo. Por ello, se realizó una administración crónica intravenosa (IV) en rata durante una semana en las mismas dosis que en ICV (10µg/día), utilizando en este caso un grupo *pair-fed*. Los resultados mostraron que la administración IV de MCH incrementó ingesta y peso, pero este último aumento es dependiente de ingesta (Figura 16A-B). Sin embargo, los efectos periféricos en el metabolismo lipídico de grasa e hígado se mantuvieron inalterados tras la administración IV de MCH (Figura 16C-D).

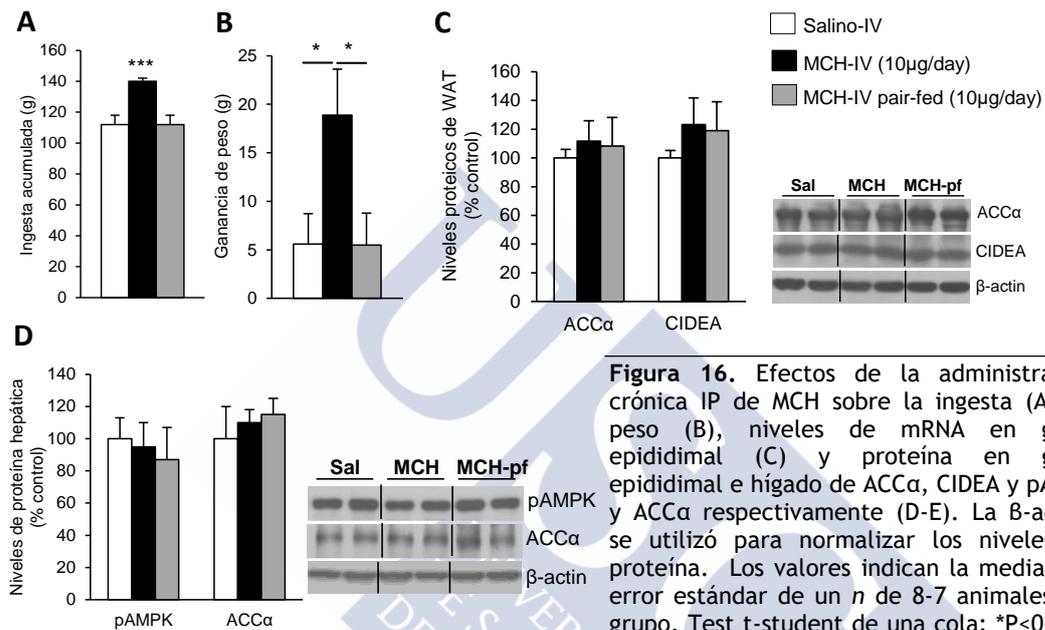


Figura 16. Efectos de la administración crónica IP de MCH sobre la ingesta (A), el peso (B), niveles de mRNA en grasa epididimal (C) y proteína en grasa epididimal e hígado de ACCα, CIDEA y pAMPK y ACCα respectivamente (D-E). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05 y ***P<0,001 frente al control.

3. MCH central realiza su efecto periférico mediante el sistema nervioso autónomo

3.1 El sistema nervioso simpático modula los efectos centrales de MCH sobre el tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco está conectado al CNS mediante el sistema nervioso autónomo, en particular por el sistema nervioso simpático (SNS)(258). Los receptores β-adrenérgicos (β-ARs) transmiten el mensaje del SNS al tejido adiposo, modulando el metabolismo lipídico. La administración crónica ICV de MCH en ratas, disminuyó significativamente la expresión de los 3 receptores independientemente de su efecto orexigénico (Figura 17A). Para esclarecer cómo la acción de MCH en el CNS modula la innervación simpática eferente hacia el tejido adiposo, se realizó un registro multi-fibra sobre la actividad nerviosa autónoma del tejido adiposo. La administración ICV de MCH, disminuyó la actividad nerviosa registrada en los nervios eferentes que inervan el tejido adiposo epididimal de ratas (Figura 17B-C); siendo esta disminución dependiente de la dosis (Figura 17D). La administración ICV de MCH no redujo la

Resultados

respuesta simpática de nervio distal (aférente) del tejido adiposo graso tras la sección del nervio distal (eferente, Figura 17E); por otro lado, tras cortar el nervio aferente, MCH central fue capaz de reducir la actividad simpática del nervio aferente (Figura 17E).

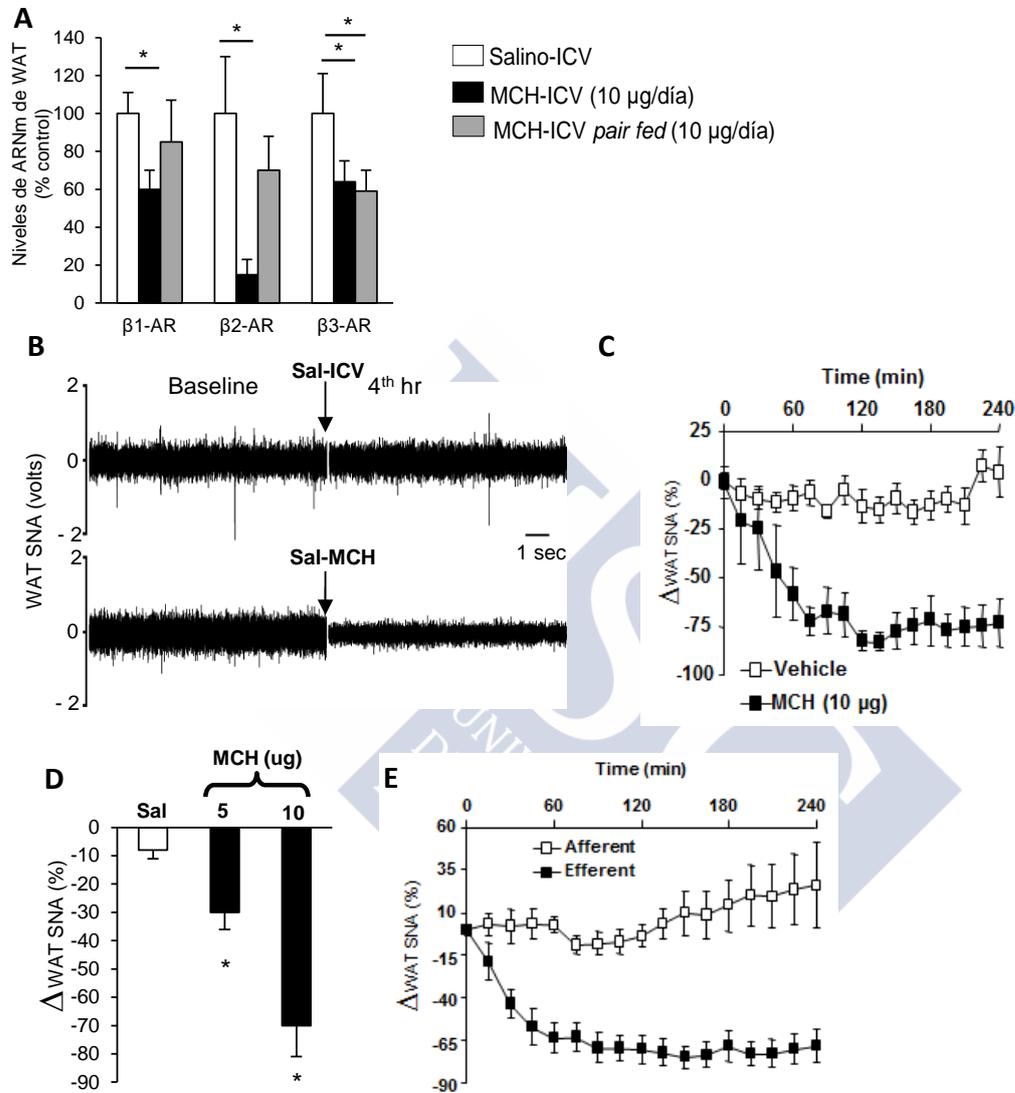


Figura 17. Efectos de la administración crónica ICV de MCH sobre los niveles de mRNA de los receptores β -adrenérgicos en grasa epididimal (A) y en la actividad nerviosa de los nervios eferentes que inervan en tejido adiposo blanco (B-C). Efecto de la administración ICV de MCH a diferentes dosis sobre el SNA de nervios eferentes del tejido adiposo (D) y sobre los nervios eferentes y aferentes tras seccionar el opuesto respectivamente (E) El HPRT se utilizó para normalizar los niveles de mRNA. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test ANOVA de una vía; * P <0,05 frente al control.

Como consecuencia a estos resultados, corroboramos el efecto de MCH sobre el SNS, administrando MCH ICV durante 7 días (2,5 µg/día) a ratones triple-KO (TKO) para los tres receptores β-adrenérgicos. MCH incrementó ingesta tanto en los WT como en los TKO (Figura 18A), pero el incremento de peso sólo se observó en los TKO (Figura 18B). En el tejido adiposo, MCH incrementó los niveles proteicos de ACCα y FAS en los WT a diferencia de los TKO (Figura 18C). Sin embargo, el hígado de los TKO se observó sensible a los efectos sobre la acumulación de lípidos hepáticos inducido por MCH (Figura 19D).

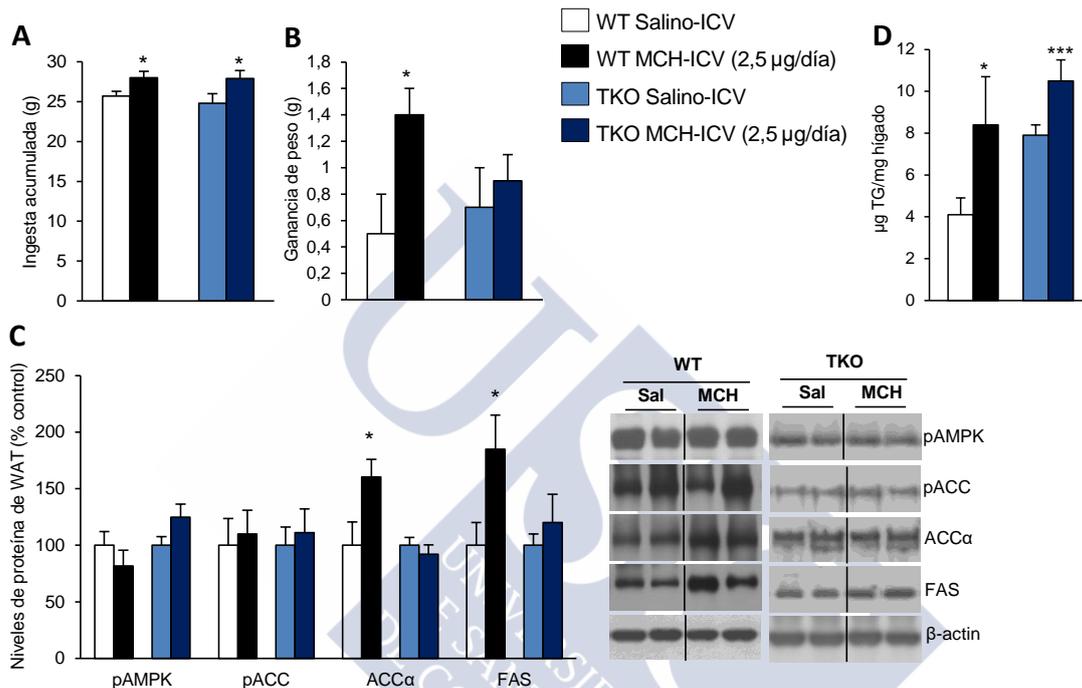


Figura 18. Efectos de la administración crónica ICV de MCH en ratones WT y triple KO para los receptores β-adrenérgicos sobre la ingesta (A), el peso (B) los niveles proteicos en grasa de pAMPK, pACC, ACCα y FAS (C) y sobre la acumulación de triglicéridos hepáticos (D) La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 7-6 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05 y ***P<0,001 frente al control.

3.2 EL sistema nervioso parasimpático modula los efectos centrales de MCH sobre el hígado

La inervación autónoma del hígado involucra tanto al SNS como al sistema nervioso parasimpático (PSNS) (276). Sin embargo, es el PSNS el involucrado en procesos que favorecen la acumulación energética (283). Por ello, se estudió si el nervio vago está involucrado en los efectos centrales de MCH sobre el metabolismo hepático. Tras realizar una vagotomía mediante la disección de ramas dorsales y ventrales del nervio vago de ratas, se administró MCH ICV de forma crónica durante una semana. La eficiencia de la vagotomía (VGX) se comprobó por la observación de hipertrofia estomacal (Figura 19A). El incremento de peso e ingesta inducido por MCH, se detectó en las ratas control (*sham*) pero no en las vagotomizadas (Figura 19B-C). Por otro lado, la infusión central de MCH, redujo los ácidos grasos libres del suero (Figura 19D) e

Resultados

incrementó los valores de triglicéridos (Figura 19E) y ácidos grasos libres hepáticos (Figura 19F) en las ratas *sham*; sin embargo, las ratas vagotomizadas (VGX) fueron resistentes a los efectos de MCH sobre los triglicéridos (Figura 19D) y AGL de hígado y suero (Figura 19D-F).

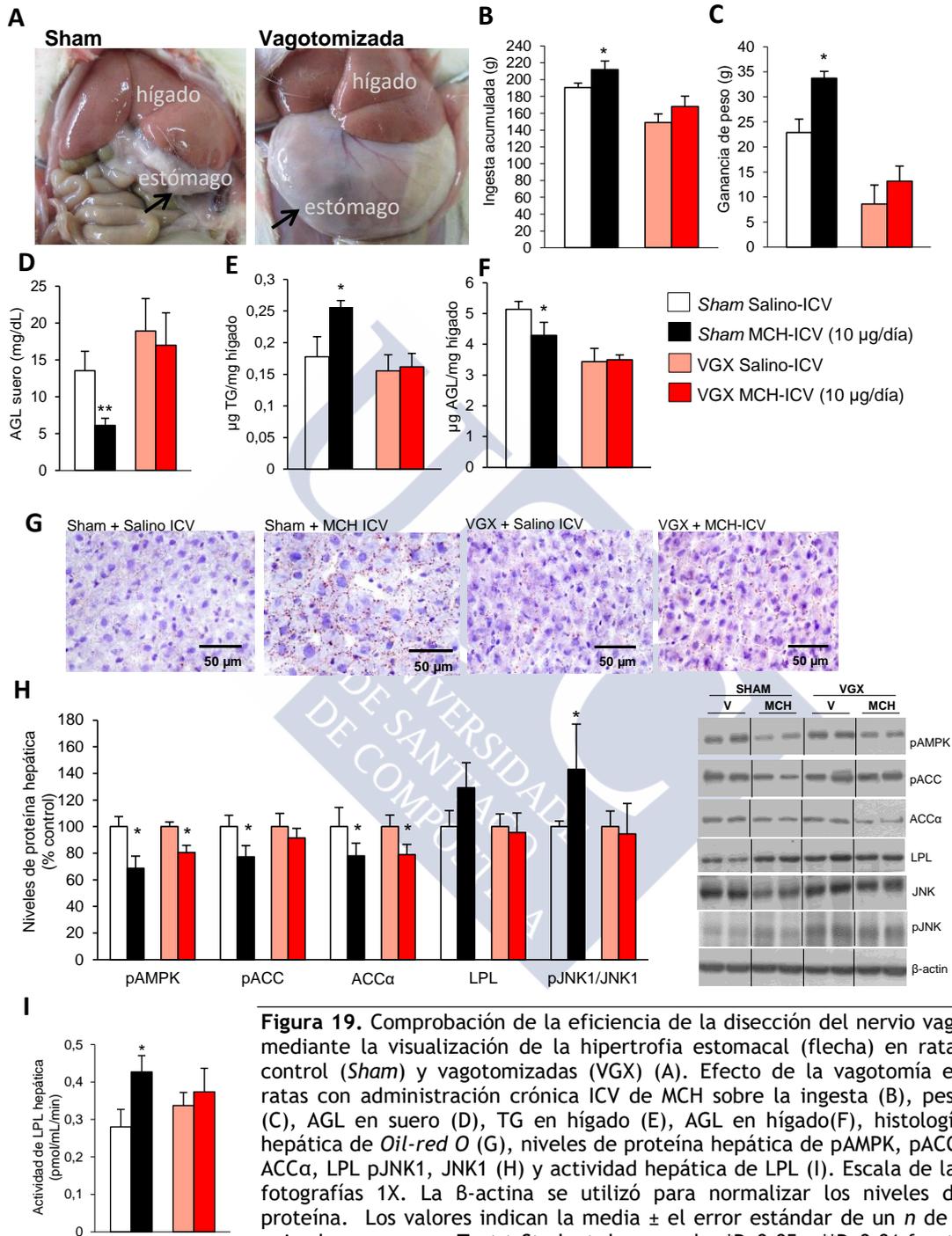


Figura 19. Comprobación de la eficiencia de la disección del nervio vago mediante la visualización de la hipertrofia estomacal (flecha) en ratas control (*Sham*) y vagotomizadas (VGX) (A). Efecto de la vagotomía en ratas con administración crónica ICV de MCH sobre la ingesta (B), peso (C), AGL en suero (D), TG en hígado (E), AGL en hígado (F), histología hepática de *Oil-red O* (G), niveles de proteína hepática de pAMPK, pACC, ACC α , LPL pJNK1, JNK1 (H) y actividad hepática de LPL (I). Escala de las fotografías 1X. La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

En concordancia, la tinción lipídica Oil-red O sobre cortes histológicos de hígado se observó más intensa en ratas *sham* con MCH que en las VGX (Figura 19G). A nivel proteico, los efectos de MCH en ratas VGX sobre los niveles de pACC, LPL y pJNK1 estaban bloqueados (Figura 19H). Al igual que ocurre con la expresión proteica de LPL, el incremento de su actividad inducido por MCH central estaba inhibido en ratas VGX (Figura 19H). Sin embargo, en el tejido adiposo blanco, no se ha detectado ningún bloqueo sobre los efectos centrales de MCH debido a la VGX (Figura 19I).

Los efectos periféricos de MCH en el CNS se modulan desde el núcleo arcuato y núcleo lateral del hipotálamo

4.

4.1 La acción de MCH y su receptor en el ARC, modulan el metabolismo lipídico del tejido adiposo

Usando vectores adenovirales, se sobre-expresó el receptor 1 de MCH (MCH-R1) o el control GFP, en el ARC mediante estereotaxia (Figura 20A). La eficiencia del pinchazo se corroboró analizando por inmunohistoquímica la positividad del virus control que sobre-expresa GFP en el ARC siendo el resultado de un 62% (n=8) (Figura 20B). Esta sobre expresión del MCH-R1 en el ARC (Figura 20C), incrementó ingesta y peso durante la semana que dura el efecto del virus (Figura 20D -E).

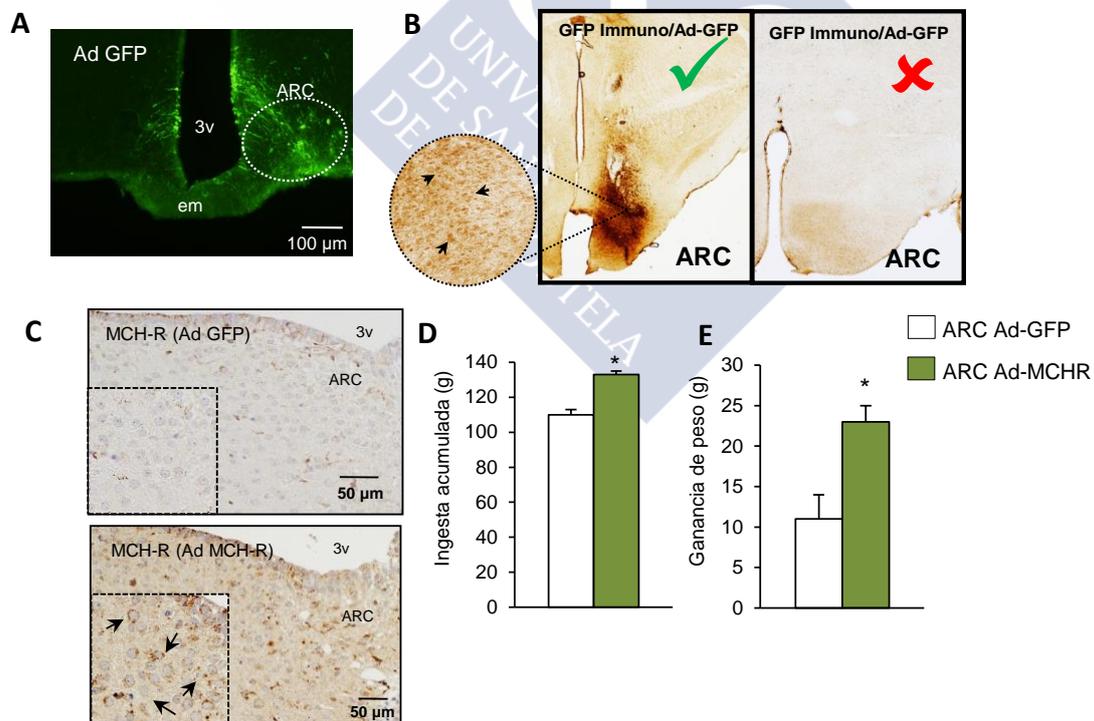


Figura 20. Comprobación de la administración de adenovirus GFP y MCH-R en el arcuato, mediante la detección del verde fluorescente emitido por GFP (A) o por inmunohistoquímica de GFP (B) y MCH-R (C). Efecto de la sobre-expresión de MCH-R en el ARC sobre ingesta (D) y peso (E). Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; * $P < 0,05$ frente al control.

Resultados

Al analizar el efecto periférico de la sobre-expresión del MCH-R1 sobre el núcleo ARC, se observó que en el hígado, esta sobre-expresión solamente incrementó los niveles proteicos de pACC y disminuyó la ratio pJNK1/JNK1 (Figura 21A). Sin embargo, en el tejido adiposo blanco, se encontró un incremento significativo de los niveles proteicos de ACC α y FAS y una disminución tanto de pHSL como de la ratio pJNK1/JNK1 (Figura 21B).

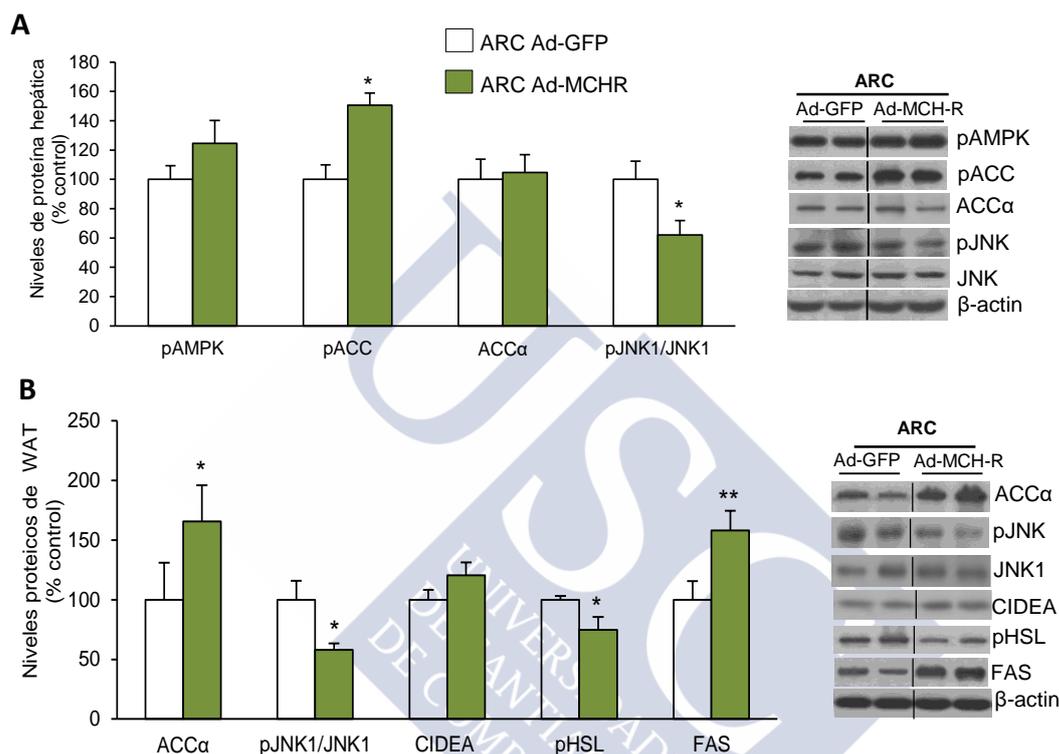


Figura 21. Efecto de la sobre-expresión de MCH-R en el ARC sobre los niveles proteicos de pAMPK, pACC, ACC α , pJNK1 y JNK1 en el hígado (A); y sobre los niveles proteicos de ACC α , pJNK1, JNK1, CIDEA pHSL y FAS en el tejido adiposo blanco (B). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

Para corroborar los resultados obtenidos con los adenovirus, y porque los efectos generados por la sobre-expresión del receptor de MCH pueden variar respecto a la acción de MCH de forma aislada, usamos bombas osmóticas conectadas específicamente en el núcleo arcuato (Figura 22A). La administración crónica (7 días) de MCH en el núcleo ARC (10 μ g/día), incrementó la ingesta (Figura 22B) y peso corporal (Figura 22C). A nivel periférico, no se han observado variaciones en las proteínas hepáticas estudiadas (Figura 22D). Sin embargo, en el tejido adiposo blanco se detectaron incrementos en los valores proteicos de ACC α , CIDEA y FAS, así como una disminución en la ratio de pJNK1/JNK1 y pHSL (Figura 22E).

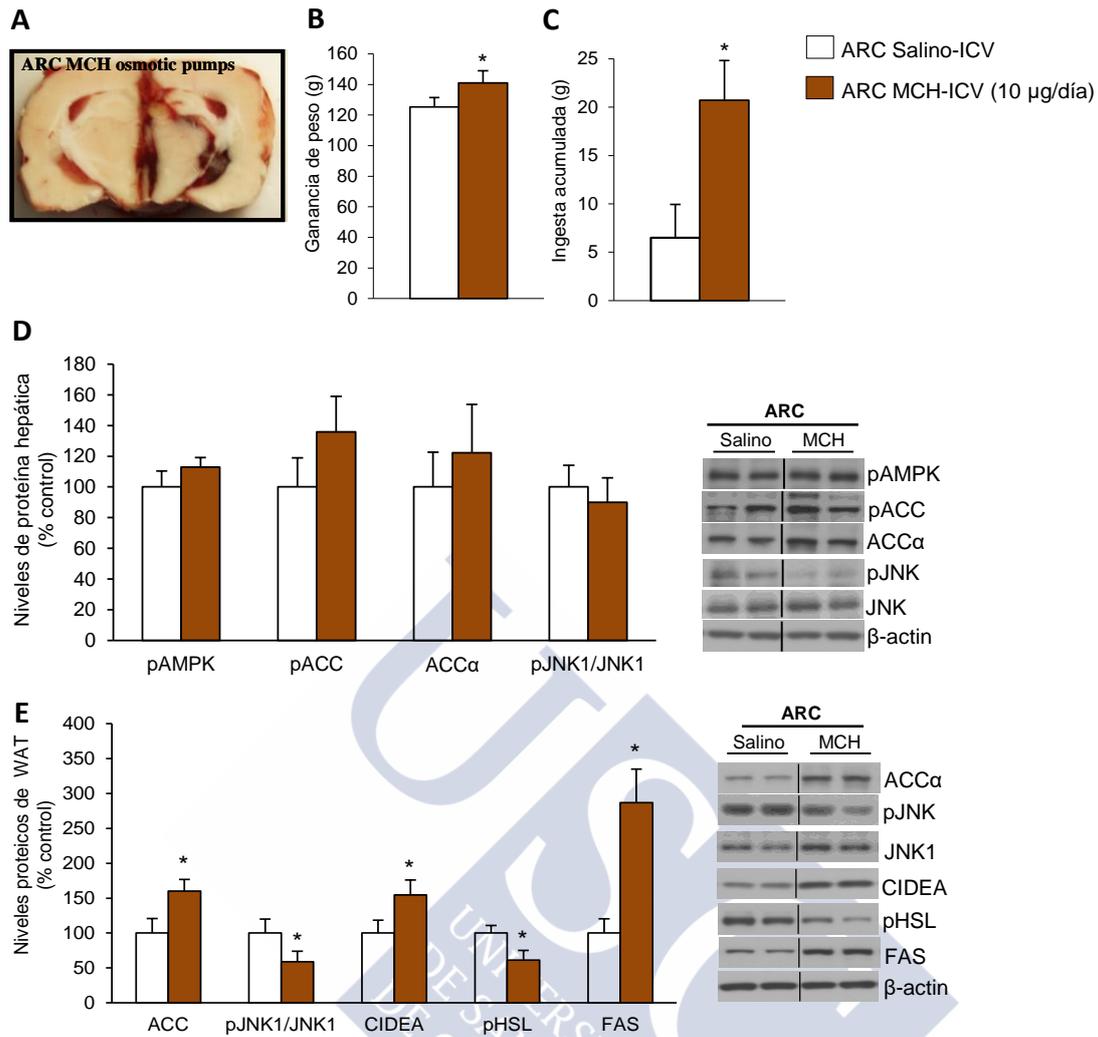


Figura 22. Efecto de la administración crónica de MCH en el ARC (10µg/día) (A) sobre la ingesta (B), peso (C), niveles proteicos de pAMPK, pACC, ACCα, pJNK1 y JNK1 en el en el hígado (D); y sobre los niveles proteicos de ACCα, pJNK1, JNK1, CIDEA, pHSL y FAS en el tejido adiposo blanco (E). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; *P<0,05 y **P<0,01 frente al control.

4.2 La acción de MCH y su receptor en el LHA, modulan el metabolismo lipídico del hígado

De nuevo, usando vectores adenovirales, se sobre-expresó el receptor 1 de MCH (MCH-R1) o el control GFP, en el núcleo lateral del hipotálamo (Figura 23A). La eficiencia del pinchazo se corroboró analizando por inmunohistoquímica la positividad GFP en el lateral siendo el resultado de un 87,5% (n=8) (Figura 23B). La sobre-expresión del MCH-R1 en el LHA (Figura 23C), incrementó ingesta y peso durante la semana que dura el efecto del virus (Figura 23D-E). A nivel hepático, la sobre-expresión del MCH-R1 en el LHA disminuyó los niveles proteicos de pACC mientras que aumenta de forma significativa los niveles de LPL y la ratio pJNK1/JNK1 (Figura 23F). Sin embargo, en el tejido adiposo no se han detectado diferencias significativas en las proteínas estudiadas (Figura 23G).

Resultados

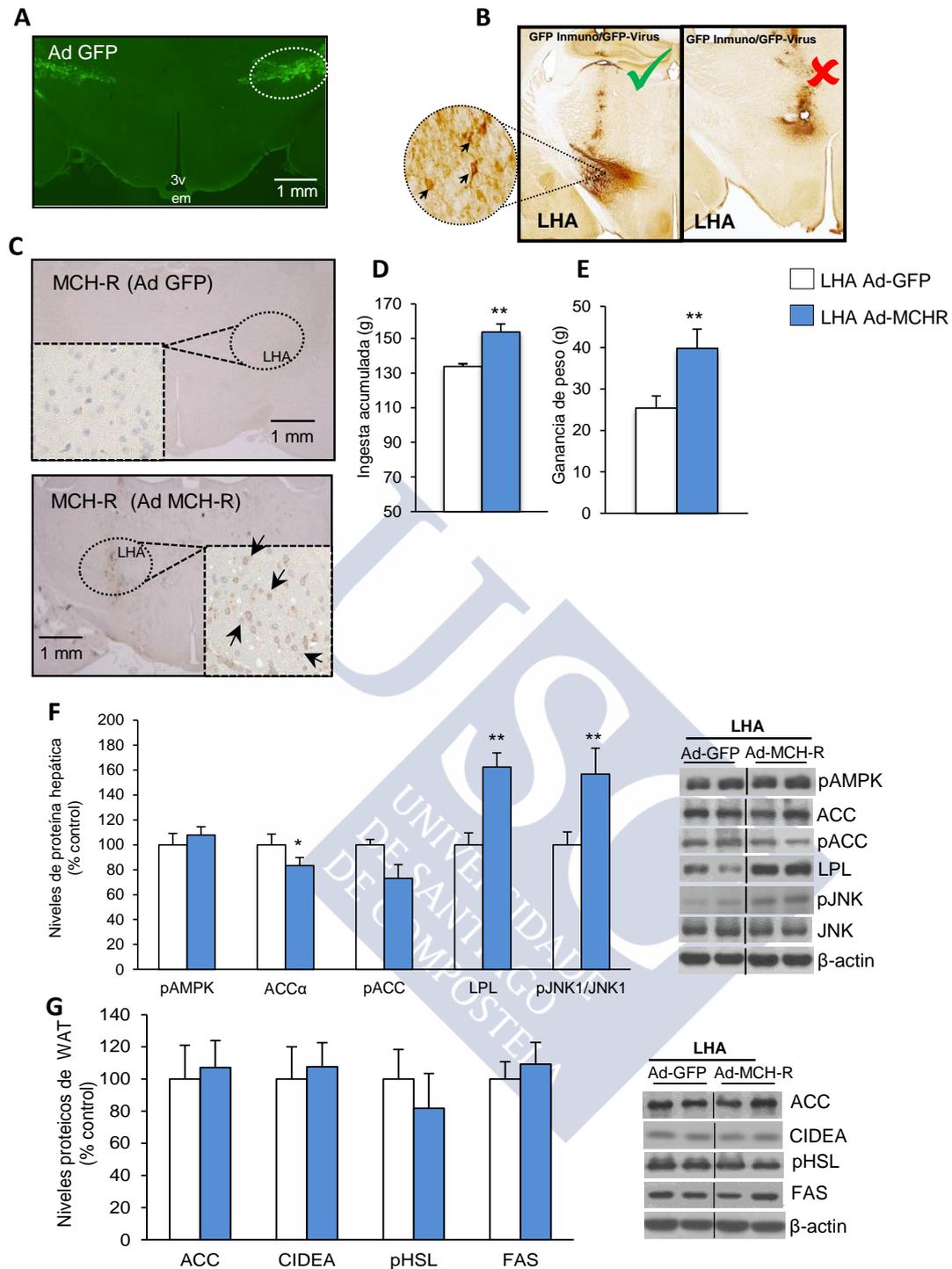


Figura 23. Comprobación de la administración de adenovirus GFP y MCH-R en el LHA, mediante la detección del verde fluorescente emitido por GFP (A) o por inmunohistoquímica de GFP (B) y MCH-R (C). Efecto de la sobre-expresión de MCH-R en el LHA sobre ingesta (D), peso (E), niveles proteicos de pAMPK, ACC α , pACC, pJNK1 y JNK1 en el en el hígado (F); y sobre los niveles proteicos de ACC α , CIDEA, pHSL y FAS en el tejido adiposo blanco (G). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

Para corroborar estos efectos, al igual que con el ARC, se administró MCH en el LHA (10µg/día) durante 7 días usando bombas osmóticas (Figura 24A). Se observó que la infusión crónica de MCH en el LHA no incrementó peso ni ingesta (Figura 24B-C). Sin embargo, en el hígado se detectó una disminución de los niveles proteicos de pACC y un incremento de LPL y la ratio de pJNK1/JNK1 inducido por MCH (Figura 24D). En el tejido adiposo blanco, no se observan diferencias en los niveles de las proteínas estudiadas (Figura 24E).

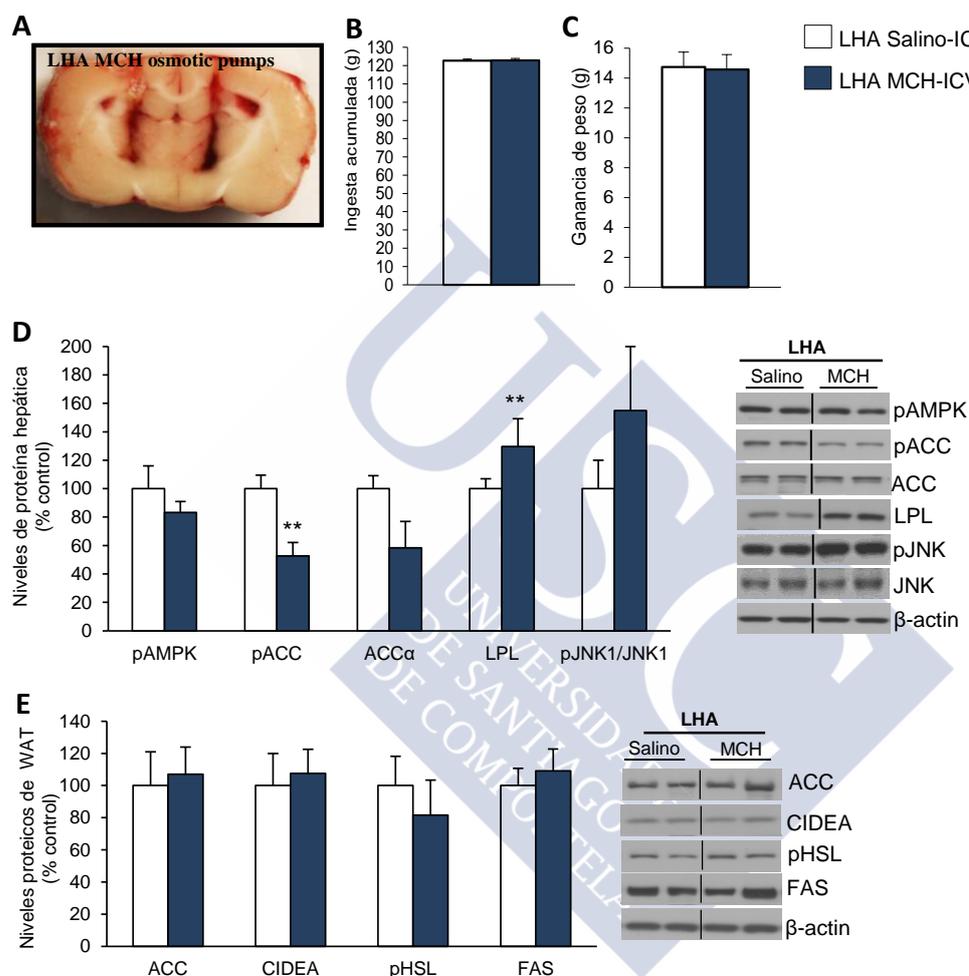


Figura 24. Efecto de la administración crónica de MCH en el LHA (10µg/día) (A) sobre la ingesta (B), peso (C), niveles proteicos de pAMPK, pACC, ACCα, pJNK1 y JNK1 en el en el hígado (D); y sobre los niveles proteicos de ACCα, CIDEA, pHSL y FAS en el tejido adiposo blanco (E). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; *P<0,05 y **P<0,01 frente al control.

Siendo el núcleo ventromedial del hipotálamo un sensor del estado nutricional y centro de la regulación del gasto energético (29,122,126), se estudió el efecto de la sobre-expresión del MCH-R1 en el VMH (Figura 25A). Sin embargo, la sobre-expresión del MCH-R1 en dicho núcleo no produjo ningún efecto sobre ingesta, peso (Figura 25B-C) ni sobre los niveles de proteínas de hígado o grasa estudiadas en ARC y LHA (Figura 25D-E).

Resultados

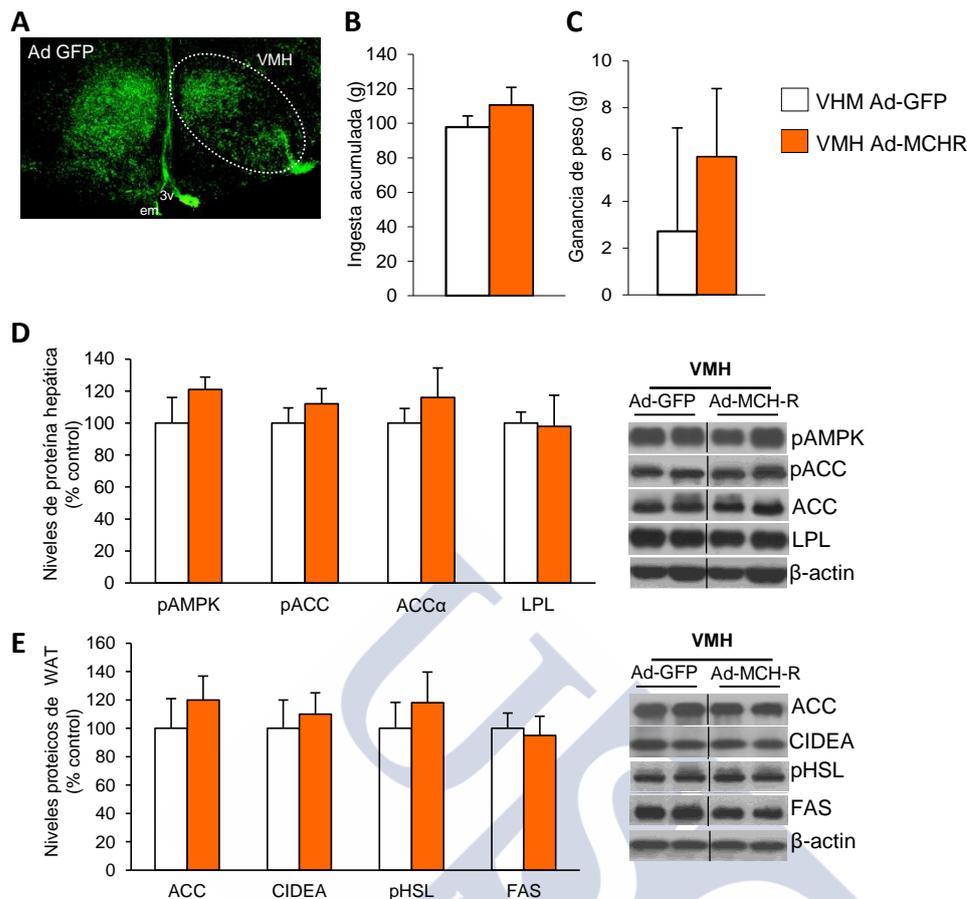


Figura 25. Efecto de la sobre-expresión de MCH-R o GFP en el VMH (A) sobre ingesta (B), peso (C), niveles proteicos de pAMPK, pACC, ACC α , y LPL en el hígado (D); y sobre los niveles proteicos de ACC α , CIDEA, pHSL y FAS en el tejido adiposo blanco (E). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test t-Student de una cola.

4.3 La inhibición genética del MCH-R1 en el LHA, reduce la esteatohepatitis inducida por dieta deficiente en colina-metionina, a través del nervio vago

Hasta ahora, se ha mostrado que la sobre-expresión de MCH-R1 o la administración de MCH en el LHA modulaba el metabolismo hepático. Por tanto, se quiso determinar si la inhibición del MCH-R1 en dicha área, sería suficiente para mejorar el estado hepático de ratas alimentadas con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Esta dieta MCD produce esteatohepatitis no alcohólica sin producir ningún otro evento fisiológico relacionado con obesidad o síndrome metabólico (389). Para inhibir el MCH-R1, se administró mediante estereotaxia en el LHA (Figura 26A) un lentivirus que codifica un RNA horquilla (shRNA) contra el mRNA de MCH-R1 en ratas alimentadas con dieta MCD. Tras comprobar la eficiencia del aislamiento de proteínas del núcleo hipotalámico lateral (Figura 26B), la reducción del MCH-R1 por el shRNA en el LHA se demostró mediante *western blot* (Figura 26C). La inhibición del MCH-R1 en el LHA, redujo el contenido de triglicéridos hepáticos en ratas con esteatohepatitis (Figura 26D). Los depósitos lipídicos observado en las tinciones hepáticas *Oil Red O* y

hematoxilina-eosina, mostraron una importante esteatosis de las ratas alimentadas con MCD en comparación con las alimentadas con dieta normal (estándar). Sin embargo, las ratas tratadas con el shRNA anti MCH-R1 alimentadas con dieta MCD, presentaron una marcada reducción de los depósitos lipídicos (Figura 26E). Así mismo, la tinción tricrómica de Masson, utilizada para teñir las fibras de colágeno, mostraron una reducción de la fibrosis característica de la esteatohepatitis alrededor de la vena central de las áreas porta de ratas en las que se inhibió el MCH-R1 alimentadas con dieta MCD (Figura 26E).

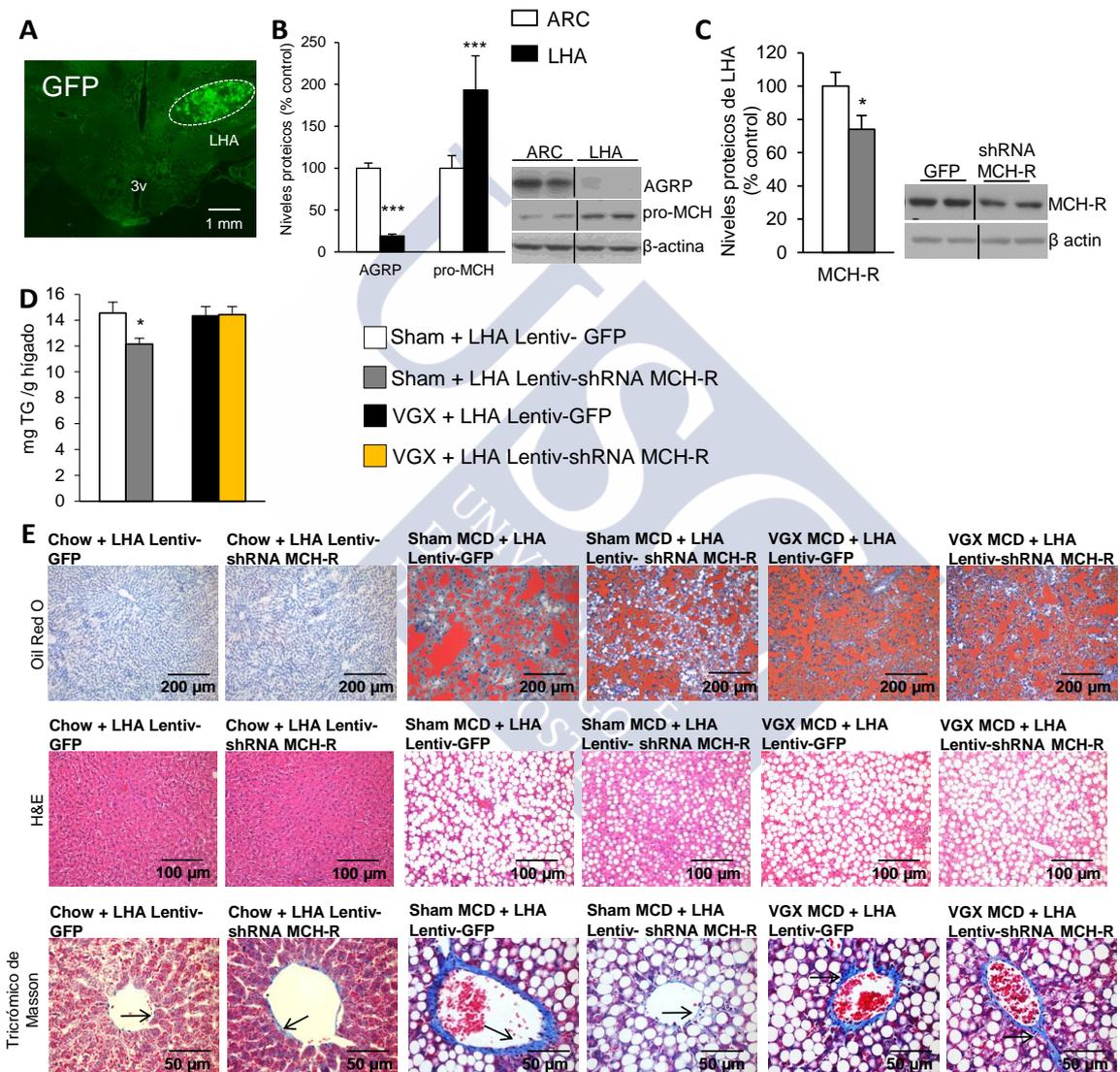


Figura 26 Localización de la administración de lentivirus en el núcleo lateral detectando GFP (A). Comprobación de la eficacia del aislamiento de núcleos hipotalámicos mediante *western blot* de proteínas específicas de ARC y LHA respectivamente: AGRP y pro-MCH (B). Efecto de la inhibición de MCH-R en el LHA en ratas alimentadas con dieta MCD y vagotomizadas, sobre los niveles de triglicéridos hepáticos (D) y sobre la morfología hepática en histologías de *Oil-red O*, H&E y tinción tricrómica de Masson (E). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ frente al control.

Resultados

La reversión del daño hepático inducido por la dieta MCD tras la inhibición del MCH-R1 en el lateral, también se reflejó en la reducción de los niveles séricos de la alanina aminotransaminasa (ALT) y de la aspartato aminotrasferasa (AST) (Figura 27A). A nivel proteico, la reducción de MCH-R1 en el LHA, redujo los niveles proteicos de LPL, pJNK1 y los marcadores del ER-stress y apoptosis (Figura 27B). Como se ha descrito con anterioridad, el nervio vago media los efectos hepáticos inducidos por la administración crónica central de MCH. Por ello, se estudió si la mejora de la esteatohepatitis inducida por MCD debido a la reducción del MCH-R1 en el LHA, estaba mediado por el nervio vago. Los resultados mostraron que la vagotomía bloquea los efectos del silenciamiento del MCH-R1 en el LHA sobre los niveles de triglicéridos hepáticos (Figura 26D), tinción histológica de *Oil red O*, H&E y fibrosis (Figura 26E); niveles séricos de AST y ALT (Figura 27A) y niveles proteicos en el hígado (Figura 27B).

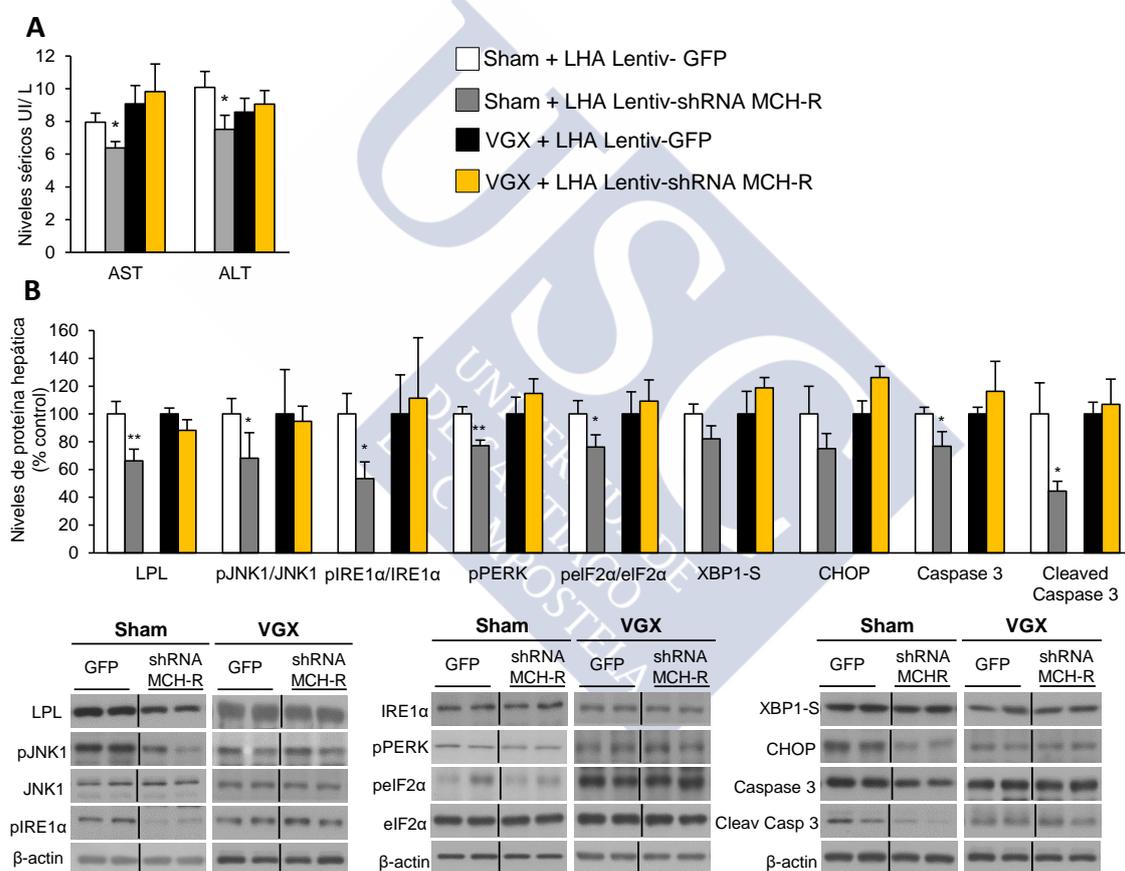


Figura 27. Efecto de la inhibición de MCH-R en el LHA en ratas alimentadas con dieta MCD y vagotomizadas, sobre los niveles séricos de las transaminasas ALT y AST (A) y sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pelf2α/eIF2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (B). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 7 animales por grupo. Test t-Student de una cola; **P*<0,05 y ***P*<0,01 frente al control.

El sistema opioide, mediante el receptor *kappa*, media las acciones centrales de MCH sobre el metabolismo lipídico del hígado

5. 5.1 El MCH-R1 y el KOR co-localizan en el LHA, y MCH induce la producción de prodinorfina

Estudios previos han demostrado que existe una asociación tanto anatómica como funcional entre MCH y el sistema kappa opioide (173,253,254). Sin embargo se desconoce si KOR modula las acciones periféricas de MCH o si el sistema central kappa opioide es capaz de modular directamente el metabolismo periférico. Usando la proteína guía tdTomato, se identificaron en el LHA las neuronas que expresan CRE-MCH-R1 en ratones transgénicos y se estudió si dichas neuronas expresaban KOR mediante una doble inmunohistoquímica (Figura 28A). El análisis confocal de la doble inmunohistoquímica determinó que la mayoría de las células que expresan el MCH-R1 (Figura 28A panel a) son positivas para KOR (Figura 28A panel b-c).

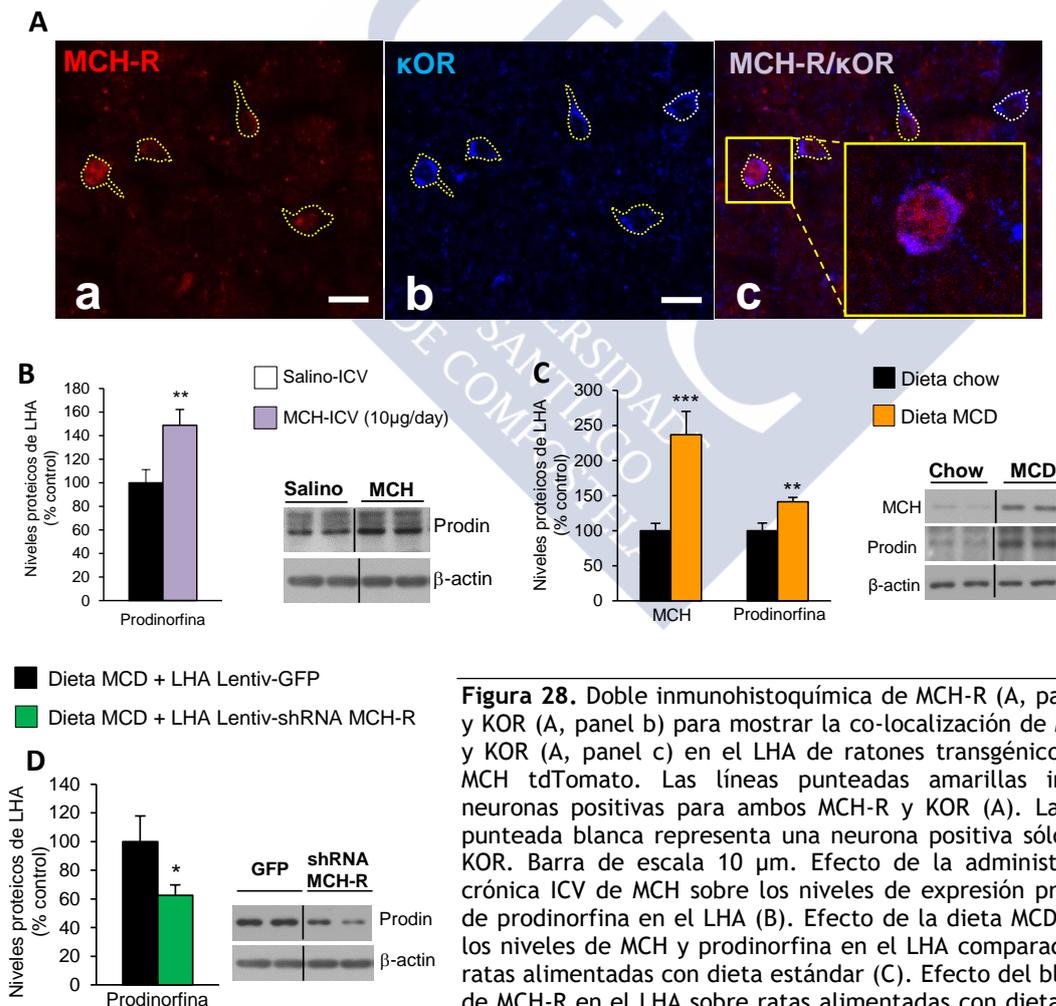


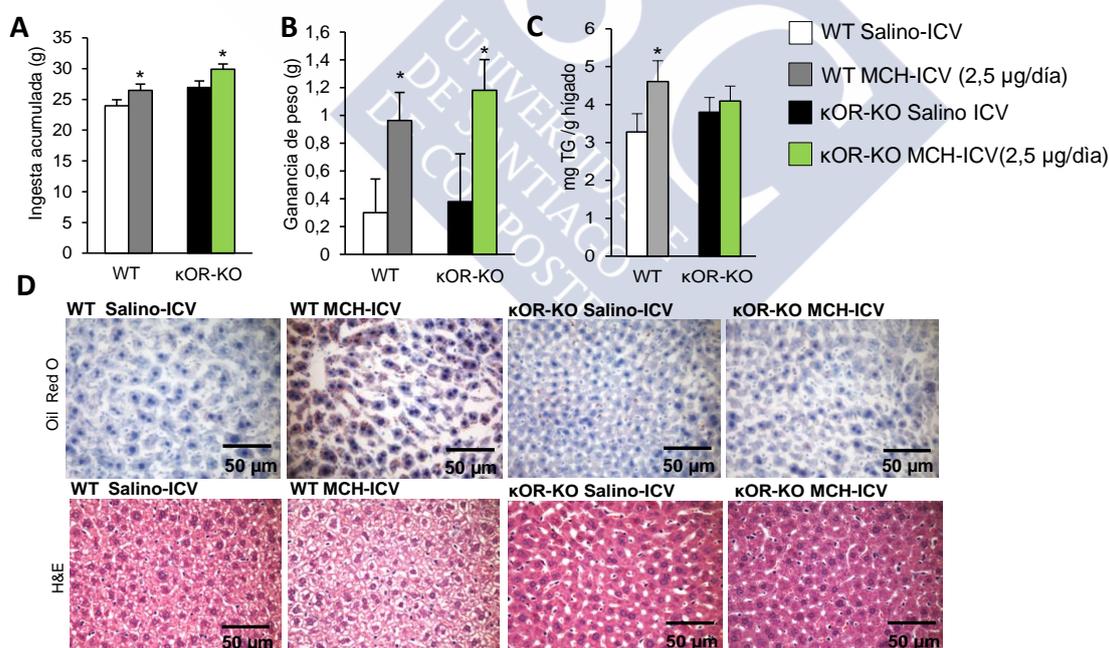
Figura 28. Doble inmunohistoquímica de MCH-R (A, panel a) y KOR (A, panel b) para mostrar la co-localización de MCH-R y KOR (A, panel c) en el LHA de ratones transgénicos cre-MCH tdTomato. Las líneas punteadas amarillas indican neuronas positivas para ambos MCH-R y KOR (A). La línea punteada blanca representa una neurona positiva sólo para KOR. Barra de escala 10 µm. Efecto de la administración crónica ICV de MCH sobre los niveles de expresión proteica de prodinorfina en el LHA (B). Efecto de la dieta MCD sobre los niveles de MCH y prodinorfina en el LHA comparado con ratas alimentadas con dieta estándar (C). Efecto del bloqueo de MCH-R en el LHA sobre ratas alimentadas con dieta MCD, sobre los niveles proteicos de prodinorfina en el LHA (D). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-Student de dos colas. *P<0,025, **P<0,005 y ***P<0,001 frente al control.

Resultados

Siendo la prodinorfina el ligando natural de KOR, determinamos si MCH influye en su expresión. Observamos que la administración crónica ICV de MCH, incrementó significativamente la expresión de prodinorfina en el hipotálamo lateral (Figura 28B). En ratas alimentadas con dieta MCD, existe un incremento significativo en la expresión tanto de MCH como de prodinorfina en el LHA, en comparación con ratas alimentadas con estándar (Figura 28C). Sin embargo, al inhibir el MCH-R1 en el lateral mediante un shRNA en esas ratas, se redujo significativamente los niveles de prodinorfina en el LHA (Figura 28D).

5.2 Los ratones KO para KOR son resistentes a los efectos centrales de MCH sobre el ER-stress y el metabolismo lipídico del hígado

En correspondencia con el hecho de que la administración central de MCH, induce la producción de prodinorfina en el LHA, se estudió si la infusión crónica ICV de MCH era capaz de modular el metabolismo lipídico y del ER-stress hepático en ratones KO para KOR. La administración crónica ICV de MCH (2,5 µg/día) estimuló ingesta y ganancia de peso tanto en el fenotipo salvaje (WT) como en los KOR-KO (Figura 29A-B). Sin embargo, mientras que en los WT el tratamiento con MCH incrementa los niveles de TG hepáticos, los ratones KOR-KO eran resistentes a dicho efecto inducido por MCH (Figura 29-EC).



A nivel proteico, tanto las proteínas clave del metabolismo lipídico hepático (LPL y pJNK1) como del ER-stress y apoptosis presentan, un incremento significativo en ratones WT tratados con MCH, pero no en lo KOR-KO (Figura 30A).

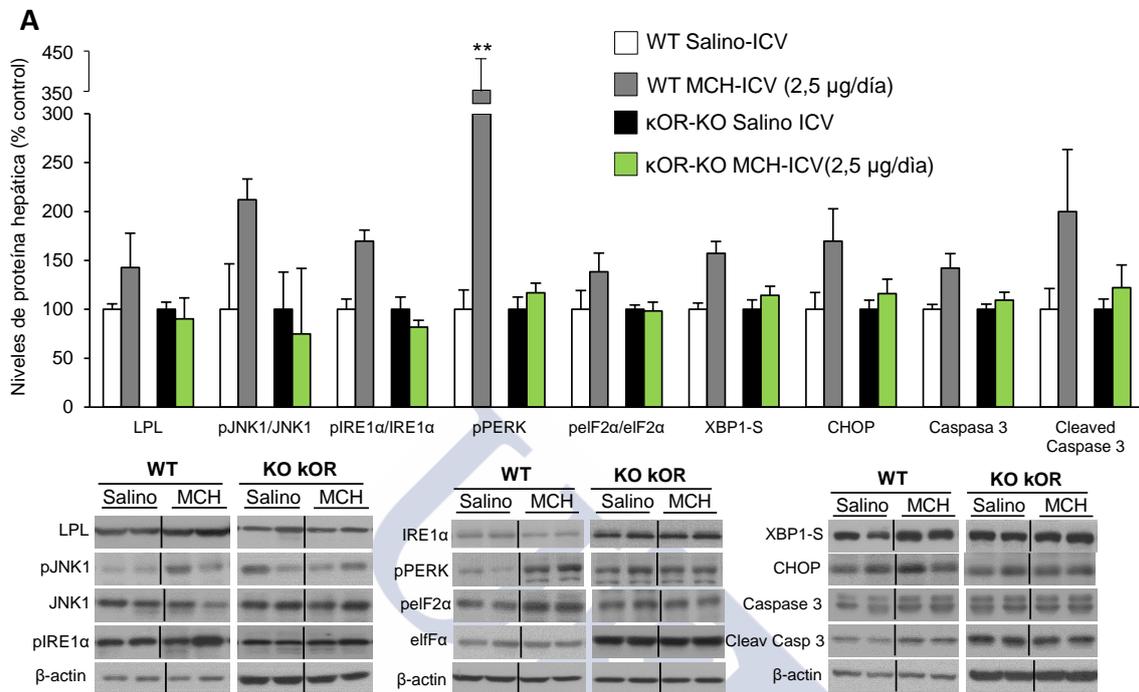


Figura 30. Efectos de la administración crónica ICV de MCH (2,5 µg/día) en ratones WT y KOR-KO sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pelf2α/elf2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3. La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05 y **P<0,01 frente al control.

5.3 El silenciamiento genético de KOR en el LHA protege frente al efecto adipogénico y ER-stress hepático inducido por MCH mediante el ANS

Mediante el uso de un adenovirus asociado (AAV) se administró un shRNA contra KOR en el LHA mediante estereotaxia. La eficiencia de la administración en el lateral se corroboró mediante la detección de GFP (Figura 31A) y midiendo los niveles proteicos de KOR en el hipotálamo lateral (figura 31B). 3 semanas después de la administración del AAV-shRNA KOR, se administró MCH ICV durante una semana (10 µg/día). La administración crónica ICV de MCH incrementa ingesta y peso independientemente de la inhibición de KOR (Figura 31C-D). Como se ha descrito en la introducción, en la medula oblongata del tronco encefálico, el núcleo dorsomedial del nervio vago (Figura 31E) es imprescindible en el control del tono parasimpático del nervio vago (390). La administración crónica ICV de MCH, incrementó la inmunoreactividad del marcador de actividad neuronal c-Fos en las neuronas del DMV (Figura 31F). Sin embargo, el silenciamiento de KOR en el LHA impidió la activación neuronal del DMV inducido por la administración crónica de MCH (Figura 31G).

Resultados

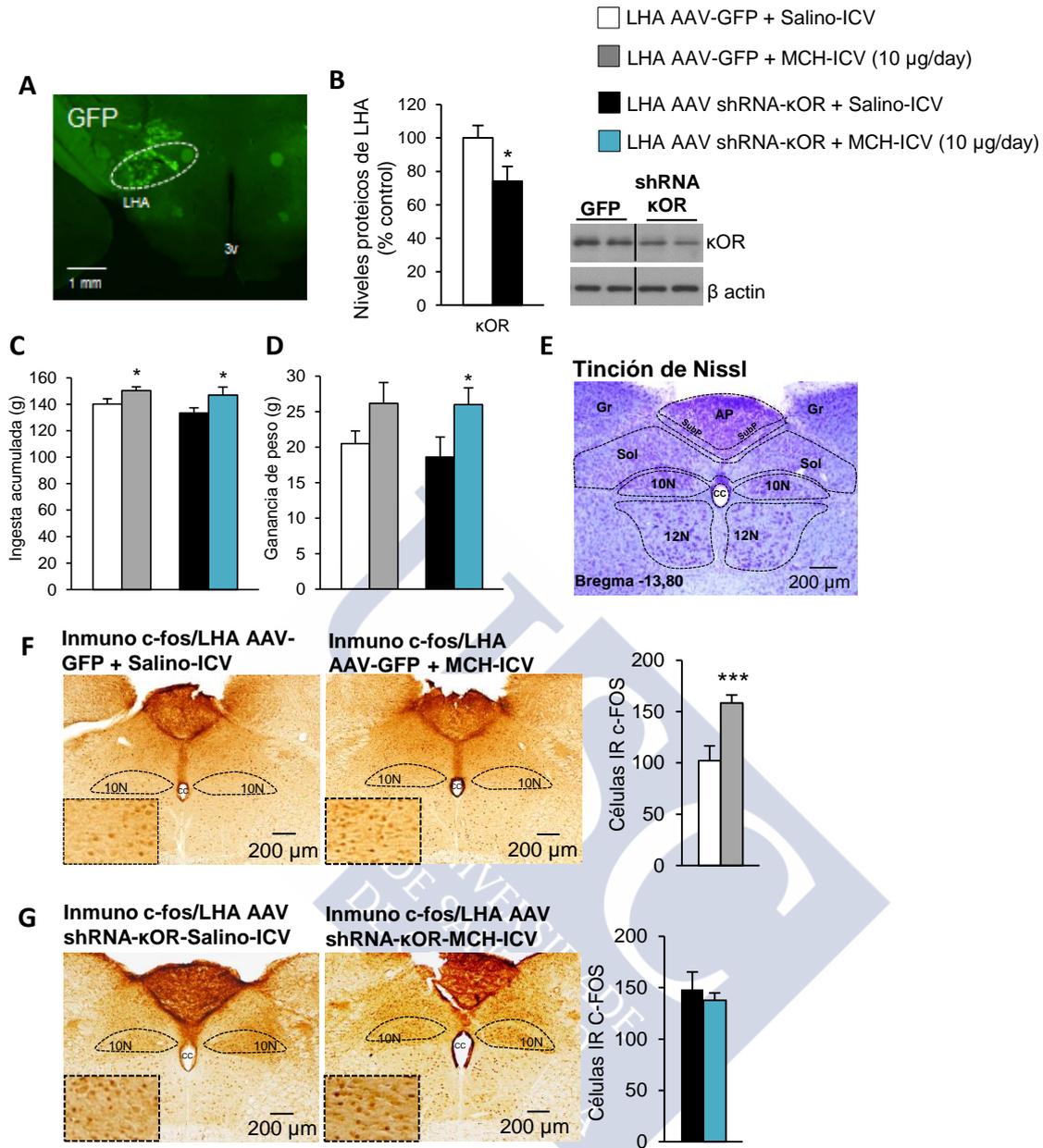


Figura 31. Comprobación de la administración del AAV shRNA-KOR en el LHA mediante GFP (A) y disminución a nivel proteico de KOR por efecto del shRNA (B). Efecto de la inhibición de KOR en el LHA ratas con tratamiento crónico ICV de MCH (10 µg/día) sobre peso e ingesta (C-D). Fotomicrografía de una sección médula oblongata del tronco encéfalo, representando el DMV con tinción de Nissl (E). Efecto de la inhibición de KOR en el LHA ratas con tratamiento crónico ICV de MCH (10 µg/día) sobre la inmunoreactividad de c-Fos en el DMV (F-G). Gr: núcleo grácil; AP: área postrema; SubP: área subpostrema; Sol: tracto solitario; 10N: nervio vago; CC: canal central; 12N: nervio hipoglosa. La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Test t-student de una cola; Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 8-7 animales por grupo. **P*<0,05 y ****P*<0,001 frente al control.

A nivel periférico, el incremento de los niveles de triglicéridos inducido por MCH se bloquea al silenciar KOR en el LHA (Figura 32A-B). En el hígado, la inhibición de KOR en el LHA impide el incremento de las proteínas implicadas en la acumulación lipídica, ER-stress y apoptosis inducido por MCH (Figura 32C).

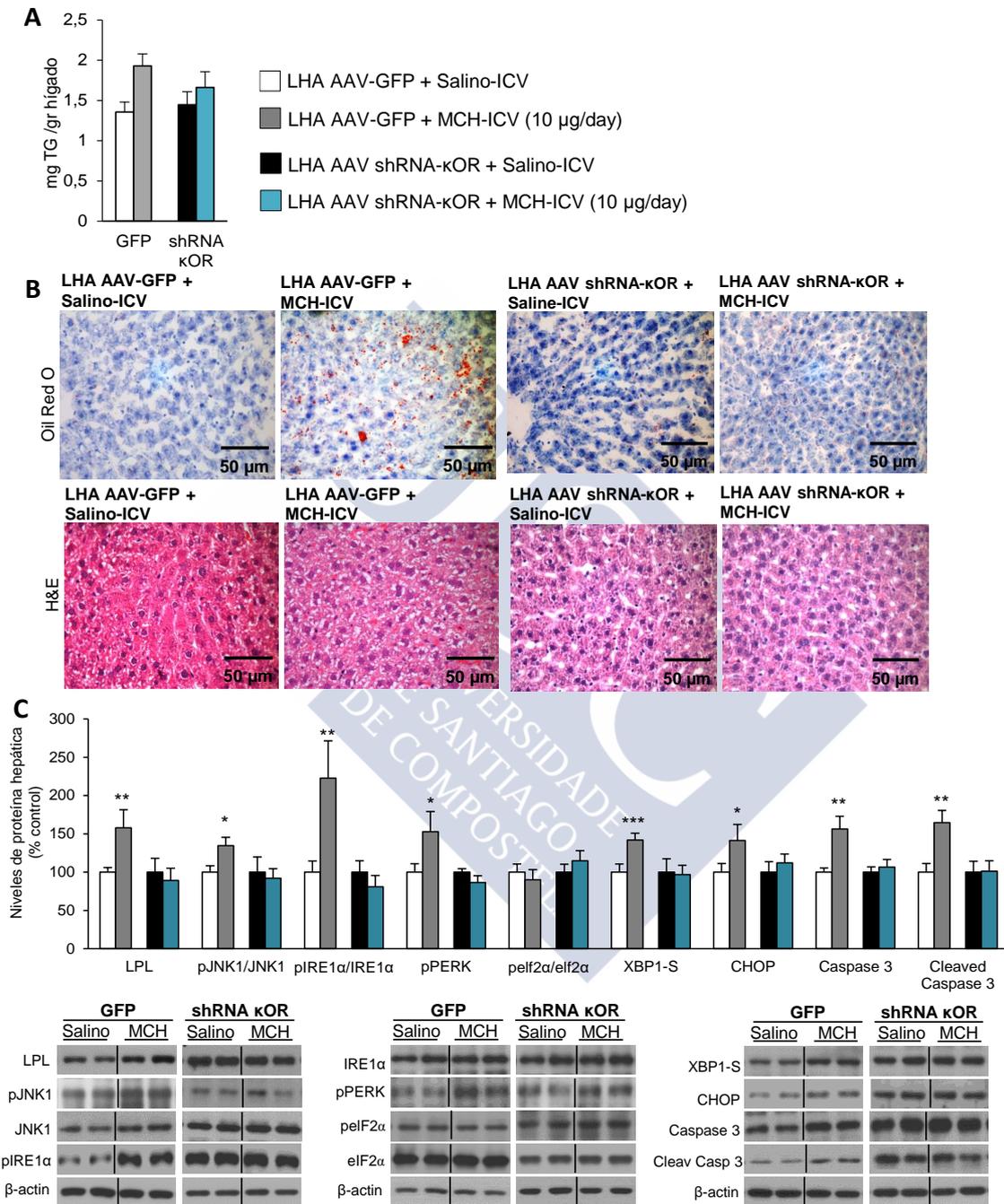


Figura 32. Efectos del silenciamiento de KOR en el LHA en ratas con administración crónica ICV de MCH (10 µg/día) sobre los TG hepáticos (A), histología de *Oil-red O* y H&E (B) y sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pelf2α/eIF2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (C). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un *n* de 8-7 animales por grupo. Test t-student de una cola; **P*<0,05; ***P*<0,01 y ****P*<0,001 frente al control.

Resultados

La especificidad de estos efectos sobre el hígado, se comprobó mediante el análisis de las proteínas moduladas por la administración central MCH en grasa. EL silenciamiento de KOR en el lateral, no impidió que la administración crónica ICV de MCH ejerza su efecto sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco (Figura 33A).

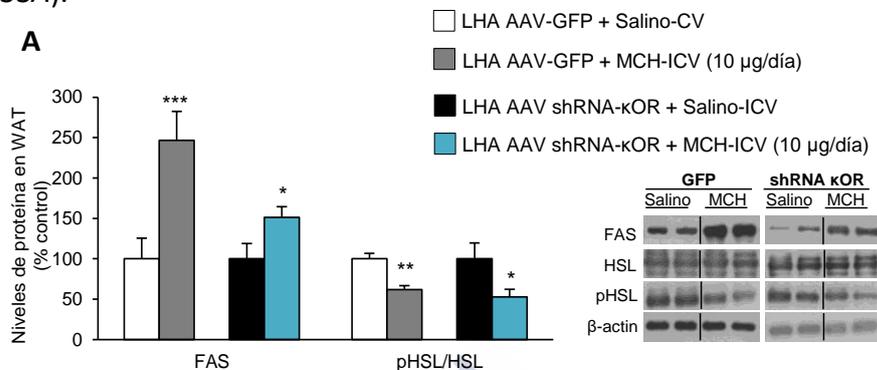


Figura 33. Efectos del silenciamiento de KOR en el LHA en ratas con administración crónica ICV de MCH (10 µg/día) sobre los niveles de proteína de FAS y la ratio pHSL/HSL en el tejido adiposo blanco (A). La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-student de una cola; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ frente al control.

5.4 La inhibición génica de KOR en el LHA, reduce la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD

Tres semanas después de la administración del AAV con el shRNA-KOR en el LHA, las ratas fueron alimentadas con MCD durante tres semanas. La eficiencia de la administración viral en el LHA, se corroboró mediante la detección de GFP (Figura 34A). La inhibición de KOR en el LHA, redujo significativamente tanto el contenido de TG hepáticos, como la deposición de colágeno alrededor de la vena central de los lóbulos hepáticos (Figura 34B-C). También cabe destacar una reducción de los niveles de mRNA de los principales marcadores de inflamación (TNF- α , IL-6, CD36, CD68) en el hígado de ratas alimentadas con MCD (Figura 34D). Acorde con estos resultados, en el hígado de las ratas con el KOR silenciado en el LHA, los niveles proteicos de LPL, pJNK1 y marcadores de ER-stress se detectaron reducidos frente al control (Figura 34E).

Efectos centrales de MCH sobre el metabolismo periférico

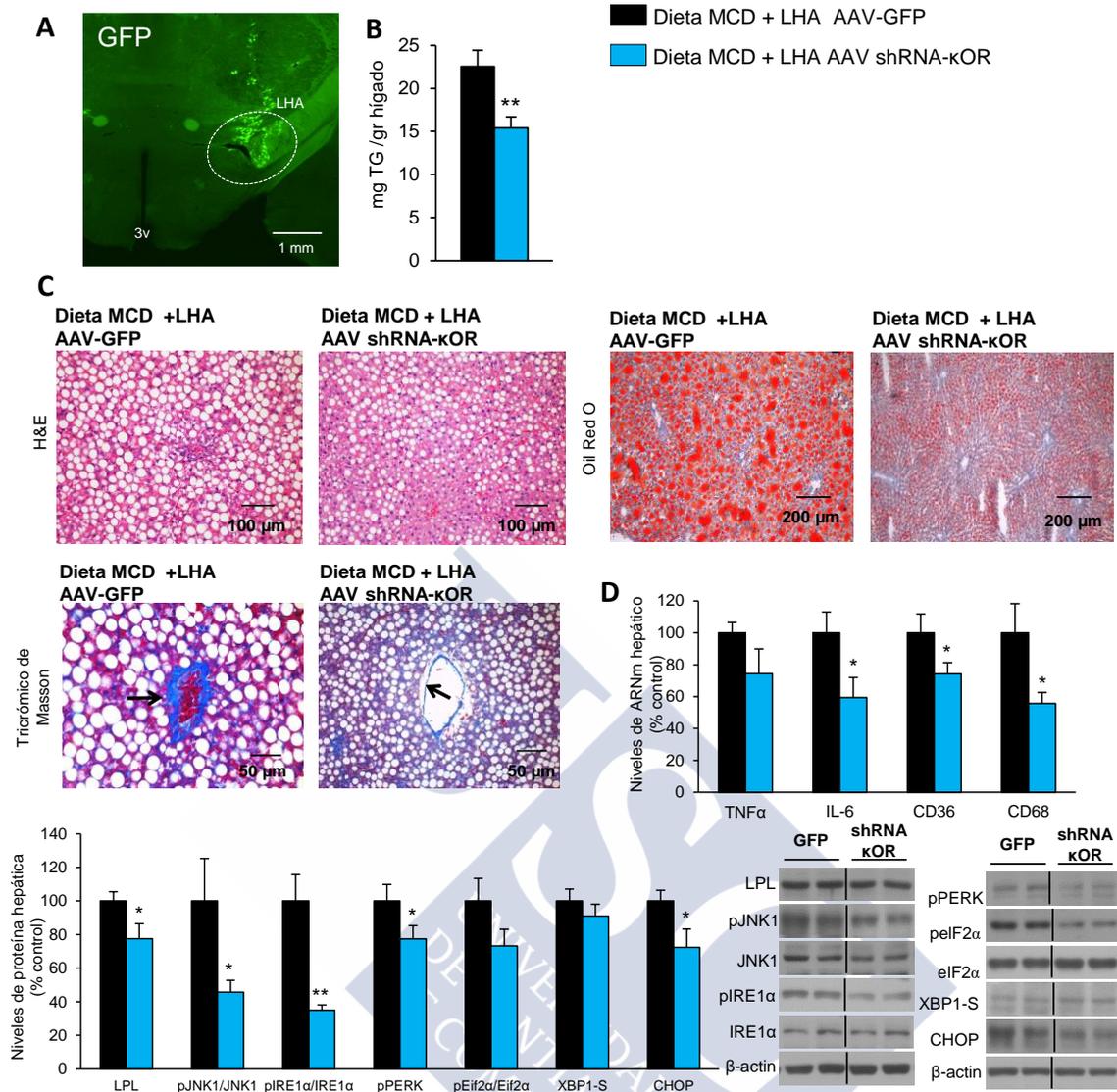


Figura 34. Localización de la administración de lentivirus en el núcleo lateral detectando GFP (A). Efecto de la inhibición de KOR en el LHA en ratas alimentadas con dieta MCD, sobre los niveles de triglicéridos hepáticos (B), sobre la morfología hepática en histologías de *Oil-red O*, H&E y tinción tricrómica de Masson (C), sobre los niveles de mRNA de TNF- α , IL-6, CD36, CD68 (D) y sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1 α /IRE1 α , pPERK, pEIF2 α /eIF2 α , XBP1-S y CHOP. La β -actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. El HPRT se utilizó para normalizar los niveles de mRNA. Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 8-7 animales por grupo. Test t-student de una cola; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ frente al control.

5.5 La sobre-expresión de KOR en el LHA produce adiposidad hepática inducido por la activación de ER-stress

Tras la demostración de que el silenciamiento de KOR en el LHA es capaz de corregir la adiposidad hepática inducida por MCH y la esteatohepatitis inducida por dieta MCD, se determinó si la sobre-expresión de KOR en el LHA produce el mismo efecto sobre el hígado que MCH. La eficiencia de la administración del adenovirus que expresa KOR en el LHA, se comprobó mediante la localización de GFP (Figura 35A) y mediante la medición proteica de la sobre-expresión de KOR en el LHA (Figura 35B). Los resultados mostraron que la administración del adenovirus que sobre-exprime KOR en el LHA, no produjo diferencia en peso e ingesta durante los siete días que dura el efecto (Figura 35C-D); sin embargo, incrementó el contenido de TG en el hígado (Figura 35E-F). Además, aumentó los niveles proteicos de LPL, pJNK1 y los marcadores de ER-stress (Figura 35G).

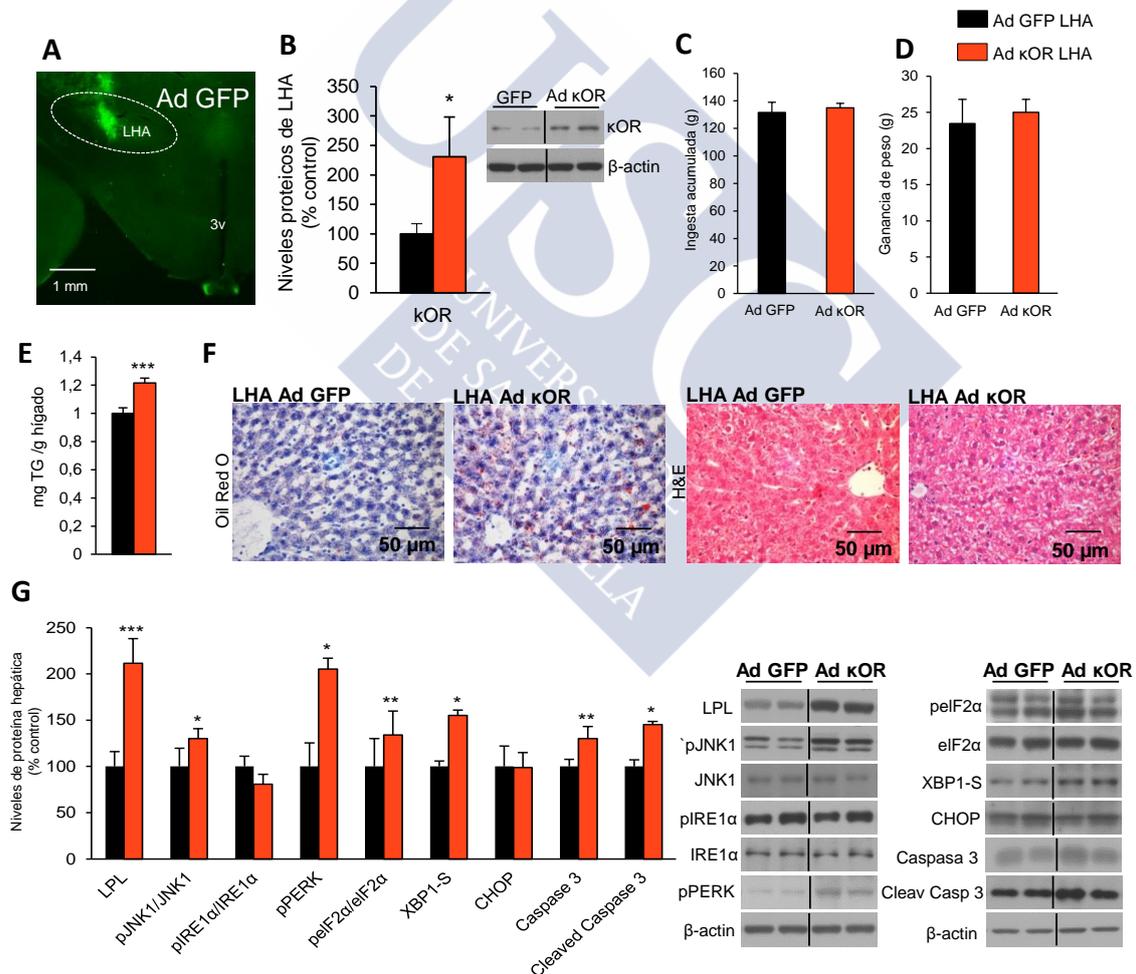


Figura 35. Localización de la administración del adenovirus de KOR en el LHA de rata mediante detección de GFP (A) y sobre-expresión de KOR a nivel proteico (B). Efecto de la sobre-expresión de KOR en el LHA sobre el peso y la ingesta (C-D), TG hepáticos e histología de *Oil-red O* y H&E (E-F) y sobre los niveles de proteínas hepáticas de LPL, ratio pJNK/JNK, pIRE1α/IRE1α, pPERK, pEIF2α/eIF2α, XBP1-S, CHOP, caspasa 3 y *cleaved* caspasa 3 (G). La β-actina se utilizó para normalizar los niveles de proteína. Los valores indican la media ± el error estándar de un n de 7-8 animales por grupo. Test t-student de una cola; *P<0,05; **P<0,01 y ***P<0,001 frente al control.

Finalmente, para investigar la relevancia del ER-stress como mediador de las acciones hepáticas de KOR en el hipotálamo lateral, se sobre-expresó KOR en el LHA de ratones a los que simultáneamente se le administró por la vena de la cola otro adenovirus que sobre-expresa la chaperona GRP78 en el hígado durante una semana. La eficiencia de la administración del adenovirus en el lateral se corroboró mediante GFP (Figura 36A). La eficiencia de la sobre-expresión de GRP78 en el hígado se corroboró mediante la medición proteica de dicha chaperona en el hígado (Figura 36B). La sobre-expresión de KOR en el LHA y de GRP78 en el hígado de ratones, no produjo diferencias ni en ingesta ni en peso (Figura 36C-D). Por otro lado, la sobre-expresión de KOR en el LHA aumentó el contenido hepático de TG, mientras que la sobre-expresión de GRP78 en el hígado bloqueó los efectos hepáticos inducidos por KOR en el LHA (Figura 36C-D).

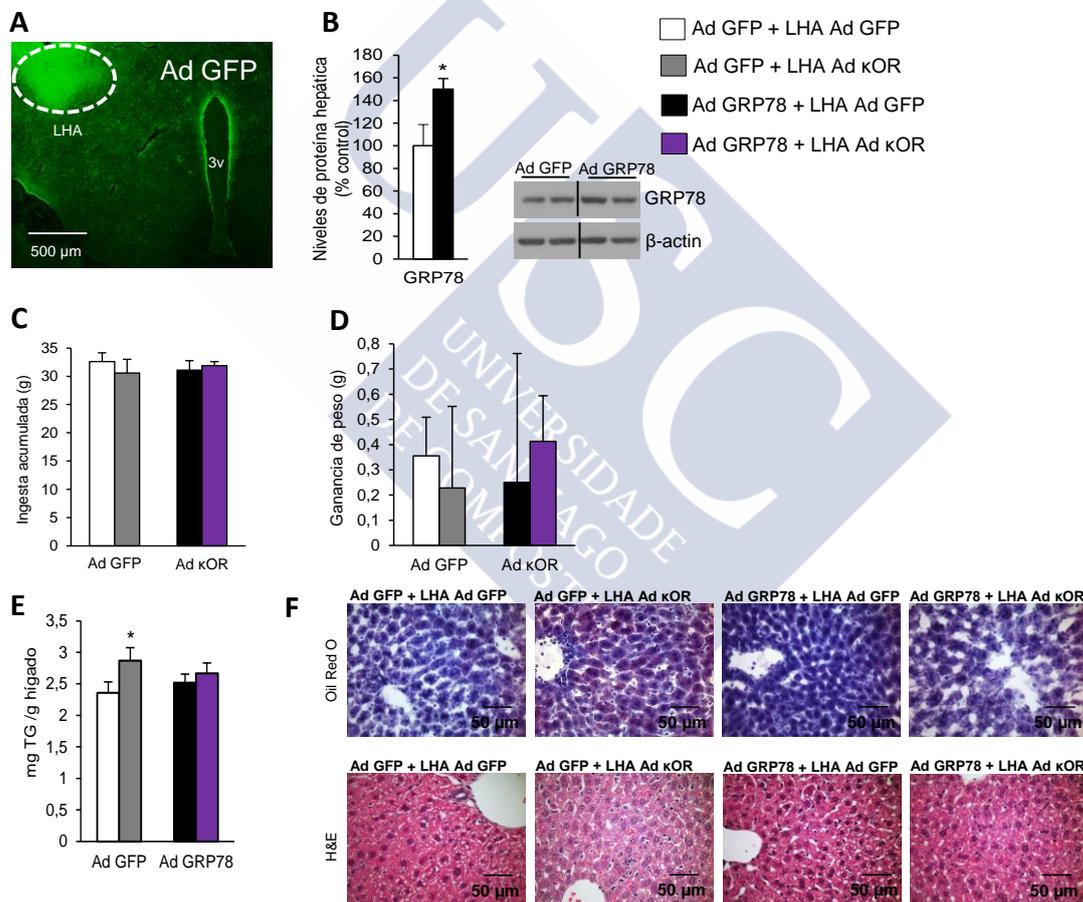


Figura 36. Localización de la administración del adenovirus de KOR en el LHA mediante detección de GFP en ratón(A). Comprobación de la expresión de GRP78 en el hígado, tras la administración IV de un adenovirus que sobre-expresa GRP78 (B). Efectos de la sobre-expresión de KOR en el LHA y de GRP78 en el hígado de ratones sobre la ingesta (C), peso (D) los TG hepáticos e histología de *Oil-red O* y H&E (E-F). Los valores indican la media \pm el error estándar de un n de 7 animales por grupo. Test t-student de una cola; * $P < 0,05$ frente al control.





DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En este estudio se muestra que los efectos centrales de la hormona MCH modula el metabolismo lipídico periférico. La administración central de MCH en modelos murinos (rata y ratón) estimula la absorción y deposición de lípidos en el tejido adiposo blanco e hígado, independientemente de sus efectos orexigénicos o cambios en el gasto energético. Es decir, se demuestra el efecto de MCH en el sistema nervioso central, sobre el cambio en la partición nutricional y en el uso de los sustratos metabólicos. Estas acciones centrales se ejecutan en la periferia mediante dos rutas diferenciadas: el sistema nervioso simpático media la acción de MCH sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo blanco; mientras que el sistema nervioso parasimpático media las acciones de MCH sobre el metabolismo lipídico del hígado, mediando el estrés del retículo endoplasmático. Los efectos centrales de MCH sobre el tejido adiposo blanco e hígado, se ejecutan en áreas independientes del hipotálamo; concretamente en el núcleo arcuato y núcleo lateral respectivamente. La acción de MCH en núcleo lateral del hipotálamo, sobre el metabolismo hepático del ER-stress y lípidos, esta mediado por el sistema opioide: concretamente el sistema kappa opioide. La inhibición genética de KOR en el LHA mejora la esteatosis hepática inducida por dieta y MCH, mientras que su sobre-expresión en dicho núcleo incrementa la acumulación lipídica en hígado mediante la activación del ER-stress hepático. Esta modulación hepática por el sistema MCH-KOR en el LHA, es relevante por el hecho de que tanto la inhibición del MCH-R1 como de KOR, reduce la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD.

MCH central modula el metabolismo lipídico periférico mediante el sistema nervioso autónomo.

La manipulación farmacológica o genética de MCH, produce importantes alteraciones en la ingesta, peso corporal y en la resistencia a la insulina (185,191,196,198,199,211,224). En esta tesis se demuestra que la administración crónica de MCH en el ventrículo lateral durante 7 días, incrementó la ingesta y la ganancia de peso, estimulando la absorción y deposición de lípidos en el hígado y tejido adiposo blanco. Mediante el uso de un grupo *pair-fed*, se pudo comprobar que los efectos sobre el metabolismo lipídico de MCH en la periferia eran independientes del incremento de ingesta. Estos efectos se demostraron también independientes del gasto de energía, puesto que MCH no varió ni la actividad locomotora, gasto energético y actividad termogénica del tejido adiposo marrón.

La partición nutricional determina la función metabólica de la grasa en los diferentes estados energéticos (391). La administración central de MCH cambia la

Discusión

partición nutricional; el cociente respiratorio (RQ) incrementó durante la administración crónica de MCH independientemente de la ingesta. Este incremento indica que el combustible preferente para su oxidación es la glucosa, lo que favorece la inmovilización de las grasas para su almacenamiento. Este dato concuerda con los obtenidos a nivel circulante, puesto que la administración crónica ICV de MCH redujo significativamente los ácidos grasos libres circulantes, indicando una reducción en la lipólisis de TG en los tejidos de almacenamiento graso.

Por tanto, el metabolismo del tejido adiposo blanco se ve influenciado por la administración crónica ICV de MCH. MCH produjo un aumento de peso de los principales depósitos grasos como en la epididimal y retroperitoneal. Este almacenamiento graso se refleja a nivel molecular en dos procesos diferenciados. Por un lado, debido a un aumento en la expresión de las enzimas lipogénicas como ACC α y FAS. Sin embargo, esta acción se debió parcialmente al efecto orexigénico de MCH puesto que el incremento de FAS tanto a nivel proteico como en su actividad enzimática, no ocurre en el grupo *pair-fed*. Por otro lado, el almacenamiento energético se reflejó en una reducción de la lipólisis independientemente de la ingesta. Por un lado, tras la administración crónica ICV de MCH se observó un incremento significativo en los niveles de CIDEA en el tejido adiposo blanco, proteína asociada a la regulación del metabolismo lipídico (392). De acuerdo con estudios previos en adipocitos (383), la activación de la kinasa JNK1 por medio de TNF- α activa la lipólisis y bloquea a CIDEA. Por tanto, nuestros datos sugieren que el incremento de CIDEA inducido por la administración central ICV de MCH, reduce la lipólisis. Por otro lado, la infusión central de MCH provocó una reducción significativa de la forma fosforilada (activa) de la hormona sensible a lipasas en el tejido adiposo blanco. Esta enzima activa la lipólisis de los triacilglicéridos almacenados a diacilglicéridos, en un proceso desencadenado por la activación de los receptores β -adrenérgicos mediante el SNS (258). Por tanto, esta reducción de la activación de HSL también indica una menor movilización de lípidos. El SNS conecta el tejido adiposo blanco con diferentes núcleos hipotalámicos y otras áreas del cerebro (258,393). Mediante estudios de electrofisiología sobre los nervios eferentes del tejido adiposo blanco, y utilizando ratones triple KO para los receptores β -adrenérgicos, se ha observado que la administración central ICV de MCH reduce el tono simpático del tejido adiposo blanco, lo que se traduce en una menor lipólisis y un incremento del almacenamiento de lípidos y, por tanto, favoreciendo la ganancia de peso.

A nivel hepático, la administración crónica de MCH central incrementó el almacenamiento de ácidos grasos, debido principalmente a un incremento de LPL tanto a nivel proteico como en su actividad enzimática. De este modo MCH incrementa la captación de lípidos circulantes y favorece su almacenamiento. Por otro lado, la inhibición farmacológica (394) y genética (395-397) de JNK1 mejora la inflamación y la resistencia a la insulina inducida por la dieta alta en grasa principalmente en el hígado.

En consonancia con estos estudios, nuestros resultados mostraron que tras la administración crónica ICV de MCH, la actividad de JNK1 se observó incrementada en el hígado. Es importante destacar, que aunque en condiciones normales los niveles de LPL hepático son bajos, existe un incremento significativo de su actividad en el hígado de pacientes con obesidad mórbida y con esteatosis no alcohólica (398). Además, se ha descrito que la ausencia de JNK1 puede afectar a la expresión de LPL inducida por dieta alta en grasa (399). Para determinar la relevancia de JNK1 y su relación con la LPL hepática, se administró MCH ICV en ratones deficientes de JNK1. En dichos ratones, MCH no era capaz de reducir los niveles séricos de ácidos grasos libres, puesto que MCH no es capaz de regular la actividad de LPL en el hígado de los ratones JNK1 KO. Estos datos se corroboraron tras la inhibición farmacológica de JNK1, que también bloqueó las acciones de MCH central sobre el peso corporal y el hígado. Por tanto, JNK1 parece ser crucial para las acciones hepáticas de MCH, ya que regula la incorporación de triglicéridos al hígado modulando la actividad de LPL, sin embargo no se puede descartar que otras isoformas de JNK también puedan estar involucradas.

La respuesta a la presencia de proteínas desplegadas en el retículo (UPR) endoplasmático inducido por ER-stress hepático, está estrechamente relacionada con el desarrollo de esteatosis y con la activación de JNK1 (354,356,357). La administración central de MCH provocó ER-stress hepático, activando IRE1 α y pPERK, también las proteínas de respuesta intermedia como eIF2 α , proteínas de respuesta tardía al ER-stress como CHOP y marcadores de apoptosis como la caspasa 3 y la *cleaved* caspasa 3. Para determinar la relevancia fisiológica del ER-stress hepático como modulador de las acciones centrales de MCH sobre el hígado se realizó un bloqueo farmacológico y genético del ER-stress hepático. Para ello se administró la chaperona química TUDCA, y se sobre-expresó genéticamente GRP78, la chaperona del retículo endoplasmático más abundante que previene la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen reticular (121,386,388). La inhibición del ER-stress en el hígado redujo la adiposidad inducida por la administración central ICV de MCH, disminuyendo los niveles de triglicéridos, LPL y la actividad de JNK1.

El nervio vago del sistema nervioso parasimpático es fundamental en la comunicación entre hígado y el sistema nervioso central, el cual media su metabolismo según los diferentes estados fisiológicos (284,400). Por tanto, se estudió si el nervio vago mediaba las acciones centrales de MCH sobre el metabolismo hepático. La vagotomía, bloqueó los efectos centrales de MCH sobre el metabolismo lipídico hepático, pero no sobre el del tejido adiposo blanco. Este bloqueo se debía a una reducción de la adquisición de lípidos circulantes por parte del hígado, puesto que la vagotomía impidió el incremento de la actividad de JNK1 y LPL inducido por la administración central de MCH.

Discusión

La adiposidad generada por la administración central de MCH en el tejido adiposo blanco e hígado, se ve favorecida desde el proceso digestivo. La administración central de MCH favoreció la absorción intestinal de las grasas dado que el contenido de TG en las heces es menor en aquellas ratas tratadas durante una semana con MCH ICV. Sin embargo, el mecanismo a través del cual se ejerce dicho efecto no se ha abordado en esta tesis.

Se ha descrito que existen receptores de MCH en tejidos periféricos y que el MCH circulante puede estar implicado en desarrollo de inflamación intestinal (207-209). Sin embargo, la posibilidad de que los efectos de MCH se deban a una acción directa sobre los tejidos periféricos quedó descartada ya que la administración intraperitoneal e intravenosa de MCH no alteró el peso corporal ni el metabolismo lipídico de grasa e hígado.

Los efectos de MCH central sobre el metabolismo periférico se modulan desde el núcleo arcuato y el núcleo lateral del hipotálamo.

Tras la descripción de los efectos periféricos de la administración central de MCH en el ventrículo lateral, se estudió qué áreas hipotalámicas eran responsables de los efectos de MCH. De hecho, el MCH-R1 y las neuronas inmunoreactivas a MCH, están ampliamente distribuidas por el sistema nervioso central (166,401), pero es el hipotálamo el principal centro de producción de MCH y modulador de la partición nutricional periférica. En el hipotálamo, el MCH-R1 se distribuye por todos los núcleos (166).

Siendo el ARC, el ventromedial (VMH) y el LHA importantes núcleos en la modulación de la homeostasis energética, mediante el uso de vectores adenovirales se sobre-expresó el MCH-R1 en los tres núcleos. Los resultados mostraron que la activación de MCH-R1 en los núcleos ARC y LHA incrementaron ingesta y peso, mientras que la sobre-expresión en el VMH no produjo ningún efecto. A nivel periférico, la sobre-expresión del MCH-R1 en el ARC, moduló el metabolismo lipídico del tejido adiposo graso pero no así el del hígado; mientras que la sobre-expresión de MCH-R1 en el LHA moduló el metabolismo lipídico del hígado y no de la grasa. La infección en el VMH, tampoco ha producido efectos a nivel periférico.

Puesto que la administración de MCH en ventrículo lateral, activa todos los MCH-R1 simultáneamente en el hipotálamo, y los adenovirus que sobre-expresan MCH-R1 pueden producir una expresión artificial de MCH-R1 en neuronas que normalmente no expresan este receptor, se administró MCH en sendos núcleos ARC y LHA durante una semana. Este experimento confirmó que la administración crónica de MCH en el ARC modula la ingesta y el metabolismo lipídico del tejido adiposo; mientras que la administración crónica de MCH en el LHA moduló el metabolismo lipídico del hígado, pero no la ingesta. La discordancia observada en la modulación de la ingesta en el LHA

(incremento de la ingesta tras la sobre-expresión de MCH-R1 pero no tras la administración de MCH), puede deberse a que algunas de las neuronas infectadas no expresan dicho receptor en condiciones basales, y que éstas puedan estar involucradas en la regulación de la ingesta. Estos resultados correlacionan con estudios previos, que establecen que el ARC juega un importante papel en la modulación de la ingesta y el sistema nervioso simpático (259,402), mientras que el LHA interacciona con el nervio vago (403).

Hasta el momento se ha mostrado el resultado de la combinación de experimentos farmacológicos y genéticos que evidencian que el sistema central de MCH incrementa el almacenamiento lipídico mediante la modulación directa del metabolismo hepático y adipocitario mediante dos circuitos independientes (Imagen 32). Estos resultados apoyan el concepto de que los diferentes núcleos hipotalámicos tienen rutas de señalización autónomas independientes hacia los diferentes órganos periféricos.

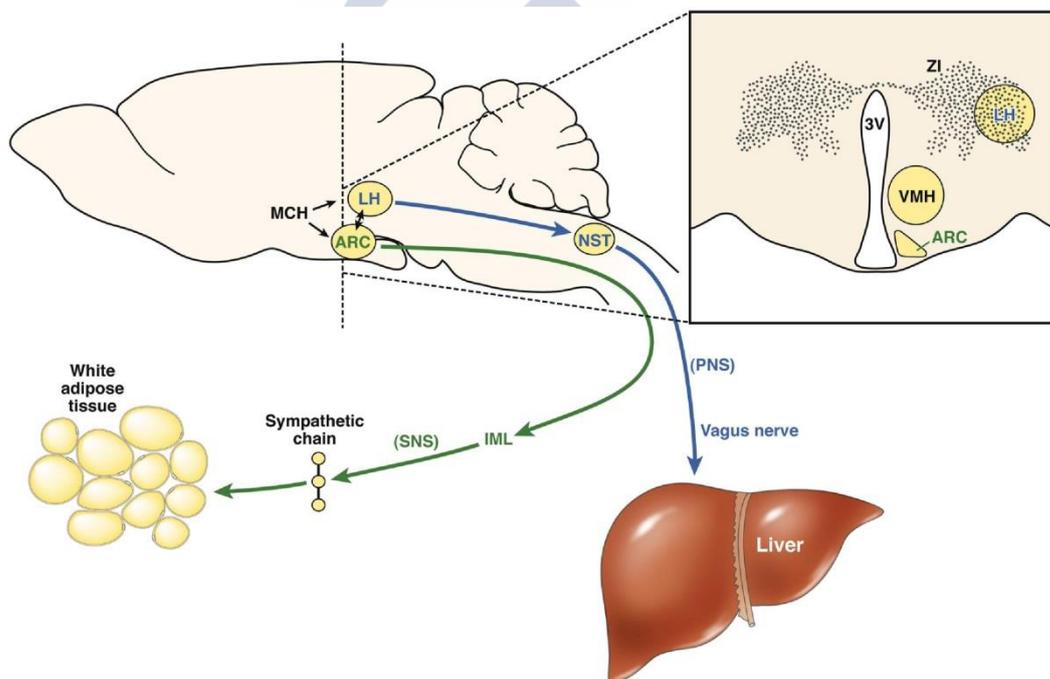


Imagen 32. Representación de los mecanismos de acción de MCH en sendos núcleos ARC y LHA sobre el tejido adiposo blanco e hígado respectivamente.

Efectos de la manipulación genética de MCH en el hipotálamo lateral sobre la esteatosis y esteatohepatitis.

La manipulación farmacológica y genética de MCH causa importantes alteraciones en la ingesta, peso corporal, metabolismo de la glucosa y almacenamiento de grasa en el hígado (180,185,191,199). Como se ha descrito hasta el momento, MCH en el LHA incrementa el depósito lipídico en el hígado mediante el PSNS en un mecanismo dependiente de ER-stress, activando la actividad de JNK1 e incrementando la acción de LPL. Tanto el ER-stress como la acción de JNK1 en el hígado, están estrechamente relacionados con el desarrollo de esteatosis hepática (354,356,357). El bloqueo farmacológico del MCH-R1 (227) o la ausencia de MCH (193,197) reducen la esteatosis hepática; por lo que se quiso determinar si la inhibición del sistema MCH en el LHA sería capaz de revertir el daño hepático. Para ello se utilizó una dieta deficiente en colina y metionina (MCD). Esta dieta genera esteatohepatitis no alcohólica sin producir ningún otro evento fisiológico asociado a obesidad o síndrome metabólico (389). La esteatohepatitis inducida por la dieta MCD en ratas, mejoró tras la inhibición genética del MCH-R1 en el LHA; reduciendo el contenido en TG, los marcadores inflamatorios hepáticos, las transaminasas séricas y el ER-stress. De igual modo al descrito, esta acción esta mediada por el PSNS, puesto que la eliminación quirúrgica del nervio vago, bloquea la mejora de la esteatohepatitis y la fibrosis inducida por la reducción de la expresión del MCH-R1 en el LHA. Sin embargo, las rutas neuronales que median las acciones periféricas de MCH en el LHA se desconocen.

Entre sus muchas acciones biológicas, el sistema opioide ha sido reconocido fundamentalmente como un importante elemento en el sistema de recompensa involucrado en el comportamiento adictivo (242). Numerosos trabajos han mostrado que el sistema opioide central está involucrado en la regulación de la homeostasis energética; de hecho los ratones KO para el receptor KOR son resistentes a la obesidad y a la esteatosis inducido por dieta alta en grasa (250). Por otro lado, la administración sistémica y central de antagonistas de KOR reducen ingesta y peso corporal, mientras que los agonistas de KOR realizan el efecto contrario (242). A nivel central, se ha descrito que el sistema kappa opioide está involucrado en los efecto hedónicos y orexigénicos de MCH en el hipotálamo y en el núcleo accumbens (254). Entre los tres tipos de receptores opioides, el mRNA de KOR co-localiza con MCH en el LHA (255) y el ligando endógeno de KOR, la dinorfina, colocaliza con el MCH-R1 en el núcleo paraventricular (173). En esta tesis se demostrado que a nivel proteico, MCH-R1 y KOR co-localizan en el LHA. Además, la expresión de prodinorfina en el LHA se estimuló por la administración central de MCH; mientras que tras el silenciamiento del MCH-R1 en el LHA los niveles de prodinorfina se redujeron. Aparte de la correlación entre la expresión de prodinorfina y el MCH-R1, se estudió la funcionalidad de esta relación. Los ratones KO para el KOR eran resistentes a la esteatosis y al ER-stress inducido por la administración crónica ICV de MCH, al igual que las ratas en las que se silenció

genéticamente KOR en el LHA. El mecanismo por el cual el silenciamiento de KOR mitiga el efecto de MCH se debió a la incapacidad de la hormona de activar el nervio vago. Esto se demuestra por el hecho de que la inhibición de KOR en el LHA redujo la activación de c-Fos en la neuronas del núcleo ventral dorsomedial (DMV) del tronco-encéfalo, área que inicia la señal parasimpática del nervio vago hacia el tracto gastrointestinal (390).

Tras establecer la estrecha relación entre MCH y KOR en el LHA y concluir que el efecto adipogénico de MCH sobre el hígado está mediado por KOR, se comprobó si, al igual que ocurrió con el silenciamiento de MCH-R1, la inhibición genética de KOR en el LHA era capaz de mejorar la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD. El silenciamiento de KOR en el LHA protegió ante la esteatohepatitis inducida por la dieta MCD, reduciendo los niveles de triglicéridos hepáticos, fibrosis, marcadores inflamatorios, ER-stress y transaminasas séricas. De forma consistente con estos resultados, mediante el uso de vectores adenovirales, se demostró que la sobre-expresión de KOR en el LHA, tanto en rata como en ratón, incrementó el contenido de grasa hepática y el ER-stress. Para determinar la relevancia fisiológica del ER-stress hepático como modulador de las acciones centrales de KOR, se realizó un bloqueo del ER-stress mediante la sobre-expresión de GRP78. Los resultados mostraron que la chaperona es capaz de prevenir la acumulación lipídica inducida por la sobre-expresión de KOR en el LHA.

Estos resultados revelaron un nuevo circuito hipotalámico, donde el KOR localizado en el LHA, modula el almacenamiento lipídico hepático, mediando las acciones de MCH en ese mismo núcleo (Imagen 33).

Para realizar su acción, este circuito MCH-KOR modula el ER-stress hepático mediante el PSNS. Esta evidencia sugiere que además de su potencial acción sobre el tratamiento de la obesidad (404), el sistema kappa opioide puede ser una importante diana terapéutica para el tratamiento de la esteatosis.

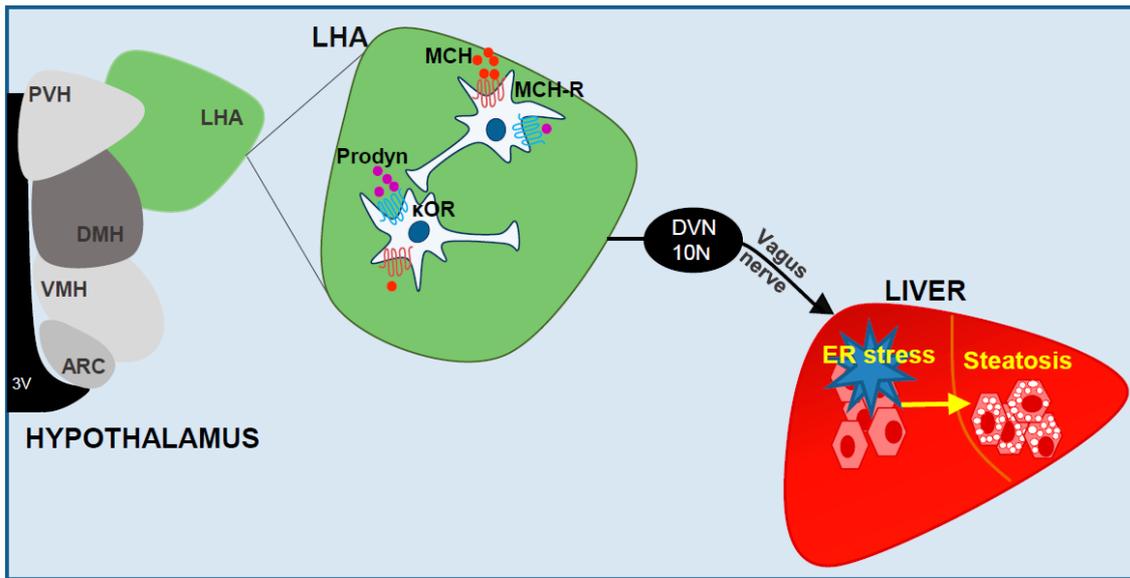


Imagen 33. Representación del mecanismo de acción de KOR sobre MCH en núcleo LHA el desarrollo de la esteatosis hepática.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral, nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La administración central crónica de MCH incrementa ingesta y peso corporal. La acción de MCH sobre peso corporal es independiente del aumento de la ingesta.
2. La administración central crónica de MCH favorece la acumulación lipídica en el tejido adiposo blanco debido a una reducción del tono simpático, produciendo como consecuencia una inhibición de la lipólisis. Esta acción es dependiente de JNK1 y CIDEA.
3. La administración central crónica de MCH favorece la captación de lípidos por el hígado. Esta acción está mediada por el sistema nervioso parasimpático. A nivel molecular, el efecto central de MCH sobre el hígado es dependiente del ER-stress, JNK1 y de LPL.
4. El núcleo ARC del hipotálamo, media la acción orexigénica y adipogénica de MCH sobre el tejido adiposo blanco.
5. El núcleo LHA del hipotálamo media la acción de MCH sobre la acumulación lipídica en el hígado.
6. En el núcleo LHA del hipotálamo, el sistema kappa opioide media la acción de MCH sobre el hígado.
7. EL silenciamiento genético del MCH-R1 y KOR en el LHA, reduce la esteatohepatitis.





BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Thomson W. II. On the dynamical theory of heat, with numerical results deduced from Mr. Joule's equivalent of a thermal unit, and M. Regnault's observations on steam. *Philosophical Magazine Series 4*. 1852;4(22):8-21.
2. Frayn KN. *Metabolic Regulation: A Human Perspective*. Wiley; 2013.
3. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int J Obes*. 0000;32(S7):S109-S119.
4. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell*. 2001;104(4):531-543.
5. Abbott WG, Howard BV, Christin L, Freymond D, Lillioja S, Boyce VL, Anderson TE, Bogardus C, Ravussin E. Short-term energy balance: relationship with protein, carbohydrate, and fat balances. *The American journal of physiology*. 1988;255(3 Pt 1):E332-337.
6. Schutz Y, Flatt JP, Jéquier E. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1989;50(2):307-314.
7. Flatt JP, Ravussin E, Acheson KJ, Jéquier E. Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances. *Journal of Clinical Investigation*. 1985;76(3):1019-1024.
8. Bray GA. Treatment for obesity: a nutrient balance/nutrient partition approach. *Nutrition reviews*. 1991;49(2):33-45.
9. Ravussin E, Lillioja S, Anderson TE, Christin L, Bogardus C. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;78(6):1568-1578.
10. Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Annals of internal medicine*. 2003;139(3):205-213.
11. López M, Alvarez CV, Nogueiras R, Diéguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*. 19(7):418-427.
12. Townsend K, Tseng Y-H. Brown adipose tissue: Recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. *Adipocyte*. 2012;1(1):13-24.
13. Townsend KL, Tseng Y-H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2014;25(4):168-177.
14. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 0000;28(S4):S22-S28.
15. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(2):147-152.
16. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1486(1):1-17.
17. Corpeleijn E, Saris WHM, Blaak EE. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obesity Reviews*. 2009;10(2):178-193.
18. Yi CX, Tschop MH. Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance. *Disease models & mechanisms*. 2012;5(5):583-587.
19. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The Hormonal Control of Food Intake. *Cell*. 2007;129(2):251-262.
20. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong

Bibliografía

- SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996;273(5277):974-977.
21. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1997;11(4):415-423.
 22. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-660.
 23. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(3):1319-1324.
 24. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4753-4758.
 25. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2001;24(6):Rc19-21.
 26. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *The Journal of endocrinology*. 2002;175(2):R7-11.
 27. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407(6806):908-913.
 28. Williams DL, Cummings DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *The Journal of nutrition*. 2005;135(5):1320-1325.
 29. Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodriguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castaneda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschop MH, Dieguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. 2008;7(5):389-399.
 30. Velásquez DA, Martínez G, Romero A, Vázquez MJ, Boit KD, Dopeso-Reyes IG, López M, Vidal A, Nogueiras R, Diéguez C. The Central Sirtuin 1/p53 Pathway Is Essential for the Orexigenic Action of Ghrelin. *Diabetes*. 2011;60(4):1177-1185.
 31. Bagnasco M, Tulipano G, Melis MR, Argiolas A, Cocchi D, Muller EE. Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting. *Regulatory peptides*. 2003;111(1-3):161-167.
 32. Tamura H, Kamegai J, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology*. 2002;143(9):3268-3275.
 33. Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, Pfluger PT, Castaneda TR, Neschen S, Hofmann SM, Howles PN, Morgan DA, Benoit SC, Szanto I, Schrott B, Schurmann A, Joost HG, Hammond C, Hui DY, Woods SC, Rahmouni K, Butler AA, Farooqi IS, O'Rahilly S, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop MH. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3475-3488.
 34. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schurmann A, Szanto I, Tschop MH, Rohner-Jeanrenaud F.

- Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1983-1993.
35. Porteiro B, Diaz-Ruiz A, Martinez G, Senra A, Vidal A, Serrano M, Gualillo O, Lopez M, Malagon MM, Dieguez C, Nogueiras R. Ghrelin requires p53 to stimulate lipid storage in fat and liver. *Endocrinology*. 2013;154(10):3671-3679.
 36. Castaneda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschop MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010;31(1):44-60.
 37. Faulconbridge LF, Cummings DE, Kaplan JM, Grill HJ. Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes*. 2003;52(9):2260-2265.
 38. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1120-1128.
 39. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
 40. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain research*. 1999;848(1-2):114-123.
 41. Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*. 1992;130(6):3608-3616.
 42. Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487):2122-2125.
 43. Havrankova J, Roth J, Brownstein M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*. 1978;272(5656):827-829.
 44. van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology*. 1979;105(3):666-673.
 45. Bagdade JD, Bierman EL, Porte D, Jr. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967;46(10):1549-1557.
 46. Woods SC, Porte D, Jr. Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *The American journal of physiology*. 1977;233(4):E331-334.
 47. Plata-Salaman CR. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1991;15(2):243-258.
 48. King GL, Johnson SM. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science*. 1985;227(4694):1583-1586.
 49. Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*. 1995;44(2):147-151.
 50. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*. 2002;22(20):9048-9052.
 51. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. 2002;8(12):1376-1382.
 52. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of endocrinology*. 2008;199(1):5-19.
 53. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschop MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature reviews Endocrinology*. 2010;6(12):689-697.

Bibliografía

54. Penhos JC, Wu CH, Daunas J, Reitman M, Levine R. Effect of glucagon on the metabolism of lipids and on urea formation by the perfused rat liver. *Diabetes*. 1966;15(10):740-748.
55. Guettet C, Rostaqui N, Mathe D, Lecuyer B, Navarro N, Jacotot B. Effect of chronic glucagon administration on lipoprotein composition in normally fed, fasted and cholesterol-fed rats. *Lipids*. 1991;26(6):451-458.
56. Hoosein NM, Gurd RS. Identification of glucagon receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(14):4368-4372.
57. Inokuchi A, Oomura Y, Nishimura H. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol Behav*. 1984;33(3):397-400.
58. Quiñones M, Al-Massadi O, Gallego R, Fernø J, Diéguez C, López M, Nogueiras R. Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Molecular metabolism*. 4(12):961-970.
59. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2002;26(4):393-428.
60. Boey D, Lin S, Karl T, Baldock P, Lee N, Enriquez R, Couzens M, Slack K, Dallmann R, Sainsbury A, Herzog H. Peptide YY ablation in mice leads to the development of hyperinsulinaemia and obesity. *Diabetologia*. 2006;49(6):1360-1370.
61. Finan B, Yang B, Ottaway N, Smiley DL, Ma T, Clemmensen C, Chabenne J, Zhang L, Habegger KM, Fischer K, Campbell JE, Sandoval D, Seeley RJ, Bleicher K, Uhles S, Riboulet W, Funk J, Hertel C, Belli S, Sebokova E, Conde-Knape K, Konkar A, Drucker DJ, Gelfanov V, Pfluger PT, Muller TD, Perez-Tilve D, DiMarchi RD, Tschop MH. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nat Med*. 2015;21(1):27-36.
62. Holst JJ. On the physiology of GIP and GLP-1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2004;36(11-12):747-754.
63. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3554-3563.
64. Nogueiras R, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Morgan DA, Varela L, Haynes WG, Patterson JT, Disse E, Pfluger PT, Lopez M, Woods SC, DiMarchi R, Dieguez C, Rahmouni K, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop MH. 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. *J Neurosci*. 2009;29(18):5916-5925.
65. Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Ananthakrishnan G, Rohner-Jeanrenaud F, Drucker DJ, DiMarchi R, Rahmouni K, Oldfield BJ, Tschop MH, Perez-Tilve D. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes*. 2012;61(11):2753-2762.
66. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, Serrano M, Ferno J, Salvador J, Escalada J, Dieguez C, Lopez M, Fruhbeck G, Nogueiras R. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*. 2014;63(10):3346-3358.
67. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of Adipose Tissue - An Update. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2007;39(05):314-321.
68. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheum*. 2007;3(12):716-724.

69. Radin MJ, Sharkey LC, Holycross BJ. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*. 2009;38(2):136-156.
70. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978;14(3):141-148.
71. Friedman JM, Leibel RL. Tackling a weighty problem. *Cell*. 1992;69(2):217-220.
72. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-770.
73. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11):1155-1161.
74. Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prevoit V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab*. 2014;19(2):293-301.
75. Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevoit V, Dehouck B. Tanycyte-Like Cells Form a Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier in the Circumventricular Organs of the Mouse Brain. *The Journal of comparative neurology*. 2013;521(15):3389-3405.
76. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(13):6231-6235.
77. Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Tyrosine Phosphorylation of STAT3 by Leptin through Leptin Receptor in Mouse Metaphase 2 Stage Oocyte. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;256(3):480-484.
78. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-484.
79. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci*. 2004;7(5):493-494.
80. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current opinion in lipidology*. 2003;14(6):561-566.
81. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2004;68(11):975-981.
82. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901-911.
83. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):2005-2010.
84. Nogueiras R, Gallego R, amp, x, Gualillo O, Caminos JE, Garcí, amp, x, a-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Letters*. 2003;548(1–3):21-27.
85. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-312.

Bibliográfia

86. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*. 2004;303(5661):1195-1198.
87. Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(4):1569-1575.
88. Lazar MA. Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2007;39(10):710-716.
89. Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castaneda TR, Vazquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Dieguez C. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(3):R1-5.
90. Vazquez MJ, Gonzalez CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology*. 2008;149(9):4534-4543.
91. Bernard C. *Leçons de physiologie expérimentale appliquée à la médecine, faites au Collège de France, par m. Claude Bernard*. Vol 1. Paris: J.B. Baillière et fils; [etc., etc.]; 1855.
92. Schwartz MW, Porte D. Diabetes, Obesity, and the Brain. *Science*. 2005;307(5708):375-379.
93. Williams KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat Neurosci*. 2012;15(10):1350-1355.
94. Seeley RJ, Woods SC. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(11):901-909.
95. Cooke D, Bloom S. The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(11):919-931.
96. Berthoud HR, Mogenson GJ. Ingestive behavior after intracerebral and intracerebroventricular infusions of glucose and 2-deoxy-D-glucose. *The American journal of physiology*. 1977;233(3):R127-133.
97. Lutz T. Effects of Amylin on Eating and Adiposity. In: Joost H-G, ed. *Appetite Control*. Vol 209: Springer Berlin Heidelberg; 2012:231-250.
98. Zheng H, Patterson LM, Phifer CB, Berthoud HR. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(1):R247-258.
99. Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol*. 2010;518(9):1460-1499.
100. Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2013;14(4):387-407.
101. Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R. Hypothalamic Control of Lipid Metabolism: Focus on Leptin, Ghrelin and Melanocortins. *Neuroendocrinology*. 2011;94(1):1-11.
102. Schulz M, Engelhardt B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2005;2:8-8.
103. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature genetics*. 1998;20(2):113-114.
104. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature genetics*. 2000;26(1):97-102.

105. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci.* 2011;14(3):351-355.
106. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes.* 1997;46(12):2119-2123.
107. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998;393(6680):72-76.
108. Kotz CM, Wang CF, Briggs JE, Levine AS, Billington CJ. Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(2):R494-498.
109. Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(4):1424-1428.
110. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of Agrp leads to obesity in transgenic mice. *Nature genetics.* 1997;17(3):273-274.
111. Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ, Bloom SR. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(4):530-533.
112. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* 1997;278(5335):135-138.
113. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(23):10931-10935.
114. Beck B, Jhanwar-Uniyal M, Burlet A, Chapeaur-Chateau M, Leibowitz SF, Burlet C. Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain research.* 1990;528(2):245-249.
115. Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *The American journal of physiology.* 1991;260(2 Pt 2):R328-334.
116. Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *The Journal of endocrinology.* 2014;220(2):T25-46.
117. Winn P. The Physiology of Motivation by Eliot Stellar. *Brain research bulletin.* 1999;50(5-6):451-452.
118. Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman LJ, Parlow AF, Camper SA, Parker KL. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development (Cambridge, England).* 2001;128(2):147-154.
119. Kim KW, Zhao L, Donato J, Jr., Kohno D, Xu Y, Elias CF, Lee C, Parker KL, Elmquist JK. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(26):10673-10678.
120. Blanco Martinez de Morentin P, Gonzalez CR, Saha AK, Martins L, Dieguez C, Vidal-Puig A, Tena-Sempere M, Lopez M. Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2011;12(3):127-140.
121. Contreras C, Gonzalez-Garcia I, Martinez-Sanchez N, Seoane-Collazo P, Jacas J, Morgan DA, Serra D, Gallego R, Gonzalez F, Casals N, Nogueiras R, Rahmouni K, Dieguez C, Lopez M. Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell reports.* 2014;9(1):366-377.

Bibliografia

122. Lopez M, Varela L, Vazquez MJ, Rodriguez-Cuenca S, Gonzalez CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Dieguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med.* 16(9):1001-1008.
123. Martinez de Morentin PB, Gonzalez-Garcia I, Martins L, Lage R, Fernandez-Mallo D, Martinez-Sanchez N, Ruiz-Pino F, Liu J, Morgan DA, Pinilla L, Gallego R, Saha AK, Kalsbeek A, Fliers E, Bisschop PH, Dieguez C, Nogueiras R, Rahmouni K, Tena-Sempere M, Lopez M. Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab.* 2014;20(1):41-53.
124. Seoane-Collazo P, Ferno J, Gonzalez F, Dieguez C, Leis R, Nogueiras R, Lopez M. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine.* 2015.
125. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, Lopez M, Vidal-Puig A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell.* 2012;149(4):871-885.
126. Tong Q, Ye C, McCrimmon RJ, Dhillon H, Choi B, Kramer MD, Yu J, Yang Z, Christiansen LM, Lee CE, Choi CS, Zigman JM, Shulman GI, Sherwin RS, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab.* 2007;5(5):383-393.
127. Contreras C, Gonzalez F, Ferno J, Dieguez C, Rahmouni K, Nogueiras R, Lopez M. The brain and brown fat. *Annals of medicine.* 2014:1-19.
128. Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LH, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport.* 1998;9(15):3415-3419.
129. Bi S, Robinson BM, Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285(5):R1030-1036.
130. Bi S, Scott KA, Kopin AS, Moran TH. Differential roles for cholecystokinin receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology.* 2004;145(8):3873-3880.
131. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):571-578.
132. Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2010;24(12):2366-2381.
133. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology.* 2002;143(10):3846-3853.
134. Zhang X, van den Pol AN. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) inhibits melanin-concentrating hormone neurons: implications for TRH-mediated anorexic and arousal actions. *J Neurosci.* 2012;32(9):3032-3043.
135. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998;92(5):1 page following 696.
136. van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron.* 2004;42(4):635-652.

137. Zheng H, Patterson LM, Berthoud HR. Orexin signaling in the ventral tegmental area is required for high-fat appetite induced by opioid stimulation of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2007;27(41):11075-11082.
138. Nixon JP, Kotz CM, Novak CM, Billington CJ, Teske JA. Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handbook of experimental pharmacology.* 2012(209):77-109.
139. Tupone D, Madden CJ, Cano G, Morrison SF. An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *J Neurosci.* 2011;31(44):15944-15955.
140. Perez-Leighton CE, Boland K, Teske JA, Billington C, Kotz CM. Behavioral responses to orexin, orexin receptor gene expression, and spontaneous physical activity contribute to individual sensitivity to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303(7):E865-874.
141. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of Comparative Neurology.* 1992;319(2):218-245.
142. Baker BI. Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int Rev Cytol.* 1991;126:1-47.
143. Nahon JL. The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene. *Critical reviews in neurobiology.* 1994;8(4):221-262.
144. Westerfield DB, Pang PK, Burns JM. Some characteristics of melanophore-concentrating hormone (MCH) from teleost pituitary glands. *General and comparative endocrinology.* 1980;42(4):494-499.
145. Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature.* 1983;305(5932):321-323.
146. Zamir N, Skofitsch G, Bannon MJ, Jacobowitz DM. Melanin-concentrating hormone: unique peptide neuronal system in the rat brain and pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(5):1528-1531.
147. Matsunaga TO, Hraby VJ, Lebl M, Castrucci AM, Hadley ME. Synthesis and bioactivity studies of two isosteric acyclic analogues of melanin concentrating hormone. *Life sciences.* 1992;51(9):679-685.
148. NAHON JL, PRESSE F, BITTENCOURT JC, SAWCHENKO PE, VALE W. The Rat Melanin-Concentrating Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus. *Endocrinology.* 1989;125(4):2056-2065.
149. Mul JD, la Fleur SE, Toonen PW, Afrasiab-Middelmann A, Binnekade R, Schetters D, Verheij MM, Sears RM, Homberg JR, Schoffemeer AN, Adan RA, DiLeone RJ, De Vries TJ, Cuppen E. Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PloS one.* 2011;6(5):e19600.
150. Sanchez MS, Salvatierra NA, Vettori G, Celis ME. Effect of neuropeptide-EI on the binding of [3H]SCH 23390 to the dopamine D1 receptor in rat striatal membranes. *Neurochemical research.* 2001;26(5):533-537.
151. Bluet-Pajot MT, Presse F, Voko Z, Hoeger C, Mounier F, Epelbaum J, Nahon JL. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat. *J Neuroendocrinol.* 1995;7(4):297-303.
152. Attademo AM, Rondini TA, Rodrigues BC, Bittencourt JC, Celis ME, Elias CF. Neuropeptide glutamic acid-isoleucine may induce luteinizing hormone secretion via multiple pathways. *Neuroendocrinology.* 2006;83(5-6):313-324.

Bibliográfia

153. Hintermann E, Tanner H, Talke-Messerer C, Schlumberger S, Zumsteg U, Eberle AN. Interaction of melanin-concentrating hormone (MCH), neuropeptide E-I (NEI), neuropeptide G-E (NGE), and alpha-MSH with melanocortin and MCH receptors on mouse B16 melanoma cells. *Journal of receptor and signal transduction research*. 2001;21(1):93-116.
154. Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E. Expanding the Scales: The Multiple Roles of MCH in Regulating Energy Balance and Other Biological Functions. *Endocrine Reviews*. 2006;27(6):606-620.
155. Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides*. 2009;30(11):2031-2039.
156. Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN. Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*. 2002;36(6):1169-1181.
157. Huang H, Acuna-Goycolea C, Li Y, Cheng HM, Obrietan K, van den Pol AN. Cannabinoids excite hypothalamic melanin-concentrating hormone but inhibit hypocretin/orexin neurons: implications for cannabinoid actions on food intake and cognitive arousal. *J Neurosci*. 2007;27(18):4870-4881.
158. Eggermann E, Bayer L, Serafin M, Saint-Mleux B, Bernheim L, Machard D, Jones BE, Muhlethaler M. The wake-promoting hypocretin-orexin neurons are in an intrinsic state of membrane depolarization. *J Neurosci*. 2003;23(5):1557-1562.
159. Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *General and comparative endocrinology*. 2011;172(2):185-197.
160. Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, Risold PY. A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. *PloS one*. 2010;5(11):e15471.
161. Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature*. 1999;400(6741):265-269.
162. Pissios P, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone: from fish skin to skinny mammals. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(5):243-248.
163. Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP. The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology*. 2000;141(12):4524-4532.
164. Pissios P, Trombly DJ, Tzameli I, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. *Endocrinology*. 2003;144(8):3514-3523.
165. Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2001;435(1):26-40.
166. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, Leslie RA. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *The European journal of neuroscience*. 2000;12(4):1194-1216.
167. Presse F, Conductier G, Rovere C, Nahon JL. The melanin-concentrating hormone receptors: neuronal and non-neuronal functions. *Int J Obes Supp*. 2014;4(S1):S31-S36.
168. An S, Cutler G, Zhao JJ, Huang SG, Tian H, Li W, Liang L, Rich M, Bakleh A, Du J, Chen JL, Dai K. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7576-7581.
169. Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feighner SD, Palyha OC, Pong SS, Figueroa DJ, Austin CP, Jiang MM, Yu H, Ito J, Ito M, Ito M, Guan XM, MacNeil DJ, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*. 2002;79(6):785-792.

170. Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20125-20129.
171. Mori M, Harada M, Terao Y, Sugo T, Watanabe T, Shimomura Y, Abe M, Shintani Y, Onda H, Nishimura O. Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;283(5):1013-1018.
172. Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Bansal A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD, Liu Q. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7564-7569.
173. Chee MJS, Pissios P, Maratos-Flier E. Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus(). *The Journal of comparative neurology*. 2013;521(10):2208-2234.
174. Adams AC, Domouzoglou EM, Chee MJ, Segal-Lieberman G, Pissios P, Maratos-Flier E. Ablation of the hypothalamic neuropeptide melanin concentrating hormone is associated with behavioral abnormalities that reflect impaired olfactory integration. *Behavioural brain research*. 2011;224(1):195-200.
175. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(7):2418-2422.
176. Monzon ME, de Souza MM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Barros DM, de Barioglio SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides*. 1999;20(12):1517-1519.
177. Roy M, David N, Cueva M, Giorgetti M. A study of the involvement of melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) in murine models of depression. *Biological psychiatry*. 2007;61(2):174-180.
178. Roy M, David NK, Danao JV, Baribault H, Tian H, Giorgetti M. Genetic inactivation of melanin-concentrating hormone receptor subtype 1 (MCHR1) in mice exerts anxiolytic-like behavioral effects. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(1):112-120.
179. Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, Bonci A, Civelli O. The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6772-6777.
180. Domingos AI, Sordillo A, Dietrich MO, Liu ZW, Tellez LA, Vaynshteyn J, Ferreira JG, Ekstrand MI, Horvath TL, de Araujo IE, Friedman JM. Hypothalamic melanin concentrating hormone neurons communicate the nutrient value of sugar. *eLife*. 2013;2:e01462.
181. Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS, Sharf R, Yeckel MF, Laubach M, Aghajanian GK, DiLeone RJ. Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. *J Neurosci*. 2010;30(24):8263-8273.
182. Maldonado-Irizarry CS, Swanson CJ, Kelley AE. Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *J Neurosci*. 1995;15(10):6779-6788.
183. Stratford TR, Swanson CJ, Kelley A. Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behavioural brain research*. 1998;93(1-2):43-50.
184. Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron*. 2011;69(4):664-679.

Bibliográfia

185. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 1996;380(6571):243-247.
186. Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, Miyoshi T, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*. 1997;138(1):351-355.
187. Zheng H, Patterson LM, Morrison C, Banfield BW, Randall JA, Browning KN, Travagli RA, Berthoud HR. Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience*. 2005;135(2):611-625.
188. Clegg DJ, Air EL, Benoit SC, Sakai RS, Seeley RJ, Woods SC. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R494-499.
189. Duncan EA, Proulx K, Woods SC. Central administration of melanin-concentrating hormone increases alcohol and sucrose/quinine intake in rats. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2005;29(6):958-964.
190. MacNeil DJ. The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4.
191. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 1998;396(6712):670-674.
192. Kokkotou E, Jeon JY, Wang X, Marino FE, Carlson M, Trombly DJ, Maratos-Flier E. Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(1):R117-124.
193. Wang Y, Zogas DC, Biddinger S, Kokkotou E. You deserve what you eat: lessons learned from the study of the melanin-concentrating hormone (MCH)-deficient mice. *Gut*. 2010;59(12):1625-1634.
194. Zhou D, Shen Z, Strack AM, Marsh DJ, Shearman LP. Enhanced running wheel activity of both Mch1r- and Pmch-deficient mice. *Regulatory peptides*. 2005;124(1-3):53-63.
195. Barzilai N, Rossetti L. Age-related changes in body composition are associated with hepatic insulin resistance in conscious rats. *The American journal of physiology*. 1996;270(6 Pt 1):E930-936.
196. Jeon JY, Bradley RL, Kokkotou EG, Marino FE, Wang X, Pissios P, Maratos-Flier E. MCH-/- mice are resistant to aging-associated increases in body weight and insulin resistance. *Diabetes*. 2006;55(2):428-434.
197. Alon T, Friedman JM. Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *J Neurosci*. 2006;26(2):389-397.
198. Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, Bates S, Myers MG, Jr., Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):10085-10090.
199. Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2001;107(3):379-386.
200. Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3240-3245.
201. Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Slieker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone

- receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2002;143(7):2469-2477.
202. Antal-Zimanyi I, Khawaja X. The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2009;39(1-2):86-98.
203. Astrand A, Bohlooly YM, Larsdotter S, Mahlapuu M, Andersen H, Tornell J, Ohlsson C, Snaith M, Morgan DG. Mice lacking melanin-concentrating hormone receptor 1 demonstrate increased heart rate associated with altered autonomic activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(4):R749-758.
204. Ahnaou A, Dautzenberg FM, Huysmans H, Steckler T, Drinkenburg WH. Contribution of melanin-concentrating hormone (MCH1) receptor to thermoregulation and sleep stabilization: evidence from MCH1 (-/-) mice. *Behavioural brain research*. 2011;218(1):42-50.
205. Bjursell M, Gerdin AK, Ploj K, Svensson D, Svensson L, Oscarsson J, Snaith M, Tornell J, Bohlooly YM. Melanin-concentrating hormone receptor 1 deficiency increases insulin sensitivity in obese leptin-deficient mice without affecting body weight. *Diabetes*. 2006;55(3):725-733.
206. Chee MJ, Pissios P, Prasad D, Maratos-Flier E. Expression of melanin-concentrating hormone receptor 2 protects against diet-induced obesity in male mice. *Endocrinology*. 2014;155(1):81-88.
207. Kokkotou E, Moss AC, Torres D, Karagiannides I, Cheifetz A, Liu S, O'Brien M, Maratos-Flier E, Pothoulakis C. Melanin-concentrating hormone as a mediator of intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10613-10618.
208. Karagiannis AK, Ziogas DC, Gras-Miralles B, Geiger BM, Nagel J, Trebicka E, Najarian R, Cherayil BJ, Kokkotou E. Increased susceptibility of melanin-concentrating hormone-deficient mice to infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity*. 2013;81(1):166-172.
209. Hoogduijn MJ, Ancans J, Suzuki I, Estdale S, Thody AJ. Melanin-concentrating hormone and its receptor are expressed and functional in human skin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;296(3):698-701.
210. Kemp EH, Waterman EA, Hawes BE, O'Neill K, Gottumukkala RV, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Watson PF. The melanin-concentrating hormone receptor 1, a novel target of autoantibody responses in vitiligo. *J Clin Invest*. 2002;109(7):923-930.
211. Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N. Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(10):1289-1295.
212. Baird JP, Rios C, Gray NE, Walsh CE, Fischer SG, Pecora AL. Effects of melanin-concentrating hormone on licking microstructure and brief-access taste responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(5):R1265-1274.
213. Sakamaki R, Uemoto M, Inui A, Asakawa A, Ueno N, Ishibashi C, Hirono S, Yukioka H, Kato A, Shinfuku N, Kasuga M, Katsuura G. Melanin-concentrating hormone enhances sucrose intake. *International journal of molecular medicine*. 2005;15(6):1033-1039.
214. Semjonous NM, Smith KL, Parkinson JRC, Gunner DJL, Liu Y-L, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR, Small CJ. Coordinated changes in energy intake and expenditure following hypothalamic administration of neuropeptides involved in energy balance. *International journal of obesity (2005)*. 2009;33(7):775-785.
215. Abbott CR, Kennedy AR, Wren AM, Rossi M, Murphy KG, Seal LJ, Todd JF, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology*. 2003;144(9):3943-3949.

Bibliográfia

216. Guesdon B, Paradis E, Samson P, Richard D. Effects of intracerebroventricular and intra-accumbens melanin-concentrating hormone agonism on food intake and energy expenditure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(3):R469-475.
217. Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Tanaka T, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(3):E583-588.
218. Ito M, Gomori A, Ishihara A, Oda Z, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Sano H, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A. Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(5):E940-945.
219. Shearman LP, Camacho RE, Sloan Stribling D, Zhou D, Bednarek MA, Hreniuk DL, Feighner SD, Tan CP, Howard AD, Van der Ploeg LH, MacIntyre DE, Hickey GJ, Strack AM. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;475(1-3):37-47.
220. Pereira-da-Silva M, De Souza CT, Gasparetti AL, Saad MJ, Velloso LA. Melanin-concentrating hormone induces insulin resistance through a mechanism independent of body weight gain. *The Journal of endocrinology.* 2005;186(1):193-201.
221. Bednarek MA, Tan C, Hreniuk DL, Palyha OC, MacNeil DJ, Van Der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD. Synthesis and biological evaluation in vitro of a selective, high potency peptide agonist of human melanin-concentrating hormone action at human melanin-concentrating hormone receptor 1. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(16):13821-13826.
222. Audinot V, Zuana OD, Fabry N, Ouvry C, Nosjean O, Henlin JM, Fauchere JL, Boutin JA. S38151 [p-guanidinobenzoyl-[Des-Gly(10)]-MCH(7-17)] is a potent and selective antagonist at the MCH(1) receptor and has anti-feeding properties in vivo. *Peptides.* 2009;30(11):1997-2007.
223. MacNeil DJ, Bednarek MA. MCH receptor peptide agonists and antagonists. *Peptides.* 2009;30(11):2008-2013.
224. Mashiko S, Ishihara A, Gomori A, Moriya R, Ito M, Iwaasa H, Matsuda M, Feng Y, Shen Z, Marsh DJ, Bednarek MA, MacNeil DJ, Kanatani A. Antiobesity effect of a melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist in diet-induced obese mice. *Endocrinology.* 2005;146(7):3080-3086.
225. Ito M, Ishihara A, Gomori A, Matsushita H, Ito M, Metzger JM, Marsh DJ, Haga Y, Iwaasa H, Tokita S, Takenaga N, Sato N, MacNeil DJ, Moriya M, Kanatani A. Mechanism of the anti-obesity effects induced by a novel melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonist in mice. *Br J Pharmacol.* 2010;159(2):374-383.
226. Ito M, Gomori A, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Matsuda M, Bednarek MA, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, Macneil DJ, Kanatani A. Antagonism of central melanin-concentrating hormone 1 receptor alleviates steatohepatitis in mice. *The Journal of endocrinology.* 2008;198(2):309-315.
227. Gomori A, Ishihara A, Ito M, Matsushita H, Mashiko S, Iwaasa H, Matsuda M, Bednarek MA, Qian S, Macneil DJ, Kanatani A. Blockade of MCH1 receptor signalling ameliorates obesity and related hepatic steatosis in ovariectomized mice. *Br J Pharmacol.* 2007;151(6):900-908.
228. Herve C, Fellmann D. Changes in rat melanin-concentrating hormone and dynorphin messenger ribonucleic acids induced by food deprivation. *Neuropeptides.* 1997;31(3):237-242.
229. Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Sliker L, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology.* 2001;142(2):680-686.
230. Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA. Neuronal Glucosensing: What Do We Know After 50 Years? *Diabetes.* 2004;53(10):2521-2528.

231. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang C-Y, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*. 2007;449(7159):228-232.
232. Vidarsdottir S, Smeets PAM, Eichelsheim DL, van Osch MJP, Viergever MA, Romijn JA, van der Grond J, Pijl H. Glucose Ingestion Fails to Inhibit Hypothalamic Neuronal Activity in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2007;56(10):2547-2550.
233. Bady I, Marty N, Dallaporta M, Emery M, Gyger J, Tarussio D, Foretz M, Thorens B. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*. 2006;55(4):988-995.
234. Burdakov D, Luckman SM, Verkhatsky A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2005;360(1464):2227-2235.
235. Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, Choi B, Bruning JC, Lowell BB. Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2010;12(5):545-552.
236. Gonzalez MI, Baker BI, Wilson CA. Stimulatory effect of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release. *Neuroendocrinology*. 1997;66(4):254-262.
237. Williamson-Hughes PS, Grove KL, Smith MS. Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. *Brain research*. 2005;1041(2):117-124.
238. Garcia MC, Lopez M, Gualillo O, Seoane LM, Dieguez C, Senaris RM. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(11):1392-1400.
239. Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, Abbott CR, Small CJ, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology*. 2001;142(7):3265-3268.
240. Kennedy AR, Todd JF, Dhillon WS, Seal LJ, Ghatei MA, O'Toole CP, Jones M, Witty D, Winborne K, Riley G, Hervieu G, Wilson S, Bloom SR. Effect of direct injection of melanin-concentrating hormone into the paraventricular nucleus: further evidence for a stimulatory role in the adrenal axis via SLC-1. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(3):268-272.
241. Nogueiras R, Romero-Pico A, Vazquez MJ, Novelle MG, Lopez M, Dieguez C. The opioid system and food intake: homeostatic and hedonic mechanisms. *Obes Facts*. 2012;5(2):196-207.
242. Bodnar RJ. Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective. *Peptides*. 2004;25(4):697-725.
243. Pennock RL, Hentges ST. Differential expression and sensitivity of presynaptic and postsynaptic opioid receptors regulating hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*. 2011;31(1):281-288.
244. Brugman S, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ. Combined blockade of both micro - and kappa-opioid receptors prevents the acute orexigenic action of Agouti-related protein. *Endocrinology*. 2002;143(11):4265-4270.
245. Romero-Pico A, Vazquez MJ, Gonzalez-Touceda D, Figueira C, Skibicka KP, Alvarez-Crespo M, Van Gestel MA, Velasquez DA, Schwarzer C, Herzog H, Lopez M, Adan RA, Dickson SL, Dieguez C, Nogueiras R. Hypothalamic [kappa]-Opioid Receptor Modulates the Orexigenic Effect of Ghrelin. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(7):1296-1307.
246. Karatayev O, Barson JR, Chang GQ, Leibowitz SF. Hypothalamic injection of non-opioid peptides increases gene expression of the opioid enkephalin in hypothalamic and mesolimbic nuclei: Possible mechanism underlying their behavioral effects. *Peptides*. 2009;30(12):2423-2431.

Bibliografia

247. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(6):2046-2050.
248. Levine AS, Billington CJ. Why do we eat? A neural systems approach. *Annual review of nutrition*. 1997;17:597-619.
249. Reid LD. Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding. *Am J Clin Nutr*. 1985;42(5 Suppl):1099-1132.
250. Czyzyk TA, Nogueiras R, Lockwood JF, McKinzie JH, Coskun T, Pintar JE, Hammond C, Tschop MH, Statnick MA. kappa-Opioid receptors control the metabolic response to a high-energy diet in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(4):1151-1159.
251. Czyzyk TA, Romero-Pico A, Pintar J, McKinzie JH, Tschop MH, Statnick MA, Nogueiras R. Mice lacking delta-opioid receptors resist the development of diet-induced obesity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(8):3483-3492.
252. Tabarin A, Diz-Chaves Y, Carmona Mdel C, Catargi B, Zorrilla EP, Roberts AJ, Coscina DV, Rousset S, Redonnet A, Parker GC, Inoue K, Ricquier D, Penicaud L, Kieffer BL, Koob GF. Resistance to diet-induced obesity in mu-opioid receptor-deficient mice: evidence for a "thrifty gene". *Diabetes*. 2005;54(12):3510-3516.
253. Chang GQ, Karatayev O, Ahsan R, Gaysinskaya V, Marwil Z, Leibowitz SF. Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(2):E561-570.
254. Lopez CA, Guesdon B, Baraboi ED, Roffarello BM, Hetu M, Richard D. Involvement of the opioid system in the orexigenic and hedonic effects of melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(4):R1105-1111.
255. Parks GS, Wang L, Wang Z, Civelli O. Identification of neuropeptide receptors expressed by melanin-concentrating hormone neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 2014;522(17):3817-3833.
256. Marino JS, Xu Y, Hill JW. Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22(7):275-285.
257. Brann MR, Ellis J, Jorgensen H, Hill-Eubanks D, Jones SV. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes: localization and structure/function. *Progress in brain research*. 1993;98:121-127.
258. Bartness TJ, B SY, H VC, J SG, K SC. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;318(1-2):34-43.
259. Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1998;275(1):R291-R299.
260. Song CK, Jackson RM, Harris RB, Richard D, Bartness TJ. Melanocortin-4 receptor mRNA is expressed in sympathetic nervous system outflow neurons to white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(5):R1467-1476.
261. Raposinho PD, White RB, Aubert ML. The melanocortin agonist Melanotan-II reduces the orexigenic and adipogenic effects of neuropeptide Y (NPY) but does not affect the NPY-driven suppressive effects on the gonadotropic and somatotrophic axes in the male rat. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(2):173-181.
262. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, Schwartz GJ, Kunos G, Rossetti L. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med*. 2008;14(6):667-675.

263. CarpÉNE C, Bousquet-MÉLou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan MAX. Lipolytic Effects of β 1-, β 2-, and β 3-Adrenergic Agonists in White Adipose Tissue of Mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;839(1):186-189.
264. Holm C, Østerlund T, Laurell H, Contreras JA. MOLECULAR MECHANISMS REGULATING HORMONE-SENSITIVE LIPASE AND LIPOLYSIS. *Annual review of nutrition*. 2000;20(1):365-393.
265. Enquist LW. Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186 Suppl 2:S209-214.
266. Perkins MN, Rothwell NJ, Stock MJ, Stone TW. Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature*. 1981;289(5796):401-402.
267. Yoshida T, Bray GA. Catecholamine turnover in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *The American journal of physiology*. 1984;246(4 Pt 2):R558-565.
268. Holt SJ, Wheal HV, York DA. Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. *Brain research*. 1987;405(2):227-233.
269. Morrison SF. RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *The American journal of physiology*. 1999;276(4 Pt 2):R962-973.
270. Uno T, Shibata M. Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(2):R536-546.
271. Tanida M, Yamamoto N, Shibamoto T, Rahmouni K. Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS one*. 2013;8(2):e56660.
272. Seoane-Collazo P, Martínez de Morentin PB, Ferno J, Dieguez C, Nogueiras R, Lopez M. Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology*. 2014;155(5):1679-1689.
273. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain research*. 2000;871(1):50-56.
274. Shimazu T. Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition*. 1996;12(1):65-66.
275. Uyama N, Geerts A, Reynaert H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;280(1):808-820.
276. Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A. The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol*. 2003;464(1):36-48.
277. La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol*. 1999;11(8):643-652.
278. Shi Y, Li F, Chen Y. Controlling morphology and improving the photovoltaic performances of P3HT/ZnO hybrid solar cells via P3HT-b-PEO as an interfacial compatibilizer. *New Journal of Chemistry*. 2013;37(1):236-244.
279. Viñuela MC, Larsen PJ. Identification of NPY-induced c-Fos expression in hypothalamic neurones projecting to the dorsal vagal complex and the lower thoracic spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*. 2001;438(3):286-299.
280. Bruinstroop E, Pei L, Ackermans MT, Foppen E, Borgers AJ, Kwakkel J, Alkemade A, Fliers E, Kalsbeek A. Hypothalamic Neuropeptide Y (NPY) Controls Hepatic VLDL-Triglyceride Secretion in Rats via the Sympathetic Nervous System. *Diabetes*. 2012;61(5):1043-1050.

Bibliografia

281. Bruinstroop E, la Fleur SE, Ackermans MT, Foppen E, Wortel J, Kooijman S, Berbée JFP, Rensen PCN, Fliers E, Kalsbeek A. The autonomic nervous system regulates postprandial hepatic lipid metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2013;304(10):E1089-E1096.
282. Nijima A. Blood glucose levels modulate efferent activity in the vagal supply to the rat liver. *J Physiol*. 1985;364:105-112.
283. Bruinstroop E, la Fleur SE, Ackermans MT, Foppen E, Wortel J, Kooijman S, Berbee JF, Rensen PC, Fliers E, Kalsbeek A. The autonomic nervous system regulates postprandial hepatic lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(10):E1089-1096.
284. Bruinstroop E, Fliers E, Kalsbeek A. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;28(5):673-684.
285. Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Journal*. 1990;268(1):1-13.
286. Hellerstein MK, Schwarz JM, Neese RA. Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annual review of nutrition*. 1996;16:523-557.
287. Diraison F, Beylot M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *The American journal of physiology*. 1998;274(2 Pt 1):E321-327.
288. Wang S, Koo SI. Plasma clearance and hepatic utilization of stearic, myristic and linoleic acids introduced via chylomicrons in rats. *Lipids*. 1993;28(8):697-703.
289. Martins IJ, Mortimer BC, Miller J, Redgrave TG. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J Lipid Res*. 1996;37(12):2696-2705.
290. Merkel M, Weinstock PH, Chajek-Shaul T, Radner H, Yin B, Breslow JL, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J Clin Invest*. 1998;102(5):893-901.
291. Craig WY, Cooper AD. Effects of chylomicron remnants and beta-VLDL on the class and composition of newly secreted lipoproteins by HepG2 cells. *J Lipid Res*. 1988;29(3):299-308.
292. Van Harken DR, Dixon CW, Heimberg M. Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes. V. The effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(9):2278-2285.
293. Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1483(1):37-57.
294. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980;55(7):434-438.
295. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama*. 2015;313(22):2263-2273.
296. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-1419.
297. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(4):643-654.e641-649; quiz e639-640.
298. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, Bedossa P, Lebray P, Poynard T, Ratziu V. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *Journal of hepatology*. 2013;59(3):550-556.

299. Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, Kajiyama W, Tani S, Goto M. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. *Japanese journal of medicine*. 1988;27(2):142-149.
300. Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB. Liver histology in a 'normal' population-examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1977;12(5):593-597.
301. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Annals of internal medicine*. 2000;132(2):112-117.
302. Nanda K. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatric transplantation*. 2004;8(6):613-618.
303. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, Waljee AK. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(3):325-334.
304. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Current molecular medicine*. 2003;3(6):483-490.
305. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*. 2001;358(9285):893-894.
306. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in liver disease*. 2001;21(1):27-41.
307. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-1351.
308. Ravikumar B, Carey PE, Snaar JE, Deelchand DK, Cook DB, Neely RD, English PT, Firbank MJ, Morris PG, Taylor R. Real-time assessment of postprandial fat storage in liver and skeletal muscle in health and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(4):E789-797.
309. de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2002;21(3):219-223.
310. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(1):43-50.
311. Stoeckman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(30):27029-27035.
312. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(42):30028-30032.
313. Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*. 2002;297(5579):240-243.
314. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11482-11486.
315. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie DG, Friedman JM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(17):6409-6414.
316. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*. 2003;546(1):113-120.

Bibliografia

317. Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T, Uyeda K. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13710-13715.
318. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-1174.
319. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med*. 2000;6(9):998-1003.
320. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(28):25226-25232.
321. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;314(2):580-585.
322. Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies LJ, Pratipanawatr W, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA. Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(6):1364-1370.
323. Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;39(1):188-196.
324. Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Wehmeier KR, Oliver D, Bacon BR. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. *Hepatology*. 2003;38(4):1008-1017.
325. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JL. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15718-15723.
326. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B, Ferrieres J. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1219-1223.
327. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Castella L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-1772.
328. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-725 e716.
329. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008;19(9):567-576.
330. J K Reddy a, Mannaerts GP. Peroxisomal Lipid Metabolism. *Annual review of nutrition*. 1994;14(1):343-370.
331. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Parks JK, Parker WD, Jr. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 1999;31(3):430-434.
332. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;38(4):999-1007.
333. Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause

- mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998;114(4):764-774.
334. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999;103(11):1489-1498.
335. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*. 1991;11(1):81-128.
336. Pan M, Cederbaum AI, Zhang YL, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1277-1287.
337. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(1):91-100.
338. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12(5):365-383.
339. Halberg N, Wernstedt I, Scherer PE. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008;37(3):753-xi.
340. Fuentes L, Roszer T, Ricote M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages. *Mediators of inflammation*. 2010;2010:219583.
341. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56(1):16-23.
342. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7(6):496-507.
343. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111-2117.
344. Obstfeld AE, Sugaru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, Ables EV, Ferrante AW, Jr. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*. 2010;59(4):916-925.
345. Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van Rooijen N, Staels B, Kersten S, Muller M. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*. 2010;51(2):511-522.
346. Duval C, Thissen U, Keshtkar S, Accart B, Stienstra R, Boekschoten MV, Roskams T, Kersten S, Muller M. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes*. 2010;59(12):3181-3191.
347. Stanton MC, Chen SC, Jackson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D, Cui L, Fine JS, Greenfeder S, Bober LA, Jenh CH. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *Journal of inflammation (London, England)*. 2011;8:8.
348. Rutkowski DT, Wu J, Back S-H, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J, Yau GDY, Kaufman RJ. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Developmental cell*. 2008;15(6):829-840.

Bibliográfia

349. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *Journal of hepatology*. 2011;54(4):795-809.
350. Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, Chang L, Xu W, Miao H, Leonardi R, Chen YE, Jackowski S, Kaufman RJ. *The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress-induced hepatic steatosis*. Vol 302011.
351. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006;313(5790):1137-1140.
352. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(1):316-332.
353. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development*. 1999;13(10):1211-1233.
354. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(8):3071-3084.
355. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):13935-13940.
356. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-917.
357. Sabio G, Davis RJ. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(9):490-496.
358. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(17):12093-12101.
359. Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(9):353-363.
360. Paxinos G, Franklin KB. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Gulf Professional Publishing; 2004.
361. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 1998.
362. Shayakhmetov DM, Li Z-Y, Ni S, Lieber A. Analysis of Adenovirus Sequestration in the Liver, Transduction of Hepatic Cells, and Innate Toxicity after Injection of Fiber-Modified Vectors. *Journal of Virology*. 2004;78(10):5368-5381.
363. Montenegro-Miranda PS, Pichard V, Aubert D, ten Bloemendaal L, Duijst S, de Waart DR, Ferry N, Bosma PJ. In the rat liver, Adenoviral gene transfer efficiency is comparable to AAV. *Gene Ther*. 2014;21(2):168-174.
364. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol*. 1949;109(1-2):1-9.
365. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Distefano PS, Geddes BJ. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(3):R747-754.
366. Westerterp KR. Food quotient, respiratory quotient, and energy balance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1993;57(5):759S-764S.
367. Koff RS, Schimmel EM. Energy metabolism: Tissue determinants and cellular corollaries. Edited by J.M. Kinney and H.N. Tucker. 562 pp. New York: Raven Press, 1992. \$56. *Hepatology*. 1993;17(2):347-347.
368. Krebs HA. Body size and tissue respiration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1950;4(0):249-269.

369. Tschop MH, Speakman JR, Arch JR, Auwerx J, Bruning JC, Chan L, Eckel RH, Farese RV, Jr., Galgani JE, Hambly C, Herman MA, Horvath TL, Kahn BB, Kozma SC, Maratos-Flier E, Muller TD, Munzberg H, Pfluger PT, Plum L, Reitman ML, Rahmouni K, Shulman GI, Thomas G, Kahn CR, Ravussin E. A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nature methods*. 2012;9(1):57-63.
370. Miller J. Reaction time analysis with outlier exclusion: bias varies with sample size. *The Quarterly journal of experimental psychology A, Human experimental psychology*. 1991;43(4):907-912.
371. SHAPIRO SS, WILK MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965;52(3-4):591-611.
372. Razali NM, Wah YB. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. 2011;2(1):21-33.
373. Kao LS, Green CE. Analysis of Variance: Is There a Difference in Means and What Does It Mean? *The Journal of surgical research*. 2008;144(1):158-170.
374. de Winter JC. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. *Practical Assessment, Research & Evaluation*. 2013;18.
375. Student. The probable error of a mean. *Biometrika*. 1908;6(1):1-25.
376. Milton JS. *Estadística para biología y ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2007.
377. Bluman AG. *Elementary Statistics: A Step by Step Approach: A Brief Version*. McGraw-Hill Companies, The; 2006.
378. Charan J, Biswas T. How to Calculate Sample Size for Different Study Designs in Medical Research? *Indian Journal of Psychological Medicine*. 2013;35(2):121-126.
379. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*. 1964;6(3):241-252.
380. Campbell G, Skillings JH. Nonparametric Stepwise Multiple Comparison Procedures. *Journal of the American Statistical Association*. 1985;80(392):998-1003.
381. Bridge PD, Sawilowsky SS. Increasing Physicians' Awareness of the Impact of Statistics on Research Outcomes. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1999;52(3):229-235.
382. Mohan P, Bloom S. Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 1999;8(5):255-261.
383. Nordstrom EA, Ryden M, Backlund EC, Dahlman I, Kaaman M, Blomqvist L, Cannon B, Nedergaard J, Arner P. A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity. *Diabetes*. 2005;54(6):1726-1734.
384. Kluwe J, Pradere JP, Gwak GY, Mencin A, De Minicis S, Osterreicher CH, Colmenero J, Bataller R, Schwabe RF. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology*. 2010;138(1):347-359.
385. Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology*. 2002;36(3):592-601.
386. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*. 2005;74:739-789.
387. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews*. 2006;86(4):1133-1149.
388. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(7):519-529.
389. Veteläinen R, Van Vliet A, Van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(9):1526-1533.

Bibliografia

390. ter Horst GJ, Luiten PGM, Kuipers F. Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguus nuclei in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1984;11(1):59-75.
391. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28 Suppl 4:S22-28.
392. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W, Li P. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nature genetics*. 2003;35(1):49-56.
393. Bartness TJ, Song CK. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res*. 2007;48(8):1655-1672.
394. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med*. 2004;10(10):1128-1132.
395. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-336.
396. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(44):45803-45809.
397. Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science*. 2008;322(5907):1539-1543.
398. Pardina E, Baena-Fustegueras JA, Llamas R, Catalan R, Galard R, Lecube A, Fort JM, Llobera M, Allende H, Vargas V, Peinado-Onsurbe J. Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis. *Obesity surgery*. 2009;19(5):608-616.
399. Sabio G, Kennedy NJ, Cavanagh-Kyros J, Jung DY, Ko HJ, Ong H, Barrett T, Kim JK, Davis RJ. Role of Muscle c-Jun NH(2)-Terminal Kinase 1 in Obesity-Induced Insulin Resistance. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(1):106-115.
400. Kalsbeek A, Bruinstroop E, Yi CX, Klieverik LP, La Fleur SE, Fliers E. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212:114-129.
401. Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*. 1998;402(4):460-474.
402. Dampney RA. Arcuate nucleus - a gateway for insulin's action on sympathetic activity. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2109-2110.
403. Jiang C, Fogel R, Zhang X. Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. *Brain research*. 2003;980(1):31-47.
404. Yanovski SZ, Yanovski JA. Naltrexone extended-release plus bupropion extended-release for treatment of obesity. *Jama*. 2015;313(12):1213-1214.



AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer. Las horas en el laboratorio pasan tan fugaces, que sólo en el momento de escribir estas líneas es cuando soy consciente del paso del tiempo, de todo lo que he aprendido, de lo que aún queda por conocer.

Querría agradecer a mis directores de tesis, al Profesor Rubén Nogueiras y al Profesor Carlos Diéguez, su acogida en el departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina, en un momento en el que creí mi vocación científica totalmente perdida. Gracias por enseñarme que puedo hacer de mi afición mi profesión.

Gracias también al Profesor Miguel López, por ser un gran consejero, aportando siempre sus buenas ideas y su experiencia.

También agradecer al departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la USC, en especial al Profesor Óscar Cordero. Allí aprendí a pipetear, a tener paciencia en el laboratorio y de donde me llevó a tres buenas amigas: Alba, Amparo y Sara.

En el ámbito científico, agradecer a todos los colaboradores externos que aportaron calidad y relevancia al trabajo presentado. En la Universidad de Santiago agradecer a todos los compañeros que también participaron en la elaboración de esta tesis; a la Dra. Rosalía Gallego por las inmunohistoquímicas, las tinciones del CNS y sus enseñanzas sobre histología; a Ana Senra por dedicar tanto tiempo a las tinciones e inmunos hepáticas. Dentro del propio grupo de investigación, gracias a Douglas, Adenis, Luis, Amparo y Omar. Gracias a Chus, por sus magistrales/divertidas clases de cirugía y manejo con los animales.

Los experimentos de este trabajo no hubiesen sido posibles sin la ayuda de Daniel y Estrella. Gracias Dani por dar sosiego y calmar mis prisas, por ser un gran compañero. Gracias a Estrella, por tu esfuerzo y energía. Gracias a los dos por vuestra paciencia conmigo.

Ya en el día a día, gracias a todos los compañer@s de los laboratorios POL4-POL3-POL2 que hacen que tengamos un estupendo ambiente de trabajo, dónde siempre hay espacio para alguna que otro café/caña: Marta, René, Chusa, Marquitos, Juan, Ahmed, Mar, Pamela... Agradecer los buenos consejos/confesiones/sonrisas/lágrimas compartidas de los que considero más que compañeros de trabajo; Eva por su experiencia y cariño, Noe por su humildad, esfuerzo y alegría; Ángela, Patri, Ismael y Luis Martins por sus divertidas y enriquecedoras conversaciones; Sonia y David por tantas y buenas horas compartidas.

Agradecimientos

A Begoña, gracias por cuidar tanto de mí. Gracias a Cintia por su cariño y amistad. A Cris, por escucharme y ser mi ventana al futuro. A Sulay por su confianza y apoyo. A las Estrella Galicia compartidas.

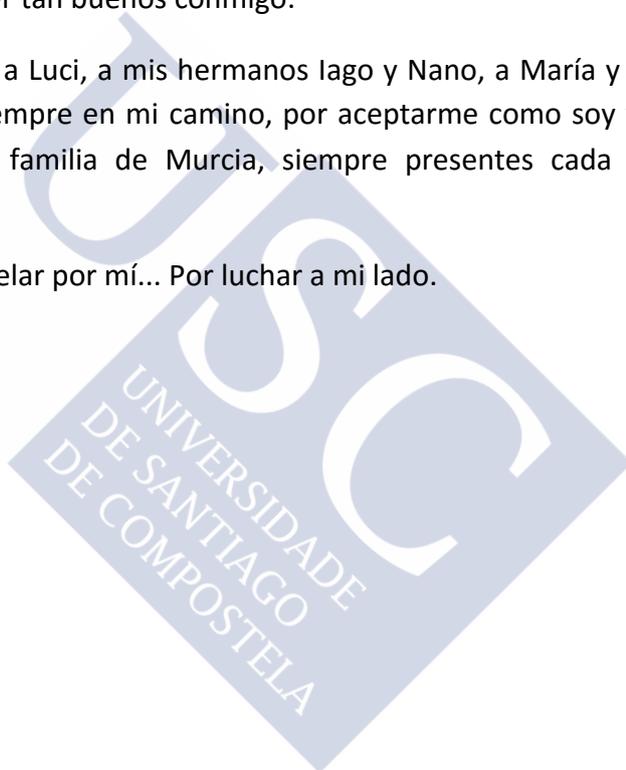
Agradecer a Rucha su compañerismo y disposición. A Marisol su gestión y paciencia con todos en el laboratorio. A Bernardo y Ana por su cuidado y serenidad con los animales (y con los que no lo somos).

Durante todos estos años también me han acompañado mis amig@s, que siempre dan un soplo de aire fresco, alegría y comprensión; gracias a Inés, Manuel, Ángela, Pablo, Tamara, Ester, Nora y Marta. Gracias a Iria y a Ana, tan lejos pero tan cerca.

Agradecer a Teresa, José Manuel, Carmen y Teté su cariño y ayuda durante estos años. Gracias por ser tan buenos conmigo.

Gracias a mi padre y a Luci, a mis hermanos Iago y Nano, a María y mis sobrinos. Gracias por apoyarme siempre en mi camino, por aceptarme como soy y creer en mi profesión. Gracias a mi familia de Murcia, siempre presentes cada día desde la distancia.

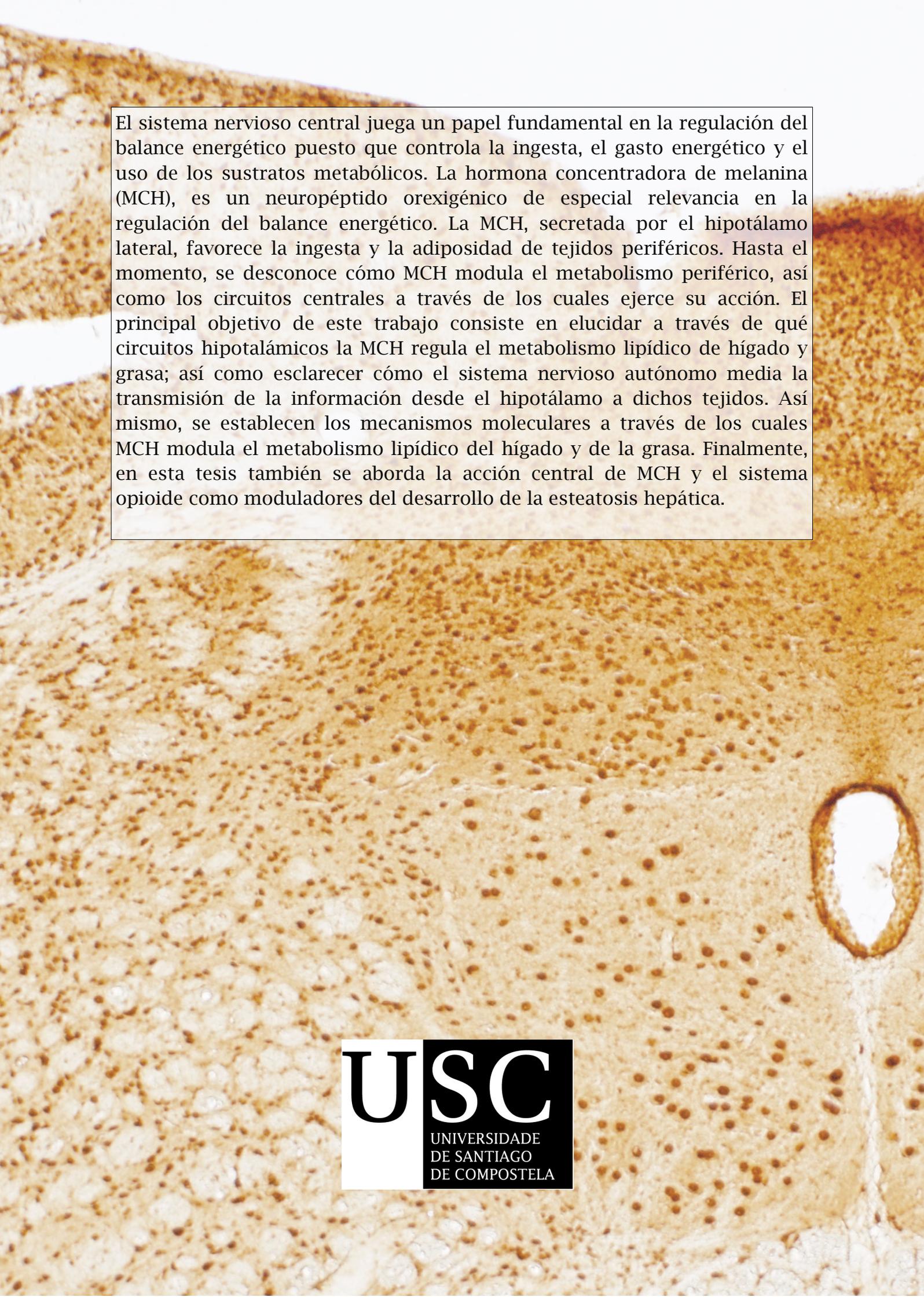
A Javier gracias por velar por mí... Por luchar a mi lado.











El sistema nervioso central juega un papel fundamental en la regulación del balance energético puesto que controla la ingesta, el gasto energético y el uso de los sustratos metabólicos. La hormona concentradora de melanina (MCH), es un neuropéptido orexigénico de especial relevancia en la regulación del balance energético. La MCH, secretada por el hipotálamo lateral, favorece la ingesta y la adiposidad de tejidos periféricos. Hasta el momento, se desconoce cómo MCH modula el metabolismo periférico, así como los circuitos centrales a través de los cuales ejerce su acción. El principal objetivo de este trabajo consiste en elucidar a través de qué circuitos hipotalámicos la MCH regula el metabolismo lipídico de hígado y grasa; así como esclarecer cómo el sistema nervioso autónomo media la transmisión de la información desde el hipotálamo a dichos tejidos. Así mismo, se establecen los mecanismos moleculares a través de los cuales MCH modula el metabolismo lipídico del hígado y de la grasa. Finalmente, en esta tesis también se aborda la acción central de MCH y el sistema opioide como moduladores del desarrollo de la esteatosis hepática.