EL ESTÓMAGO COMO UN ÓRGANO ENDOCRINO: Mecanismos gástricos implicados en la regulación de la ingesta y el balance energético

Lucía López Senín

Tesis doctoral, 2014

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

El estómago como un órgano endocrino: Mecanismos gástricos implicados en la regulación de la ingesta y el balance energético

Lucía López Senín

2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

Dra. Luisa María Seoane Camino, Investigadora del Sistema Nacional de Salud, IDIS/SERGAS.

Dra. María Pardo Pérez, Investigadora del Sistema Nacional de Salud Miguel Servet, IDIS/SERGAS.

Dr. Felipe Casanueva Freijo, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "**El estómago como un órgano endocrino: Mecanismos gástricos implicados en la regulación de la ingesta y el balance energético**" que presenta Lucía López Senín ha sido realizada bajo su dirección en el grupo Fisiopatología Endocrina (IDIS) del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en la Universidad de Santiago de Compostela.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización:

Fdo. Luisa María Seoane Camino

Fdo. María Pardo Pérez

Fdo. Felipe Casanueva Freijo

Santiago de Compostela, 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Sempre se di que esta parte é a máis difícil de escribir e a min paréceme a máis doada, pero aínda que non teña límite de palabras coma nun artigo sería necesaria outra tese para poder dar as grazas a todas as persoas que tantas cousas fixeron por min ao longo deste proxecto, por iso, aínda que non vexades os vosos nomes aquí escritos, espero que poidades identificarvos nas miñas palabras.

En primeiro lugar gustaríame agradecer a Felipe darme a oportunidade de entrar no seu grupo de investigación e deixarme formar parte do seu equipo, non unha vez senón dúas. A María e a Sisi porque ademais de deseñar e dirixir os experimentos estivestes dispostas a saír do despacho e poñer a bata e os guantes para ensinarme.

Ás catro persoas das que fixen especial mención no meu máster, e que seguen tendo que estar aquí porque este traballo tamén e deles; a Turo e Omar por ser os meus profes cando cheguei e responder as miñas dúbidas ata o último día, a Cecilia por ser imprescindible, e a Jana pola súa axuda e entusiasmo tanto dentro como fóra do laboratorio que tanto se bota de menos.

Ás pobres ratitas non podo darlle as grazas porque non tiveron elección, pero si pedir desculpas xa que foron quen máis sufriron.

Aos meus compis do IDIS-CHUS por todos os bos momentos (comidas, viaxes, situacións surrealistas, cafés, festas, …), pero sobre todo por compartir todas as horas de máis, xa que sempre se traballa mellor acompañado e con música na sala de enfronte, e por atopar tempo e estar sempre dispoñibles para prestar a vosa axuda cunha nova técnica ou un problema estatístico.

Aos meus amigos por aturarme, mostrar interese en cousas moi aburridas e axudarme a desconectar e cargar pilas, especialmente ás persoas que viviron comigo estes anos e fixeron bos os días malos ao chegar a casa.

E por último á miña familia, á miña irmán por darme os consellos máis sabios aínda que non os siga, e aos meus pais por darme sempre ese apoio incondicional como soamente os pais saben facelo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2-AG	2-araquidonilglicerol
2-DE	electroforesis bidimensional
aa	aminoácidos
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AgRP	péptido relacionado con Agouti
AL	ad líbitum
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	kinasa activada por adenosín monofosfato
ANOVA	análisis de la varianza
ARC	núcleo arcuato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CART	transcrito regulado por anfetamina y cocaína
CBs	receptores de cannabinoides
CCK	colecistokinina
CPT1	carnitina palmitoiltransferasa 1
CRF	factor liberador de corticotropinas
CRH	hormona liberadora de corticotropinas
CT	ciclo umbral
DIO	obesidad inducida por la dieta
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	dimetil sulfóxido
DMT2	diabetes mellitus tipo 2
DNasa	desoxirribonucleasa
DTT	ditiotreitol
E2	estrógenos
ECS	sistema endocannabinoide
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EIA	inmunoensayo enzimático
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	suero bovino fetal
FTO	gen asociado a masa grasa y obesidad
GH	hormona de crecimiento
GHRH	hormona liberadora de gonadotropinas
GHSR	receptor de secretagogos de la GH

GLP-1	péptido tipo glucagón 1
GOAT	ghrelin O-aciltransferasa
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
$HPRT_1$	fosforribotransferasa hipoxantina 1
icv	intracerebroventricular
IEF	isoelectroenfoque
IMC	índice de masa corporal
ip	intraperitoneal
iTRAQ	marcaje isobárico para la cuantificación absoluta y relativa
kDa	kilodaltons
KRH	tampón Krebs-Ringer-Hepes
LEPR	receptor de leptina
MALDI	desorción iónica provocada por láser asistida por matriz
MAP	proteína activadora de mitógenos
MCH	hormona concentradora de melanina
MC3/4R	receptores 3/4 de melanocortinas
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
mTOR	diana de rapamicina de mamíferos
Mw	masa molecular
NTS	núcleo del tracto solitario
NPY	neuropéptido Y
NUCB2	nucleobindina-2
ORQX	orquidectomía
OVX	ovariectomía
pI	punto isoeléctrico
PBS	tampón fosfato salino
PCs	prohormonas convertasas
PCA	análisis de componentes principales
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
POMPC	proopiomelanocortina
PP	polipéptido pancreático
PS	péptido señal
PYY	péptido tirosina-tirosina
PVN	núcleo paraventricular
qPCR	PCR cuantitativa

RA	realimentación
RD	retraso del destete
RE	retículo endoplasmático
RIA	radioinmunoensayo
RIPA	tampón de radioinmunoprecipitación
ROS	especies reactivas de oxígeno
S6K1	kinasa 1 de la proteína ribosomal S6
SDS	dodecil sulfato sódico
SEM	error estándar de la media
SILAC	aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivos celulares
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SNE	sistema nervioso entérico
T	testosterona
TAB	tejido adiposo blanco
TAP	tejido adiposo pardo
TAS	tejido adiposo subcutáneo
TBP	tributilfosfina
TFA	ácido trifluoroacético
THC	tetrahidrocannabinol
TOF	tiempo de vuelo
TRH	hormona liberadora de tirotropinas
Tris	tris hidroximetil aminometano
UCPs	proteínas desacopladoras

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS **1**

ÍNDICE **7**

INTRODUCCIÓN **13**
1 OBESIDAD **15**
2 REGULACIÓN DE LA INGESTA **17**
2.1 Homeostasis energética 17
2.2 Regulación central de la ingesta 17
2.3 Regulación periférica de la ingesta 19
2.3.1 Tejido adiposo blanco 19
2.3.2 Páncreas 20
2.3.3 Tracto gastrointestinal 21
3 EL ESTÓMAGO **23**
3.1 Anatomía del estómago 23
3.2 Glándulas gástricas 23
3.3 Control de la función gástrica 24
3.3.1 Control neural del estómago 25
3.3.2 Control hormonal del estómago 26
4 CONTROL DE LA INGESTA Y LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL ESTÓMAGO **27**
4.1 Ghrelina 27
4.1.1 Estructura y acilación de la ghrelina 27
4.1.2 Receptores de la ghrelina 28
4.1.3 Distribución de la ghrelina 29
4.1.4 Regulación de la ghrelina 30
4.1.5 Funciones de la ghrelina 31
4.2 Obestatina 35
4.3 Sistema endocannabinoide (ECS) 35
4.3.1 Receptores cannabinoides 35
4.3.2 Cannabinoides endógenos 37
4.3.3 Antagonistas del receptor CB1 37
4.3.4 Funciones del ECS 38
4.3.4.1 Papel del ECS en la regulación de la ingesta 38
4.3.4.1.1 Papel del ECS gástrico en la regulación de la ingesta 40
4.3.4.1.2 Interacción ghrelina-ECS en la regulación de la ingesta 41
4.4 Nesfatina-1 42
4.4.1 NUCB2 42
4.4.2 Distribución de NUCB2/nesfatina-1 44
4.4.3 Regulación de los niveles de NUCB2/nesfatina-1 44
4.4.4 Acciones de NUCB2/nesfatina-1 47
4.5 Ruta de señalización intracelular mTOR/S6K1 49
4.5.1 Papel de la ruta de mTOR/S6K1 en el estómago 50
5 TIPOS DE SECRECIÓN PROTEICA **51**

6 PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO HORMONAL 52
6.1 Estudios proteómicos relacionados con obesidad y nutrición 52
6.2 Estudios proteómicos de la secreción de estómago 54
6.2.1 Estudios proteómicos del fluido gástrico 54
6.2.2 Secretoma de líneas celulares de cáncer gástrico 55
7 HIPÓTESIS 55

OBJETIVOS 57

MATERIALES Y MÉTODOS 61
1 LÍNEAS CELULARES 63
1.1 AGS 63
1.2 KATO-III 63
1.3 Secretomas de líneas celulares AGS y KATO III 63
2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 63
3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES 64
3.1 Tratamientos farmacológicos 64
3.2 Procedimientos quirúrgicos 64
3.2.1 Implantación de la cánula intracerebroventricular para inyección de ghrelina 65
3.2.2 Vagotomía 65
3.2.3 Orquidectomía 66
3.2.4 Ovariectomía 66
3.2.5 Implantación de cánulas subcutáneas 66
3.3 Extracción de tejidos 66
3.4 Cultivos de explantes 67
4 DISEÑO EXPERIMENTAL 68
4.1 Estudio del efecto de la administración de ghrelina y rimonabant sobre la ingesta 68
4.2 Estudio del efecto del bloqueo farmacológico del receptor de CB1 sobre los niveles de ghrelina 69
4.2.1 Tratamiento con rimonabant *in vivo* 69
4.2.2 Tratamiento con rimonabant *in vitro* 69
4.2.3 Respuesta a rimonabant y rapamicina 70
4.2.4 Tratamiento con AM281 70
4.3 Estudio de ontogenia 70
4.4 Modelo de retraso del destete 70
4.5 Estudio del efecto de los esteroides gonadales sobre los niveles de NUCB2/nesfatina-1 71
4.6 Modelo de ayuno y realimentación 72
4.7 Modelo de obesidad inducida por la dieta 72
5 MÉTODOS ANALÍTICOS 72
5.1 Estudios de proteína 72
5.1.1 Extracción de proteínas totales 72
5.1.1.1 Secretomas 72

5.1.1.2 Proteína intracelular procedente de líneas celulares 73
5.1.1.3 Proteína intracelular procedente de tejido 73
5.1.2 Cuantificación de proteína 74
5.1.3 Inmunoprecipitación de ghrelina 74
5.1.4 Inmunodetección mediante *western blot* 74
5.1.4.1 Preparación de la muestra 75
5.1.4.3 Transferencia 76
5.1.4.4 Tinción con rojo Ponceau 76
5.1.4.5. Bloqueo de la membrana 76
5.1.4.6 Inmunodetección 77
5.1.4.7 Análisis de resultados 78
5.1.5 Inmunoensayo enzimático para NUCB2/nesfatina-1 78
5.1.6 Radioinmunoensayo (RIA) de ghrelina 78
5.1.7 Inmunohistoquímica 79
5.2 Estudios de expresión de ARNm 80
5.2.1 Extracción de ARN 80
5.2.2 Tratamiento con DNasas 80
5.2.3 Retrotranscripción 81
5.2.4 PCR cuantitativa 81
5.3 Análisis estadístico 82
6 TÉCNICAS PROTEÓMICAS 82
6.1 Electroforesis bidimensional (2-DE) 82
6.1.1 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF) 83
6.1.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE 84
6.1.3 Tinción de geles de poliacrilamida con fluorescencia (Sypro Ruby) 84
6.2 Inmunodetección en geles 2-DE 85
6.3 Análisis de imagen diferencial 85
6.4 Digestión proteica en gel 86
6.5 Espectrometría de masas 87
6.5.1 Identificación de proteínas digeridas procedentes de 2-DE 87
6.5.2 Identificación de ghrelina por espectrometría de masas 88
6.6 Predicción de proteínas secretadas 88
6.7 Análisis de la interacción entre proteínas 89

RESULTADOS 91
1 PAPEL DE LA INTERACCIÓN ENTRE GHRELINA Y CB1 MEDIADA POR LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MTOR/S6K1 A NIVEL GÁSTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA 93
1.1 Efecto de la administración de ghrelina y rimonabant sobre la ingesta 93
1.2 Estudio de la localización de la ghrelina y los receptores CB1 en el tejido gástrico 95
1.3 Efecto del rimonabant sobre la producción gástrica y los niveles plasmáticos de ghrelina 96
1.4 Papel de la ruta de señalización de mTOR/S6K1 en la interacción de ghrelina y CB1 a nivel gástrico 101

1.5 Efecto del AM281 sobre la regulación de ghrelina y mTOR gástricos 104

2 CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA NUCB2/NESFATINA-1 EN EL ESTÓMAGO, TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y PLASMA 106

2.1 Influencia de la edad y el sexo en los niveles de NUCB2/nesfatina-1 106

2.2 Efecto de la lactancia sobre la secreción de NUCB2/nesfatina-1 111

2.3 Efecto de los estrógenos y la testosterona sobre la producción de NUCB2/nesfatina-1 113

3 ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL SECRETOMA DE ESTÓMAGO EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES 116

3.1 Optimización y validación de la incubación de explantes de estómago de rata para su estudio por proteómica 116

3.2 Análisis diferencial de secretomas de estómago de rata en distintas condiciones de alimentación: ad líbitum, ayuno y realimentación 119

3.3 Caracterización de la presencia de GAPDH en plasma y estómago de animales bajo diferentes condiciones nutricionales o patológicas 123

3.4 Caracterización de las isoformas de calponina-1 en plasma y secretomas gástricos de animales bajo diferentes condiciones nutricionales o patológicas 125

DISCUSIÓN 131

1 PAPEL DE LA INTERACCIÓN ENTRE GHRELINA Y CB1 MEDIADA POR LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MTOR/S6K1 A NIVEL GÁSTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA 133

2 CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA NUCB2/NESFATINA-1 EN EL ESTÓMAGO, TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y PLASMA 138

3 ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL SECRETOMA DE ESTÓMAGO EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES 145

CONCLUSIONES 155

APÉNDICE 159

BIBLIOGRAFÍA 171



INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 OBESIDAD

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La obesidad y el sobrepeso se determinan midiendo el Índice de Masa Corporal (IMC) que es el ratio de peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros. En adultos el sobrepeso se define por un IMC mayor de 25 kg/m^2 y la obesidad por un IMC mayor de 30 kg/m^2.

En los últimos años, la prevalencia de la obesidad ha aumentado exponencialmente alcanzando proporciones pandémicas. La Organización Mundial de la Salud estima que en 2008 el 35% de la población mundial adulta presentaba sobrepeso, y el 11% era clínicamente obesa. La obesidad infantil es especialmente preocupante; se estima que en 2010 en el mundo 40 millones de niños menores de 5 años tienen sobrepeso (World Health Organization; http://www.who.int/topics/obesity/en/). En cuanto a la situación en España, el último estudio realizado en la población adulta indica que el 39% sufre problemas de sobrepeso y cerca de un 23% padece obesidad [1]. Las cifras de la obesidad infantil son aún más alarmantes, ya que según el estudio ALADINO en el año 2011 un 26% de la población infantil presentaba sobrepeso y el 19% se clasificaba como obesa [2]. Este dato es especialmente importante puesto que el riesgo de que un niño obeso sufra obesidad en la edad adulta es del 82%.

La obesidad es una enfermedad multifactorial y en su etiología están implicados factores genéticos, sociales y ambientales. Se ha demostrado que existe una fuerte asociación entre la obesidad y la alteración de ciertos genes como LEPR, FTO y MC4R, sin embargo, las variaciones en estos genes explican un porcentaje muy bajo de casos de obesidad humana. Se considera como causa principal de la epidemia actual de obesidad el desequilibrio entre el consumo y el gasto energético provocado por una dieta alta en calorías asociada a una reducida actividad física [3]. El exceso de energía se almacena en los adipocitos que aumentan en tamaño y/o incrementan su número dando lugar a la disfunción del tejido adiposo y en último término al desarrollo de la obesidad. Además, la acumulación ectópica de grasa en hígado y músculo, junto con el aumento de la producción de ácidos grasos libres van a desencadenar la resistencia a insulina y en consecuencia el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La obesidad también se asocia a un mayor riesgo

de padecer otras enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, apnea del sueño, osteoartritis y algunos tipos de cáncer [4].

En la actualidad la principal estrategia para reducir la obesidad se basa en una dieta baja en calorías combinada con el incremento del ejercicio físico. Sin embargo, la eficacia a largo plazo es limitada ya que los pacientes vuelven a recuperar el peso perdido tras abandonar el tratamiento. Los fármacos utilizados en el tratamiento de la obesidad consiguen una reducción del peso corporal limitada y en varios casos han sido retirados del mercado por presentar efectos secundarios nocivos. En este contexto, es necesario el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que sean efectivas a largo plazo en el tratamiento de la obesidad. Con respecto a esto, los principales fármacos en desarrollo incluyen moléculas destinadas a disminuir la absorción de lípidos del tracto gastrointestinal, distintas estrategias para reducir la ingesta de comida y el uso de compuestos que incrementan el gasto energético o reducen el tamaño del tejido adiposo [5].

En la actualidad, la cirugía bariátrica representa el único método efectivo en el tratamiento de la obesidad mórbida. Las distintas estrategias quirúrgicas producen pérdida de peso a través de la restricción gástrica y/o la malabsorción de nutrientes en el intestino. Los procedimientos restrictivos limitan la capacidad gástrica funcional mediante la colocación de un tubo justo debajo de la unión gastroesofageal (banda gástrica) o reduciendo el tamaño del estómago (gastroplastia vertical y gastrectomía en manga). Las cirugías malabsortivas como la derivación bilio-pancreática derivan la comida del estómago al íleo reduciendo el área de mucosa disponible para la absorción de nutrientes. El baipás gástrico en Y de Roux es el procedimiento más realizado y combina ambos mecanismos. Este procedimiento consiste en la creación de una bolsa estomacal a partir de una pequeña porción del estómago y su unión directamente al yeyuno, evitando así el paso a través de una gran parte del estómago y el duodeno [6]. El baipás gástrico mejora todas las comorbilidades relacionadas con la obesidad produciendo la remisión de la DMT2 independientemente de la pérdida de peso [7]. Se ha demostrado que la disminución del apetito y el peso corporal tras la cirugía bariátrica está asociada a la variación de la producción de hormonas gastrointestinales [8–10]. Este hecho indica que las señales liberadas por el tracto gastrointestinal tienen un papel fundamental en el control de la ingesta calórica y el peso corporal.

2 REGULACIÓN DE LA INGESTA

2.1 Homeostasis energética

El mantenimiento de la homeostasis energética depende del balance entre la ingesta calórica y el gasto energético. El control de este equilibrio está mediado por circuitos neuroendocrinos que actúan tanto a nivel central como periférico. Bajo este contexto, la ingesta y el peso corporal están regulados por mecanismos a corto plazo, comida a comida, y mecanismos a largo plazo, sensibles a variaciones en las reservas de grasa del organismo [11].

2.2 Regulación central de la ingesta

El cerebro recibe e integra las señales periféricas de hambre, saciedad y adiposidad y emite respuestas aferentes que modifican la conducta de la ingesta y del funcionamiento del sistema nervioso autónomo. El principal regulador de la ingesta es el hipotálamo, aunque otras áreas del encéfalo como el tronco encefálico también intervienen en esta regulación [11]. El hipotálamo está compuesto por distintos núcleos que forman una red de circuitos neuronales interconectados, entre ellos el núcleo arcuato (ARC) tiene un papel esencial en la integración de señales reguladoras del apetito. Este núcleo se sitúa próximo a la eminencia media en una zona donde la barrera hematoencefálica es casi inexistente y permite la circulación hormonal [12]. Se han identificado dos poblaciones de neuronas primarias en el ARC con efectos opuestos. En el núcleo arcuato medial las neuronas que coexpresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agouti (AgRP) estimulan la ingesta de comida y la ganancia de peso, mientras que en el núcleo arcuato lateral se sitúan las neuronas que coexpresan el polipéptido precursor de melanocortinas, proopiomelacortina (POMC), y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART) con propiedades anorexigénicas [12]. Schwartz propuso un modelo de regulación de la ingesta en el cual las hormonas periféricas actuarían sobre las neuronas de primer orden del ARC desde donde proyectan a las neuronas de segundo orden de otros núcleos hipotalámicos [13]. Según este modelo, la leptina y la insulina estimulan al POMC el cual libera melanocortinas como la α-MSH que se une a los receptores de melanocortinas MC3R y MC4R disminuyendo la ingesta e incrementado la tasa metabólica, lo que promueve la pérdida de peso. Además, la leptina y la insulina inhiben las neuronas NPY/AgRP. Por otra parte, las señales

orexigénicas activan las neuronas NPY/AgRP, liberando el péptido NPY que actúa sobre los receptores Y1 e Y5 y AgRP que inhibe el receptor MC4R estimulando la ingesta y la ganancia de peso [13,14].

Otras regiones del hipotálamo como el núcleo paraventricular (PVN), el área perifornical y el área hipotalámica lateral (LHA) reciben inervaciones del núcleo arcuato. El PVN contiene neuronas que liberan oxitocina, CRH y TRH implicadas en la disminución de la ingesta y/o el aumento de la tasa metabólica. En el área hipotalámica lateral y el área perifornical existen poblaciones de neuronas que expresan orexina y la hormona concentradora de melanina (MCH), un péptido estimulador de la ingesta. Estas regiones del hipotálamo pueden ejercer su función mediada por el ARC o por mecanismos independientes [13,15].

En el tronco encefálico se encuentran el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema. La barrera hematoencefálica en el área postrema está incompleta permitiendo la respuesta a señales circulantes de saciedad. A su vez el NTS recibe información del tracto gastrointestinal, de las vísceras abdominales y de la cavidad oral a través de las aferencias vagales. Las áreas hipotalámicas tienen proyecciones recíprocas con el NTS, permitiendo la integración de respuestas para diferentes señales neuroendocrinas [11].

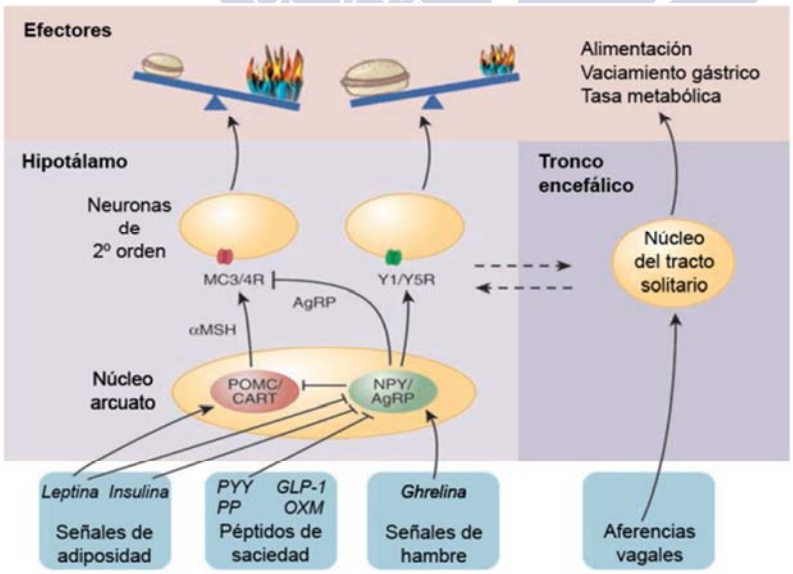


Figura 1. Regulación de la ingesta en el SNC. Modificada de [11].

El cerebro también responde a la disponibilidad de nutrientes como glucosa, ácidos grasos libres y ciertos tipos de aminoácidos (aa). La kinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) y la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR) integran las señales procedentes de nutrientes y regulan las rutas efectoras responsables de la ingesta y utilización de metabolitos [16]. AMPK actúa como un sensor del estado energético de la célula, se activa cuando se reducen las reservas energéticas estimulando rutas catabólicas e inhibiendo rutas anabólicas para incrementar el ATP celular [17]. mTOR es una kinasa que actúa como sensor de ATP celular regulando la progresión del ciclo celular y el crecimiento. Al contrario que AMPK, mTOR se activa en estado energético positivo al aumentar el ratio ATP:AMP [18]. Recientemente se ha demostrado que AMPK y mTOR tienen un papel clave en el balance energético, integrando señales periféricas como hormonas y metabolitos, y señales centrales como neuropéptidos para regular la ingesta a nivel hipotalámico [16,19,20].

Además del control homeostático para regular el peso corporal, la ingesta también está influenciada por el placer y la recompensa de comer. La palatabilidad de la comida puede estimular la ingesta incluso en situaciones de balance energético positivo [21]. La percepción de la recompensa de la comida se inicia en los receptores orales del gusto que transmiten la información al NTS, y este a su vez a otras áreas del cerebro [22]. La respuesta a los estímulos hedónicos está mediada por la interacción de los sistemas opioides, endocannabinoides, dopaminérgicos, serotoninérgicos y gabaérgicos [21].

2.3 Regulación periférica de la ingesta

2.3.1 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (TAB) está compuesto por adipocitos y el estroma vascular (fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y preadipocitos). Clásicamente se consideraba un depósito inerte cuyas únicas funciones eran almacenar energía, aislante térmico y soporte estructural, hasta que el descubrimiento de la leptina puso de manifiesto su función como órgano endocrino [23,24]. El TAB se distribuye en depósitos localizados en distintas zonas del cuerpo que presentan diferencias estructurales, de organización, tamaño celular y actividad biológica. En función de su localización este tejido se clasifica en tejido adiposo visceral (TAV) y tejido adiposo subcutáneo (TAS) [25]. La distribución del TAB está

influenciada por el sexo y se cree que las hormonas sexuales esteroideas están implicadas en este dimorfismo sexual [26].

El tejido adiposo secreta una variedad de hormonas llamadas adipoquinas, implicadas en la regulación del metabolismo energético, y también citoquinas inflamatorias que participan en el desajuste metabólico relacionado con la obesidad [27]. Los niveles de algunas adipoquinas están correlacionados con estados metabólicos específicos y tienen la capacidad de influir directamente en la regulación de la ingesta. Las principales adipoquinas conocidas implicadas en la regulación de la ingesta y el balance energético son leptina, adiponectina, resistina y visfatina [24,28].

La identificación del gen ob y la demostración de que codifica la leptina secretada por el tejido adiposo supuso un cambio del paradigma de la regulación del peso corporal. Las variaciones de los niveles plasmáticos de leptina reflejan la masa de tejido adiposo corporal total. La deficiencia de leptina en ratones ob/ob y de su receptor funcional, ratones db/db y ratas fa/fa, causan hiperfagia severa y obesidad [23,29]. Este fenotipo se revierte tras la administración de leptina [30,31], sin embargo comúnmente la obesidad está asociada a niveles de leptina elevados y resistencia a la acción de la leptina [32]. El receptor de leptina LEPR se expresa principalmente en los centros del SNC reguladores del apetito y en órganos periféricos indicando su papel autocrino y paracrino en la regulación de la homeostasis energética. Además del tejido adiposo, la leptina es secretada por el músculo esquelético, la placenta y el estómago. La síntesis de leptina en el estómago está regulada por el estado nutricional y su interacción con otras hormonas gástricas [33].

2.3.2 Páncreas

El páncreas es un órgano mixto formado por una parte exocrina secretora de enzimas al tracto gastrointestinal y una parte endocrina que libera hormonas reguladoras de los niveles circulantes de glucosa. La insulina se libera por las células β pancreáticas después de las comidas y su principal función es regular el almacenamiento de los nutrientes absorbidos. Los niveles circulantes de insulina en ayuno son proporcionales al contenido de grasa corporal. Los receptores de la insulina del cerebro se encuentran en las áreas reguladoras del apetito y su inactivación causa hiperfagia y obesidad [34]. Además la administración central de

insulina reduce la ingesta y el peso corporal y afecta a factores de saciedad como la colecistokinina (CCK) [35]. Otros péptidos secretados por el páncreas que están implicados en la regulación de la ingesta son la amilina, la enteroestatina y el polipéptido pancreático (PP). La amilina se produce en las células β del páncreas y en el tracto gastrointestinal, inhibe la ingesta y retrasa el vaciamiento gástrico [36]. El páncreas exocrino libera enteroestatina en respuesta a la ingestión de grasas, y se ha observado que su administración reduce la ingesta en ratas, aunque este efecto no se reproduce en humanos [37]. El PP se libera desde los islotes pancreáticos y en menor medida desde el intestino grueso en respuesta a la ingesta y actúa sobre los receptores Y4 e Y5 del cerebro [36].

2.3.3 Tracto gastrointestinal

La respuesta a la ingesta está subdividida en tres fases: cefálica, gástrica e intestinal. La fase cefálica preabsortiba se produce por el olor y visualización del alimento, así como por el estímulo orofaríngeo de masticar el alimento. Las fases gástrica e intestinal resultan de la acción del alimento en el estómago y el intestino. La fase cefálica puede activar las eferencias vagales del NTS y estimular la liberación de hormonas gastrointestinales [38].

El tracto gastrointestinal se considera uno de los mayores órganos endocrinos del organismo, puesto que produce más de 50 péptidos conocidos, muchos de los cuales se liberan en respuesta a la ingesta de alimento y actúan sobre distintos tejidos (SNC, glándulas endocrinas, el músculo liso y los terminales de los nervios aferentes) [11]. Estas hormonas gastrointestinales además de optimizar la digestión y la absorción de alimentos, están implicadas en la regulación a corto plazo de la ingesta y el balance energético mediante la interacción con hormonas implicadas en la regulación a largo plazo del peso corporal, como por ejemplo, la leptina y la insulina [36]. A excepción de la ghrelina, las hormonas gastrointestinales conocidas hasta el momento inducen saciedad. Las principales hormonas anorexigénicas intestinales son la colecistokinina (CCK), las incretinas, el péptido tirosina-tirosina (PYY), la amilina y la apolipoproteína A-IV (APO AIV). La CCK fue la primera hormona anorexigénica intestinal conocida. Las células endocrinas tipo I localizadas en la mucosa de duodeno y yeyuno liberan varias isoformas de CCK en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen, especialmente a lípidos y proteínas. La existencia de receptores de CCK1 en el nervio vago se demostró por el bloqueo del

efecto anorexigénico de la CCK tras la vagotomía [39]. Las incretinas son una familia de hormonas producidas en el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta y cuya función principal consiste en inducir la secreción de insulina por el páncreas dependiente de la glucosa. Algunas incretinas reducen la ingesta, como el péptido tipo glucagón (GLP-1) y la oxintomodulina (OXM) que se producen por procesamiento del preproglucagon en las células L del colon y del intestino delgado distal mayoritariamente en respuesta a carbohidratos y ácidos grasos libres. El GLP-1 presenta un efecto insulinotrópico dependiente de glucosa en las células β del páncreas e inhibe el vaciamiento gástrico y la secreción de glucagón [40]. La oxintomodulina es una incretina menos potente que el GLP-1, sin embargo presenta mayor efecto en la pérdida de peso en roedores y humanos [36]. La familia PP está formada por el PYY, el polipéptido pancreático PP y el NPY. PYY se secreta por las células L del íleon y del colon después de la comida, retrasa el vaciado gástrico e inhibe secreción pancreática y de la vesícula biliar, pero su efecto y mecanismo de acción anorexigénico en animales es controvertido [41]. La apolipoproteína A-IV se libera por el intestino en respuesta a la absorción de grasa. La administración exógena de APO A-IV disminuye la cantidad de la ración de comida, la ingesta y la ganancia de peso en ratas [37].

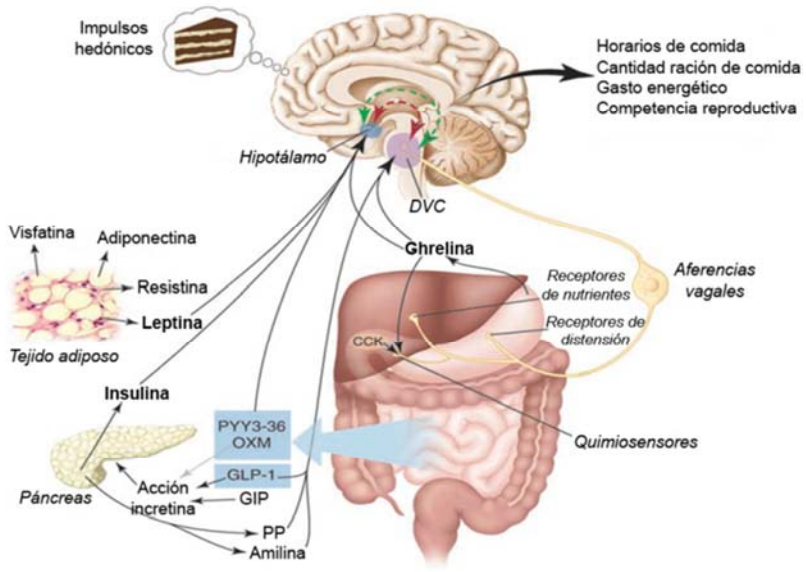


Figura 2. Esquema de las señales periféricas reguladoras del balance energético. Modificada de [11].

3 EL ESTÓMAGO

3.1 Anatomía del estómago

El estómago es un segmento dilatado del tracto digestivo, que en el humano se divide en tres segmentos principales: el cardias, el cuerpo y el píloro. El cardias es una región especializada localizada a continuación de la unión gastroesofageal. El cuerpo es la porción más grande del estómago, y su región proximal recibe el nombre de *fundus* y la región distal se denomina antro [42]. La estructura de la pared del estómago está formada por cuatro capas: serosa, muscular, submucosa y mucosa.

- La capa serosa es una cubierta de tejido conectivo revestida por peritoneo.
- La capa muscular está formada por tres extractos de músculo liso: una capa longitudinal externa, una capa circular media y una capa de fibras oblicuas, que realizan un movimiento coordinado que determina las funciones motoras gastrointestinales.
- La submucosa está formada por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Puede contener glándulas que secretan sustancias al lumen del tracto gastrointestinal.
- La mucosa que está formada por una lámina epitelial, la lámina propia de tejido conectivo y la lámina muscular de fibras de músculo liso denominada *muscularis mucosae*. La lámina propia contiene capilares, neuronas entéricas y células inmunes. La superficie de la mucosa aumenta por la formación de invaginaciones que dan lugar a las glándulas gástricas.

En las ratas, el estómago está subdividido en dos partes: la porción aglandular o cutánea y la porción glandular. La porción aglandular es una porción modificada del esófago. Presenta una pared delgada y su mucosa está formada por un epitelio escamoso estratificado y se caracteriza por un color blanquecino y ausencia de glándulas. La porción glandular está formada por el *fundus* y la región pilórica. La pared es más gruesa y la mucosa contiene glándulas gástricas, siendo equivalente al estómago humano [43].

3.2 Glándulas gástricas

Las glándulas de la mucosa gástrica están formadas por la fosa, el cuello y la base. La distribución de las glándulas varía entre las distintas partes del estómago. Estas

glándulas están formadas por varios tipos celulares epiteliales: mucosas, parietales, principales y células endocrinas.

- Las células epiteliales superficiales secretan HCO_3 y mucus.
- Las células mucosas del cuello secretan el mucus protector del estómago.
- Las células principales producen pepsinógeno, zimógeno y lipasa gástrica.
- Las células parietales u oxínticas producen el ácido gástrico (HCl) y el factor intrínseco necesario para la absorción de vitamina B12. Se sitúan en la mucosa del cuerpo del estómago por ello recibe el nombre de mucosa oxíntica.
- Las células enteroendocrinas liberan distintas hormonas. Reciben también el nombre de células neuroendocrinas [42].

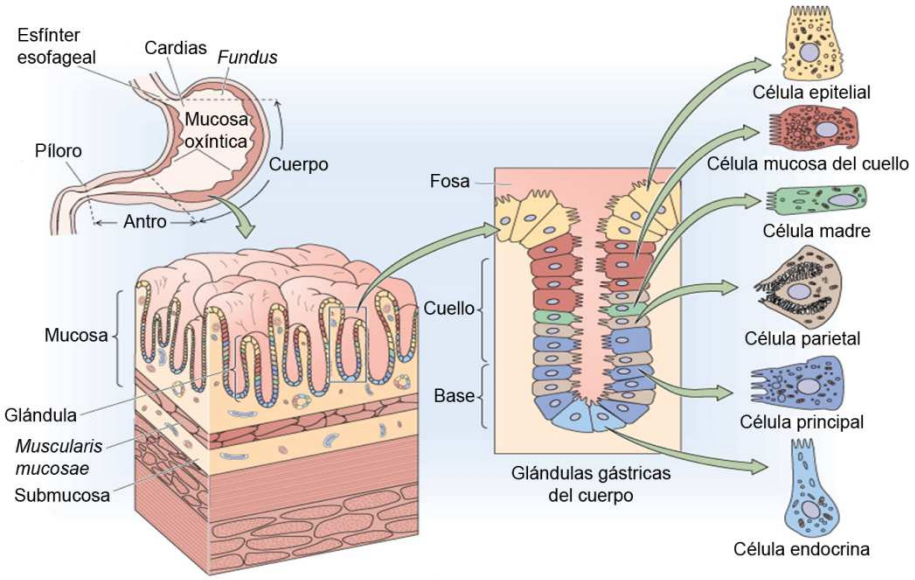


Figura 3. Anatomía del estómago humano. Representación de las divisiones macroscópicas del estómago, y vistas aumentadas de las secciones a través de la pared del cuerpo del estómago. Modificada de [42].

3.3 Control de la función gástrica

El estómago realiza funciones motoras, secretoras y endocrinas de forma integrada para iniciar el proceso digestivo y modular la ingesta de alimentos. La función motora regula la ingesta de comida, mezcla las secreciones gástricas y reduce el tamaño de partícula. El estómago secreta varias sustancias que continúan la digestión iniciada en la boca y protegen el estómago, y además, produce agentes humorales con

acción endocrina y paracrina que van a influir tanto el proceso de la digestión como en la regulación de la ingesta. La función gástrica está regulada mediante control hormonal y neural. Esos mecanismos son de crucial importancia para el proceso de ingestión de nutrientes y la regulación final de la ingesta [44].

3.3.1 Control neural del estómago

El sistema nervioso autónomo (SNA) es el responsable del control nervioso del estómago. Este sistema recibe inervaciones excitatorias del sistema simpático e inervaciones inhibitorias del sistema parasimpático. La división simpática está formada por los nervios esplácnicos y la división parasimpática está compuesta por los nervios vagales y pélvicos [44].

Las fibras aferentes del nervio vago son las principales conexiones neuroanatómicas entre el tracto gastrointestinal y el núcleo del tracto solitario (NTS). Las terminaciones de estas fibras contienen sensores en la submucosa y mucosa gástrica que están en contacto con las sustancias liberadas por las células enteroendocrinas, de modo que ciertos metabolitos y estímulos mecánicos activan estos sensores provocando variedad de reflejos viscerales que regulan las funciones del tracto gastrointestinal, el apetito y el comportamiento [45].

Una tercera división del sistema autónomo es el sistema nervioso entérico (SNE), una red de neuronas intrínsecas localizadas en el tracto gastrointestinal. Este sistema controla las principales funciones gastrointestinales como flujo sanguíneo, secreción y motilidad gástrica. Las células nerviosas del SNE inervan el estómago y se localizan en dos plexos: el mientérico que coordina principalmente los patrones de motilidad gástrica y el submucoso que está implicado en la señalización en respuesta a la presencia de nutrientes [44]. De hecho, se ha demostrado que las terminaciones aferentes vagales interaccionan con las neuronas entéricas en la mucosa gástrica [46].

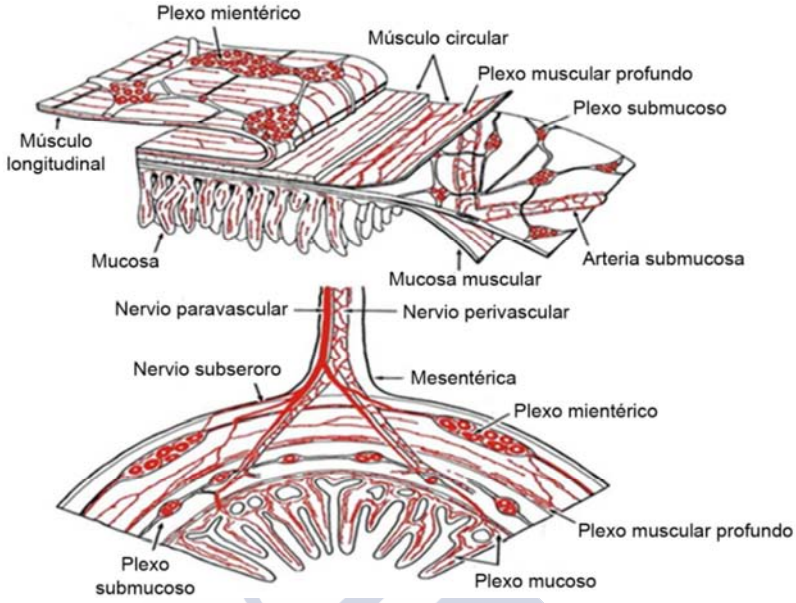


Figura 4. Esquema de la composición gástrica e innervación nerviosa. Modificada de [47].

3.3.2 Control hormonal del estómago

En las distintas áreas del tracto gastrointestinal existen mecanismos sensoriales encargados de detectar la presencia de nutrientes y comunicar a los centros del cerebro el estado nutricional del organismo [45]. Las hormonas liberadas por las células enteroendocrinas del intestino se consideraban las principales reguladoras de la ingesta y de las funciones gastrointestinales, sin embargo descubrimientos recientes señalan un papel principal de las hormonas gástricas en la regulación de estos procesos [48].

El estómago contiene 4 tipos distintos de células endocrinas que secretan sustancias implicadas en la regulación de la producción y secreción de ácido y en el control de la motilidad. Como ejemplo, las células tipo enterocromafines (ECL) producen histamina, las células G liberan gastrina, las células D producen somatostatina y en menor abundancia las células enterocromafines (EC) contienen serotonina. Además en la mucosa oxíntica se encuentra el segundo tipo de células endocrinas más abundante denominadas células P/D1 en humanos y células tipo X/A en ratas [49]. Estas células secretan los péptidos ghrelina, obestatina y nesfatina-1 y juegan un papel clave en el control de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética.

4 CONTROL DE LA INGESTA Y LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL ESTÓMAGO

4.1 Ghrelina

4.1.1 Estructura y acilación de la ghrelina

La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos (aa) aislado del estómago como ligando endógeno del receptor huérfano de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR) que recibe su nombre por la capacidad de estimular la secreción de GH ("ghre": crecimiento) [50].

En humanos el gen de la ghrelina se localiza en la región cromosómica 3p 25-26 y está formado por 6 exones y 5 intrones [51]. El precursor de la ghrelina se denomina pre-proghrelina y está compuesto de 117 aa. El procesamiento proteolítico de la proghrelina por acción de la prohormona convertasa 1/3 (PC1/3) da lugar a dos péptidos activos la ghrelina y la obestatina [52].

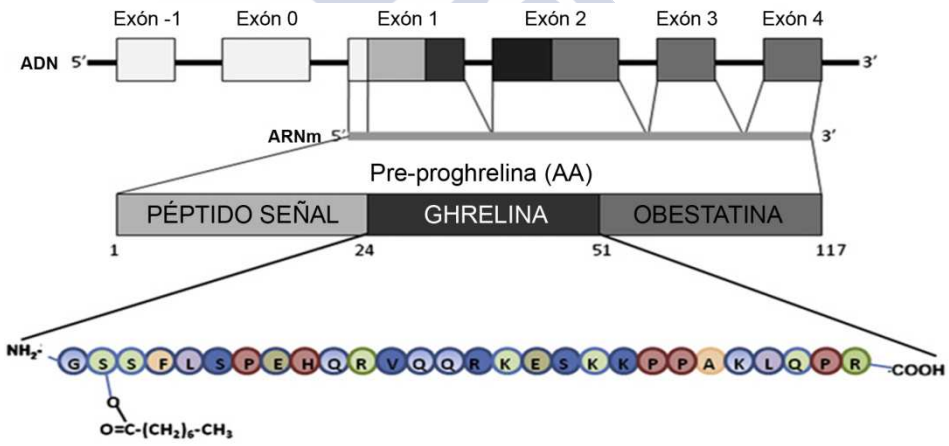


Figura 5. Estructura genética de la ghrelina humana. Modificada de [53].

La ghrelina sufre una acilación con un ácido n-octanoico en el residuo 3 de serina. La forma aciladada representa el 10% de los niveles circulantes de ghrelina y a la forma que constituye el 90% restante en circulación se le denomina ghrelina desacilada [54]. No obstante, un nuevo método en la obtención de péptidos indica que el ratio de ghrelina acilada/total es de 1:5 [55]. Recientemente se ha identificado otra forma acilada de la ghrelina, la n-decanoil-ghrelina, la cual representa la principal forma circulante de ghrelina en ratones [56]. La acilación es esencial para

su unión al receptor GHSR y por lo tanto, inicialmente se consideró necesaria para la realización las acciones endocrinas de la ghrelina. Existen estudios que sugieren distintas funciones de la ghrelina desacilada, incluso ejerciendo un efecto opuesto a la forma acilada [57,58]. Sin embargo, no se ha identificado un receptor específico para la acción de la desacilghrelina y su función es controvertida.

La enzima responsable de la acilación de la ghrelina se denomina ghrelin O-aciltransferasa (GOAT) [59]. La acilación se produce en el retículo endoplasmático (RE) antes de que se produzca el procesamiento proteolítico que da lugar a la ghrelina madura [52]. Se ha demostrado la co-localización de GOAT y ghrelina indicando que la acilación se produce en las células responsables de la síntesis de ghrelina de la mucosa oxíntica [60]. Los niveles más elevados de GOAT se producen en el estómago, aunque también se ha detectado en todos los tejidos que expresan ghrelina: páncreas, tracto gastrointestinal, corazón, riñón, músculo, lengua, bazo, timo, tejido adiposo, glándula adrenal, hipófisis, hipotálamo, tiroides, mama, trompas de Falopio, placenta, próstata, testículos y ovario [61]. GOAT también se ha detectado en circulación en ratas y ratones sugiriendo la posible acilación extracelular de la ghrelina [62]. La producción de esta enzima está regulada por la disponibilidad de nutrientes y se ha demostrado que utiliza como sustrato ácidos grasos de cadena media procedentes de la dieta lo cual indica que actúa como un sensor lipídico con el fin de regular la adiposidad [63,64].

4.1.2 Receptores de la ghrelina

El gen del receptor GHSR se encuentra en la región cromosómica 3q26.2. Este gen sufre procesamiento alternativo dando lugar a dos subtipos del receptor: GHSR1a y GHSR1b. El GHSR1a es un receptor acoplado a proteína G formado por 366 aa, que presenta 7 dominios transmembrana y se activa tanto por unión a la ghrelina como a los GHS. El receptor GHSR1b está formado únicamente por 289 aa y 5 dominios transmembrana y no presenta actividad tras la unión de ghrelina o GHSs [65]. El GHSR1a se expresa mayoritariamente en el hipotálamo y la hipófisis, lo cual concuerda con las acciones de la ghrelina a nivel central sobre la regulación del apetito y la secreción de GH. La expresión de GHSR1a se ha detectado también en órganos periféricos como estómago, tiroides, páncreas, bazo, corazón, glándulas adrenales, ovarios y testículos [66–68].

El descubrimiento de un antagonista del GHSR1a que bloquea la acción de la ghrelina sobre la secreción de GH pero que presenta acciones orexigénicas ha sugerido que la ghrelina acilada podría ejercer su efecto a través de otro receptor distinto de GHSR1a que aún no ha sido clonado [69]. En el 2013 se ha descrito que el receptor huérfano GPR83 heterodimeriza con el GHSR1a disminuyendo la acción de la ghrelina sobre el receptor GHSR1a [70].

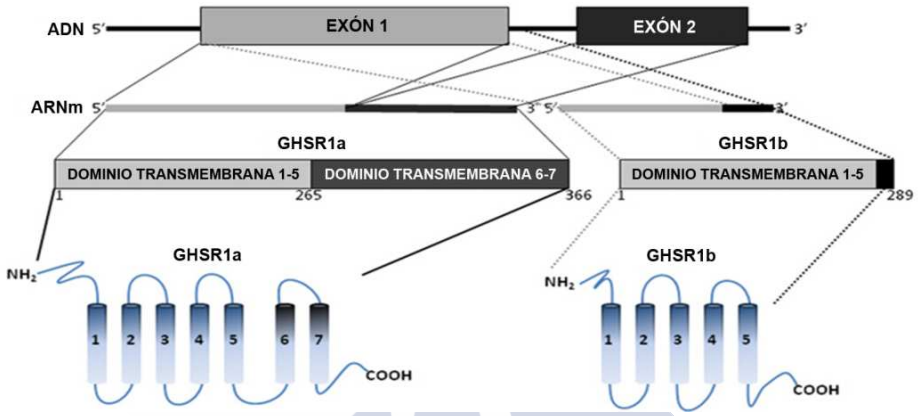


Figura 6. Estructura genética de los receptores GHSR1a GHSR1b humanos. Modificada de [53].

4.1.3 Distribución de la ghrelina

Tanto en humanos como en roedores los niveles de ghrelina circulante sufren un descenso del 65% después de la gastrectomía, sugiriendo que el estómago es la principal fuente de ghrelina del organismo [71,72]. La ghrelina se produce mayoritariamente en las células X/A del *fundus* gástrico [72,73]. Existen dos tipos de células productoras de ghrelina, las cerradas, y las abiertas, estas últimas están contacto con el lumen del tracto gastrointestinal [74]. La expresión de ghrelina también se ha detectado a lo largo de todo el tracto digestivo y en otros tejidos tales como cerebro, hipófisis, páncreas, riñón, corazón, pulmón, tejido adiposo, hígado, músculo, glándula adrenal, bazo, tiroides, células inmunes, próstata, mama, ovario, testículo, y placenta [66]. Este hecho muestra la diversidad de las numerosas funciones fisiológicas en las que está implicada la ghrelina. En el cerebro la ghrelina se expresa en el ARC y en neuronas adyacentes al tercer ventrículo y puede atravesar la barrera hematoencefálica [75,76].

4.1.4 Regulación de la ghrelina

Los niveles circulantes de ghrelina están inversamente correlacionados con el peso corporal y generalmente disminuyen en pacientes obesos y aumentan en individuos con anorexia [77,78]. La excepción a esto son los pacientes con el síndrome de Prader-Willi, en quienes los niveles circulantes de ghrelina permanecen elevados provocando hiperfagia y obesidad [79].

Los niveles endógenos de ghrelina siguen un ritmo circadiano, produciéndose una elevación de sus niveles en plasma en situación de ayuno y una disminución tras la ingesta, lo que sugiere que puede tener un papel fisiológico en la regulación del hambre y la iniciación de la comida [77,80]. No obstante, esta hipótesis ha cambiado y en los últimos años se ha sugerido que la ghrelina actúa como un sensor nutricional [64]. La disminución de los niveles de ghrelina tras la ingesta no se debe a la distensión del estómago [81], indicando que la composición de la dieta podría ser un factor regulador de los niveles de ghrelina. Existe una regulación diferencial de los niveles circulantes de ghrelina por los distintos macronutrientes [82].

Los cambios en los niveles circulantes de ghrelina inducidos por el estado nutricional son el reflejo de las variaciones de en la producción y secreción de ghrelina por el estómago [83–85]. En los últimos años se han identificado receptores del gusto de la familia T1R en la mucosa gastrointestinal; concretamente el subtipo T1R3, esencial en la detección de azúcares y aa que está presente en las células productoras de ghrelina de la mucosa gástrica lo cual sugiere la implicación de los quimiosensores gástricos en la regulación de la secreción de ghrelina [86]. Se ha demostrado que los macronutrientes, aa y lípidos, actúan directamente sobre las células productoras de ghrelina del estómago para regular su secreción [87].

El olor, la visualización y la masticación de los alimentos sin permitir su ingesta también modifican los niveles plasmáticos de ghrelina en animales y humanos, aunque existen datos contradictorios [88,89]. Los estímulos sensoriales (olor y visión) también regulan la secreción de ghrelina por el estómago [84]. Estos datos demuestran que la regulación de la ghrelina no depende exclusivamente del contacto directo mecánico con la pared gástrica, la digestión o la absorción de nutrientes. Además, se ha demostrado que la regulación de la secreción de ghrelina por el estómago debida a estímulos relacionados con el alimento está mediada por un mecanismo de memoria a medio plazo del sistema nervioso sensorial, que está integrado en el SNE. La vagotomía quirúrgica bloquea la secreción gástrica de

ghrelina provocada por estímulos sensoriales en ratas, indicando que el nervio vago está implicado en la regulación de la secreción gástrica de ghrelina [84].

Además de los factores relacionados con la ingesta de alimentos, otros estímulos metabólicos como los componentes clásicos del eje somatotropo están implicados en la regulación gástrica de ghrelina. Se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* tanto con somatostatina como con GH inhiben la secreción gástrica de ghrelina a través de los receptores específicos de ambas hormonas en el estómago [90].

Los niveles plasmáticos de ghrelina permanecen constantes en el tiempo sin alteraciones relevantes con la edad. Sin embargo durante la pubertad temprana se produce una disminución de la secreción de ghrelina por el estómago en ratas hembra que viene determinada por la alteración en los niveles de estrógenos característica de esta etapa [91]. En ratas macho, se produce un aumento de los niveles de secreción de ghrelina gástrica coincidiendo con el aumento de los niveles circulantes de testosterona al comienzo de la pubertad [91]. Además la expresión de GOAT en el estómago durante la pubertad también se encuentra modificada [91]. Otro factor que también afecta a la producción de ghrelina por el estómago es la lactancia materna, ya que se ha descrito que la secreción gástrica de ghrelina es elevada durante la lactancia y disminuye drásticamente tras el destete en ratas macho como hembra [91].

4.1.5 Funciones de la ghrelina

Las dos funciones más importantes de la ghrelina son la estimulación de la secreción de GH y la regulación del balance energético [50,77,92]. Además la ghrelina está implicada en otros procesos como la liberación de prolactina, respuesta a estrés, sueño, funciones cardiovasculares, homeostasis de la glucosa, funciones reproductivas y proliferación celular [93].

Con respecto al tracto digestivo los efectos de la ghrelina incluyen el aumento de la secreción de ácido gástrico y de la motilidad gástrica [94]. Se ha descrito también que la ghrelina presenta un papel gastroprotector debido a su acción antinflamatoria en úlceras gástricas y en enfermedades inflamatorias del intestino [95].

En un estudio en el cual se testaba el papel de la ghrelina sobre la secreción de GH en humanos, se observó que además de la acción como secretagogo de la

GH, la administración de ghrelina producía un aumento del apetito en individuos sanos [96]. Este dato se corroboró en trabajos posteriores en los que se demostró que tanto la administración central como periférica de ghrelina estimula la ingesta en ratas, independientemente de su efecto sobre la liberación de GH [77,92,97]. El efecto estimulador de la ingesta producido por la administración de ghrelina desaparece en ratones deficientes en su receptor GHSR1a lo cual indica que éste es necesario para la acción orexigénica de la ghrelina [98]. El receptor de ghrelina se localiza a nivel hipotalámico en las neuronas del núcleo arcuato productoras de los neuropéptidos orexigénicos NPY, AgRP y orexina, cuya expresión se ve estimulada por la administración de ghrelina; así como en neuronas productoras de neuropéptidos como POMC y CART donde la ghrelina inhibe su expresión produciendo finalmente la acción anorexigénica sobre la ingesta [75,99].

En los últimos años se han estudiado los mecanismos de señalización celular que median el efecto de la ghrelina sobre la regulación de la ingesta. La ghrelina estimula la activación hipotalámica de la desacetilasa sirtuina 1 (sirt1) que actúa sobre el gen supresor de tumores p53, implicado en la activación de AMPK [100]. AMPK activada reduce los niveles de malonil-CoA aumentando la actividad de CPT1c y CPT1a, lo que provoca el incremento de la síntesis de ceramidas en el RE, el aumento de la respiración mitocondrial y la bajada de radicales libres mediada por UCP2 [101–103]. Estos cambios metabólicos modulan la expresión de los factores de transcripción BSX, CREB y FoxO1 incrementando la expresión de AgRP y NPY y en consecuencia estimulando la ingesta (Figura 7) [104].

Recientemente se ha demostrado que la inhibición central de mTOR con rapamicina disminuye la acción orexigénica de la ghrelina normalizando la expresión de CREB, FoxO1, AgRP y NPY, lo que indica que la ghrelina también regula la ingesta a través de la ruta de señalización de mTOR hipotalámico [105].

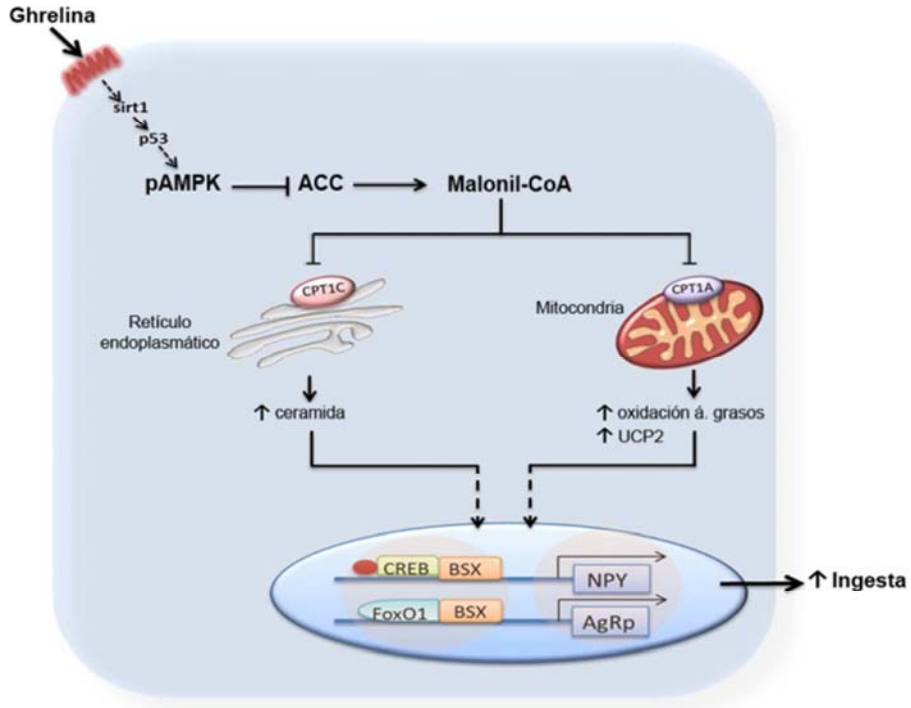


Figura 7. Esquema de la ruta señalización ghrelina-AMPK en el hipotálamo. Modificada de [103].

El hecho de que administración periférica de ghrelina también estimule la ingesta [77,97], sugiere que existe una vía indirecta a través de la cual la ghrelina pueda activar las neuronas del hipotálamo. Se ha descrito que el receptor GHSR1a está presente en las neuronas aferentes de los ganglios nodosos y la inactivación de las aferencias vagales mediante vagotomía gástrica o por la acción de capsaicina bloquea el aumento de la ingesta en ratas [106,107]. Estos hechos indican que la ghrelina secretada por el estómago actúa sobre las terminaciones del nervio vago para transmitir la señal al sistema nervioso central y estimular el apetito [108]. Sin embargo, existe un estudio que muestra que las aferencias vagales no son necesarias para la estimulación de la ingesta por la inyección de ghrelina intraperitoneal (ip) en ratas [109], por lo que este hecho debe ser clarificado.

Además de regular la ingesta a corto plazo, la ghrelina también está implicada en la regulación a largo plazo la homeostasis energética. La administración crónica de ghrelina da lugar al aumento del peso corporal mediante la estimulación de la ingesta, pero también produce disminución del gasto

energético y la utilización de la grasa corporal [77]. La ghrelina promueve la expresión de genes implicados en la lipogénesis en el TAB, como la lipoproteína lipasa (LPL), la acetil-CoA caboxilasa α (α-ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) [110]. Además en el tejido adiposo pardo (TAP), la ghrelina disminuye la expresión de genes relacionados con la termogénesis como UCP1 y UCP3, un efecto probablemente mediado a través del sistema nervioso simpático [110]. La acción lipogénica de la ghrelina es independiente de los efectos orexigénicos [111].

A nivel hepático, la administración de ghrelina mediante su interacción con el receptor GHSR1a induce esteatosis hepática, incrementando el número de gotas lipídicas y de contenido en triglicéridos [112].

A pesar de todos los datos que demuestran el papel de la ghrelina en la regulación del balance energético, los ratones deficientes en el gen de la ghrelina (ghrelina$^{-/-}$), el GHSR1a (GHSR1a$^{-/-}$) y/o GOAT (GOATa$^{-/-}$) no presentan la disminución esperada del apetito y peso corporal [113–115]. Recientemente se ha descrito que la ghrelina acilada podría estar implicada en un mecanismo de supervivencia de mantenimiento de los niveles de glucosa durante periodos de restricción de comida muy prolongados mediante su efecto sobre la liberación de GH (Figura 8) [115].

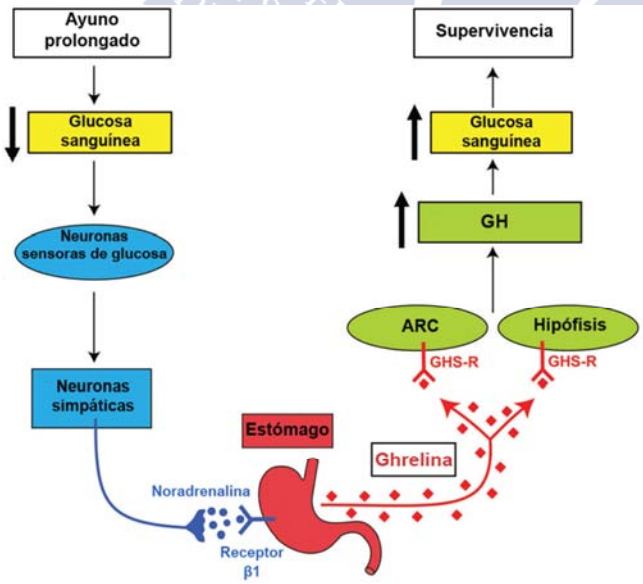


Figura 8. Modelo de respuesta metabólica al ayuno prolongado. Modificado de [115].

4.2 Obestatina

La obestatina es un péptido de 23 aa codificado por el mismo gen que la ghrelina y que también es producido por las células X/A del estómago. Se ha descrito que es el ligando endógeno del receptor GRP39 de la familia de receptores de secretagogos de GH y que presenta acciones opuestas a la ghrelina como supresión de la ingesta, retraso del vaciamiento gástrico y disminución del peso corporal [116]. No obstante, a pesar del interés inicial y de que en algunos estudios se reprodujeron los resultados [117,118], la mayoría de investigaciones posteriores demostraron que la obestatina no produce efecto anorexigénico ni pérdida de peso [119–122]. Además también existe controversia con respecto a si el GRP39 es su receptor [118,123]. Se ha descrito la expresión de obestatina en otros órganos como duodeno, páncreas, bazo y glándulas mamarias [124], y aunque se considera que la obestatina no está implicada en la regulación de la ingesta, si se le han atribuido otras funciones como proliferación, adipogénesis y metabolismo de la glucosa [125,126].

4.3 Sistema endocannabinoide (ECS)

Desde la antigüedad se conocen los efectos de la marihuana (*Cannabis sativa)* sobre el apetito debido a su uso en la práctica médica india [127]. El estudio a nivel molecular de los cannabinoides comenzó con el aislamiento del δ(9)-tetrahidrocannabinol (Δ^9-THC), principal componente psicoactivo de la marihuana [128]. Se descubrió que el THC actúa en el organismo mediante su unión a los receptores cannabinoides CB1 y CB2. La identificación de estos receptores específicos, el aislamiento de los ligandos endógenos para estos receptores, así como de la maquinaria para su síntesis y degradación ponen de manifiesto la existencia del sistema endocannabinoide (ECS).

4.3.1 Receptores cannabinoides

En 1990 se clonó el receptor cannabinoide 1 (CB1) implicado en los efectos de los cannabinoides en el cerebro [129]. Posteriormente se descubrió la existencia de otro receptor cannabinoide (CB2) presente en los macrófagos del bazo [130]. CB2 se expresa mayoritariamente en células inmunes y sanguíneas y en menor grado en el SNC y otros tejidos periféricos [131].

En humanos el gen de CB1 se localiza en la posición 6q14-q15. La secuencia codificadora de CB1 está incluida en un único exón y da lugar a una proteína de 472

aa formado por 7 dominios transmembrana y un dominio extracelular de 116 residuos. CB1 es uno de los receptores acoplados a proteínas G más abundantes del cerebro, sus niveles varían entre las diferentes subpoblaciones de neuronas, aunque se expresa mayoritariamente en prosencéfalo, ganglio basal, cerebelo y corteza cerebral [132]. CB1 también se expresa a niveles más bajos en los siguientes órganos periféricos: hipófisis, tracto gastrointestinal, tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo, bazo, tiroides, glándula adrenal, médula ósea, corazón, pulmón, próstata, útero, ovarios, testículos, timo y amígdalas [133–137].

Tanto CB1 como CB2 son receptores acoplados a proteínas G del tipo $G_{i/0}$. Los receptores CBs utilizan la subunidad proteica G-inhibidora (G_i) para inducir la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMPc, activación de las MAP (proteínas activadas por mitógenos) kinasas, disminución de la apertura de los canales de Ca^{+2} y activación de los canales K^+ (Figura 9) [132]. No obstante, los sistemas de transducción de CB1 implican la modulación de distintas rutas intracelulares de señalización en función del tipo celular y de las condiciones experimentales [138]. Se cree que existen otros receptores cannabinoides como el GPR55, el GPR119 y los TPRs que aún no han sido bien caracterizados [139].

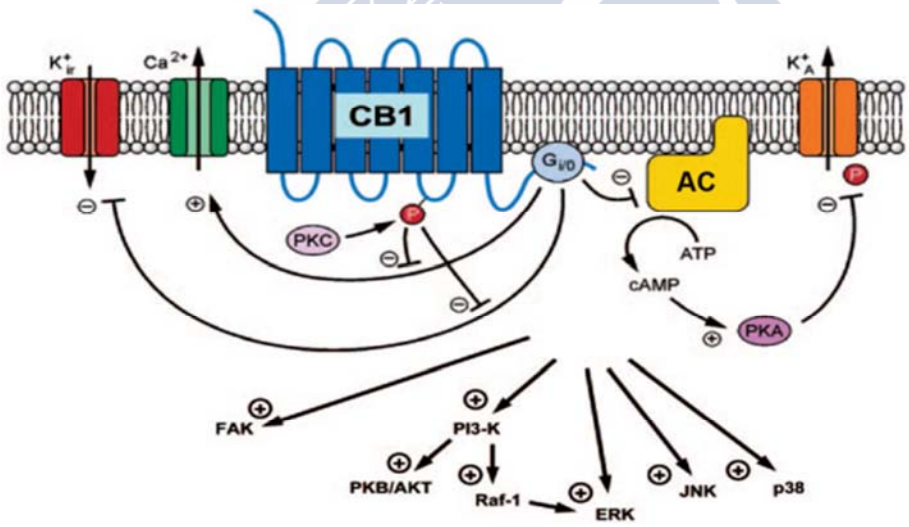


Figura 9. Representación esquemática de los principales efectos de CB1 sobre las rutas de señalización intracelulares. Modificada de [138].

4.3.2 Cannabinoides endógenos

Los primeros ligandos endógenos para los receptores cannabinoides identificados fueron la anandamida y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) [140,141]. Estos compuestos son lípidos derivados del ácido araquidónico que se sintetizan a demanda y se unen a los receptores CB1 y CB2. Se necesitan enzimas específicas que regulan su síntesis y degradación para que los endocannabinoides estén disponibles cuando sean necesarios [142]. Los endocannabinoides pueden actuar como neurotransmisores o ejercer efecto intracelular, autocrino o paracrino. Posteriormente se han descubierto otros lípidos endógenos con afinidad por los receptores cannabinoides como 2-araquidonil-glicerol-eter (noladin eter), O-araquidonil-etanolamina, N-araquidonil-dopamina (NADA) y oleoiletanolamida (OEA) [143]. Además de los cannabinoides endógenos existen distintos agonistas sintéticos, como CP55,940 y WIN55212-2, así como derivados del *Cannabis,* como el Δ^9-THC y el cannabidiol, que ejercen su efecto a través de los receptores CB1 y CB2.

4.3.3 Antagonistas del receptor CB1

El fármaco *N*-(piperidin-1-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-clorofenil)-4-metil-1Hpirazol-3-carboxamida, conocido como rimonabant o SR141716, fue el primer antagonista del receptor CB1 central [144]. Se propuso que este fármaco podría constituir una prometedora terapia anti-obesidad, debido a sus acciones inhibidoras de la ingesta y a que ejerce efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y sensibilidad a la insulina. En 2006 el rimonabant fue aprobado para su comercialización en Europa bajo el nombre de Acomplia, pero en el 2008 tuvo que ser retirado del mercado por sus efectos adversos a nivel central. No obstante, la investigación de antagonistas que actúan selectivamente sobre el receptor de CB1 en órganos periféricos sigue siendo de interés, ya que estos fármacos permitirían mantener el efecto metabólico del bloqueo de CB1 sin afectar a los circuitos centrales reguladores de ansiedad y el comportamiento [145]. Existen numerosos compuestos que actúan como antagonistas del receptor de CB1. El N-(morfolin-4-il)-1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida o AM281 es un análogo del rimonabant que se comporta como antagonista selectivo de CB1 [146].

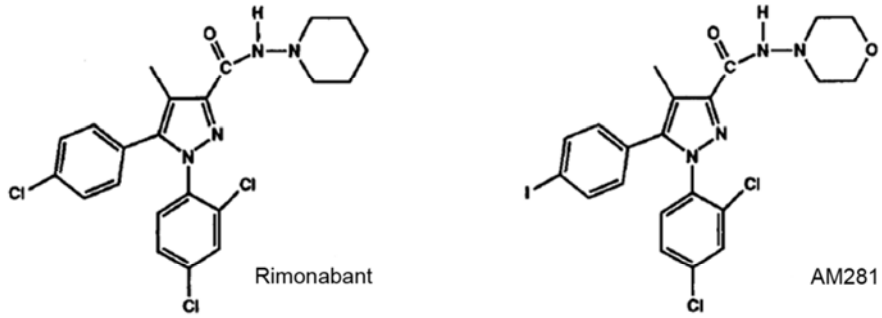


Figura 10. Estructuras del rimonabant y el AM281. Modificada de [147].

4.3.4 Funciones del ECS

El ECS está implicado en la regulación de numerosas funciones fisiológicas como el control del estrés y la ansiedad, secreción de GH, neuroprotección, nocicepción, memoria, locomoción, respuesta inmune, inflamación, funciones cardiovasculares, proliferación, apoptosis y carcinogénesis y homeostasis energética [138]. En el tracto gastrointestinal, el ECS está implicado en la regulación de la motilidad y peristalsis, vaciamiento gástrico, secreción e inflamación [148,149].

El ECS regula el peso corporal mediante el control de la ingesta de alimentos y del metabolismo. En situaciones de obesidad tanto genética (ratones ob/ob) como inducida por dieta alta en grasa (DIO) se ha demostrado que existen niveles elevados de endocannabinoides [150,151]. Los ratones con una deleción genética del receptor CB1 ($CB1^{-/-}$) presentan una disminución de la ingesta, de la masa grasa y del peso corporal, presentando resistencia a desarrollar obesidad inducida por la dieta [133,152]. A nivel de metabolismo lipídico, se ha demostrado que el ECS activa la lipogénesis *de novo* en el TAB y en el hígado [133,135], modula el gasto energético y la termogénesis en el tejido adiposo pardo y presenta además efecto sobre la sensibilidad a insulina [137,153].

4.3.4.1 Papel del ECS en la regulación de la ingesta

Desde el aislamiento del THC, se observó su capacidad de estimular el ingesta y el peso corporal [154,155]. Posteriormente se demostró que el bloqueo del receptor cannabinoide CB1 por la inyección intraperitoneal de rimonabant inhibe el apetito y disminuye el peso corporal [156,157]. Los efectos anorexigénicos de otros

antagonistas de CB1 como el AM281 refuerzan la implicación de este receptor en los mecanismos fisiológicos encargados de regular la ingesta y el apetito [158]. Los niveles de anandamida y 2-AG en distintas áreas del cerebro varían con el estado nutricional; además la administración central o periférica de endocannabinoides estimula el consumo de alimentos de manera dependiente del receptor CB1 [159–161]. La hiperfagia en respuesta a un estado de ayuno desaparece en ratones $CB1^{-/-}$ [151]. El ECS regula la ingesta mediante una compleja red de interacciones con neuropéptidos y hormonas clásicas implicadas en el control del apetito como CART, NPY, oxitocina, leptina, glucocorticoides, orexina, CCK, y ghrelina [151,162–166]. Estos datos demuestran la implicación de CB1 a nivel central en la estimulación de la ingesta. Sin embargo recientemente se demostró que CB1 puede actuar en distintos circuitos neuronales y reducir la hiperfagia producida por el ayuno, ejerciendo un control bimodal sobre la ingesta. Este hecho implica que el ECS puede actuar simultáneamente de dos maneras, inhibiendo o estimulando la ingesta, dependiendo del circuito neuronal bajo control de CB1 [167].

Los efectos del ECS sobre la ingesta se han observado preferencialmente en la regulación de respuestas hedónicas [155,157]. Además, la presencia de los componentes del ECS en las áreas cortico-límbicas, especialmente el núcleo acumbens (NAc) y el área tagmental ventral (VTA), indican que juega un papel importante en la modulación de los circuitos de recompensa cerebrales [168]. De hecho se ha demostrado que el receptor CB1 puede interaccionar con receptores de serotonina $5HT_2$ y receptores dopaminérgicos D2 mediante procesos de hetero-oligomerización [169,170]. La administración de inhibidores del receptor dopaminérgico D1 reduce el efecto orexigénico del THC [171]. Además el rimonabant inhibe la secreción de dopamina causada por la ingesta de comida apetitosa en el núcleo accumbens [172]. También se han descrito efectos sinérgicos entre inhibidores de cannabinoides y opioides en la reducción de la ingesta [173,174]. Estas evidencias demuestran la interacción entre ECS y otros sistemas ligados a mecanismos de recompensa con el fin de regular el apetito y la ingesta de alimentos.

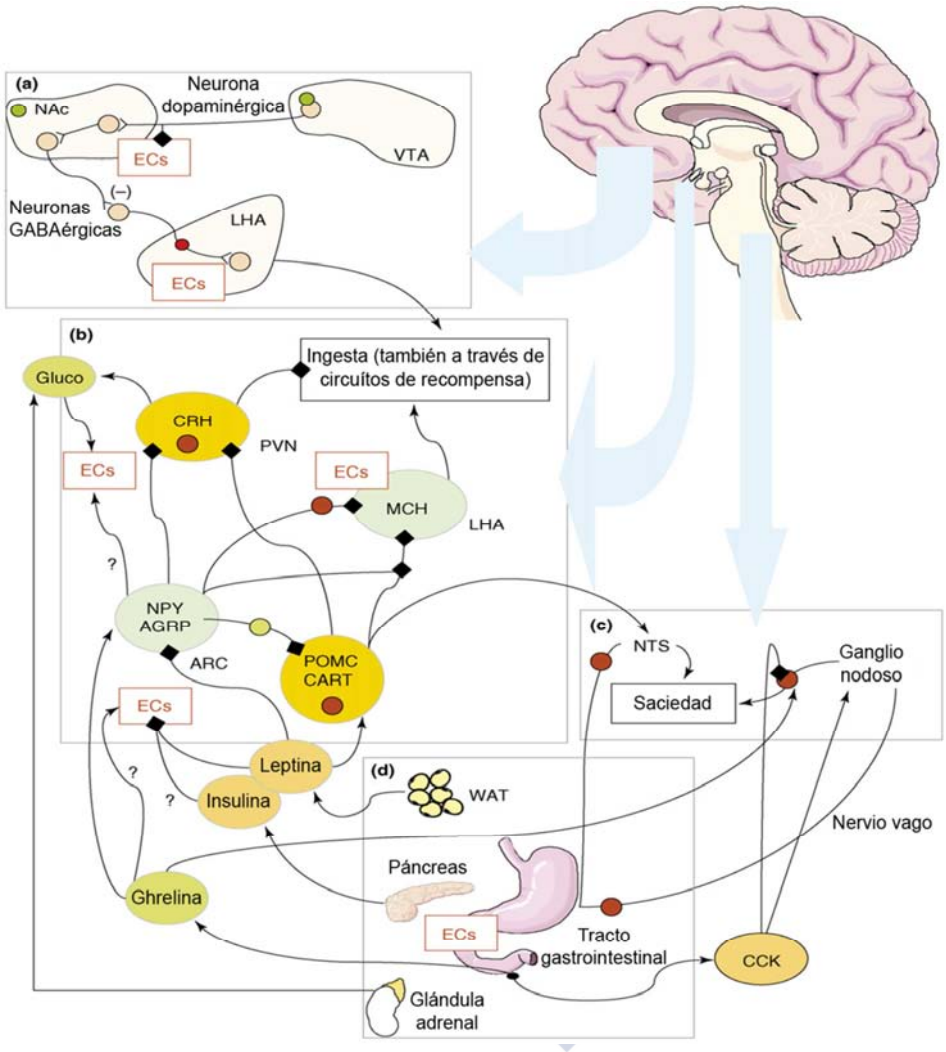


Figura 11. Esquema de las funciones del ECS en el control central y periférico de la ingesta de alimentos. Los endocannabinoides (ECs) y los receptores CB1 se representan como círculos verdes y rojos respectivamente. Modificada de [175].

4.3.4.1.1 Papel del ECS gástrico en la regulación de la ingesta

Se ha demostrado que la administración central de rimonabant a animales privados de comida no tiene efecto, mientras que la administración periférica de este fármaco provoca la disminución de la ingesta, efecto que está mediado por el nervio vago [176]. Existen evidencias funcionales que indican la posible influencia de los receptores CB1 en el control del apetito en ratas y humanos a nivel gástrico e

intestinal. Se ha demostrado la presencia de CB1 en las terminaciones vagales que proyectan al estómago y duodeno [46]. Estos receptores cannabinoides presentan una actividad constitutiva relativamente alta a este nivel, y modulan la función del nervio vago incluso en ausencia de ligando endógeno. Los receptores CB1 de las terminaciones vagales están regulados por el estado nutricional de tal manera que el ayuno produce una sobreexpresión de CB1 que disminuye tras 2 horas de realimentación [46]. La administración sistémica de AM281 inhibe la sobreexpresión de CB1 producida por el ayuno y aumenta la expresión del receptor Y2 [165]. Estos datos demuestran la implicación del ECS en la señalización cerebro-estómago.

4.3.4.1.2 Interacción ghrelina-ECS en la regulación de la ingesta

Varios autores han descrito que el rimonabant bloquea el efecto anorexigénico producido por la administración central de ghrelina [177,178]. Sin embargo, el rimonabant también puede ejercer el efecto contrario e incrementar la hiperfagia producida por el ayuno o la inyección de ghrelina en el PVN [179]. Este descubrimiento confirma la hipótesis propuesta por Bellocchio de que CB1 puede tener una acción bimodal en la regulación de la ingesta realizando acciones opuestas dependiendo de los circuitos neuronales sobre los que actúe [167]. La ghrelina requiere la presencia de CB1 para activar AMPK y regular la ingesta en el hipotálamo [166].

Además el rimonabant inhibe el efecto anorexigénico producido por la administración periférica de la hexarelina, un péptido mimético de la ghrelina [180]. Se ha demostrado la presencia de CB1 en la mucosa del estómago, donde la anandamida y el CP55,940, agonistas de este receptor, provocan la liberación de ghrelina por las células X/A y un aumento de sus niveles circulantes [148,181]. En concordancia con estos datos, la administración sistémica de rimonabant y oleoiletanolamida disminuye la ingesta y revierte la elevación de los niveles de ghrelina circulante producida por el ayuno [182].

También se ha observado que la ghrelina y el ECS interactúan en otros órganos periféricos como el páncreas y regulan la actividad de AMPK en el TAB, el corazón y el hígado [183,184]. Se ha descrito que se necesitan los receptores CB1 y GHR1a para que la ghrelina y el ECS realicen sus acciones metabólicas mediadas por AMPK [185,186].

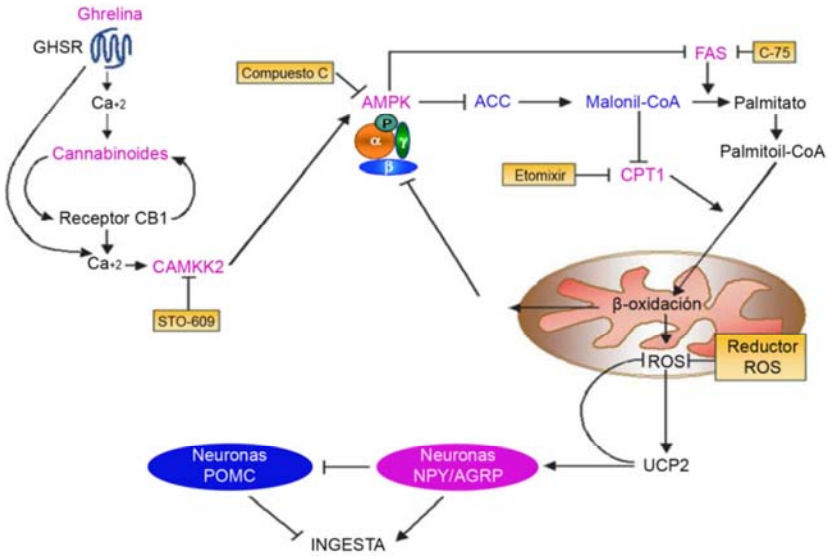


Figura 12. Diagrama esquemático de la interacción de la ghrelina y CB1 en la regulación de la ingesta. Modificada de [187].

4.4 Nesfatina-1

La nesfatina-1 es un péptido de 9.7 kDa identificado por Oh-I y colaboradores como una señal anorexigénica expresada en el hipotálamo. La nesfatina-1 está formada por 82 aa que proceden del extremo N-terminal de la proteína de 420 aa nucelobindina-2 (NUCB2) [188]. Se desconoce cuál es el receptor de la nesfatina-1 pero se ha descrito que actúa sobre un receptor acoplado a proteínas Gi/G_o [189,190].

4.4.1 NUCB2

La nucleobindina-2 (NUCB2) es una proteína de 50 kDa que también se denomina NEFA por contener un domino de unión a ADN, motivos EF de unión a Calcio y regiones ricas en aa ácidos. NUCB2 se localiza en el citoplasma y la membrana plasmática y puede secretarse al medio extracelular [191]. NUCB2 está compuesta por un péptido señal de 24 aa y una secuencia de 396 aa que está altamente conservada en vertebrados. En humanos el gen de NUCB2 se localiza en la región cromosómica 11p15.1 y está formado por 14 exones y 13 intrones [192]. Anteriormente al descubrimiento de la nesfatina-1, la expresión proteica de NUCB2

se había encontrado en cerebro, hígado, corazón, timo, músculo, intestino, riñón, pulmón y bazo [193].

En 2006 se descubrió que NUCB2 es procesada por las prohormonas convertasas PC 1/3 y 2 dando lugar a tres segmentos: nesfatina-1 (aa 25-106), nesfatina-2 (aa 109-187) y nesfatina-3 (aa 190-420). Sin embargo de todos ellos sólo la nesfatina-1 ha demostrado tener una acción reductora de la ingesta y peso corporal en ratas, mientras que los otros 2 fragmentos carecen de acción biológica conocida [188].

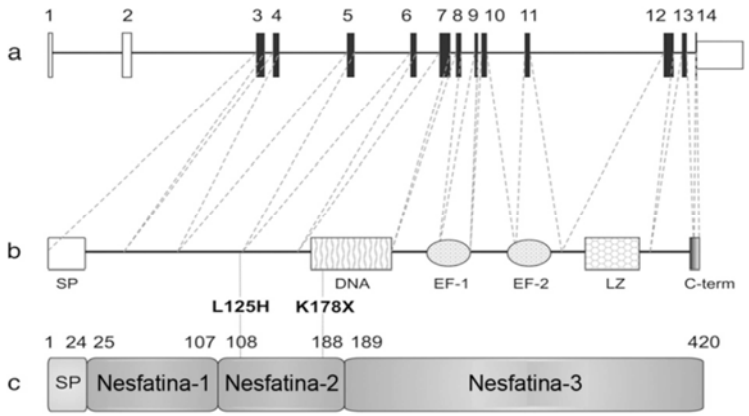


Figura 13. Representación gráfica de NUCB2.

En la mayor parte de los trabajos inmunohistoquímicos e inmunoensayos realizados, los anticuerpos utilizados reconocen tanto NUCB2 como nesfatina-1 y en consecuencia no distinguen entre ambas formas. Además por *western blot* sólo se ha identificado la nesfatina-1 endógena en cerebro, corazón, estómago y pulmón en tres trabajos [194–196], mientras que en los demás estudios sólo se identifica la forma completa de NUCB2 aunque si se detecta la nesfatina-1 sintética. Se desconoce el motivo por el cual la forma madura de la nesfatina-1 no es detectable en la mayoría de tejidos analizados. Una posible explicación podría ser que NUCB2 sufriese el procesamiento proteolítico después de ser secretada, ya que la nesfatina-1 se detectó en plasma mediante un ELISA específico que no reacciona con la forma completa de NUCB2 [197]. Debido a que la inyección de NUCB2 produce una disminución de la ingesta similar al efecto producido por la nesfatina-1, no debe descartarse que la forma completa de NUCB2 sea activa [188,198]. Además NUCB2

también inhibe la diferenciación de adipocitos a igual dosis que la nesfatina-1, aunque el dominio de la nesfatina-1 debe estar intacto para que sea activa [199].

4.4.2 Distribución de NUCB2/nesfatina-1

El péptido de 9.7 kDa nesfatina-1 se identificó inicialmente en extractos hipotalámicos y fluido cerebroespinal (CSF) [188]. La expresión de NUCB2/nesfatina-1 se detectó en los núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta y otras áreas cerebrales que incluyen circuitos relacionados con estrés y centros de regulación autónoma. Se demostró la co-expresión de NUCB2/nesfatina-1 con otros péptidos reguladores del apetito conocidos como MCH, oxitocina, urocortina, POMC, CART, αMSH y NPY, así como con neuropéptidos implicados en la secreción hormonal hipofisaria como TRH, GHRH y somatostatina, y en la respuesta a estrés como neurotensina, urocortina, CRF y serotonina [189,200–203].

A nivel periférico la expresión de NUCB2/nesfatina-1 se ha descrito en estómago, corazón, páncreas, hipófisis, hígado, tracto gastrointestinal, tejido adiposo, pulmón, músculo esquelético, testículos, vesícula seminal, ovario, útero y placenta [194,204–210].

La expresión de mRNA de NUCB2 en el estómago es 10 veces superior a la del cerebro. En el estómago de rata, NUCB2/nesfatina-1 se ha detectado en el citoplasma de células enteroendocrinas de la mucosa oxíntica, principalmente en las células X/A productoras de ghrelina y células productoras de somatostatina [208]. En ratas la localización de ghrelina y NUCB2/nesfatina-1 dentro de las células enteroendocrinas se produce en diferentes vesículas citoplasmáticas [208], sin embargo en humanos ambas hormonas están localizadas en las mismas vesículas citoplasmáticas [211].

En el tejido adiposo la expresión de NUCB2/nesfatina-1 se ha detectado tanto en TAP como en TAB, siendo mayor en los depósitos de grasa subcutánea que en grasa visceral y epicárdica [209].

4.4.3 Regulación de los niveles de NUCB2/nesfatina-1

Existen evidencias experimentales que demuestran el papel fisiológico de NUCB2/nesfatina-1 como un regulador negativo de la ingesta. Por una parte, los mayores niveles de expresión de NUCB2/nesfatina-1 en el cerebro se encuentran en los núcleos hipotalámicos reguladores de la ingesta y el metabolismo. Por otra parte

estos niveles hipotalámicos varían con el estado nutricional disminuyendo la expresión de NUCB2 y nesfatina-1 en estados de ayuno y aumentando tras la realimentación [188,200,212]. La expresión de ARNm de NUCB2 también se encuentra afectada por los ritmos circadianos, con niveles más elevados en la fase luminosa asociados a la disminución de la ingesta [213].

Los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 también están regulados por el estado nutricional, en rata se ha encontrado que se produce una reducción en los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 tras 24 h de ayuno y el retorno a los valores basales tras la realimentación [214]. Sin embargo, en humanos sanos se ha visto que la ingestión de comida o glucosa oral no altera los niveles plasmáticos de nesfatina-1 [197] o de NUCB2/nesfatina-1 [215].

Existen datos controvertidos entre el IMC y los niveles de nesfatina-1 circulantes. En un estudio en sujetos sanos se ha encontrado una relación inversa entre el IMC y los niveles plasmáticos de nesfatina-1 [197]. Sin embargo, existen estudios que demuestran que existe una correlación positiva con el IMC, siendo los niveles de NUCB2/nesfatina-1 bajos en anorexia y elevados en obesidad [209,215,216], indicando que los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 podrían estar regulados por cambios sostenidos en el volumen de tejido adiposo. En pacientes obesos los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 disminuyen tras someterse a distintos tipos de cirugía bariátrica, y además en la gastrectomía en manga estos niveles están correlacionados con el IMC [10], sugiriendo que el estómago debe jugar un papel relevante en la regulación de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1.

Al igual que sucede con los niveles circulantes, en ratas los niveles gástricos de NUCB2/nesfatina-1 disminuyen con el ayuno y se recuperan tras la realimentación. Esta regulación esta mediada a nivel intracelular por la vía de señalización de mTOR [208,217]. La expresión en el estómago de NUCB2/nesfatina-1 es mayor al aumentar el IMC, justo al contrario de lo que ocurre con los niveles gástricos de ghrelina y GOAT [211]. Debido a los efectos opuestos de ghrelina y nesfatina-1 en la ingesta, la adiposidad y el peso corporal, se ha propuesto que la nesfatina-1 podría contrarrestar a la ghrelina para regular la homeostasis energética.

Los niveles de expresión y secreción de NUCB2/nesfatina-1 en grasa subcutánea aumentan en ratones alimentados con dieta alta en grasa y disminuyen en situación de ayuno, demostrando que la producción de NUCB2/nesfatina-1 en

grasa subcutánea está regulada por las condiciones nutricionales como ocurre con la expresión a nivel central y los niveles circulantes [209].

En humanos se ha observado un aumento de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 con la edad [215]. Este hecho se confirmó en ratas macho donde los niveles séricos de NUCB2/nesfatina-1 aumentan gradualmente con el crecimiento desde el nacimiento hasta la etapa adulta [218]. Sin embargo en ratones hembras los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 permanecen constantes [219]. Para elucidar si estas contradicciones se deben a diferencias entre ambos sexos, o entre los modelos empleados (rata/ratón, suero/plasma, diferentes edades), se requiere la realización de más estudios.

La distribución de los péptidos neuroendocrinos en el tracto gastrointestinal varía con la edad para adaptar el organismo a los requerimientos metabólicos demandados en cada etapa de la vida. Se ha demostrado que los la expresión de NUCB2/nesfatina-1 aumenta en tejidos gastroenteropáticos desde el estado embrionario hasta el día 27 postnatal, indicando que la que NUCB2/nesfatina-1 tiene un potencial papel en el desarrollo fisiológico de las ratas específico del tejido y la edad [218]. La lactancia materna es un periodo clave en el desarrollo postnatal de la rata desde un punto de vista metabólico. Así, NUCB2/nesfatina-1 está presente en la leche materna y se ha descrito que contribuye al crecimiento, regulación energética y maduración del sistema gastrointestinal de niños lactantes [220].

La pubertad es otra etapa en la cual los requerimientos energéticos están alterados y en consecuencia los niveles de ciertas hormonas implicadas en el metabolismo. En ratas hembra los niveles de ARNm y proteína de NUCB2 aumentan en algunos núcleos hipotalámicos durante la transición entre la etapa infantil y peripuberal, siendo NUCB2/nesfatina-1 indispensable para que se desencadene la pubertad [212]. A su vez en ratas macho la expresión proteica de NUCB2/nesfatina-1 aumenta en la transición entre pubertad y etapa adulta en los testículos [206]. Además la inactivación hipotalámica de NUCB2 produce hiperfagia en ratas macho adultas [188,206,221], mientras en ratas hembra este efecto sólo se produce en ratas prepuberales y no en adultas [212]. Estos hechos indican que el efecto de NUCB2/nesfatina-1 sobre la ingesta está influenciado por el sexo y la etapa de desarrollo. Además la nesfatina-1 estimula la elevación de los niveles de gonadotropinas en hembras puberales y la secreción de testosterona en explantes de testículos *in vitro* [206,212]. Por otra parte, el estradiol aumenta la expresión de

ARNm de NUCB2 en las células MCF-7 a través del receptor de estrógenos (ER) *in vitro* [222]. Estos datos indican que las hormonas sexuales podrían ejercer un efecto regulador sobre la producción de NUCB2/nesfatina-1.

Los niveles séricos de NUCB2 aumentan significativamente en ratas macho con síndrome metabólico inducido por fructosa, mientras que en hembras no hay variación significativa [207] y se ha encontrado una asociación de tres polimorfismos del gen NUCB2 con obesidad en hombres que no existe en mujeres [223]. Estos datos opuestos entre ambos sexos indican que podría existir dimorfismo sexual en la regulación de la producción y liberación de NUCB2/nesfatina-1.

4.4.4 Acciones de NUCB2/nesfatina-1

La primera acción biológica descrita de nesfatina-1 fue la reducción de la ingesta en la fase oscura tras su inyección intracerebroventricular (icv) en ratas. Además se encontró que se producía una reducción en la ganancia de peso y los depósitos de grasa tras la administración crónica de NUCB2 y nesfatina-1, probablemente como consecuencia de la acción anorexigénica observada [188]. La administración central de nesfatina-1 induce sensación de saciedad disminuyendo la cantidad y frecuencia de las comidas [224]. Además la inyección de anticuerpos anti-NUCB2 o anti-nesfatina-1 en el tercer ventrículo del cerebro aumentan la ingesta [188,221]. A nivel central, la nesfatina-1 induce anorexia interactuando con otros neuropéptidos como oxitocina, melanocortinas y NPY, y se ha demostrado que este efecto no está mediado por la leptina [221,225]. La administración de otros péptidos gastrointestinales como CCK y la inyección simultánea de ghrelina y desacilghrelina inducen la expresión de cFOS en las neuronas NUCB2/nesfatina-1 inmunopositivas del cerebro para inhibir la ingesta [214,226,227].

La nesfatina-1 puede atravesar la barrera hematoencefálica en ambas direcciones por un mecanismo no saturable [228]. Sin embargo existen pocos datos acerca de la implicación de la nesfatina-1 periférica en la inhibición de la ingesta, y los resultados obtenidos son controvertidos. Algunos estudios postularon que la administración sistémica de nesfatina-1 no tiene efecto sobre la ingesta [214,224]. Al contrario, Shimizu y colaboradores demostraron que la inyección intraperitoneal de nesfatina-1 reduce la ingesta en la fase oscura, aumentando la expresión de cFOS, CART y POMC en el NTS [229]. Además otro estudio demostró que la administración sistémica de nesfatina-1 reduce la ingesta de comida y aumenta la

actividad física espontánea y la oxidación de grasas [230]. La nesfatina-1 también afecta a distintos procesos digestivos, como el retraso del vaciamiento gástrico y la supresión de la motilidad gastroduodenal, un efecto que podría contribuir a la inducción de la saciedad [214,231]. Se propuso que los efectos periféricos de la nesfatina-1 podrían estar mediados por el nervio vago ya que la nesfatina-1 activa la entrada de calcio en neuronas del ganglio nodoso *in vitro* [232], y los ratones con bloqueo de la comunicación vagal por la administración de capsaicina no responden a la inyección de nesfatina-1 [233].

Existen evidencias que sugieren que NUCB2/nesfatina-1 en grasa subcutánea podría tener un papel en la hipertrofia de los adipocitos como consecuencia de ciertos tipos de obesidad. Así se ha demostrado que lesiones del núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) provocan el aumento de la expresión proteica de NUCB2/nesfatina-1 en los depósitos de grasa subcutánea y visceral, acompañado de un aumento del peso y de la acumulación de grasa corporal. Además se ha sugerido que el sistema nervioso simpático podría estar implicado en la regulación de la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el tejido adiposo [205].

También se ha observado que la secreción de NUCB2/nesfatina-1 aumenta durante la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos maduros, sugiriendo el posible papel de NUCB2 y nesfatina-1 en el desarrollo y diferenciación de adipocitos [209]. Sin embargo existe un trabajo donde se demostró que la reducción de los niveles de NUCB2 en preadipocitos 3T3-L1 da lugar a mayor diferenciación a adipocitos [234]. Además tanto la secreción de NUCB2 como de nesfatina-1 suprime la diferenciación a adipocitos mediante la inhibición de la producción de AMPc y de la señalización de la insulina [199]. Por lo tanto, se necesitan más datos para comprender la regulación de la producción y secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el tejido adiposo.

Además de la acción anorexigénica inicialmente descrita, la nesfatina-1 interviene en otras funciones fisiológicas como la regulación del estrés, ansiedad, sueño, ingesta de agua, hipertensión, reproducción, secreción de ácido gástrico, homeostasis de la glucosa y secreción de insulina [198].

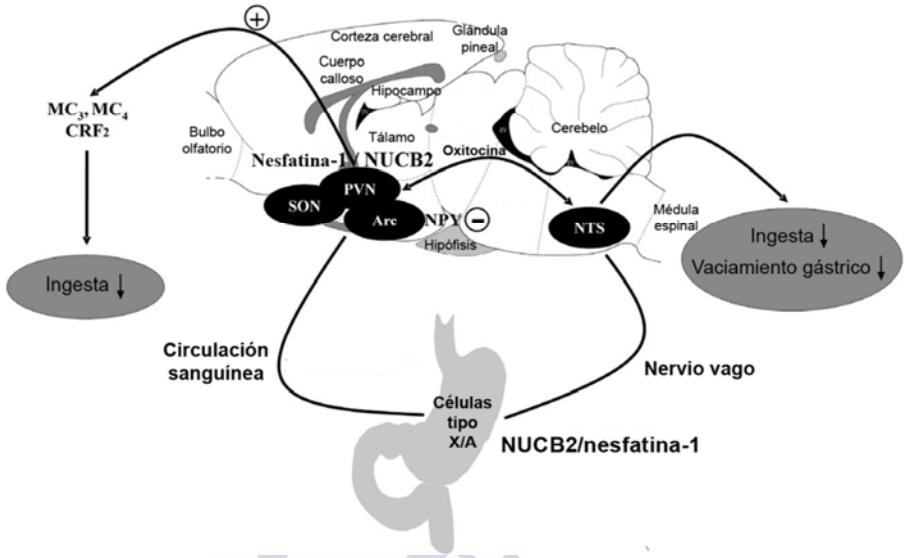


Figura 14. Rutas de acción de NUCB2/nesfatina-1. Modificada de [235].

4.5 Ruta de señalización intracelular mTOR/S6K1

La diana de mamíferos para rapamicina (mTOR), también conocida como FRAP, RAFT, RAPT y SEP, es una serin-treonin kinasa altamente conservada de 289 kDa. mTOR forma parte de dos complejos multiproteicos: el complejo mTORC 1 (mTORC1) que contiene la proteína raptor y el complejo mTORC 2 (mTORC2) que contiene la proteína rictor [236]. El mTORC1 es el más estudiado por ser el principal mediador de la acción de la rapamicina. Raptor actúa reclutando los sustratos de mTOR como la serin/treonin kinasa 1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1). Cuando se produce la fosforilación de mTOR, se activa y fosforila a S6K1 modulando su actividad. En consecuencia, S6K1 fosforila y activa a S6, una proteína ribosomal implicada en la traducción de proteínas [237]. Estudios *in vitro* demostraron que los niveles celulares de ATP aumentan la señalización de mTOR [18].

La ruta de señalización intracelular mTOR/S6K1 se ha propuesto como un sensor intracelular de ATP ya que es sensible a alteraciones en el estado energético, como el ayuno y la obesidad [16]. En estudios realizados en ratas obesas resistentes a insulina sometidas a dieta alta en grasa se ha demostrado que la vía de mTOR se encuentra activada en varios tejidos periféricos, como el hígado y el músculo esquelético [238]. A nivel central, la ruta de señalización de mTOR en neuronas hipotalámicas está implicada en detección de la disponibilidad de nutrientes y regula

la ingesta de comida y el balance energético [20,105]. Además se ha descubierto que S6K1 puede fosforilar αAMPK inhibiendo su acción sobre la regulación de la ingesta en el hipotálamo [239].

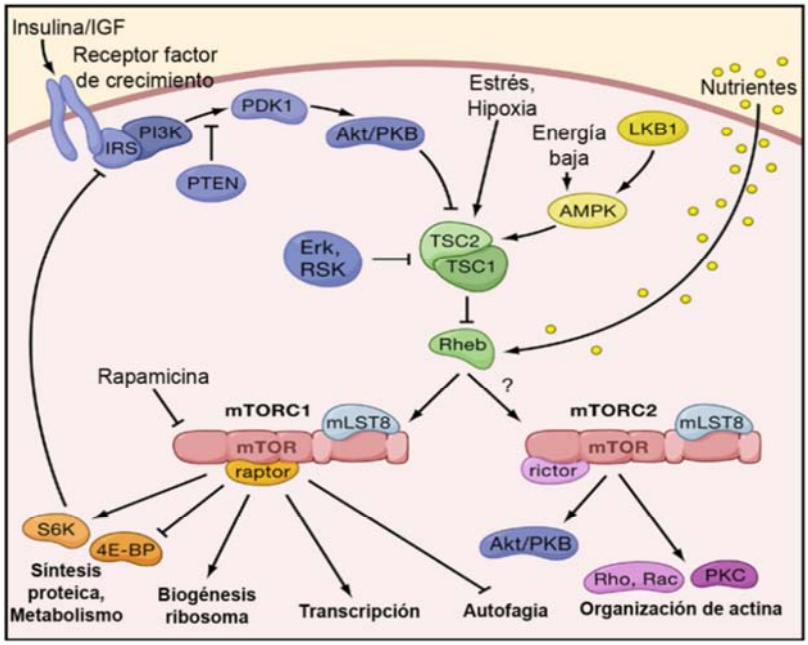


Figura 15. Modelo de la ruta de señalización de mTOR. Modificada de [236].

4.5.1 Papel de la ruta de mTOR/S6K1 en el estómago

Se ha descrito la expresión de mTOR en las células X/A del estómago, donde actúa como un sensor periférico del estado energético y responde a través de la modulación de la expresión de ghrelina y NUCB2/nesfatina-1 [85,217]. Esta ruta de señalización participa indirectamente en la regulación de la conexión cerebro-estómago a través de la acción de los péptidos gástricos en las neuronas hipotalámicas que regulan la ingesta. Variaciones en el estado nutricional, como el ayuno y la realimentación, regulan la fosforilación de mTOR en el tejido gástrico. Además existe una relación inversa entre la activación de mTOR y la expresión y secreción de ghrelina durante cambios del estado energético. La inhibición de mTOR gástrico provoca el incremento de la expresión de ARNm de ghrelina y GOAT, de preproghrelina intracelular y de ghrelina circulante; por el contrario, la activación de mTOR suprime la expresión y secreción de ghrelina [85]. También se ha demostrado

la co-localización de S6K1 con NUCB2/nesfatina-1 en la mucosa oxíntica. La relación entre la ruta de señalización de mTOR y nesfatina-1 es opuesta a la de la ghrelina en relación a cambios en el estado energético, la actividad de mTOR y la expresión de NUCB2/nesfatina-1 disminuyen con el ayuno y se recuperan tras la realimentación. En ratones con obesidad inducida por la dieta, la actividad de mTOR y NUCB2/nesfatina-1 gástricos aumentan [217]. Además el bloqueo de la ruta de mTOR mediante el tratamiento con rapamicina inhibe la síntesis y secreción de gastrina por el estómago [240].

5 TIPOS DE SECRECIÓN PROTEICA

Las proteínas secretadas constituyen aproximadamente el 10% de las proteínas codificadas por el genoma humano [241]. Las más abundantes son las proteínas séricas, proteínas de la matriz extracelular, enzimas digestivas o las proteínas de la leche [242]. Otras proteínas como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y proteasas procesadoras de la matriz extracelular son menos abundantes pero altamente bioactivas [243].

Las proteínas pueden secretarse a través de distintos mecanismos englobados en dos tipos principales de secreción: vía clásica y no clásica. Las proteínas secretadas por la denominada vía clásica se caracterizan por presentar una secuencia en el extremo amino-terminal denominada péptido señal. Este péptido está formado por uno o más aminoácidos cargados positivamente seguidos por una secuencia de 6 residuos hidrófobos continuos. Así, durante la síntesis de las proteínas en los ribosomas del citoplasma, la secuencia señal es detectada provocando la translocación al lumen del RE donde continua la traducción; posteriormente son trasportadas a través del complejo de Golgi y se liberan por exocitosis. El péptido señal se escinde normalmente en el ribosoma y no forma parte del polipéptido final [244].

Las vías de secreción no clásicas no implican el paso a través del RE y Golgi, sino que la secreción se ejerce a través de una serie procesos cuyos mecanismos son todavía poco conocidos [245]. Ciertos reguladores de la respuesta inmune, la diferenciación celular y la angiogénesis se secretan en ausencia de péptido señal como el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), lectinas de unión específica a b-galactosidadas y ciertas interleuquinas [245]. Se han descrito cuatro tipos

diferentes de rutas de secreción no clásicas principales: la exportación a través de vesículas intracelulares que son probablemente subcompartimentos endosomales; la translocación directa a través de la membrana plasmática mediante transportadores; la translocación directa mediante el sistema de membrana flip-flop; o a través de exosomas que liberan su contenido en el espacio extracelular (Figura 16). Afortunadamente existen varias herramientas bioinformáticas que permiten predecir la secreción y localización de una proteína a partir de su secuencia; como los softwares de predicción *SignalP* y *SecretomeP* que reconocen proteínas secretadas por mecanismos clásicos y/o no clásicos [244,245].

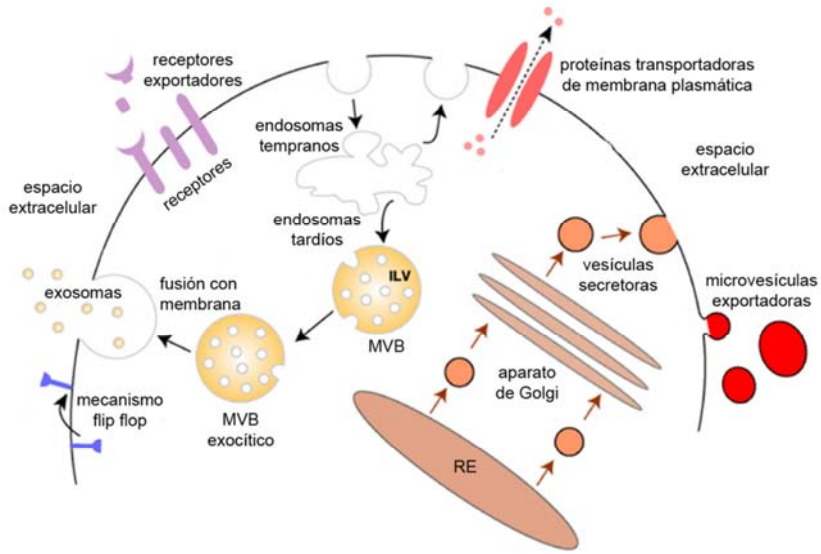


Figura 16. Principales mecanismos de secreción proteica. Modificada de [245].

6 PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO HORMONAL

6.1 Estudios proteómicos relacionados con obesidad y nutrición

El desarrollo de tecnologías de alto rendimiento como la proteómica ha abierto nuevas oportunidades para esclarecer los mecanismos moleculares de enfermedades complejas; por ejemplo, es una herramienta muy útil en la búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas. Además de permitir la identificación de proteínas desconocidas, la ventaja de utilizar esta técnica reside en la capacidad de

esta tecnología para detectar modificaciones post-traduccionales e interacción de proteínas que en general no pueden ser predichas a nivel genómico [246].

En el campo de la obesidad y la diabetes, los estudios proteómicos llevados a cabo se centran mayoritariamente en el estudio de líneas celulares, muestras y secretomas procedentes de tejido adiposo, aunque también se han realizado trabajos en plasma, hígado, hipotálamo y músculo [247,248].

La proteómica ha sido aplicada en la investigación nutricional para el descubrimiento de biomarcadores de la efectividad de las dietas y mecanismos de acción de los componentes de la comida [249]. Se han utilizado distintas técnicas proteómicas para determinar el efecto que ejercen las variaciones en el estado nutricional como la alimentación, diferentes tiempos de ayuno y realimentación tras el ayuno, sobre el perfil proteico de tejidos como cerebro, hipófisis, hígado, tejido adiposo, riñón y músculo [250–254], así como en organismos completos como Drosophila [255]. También se ha demostrado la expresión diferencial de proteínas inducida por distintos tipos de dieta (alta en grasa o carbohidratos) en varios órganos implicados en el metabolismo como el hígado y el núcleo estriado del cerebro [256,257]. Un estudio comparativo muestra un patrón diferencial de proteínas en el intestino delgado en distintos tiempos de ayuno (12, 24 y 72 horas) y alimentación, demostrando la regulación de las proteínas de la mucosa intestinal en respuesta al estado nutricional [258]. Sin embargo, no existe ningún estudio del proteoma de estómago enfocado en la investigación del efecto de las variaciones nutricionales o de situaciones patológicas como obesidad y anorexia relacionadas con la regulación de la ingesta.

A pesar de la utilidad del análisis del proteoma de tejidos en el estudio de las proteínas intracelulares, estos trabajos no permiten la identificación de proteínas secretadas implicadas en la regulación endocrina y la comunicación con otros órganos. El estudio del proteoma de la saliva durante el consumo de comida y el tratamiento con dosis isocalóricas de emulsiones de ácidos grasos de cadena larga permitió la caracterización de nuevos péptidos y proteínas diferencialmente expresados que podrían actuar como señales de saciedad y apetito en humanos [259,260]. Sin embargo, en un estudio comparativo en plasma y otros fluidos corporales humanos, el efecto de la extensión del ayuno (12-36 horas) resultó enmascarado por la variabilidad entre individuos [261]. Otro estudio proteómico sobre las variaciones plasmáticas de ratas sometidas a alimentación y ayuno

prolongado (4-6 días) refleja alteraciones en el metabolismo lipídico y la señalización de la insulina, pero el número de proteínas identificadas fue bajo debido a la gran presencia de albúmina [262]. Generalmente la presencia de proteínas abundantes en suero y plasma como la albúmina y las inmunoglobulinas impide la identificación de otras proteínas de menor concentración. Por este motivo es interesante el estudio directo de secretomas de células y tejidos para la identificación de proteínas secretadas.

6.2 Estudios proteómicos de la secreción de estómago

En la actualidad no existen trabajos que utilicen sistemas de explantes en cultivo para analizar la secreción directa del estómago por técnicas proteómicas. Esta metodología no ha avanzado como en otros tejidos debido a los obstáculos técnicos intrínsecos del estómago, como la proteólisis enzimática y la rotura de células del epitelio gástrico. Los únicos estudios existentes se han realizado en muestras de fluido gástrico humano procedente de endoscopias o en secretomas de líneas celulares [263].

6.2.1 Estudios proteómicos del fluido gástrico

El jugo gástrico es un fluido de pH elevado producido por las glándulas de la mucosa gástrica y está compuesto por agua, mucus, enzimas digestivas, ácido hidroclórico y electrolitos [264]. El fluido gástrico recogido en las endoscopias contiene moléculas secretadas por el estómago como factores autocrinos y paracrinos o citoquinas inflamatorias, por lo que ha sido caracterizado mediante aproximaciones proteómicas para la búsqueda de biomarcadores de cáncer gástrico. La mayoría de los trabajos existentes comparan muestras de fluido gástrico de pacientes con cáncer gástrico y/u otras patologías como gastritis crónica con muestras de sujetos sanos mediante diferentes aproximaciones proteómicas (2-DE, cromatografía líquida y arrays de proteínas) [265–267]. A pesar del incremento del número de trabajos en fluido gástrico centrados en la búsqueda de marcadores de patologías gástricas, no existen estudios encaminados a determinar su relación con la regulación de la ingesta y el peso corporal.

6.2.2 Secretoma de líneas celulares de cáncer gástrico

El secretoma comprende el conjunto de todas las proteínas liberadas por una célula, tejido u organismo en un tiempo determinado. Para estudiar el secretoma de una línea celular, las células se incuban en medio sin suero durante un tiempo determinado para evitar el enmascaramiento de proteínas de poca abundancia por las proteínas del suero [247]. Al igual que sucede con los estudios de fluido gástrico, los ensayos proteómicos para analizar el secretoma de líneas celulares se centraron en la investigación del cáncer [268,269].

7 HIPÓTESIS

El presente proyecto se basa en la hipótesis de que el estómago coordina y procesa factores externos, sensoriales y nutricionales. Como consecuencia de esto, el propio estómago responde a estos estímulos liberando sustancias, algunas de ellas posiblemente desconocidas, que actuarían modulando los distintos sistemas reguladores del apetito y peso corporal. Hasta el momento no se ha descrito en profundidad el papel que desempeña el estómago en la regulación de la homeostasis energética. Las señales hormonales y neurales conocidas no explican el complejo mecanismo de regulación del balance energético por parte del estómago. Por este motivo, es necesario clarificar la implicación del sistema digestivo en la regulación de la homeostasis energética y sus posibles alteraciones en procesos patológicos como la obesidad. Para ello, en este trabajo hemos seguido tres estrategias experimentales:

1) Estudiar a nivel molecular los mecanismos gástricos clásicos implicados en la regulación de la ingesta y el peso corporal (ghrelina y sistema endocannabinoide).

2) Investigar el papel del estómago en la regulación de los niveles de una nueva gastroquina, NUCB2/nesfatina-1, mediante la interacción con otros tejidos implicados en el balance energético como el tejido adiposo subcutáneo (TAS).

3) Identificar mediante técnicas proteómicas nuevas señales secretadas por el estómago implicadas en la regulación del apetito y el balance energético.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Establecer la acción del rimonabant y el AM281, antagonistas del receptor CB1, sobre la secreción de ghrelina a nivel gástrico y la regulación de la ingesta.

2. Estudiar la implicación de la vía de señalización mTOR/S6K1 en la interacción a nivel gástrico de la ghrelina y el receptor CB1.

3. Observar el efecto del desarrollo asociado a la edad y el sexo sobre la regulación los niveles de NUCB2/nesfatina-1.

4. Determinar de qué forma el periodo de lactancia influye en la producción y secreción de NUCB2/nesfatina-1 en el estómago y en el tejido adiposo subcutáneo.

5. Optimizar y validar la técnica de obtención de secretomas de explantes de estómago para su estudio por proteómica.

6. Identificar por proteómica nuevas señales liberadas por el estómago y caracterizarlas en diferentes situaciones nutricionales y patológicas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 LÍNEAS CELULARES

1.1 AGS

La línea celular AGS deriva de un adenocarcinoma de cáncer gástrico de estómago humano y se cultivó siguiendo las especificaciones del proveedor (ECACC, European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK). Las células AGS se mantuvieron en medio de cultivo Ham's-F12 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina (LabClinics, España). Las células se cultivaron bajo una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2 a 37ºC.

1.2 KATO-III

La línea celular KATO-III deriva de un carcinoma de cáncer gástrico de estómago humano y se cultivó siguiendo las especificaciones del proveedor (ECACC). Las células se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 20% de FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina a 37ºC bajo una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2.

1.3 Secretomas de líneas celulares AGS y KATO-III

Cuando las células se encontraban en 80% de confluencia, se retiró el medio de la placa de cultivo y se lavaron con el tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Sigma-Aldrich) para eliminar posibles restos de FBS. Inmediatamente se incubaron las células AGS en 5 ml de medio Ham's-F12 y las KATO-III en 5 ml de RPMI 1640, ambos suplementados con 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina. A las 24 horas se recogió el medio de cultivo (secretoma), se centrifugó a 650 g durante 5 minutos para eliminar las células que se pudieran haber desprendido y se procesó inmediatamente.

2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos se realizaron en ratas *Rattus norvegicus* de la variedad Sprague-Dawley procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. Las ratas fueron estabuladas en el momento de su llegada y

alimentadas con libre acceso a agua y pienso comercial estándar con una composición de un 5.5% de grasa, 23% de proteína y 70% de carbohidratos; 3.5 Kcal/g (SAFE-Panlab, España) durante 5-7 días para su aclimatación antes de comenzar los experimentos. Se mantuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura (22 ± 2ºC) y en ciclos alternativos de luz y oscuridad de 12 horas. Todos los protocolos de manipulación y experimentos llevados a cabo han sido aprobados previamente por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Santiago de Compostela cumpliendo las Normas de Cuidado de Animales de Laboratorio y la Ley Internacional de Experimentación Animal.

3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.1 Tratamientos farmacológicos

En todos los tratamientos se utilizaron como control animales de las mismas características tratados con el vehículo correspondiente.

- Ghrelina humana (Global Peptides, Fort Collins, CO, EUA): Administración icv de 6 µg/rata en salino, en el tiempo 0 del experimento.
- Rimonabant: Inyección ip de 3 mg/Kg rata 1 hora antes del sacrificio. El rimonabant se disuelve en un vehículo de DMSO-salino 70%.
- AM281 (Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, EUA): Inyección ip de 3 mg/Kg rata en DMSO 1 hora antes del sacrificio.
- Rapamicina (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA): administración ip diaria de 1 mg/Kg rata en DMSO-salino 70% durante 6 días.

3.2 Procedimientos quirúrgicos

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron asépticamente en un quirófano y todo el material quirúrgico se esterilizó antes de la operación. Se utilizó como anestésico una mezcla de ketamina-xilacina: ketamina: 42.5% (Ketolar 50 mg/ml, Parke-Davis, Morris Plañís, N.J., EUA), xilacina 20% (Rompun 2mg/ml, Bayer Leverkusen, Alemania) y suero salino fisiológico 37.5%. La anestesia se administró por vía ip en una dosis de 200 µl por cada 100 gramos de peso corporal. En todas las cirugías se realizó operación simulada en animales de las mismas características como control.

3.2.1 Implantación de la cánula intracerebroventricular para inyección de ghrelina

Esta operación se realizó 5 días antes del experimento. El objeto de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral. Se utilizaron cánulas de polietileno (PE20, Clay-Adams Becton-Dickinson, NJ, EUA) de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro interno). En uno de los extremos de la cánula se puso un tope a 3.5 mm de distancia, siendo esta la longitud de la cánula que se introdujo en el cráneo. El extremo opuesto de la cánula se selló el día del experimento.

Una vez anestesiados los animales, se realizó un corte transversal en la piel de la cabeza, a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual fue retirado con ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localizó el bregma y se utilizó como punto de referencia. Se realizó un orificio en las coordenadas 1.2 mm lateral y 1 mm posterior, a través del cual se introdujo la cánula. Para fijar perfectamente la cánula se recubrió la zona con cianoacrilato (Loctite Super Glue-3, Henkel, Düsseldorf, Alemania). La colocación correcta de la cánula se comprobó con la inyección de azul de metileno, lo cual claramente tiñó el ventrículo lateral.

3.2.2 Vagotomía

Las vagotomías se realizaron una semana antes del experimento. Las ratas se colocaron en posición decúbito supino y se llevó a cabo una incisión en la línea media abdominal. El hígado se desplazó cuidadosamente hacia la izquierda para exponer el esófago. Las ramas dorsal y ventral del nervio vago se expusieron y separaron del esófago. Cada rama del nervio se ligó con sutura quirúrgica en dos puntos en una posición distal y se cauterizó entre las suturas para prevenir sangrados. Los músculos abdominales y la piel se suturaron con seda quirúrgica. En los controles quirúrgicos el nervio se expuso pero no fue atado o cauterizado. La efectividad de la vagotomía se valoró mediante la observación del estómago *post-morten*. Se incluyeron en el análisis las ratas que presentaron un aumento de al menos tres veces el tamaño del estómago tras la vagotomía.

3.2.3 Orquidectomía

La orquidectomía se realizó por vía escrotal. Se colocaron las ratas en posición decúbito supino y se procedió a la apertura secuencial del escroto por la línea media y de ambas bolsas testiculares. A continuación se realizó la ligadura del conducto deferente y el pedículo vascular de cada testículo para evitar hemorragias, y se extrajo dicho testículo tras un corte. Finalmente se suturaron todas las incisiones. En los controles quirúrgicos se expusieron los testículos pero no se realizó la extracción.

3.2.4 Ovariectomía

Los animales se colocaron en posición decúbito lateral para proceder a la operación. Se realizó una incisión en la piel y la pared abdominal dorsal. Con ayuda de unas pinzas se separó la grasa gonadal para visualizar el ovario. Previamente a su eliminación, se ligó la trompa de Falopio para evitar hemorragias. Seguidamente a la extracción se procedió a coser el músculo y la piel. Se repitió la operación en el otro lado del animal con el fin de eliminar los dos ovarios. En los controles quirúrgicos se realizó la incisión bilateral y se expusieron los ovarios pero no se realizó la extirpación.

3.2.5 Implantación de cánulas subcutáneas

Se utilizaron cánulas de 2 cm de Silastic de 3.18 mm de diámetro externo y 1.98 mm de diámetro interno (Dow Corning, Midland, EUA). Previamente se selló un extremo con silicona y se rellenó la cánula con 3-benzoato de β-estradiol (Sigma-Aldrich) o propionato de testosterona (Sigma-Aldrich). Tras llenar completamente la cánula, se selló el otro extremo con silicona y se dejó secar hasta el día siguiente.

Para la implantación, se realizó una incisión subcutánea en la zona dorsal del animal, se introdujo la cánula, y por último, se suturó la incisión. En las ratas control se implantaron cánulas vacías.

3.3 Extracción de tejidos

El sacrifico se realizó por decapitación en el quirófano del animalario. La sangre troncal se recogió en tubos con 7.2 mg de EDTA (BD Vacutainer, NJ, EUA) y se centrifugó inmediatamente a 2500 g y 4℃ durante 15 minutos para separar el plasma que se almacenó a -80ºC hasta su uso. Se utilizó material quirúrgico previamente esterilizado. El tejido adiposo subcutáneo (TAS) y el estómago de los

animales se extrajeron cuidadosamente, minimizando todo lo posible las contaminaciones, en especial con pelo. El tejido adiposo subcutáneo se extrajo de los depósitos situados bajo la piel de las ingles y fue congelado en hielo seco hasta su almacenamiento a -80ºC.

Se seleccionó la parte glandular del estómago y se lavó en el tampón KRH [NaCl 125 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.3 mM, $CaCl_2$ 2 mM, glucosa 6 mM, HEPES 25 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y pH 7.4] para eliminar los restos de comida y cualquier otro contaminante (vasos sanguíneos y tejido conectivo).

- Los estómagos destinados a experimentos de secreción se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente en tampón KRH estéril. Posteriormente se hicieron lavados sucesivos con KRH en una campana de flujo laminar en condiciones estériles.
- Los estómagos destinados a inmunohistoquímica se introdujeron en un tubo con formol 4% a temperatura ambiente.
- Para estudios analíticos se realizó un raspado suave de la mucosa de estómago con bisturí que fue almacenada directamente a -80℃ para ensayos de proteína o sumergida en 300 µl de TRIzol (Invitrogen, CA, EUA) para ensayos de ARNm en tubos de microcentrífuga *eppendorf* a -80ºC.

3.4 Cultivos de explantes

El protocolo de cultivo de explantes se basó en el desarrollado por Seoane y colaboradores en 2007 [90]. Los explantes de estómago se incubaron en placas de cultivo de seis pocillos (Iwaki, Tokio, Japón) con 2.5 ml de medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) a 37ºC bajo una atmósfera humidificada de 95% de aire 5% de CO_2. En primer lugar, se realizó una pre-incubación con el fin de estabilizar el tejido tras la extracción y eliminar en la medida de lo posible todos los contaminantes, tanto sangre como componentes intracelulares procedentes de la rotura celular. Después de una hora se aspiró el medio y se añadieron 2.5 ml de medio fresco en cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. Tras este tiempo, se recogió el medio de cultivo (secretoma), se centrifugó a 650 g durante 5 minutos para separar células que se pudieran haber desprendido, y se congeló a -80ºC hasta su uso.

En el cultivo de explantes de estómago de muestras destinadas a estudios proteómicos se realizaron algunas modificaciones en el protocolo. Se incubó el estómago entero (sin eliminar previamente la parte aglandular) en 4 ml de medio DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich). Tras la obtención del secretoma se procedió inmediatamente a su procesado.



Figura 17. Esquema del protocolo de cultivo de explantes de estómago.

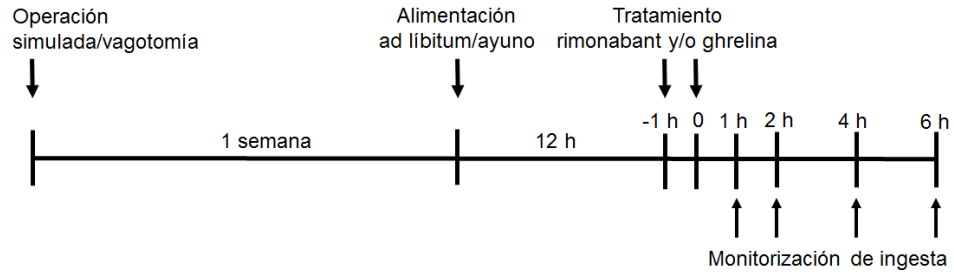
4 DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 Estudio del efecto de la administración de ghrelina y rimonabant sobre la ingesta

Se implantó una cánula icv en ratas macho adultas de 250-300 gramos en las que se midió la ingesta de comida diariamente durante los días previos al experimento. Los animales se dividieron en 3 grupos: ratas alimentadas ad líbitum con acceso libre a comida, ratas en ayuno nocturno privadas de comida las 12 horas anteriores al experimento y ratas vagotomizadas en ayuno nocturno 12 horas. Estos tres grupos se sometieron a 4 tratamientos diferentes (n=8-10/grupo):

- Vehículo ip (DMSO-salino 70%) + vehículo icv (salino)
- Vehículo ip (DMSO-salino 70%) + ghrelina 6 µg/rata icv
- Rimonabant 3 mg/Kg ip + vehículo icv (salino)
- Rimonabant 3 mg/Kg ip + ghrelina 6 µg/rata icv

La ingesta de comida se monitorizó a tiempos de 1, 2, 4 y 6 horas tras la inyección.



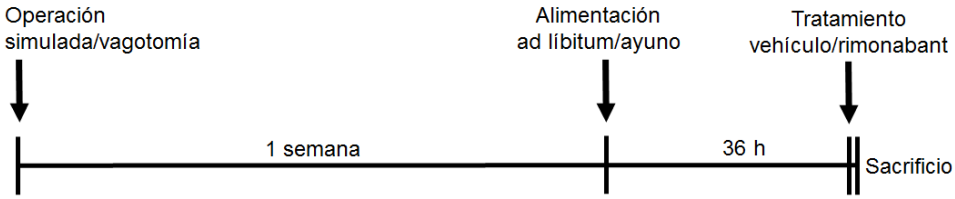
4.2 Estudio del efecto del bloqueo farmacológico del receptor de CB1 sobre los niveles de ghrelina

4.2.1 Tratamiento con rimonabant *in vivo*

Para estudiar si el bloqueo de CB1 periférico afecta directamente a la secreción de ghrelina por el estómago, se dividieron ratas macho adultas en 4 grupos (n=10/grupo):

- Control (C): operación simulada + vehículo ip
- Rimonabant (R): operación simulada + rimonabant ip
- Vagotomía (V): vagotomía + vehículo ip
- Vagotomía + rimonabant (V+R): vagotomía + rimonabant ip

Estos 4 grupos se realizaron tanto en ratas con alimentación ad líbitum (AL) como en ratas sometidas a 36 horas de ayuno.



4.2.2 Tratamiento con rimonabant *in vitro*.

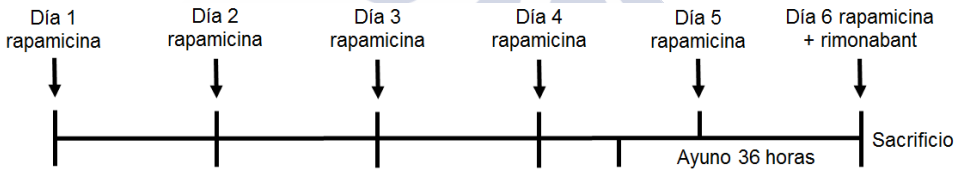
Para observar el efecto del rimonabant *in vitro*, se extrajeron los estómagos de animales con vagotomía u operación simulada sometidos a alimentación ad líbitum o ayuno de 36 horas, y se desarrolló el modelo de explantes, en el que se incubaron los estómagos con 1 µM de rimonabant o vehículo (DMSO-salino 70%) durante las 2 horas de cultivo.

Además se hizo un ensayo dosis-respuesta con diferentes tratamientos de rimonabant (0, 2.5 y 5 µM) en explantes de estómago de ratas sometidas a 36 horas de ayuno (n=10).

4.2.3 Respuesta a rimonabant y rapamicina

Con el objeto de estudiar si el efecto del rimonabant sobre la secreción de ghrelina está mediado por la ruta de señalización de mTOR, se bloqueó esta ruta mediante la administración crónica de rapamicina durante 6 días. Se utilizaron ratas macho adultas de aproximadamente 250 g sometidas a 36 h de ayuno que se dividieron en 4 grupos experimentales (n=8/grupo):

- Control (C): vehículo ip 6 días + vehículo ip 1h
- Rimonabant (R): vehículo ip 6 días + rimonabant 3 mg/Kg ip 1h
- Rapamicina (Ra): rapamicina 1 mg/Kg ip 6 días + vehículo ip 1h
- Ra + R: rapamicina 1 mg/Kg ip 6 días + rimonabant 3 mg/Kg ip 1h



4.2.4 Tratamiento con AM281

Para demostrar el efecto del bloqueo farmacológico de CB1 sobre la regulación de ghrelina, se utilizó otro inhibidor de CB1, el AM281. Se utilizaron ratas macho adultas de aproximadamente 250 g sometidas a 36 horas de ayuno, que fueron tratadas con vehículo (DMSO) o AM281 a dosis de 3 mg/Kg ip (n=12/grupo).

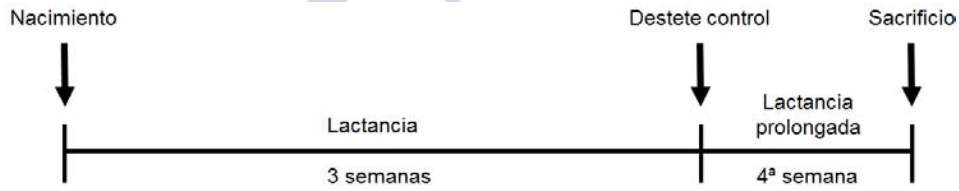
4.3 Estudio de ontogenia

Para valorar los posibles cambios de los niveles de NUCB2/nesfatina-1 con la edad y el sexo, se utilizaron ratas macho y hembra de distintas edades: 2, 4, 6 y 8 semanas (n=10/grupo). Al alcanzar la edad apropiada las ratas fueron sacrificadas.

4.4 Modelo de retraso del destete

Con el objetivo de inducir lactancia prolongada se llevó a cabo una programación perinatal mediante la modificación de la edad de destete en ratas lactantes. En el

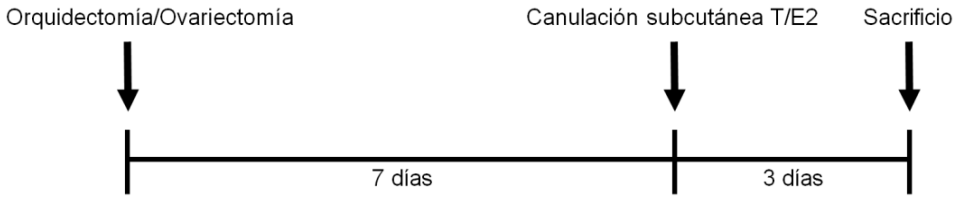
momento del parto las crías fueron mezcladas y distribuidas entre las madres de manera aleatoria, con el fin de minimizar otros factores no estudiados como la carga genética, factores fetales, etc. Se ajustó el tamaño de la camada a 12 crías para evitar que el exceso o déficit de alimentación neonatal pudiese interferir en los resultados. Durante el período de lactancia las madres se alimentaron ad líbitum con pienso comercial. Para la formación de las camadas se utilizaron ratas hembra y macho en números similares en todos los casos. El grupo control (C) fue destetado a la edad de tres semanas y se alimentó de pienso estándar durante la cuarta semana. En el grupo de retraso del destete (RD) los animales permanecieron con la madre durante una semana más de lo habitual. Todos los animales fueron sacrificados en el día 28 (fin de la 4ª semana) (n=10/grupo).



4.5 Estudio del efecto de los esteroides gonadales sobre los niveles de NUCB2/nesfatina-1

Se utilizaron ratas macho y hembra adultas de 8 semanas de edad para estudiar el efecto de los esteroides gonadales en la regulación de NUCB2/nesfatina-1. Las ratas fueron orquidectomizadas u ovariectomizadas, y una semana después se les implantó una cánula subcutánea con propionato de testosterona (T) en machos y 3-benzoato de β-estradiol (E2) en hembras. Tres días después las ratas fueron sacrificadas. Los grupos experimentales fueron los siguientes (n=8-10):

MACHOS	HEMBRAS
- Operación simulada + cánula vacía	- Operación simulada + cánula vacía
- Orquidectomía + cánula vacía	- Ovariectomía + cánula vacía
- Orquidectomía + T	- Ovariectomía + E2



4.6 Modelo de ayuno y realimentación

Se emplearon ratas macho adultas de aproximadamente 250 g que fueron asignadas a uno de los tres grupos experimentales (n=10/grupo):

- Alimentación control ad líbitum: Acceso libre a comida durante 48 horas.
- Ayuno: Restricción de comida durante las 48 horas anteriores al sacrificio.
- Realimentación: Tras 48 horas en ayuno las ratas tuvieron acceso libre a comida durante la hora previa al sacrificio.

4.7 Modelo de obesidad inducida por la dieta

El modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) se utilizó para estudiar los efectos de la obesidad producida al someter a los animales a una dieta hipercalórica alta en grasa. Se utilizaron ratas adultas de aproximadamente 250 g que se dividieron en dos grupos experimentales alimentados con dos tipos diferentes de dieta durante 10 semanas. El primer grupo denominado control (C) fue alimentado con dieta estándar. El grupo DIO se alimentó con una dieta alta en grasa (*Hight fat diet* D12492; Research Diets Inc., NJ, EUA) formada por 60% de grasa, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos; 5.24 Kcal/g.

5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1 Estudios de proteína

5.1.1 Extracción de proteínas totales

5.1.1.1 Secretomas

Los secretomas recogidos para ensayos de proteómica y *western blot* fueron concentrados y desalados mediante el uso de filtros de ultracentrifugación (*Amicon Ultra 3kDa cut off,* Millipore, Billerica, EUA) hasta un volumen de entre 100-250 µl centrifugando a 3200 g y 4ºC. Tras este paso, los secretomas se procesaron según el tipo de técnica a la que estarían destinados:

- Las muestras destinadas a técnicas de inmunodetección por *western blot* se cuantificaron directamente tras ser concentradas.
- Las muestras destinadas a técnicas proteómicas se precipitaron utilizando un kit basado en el método de precipitación modificado de ácido tricloroacético/acetona (*2-DE Clean Up kit*, GE, Uppsala, Suiza). Posteriormente fueron resuspendidas en tampón de carga para electroforesis bidimensional (tampón 2D) tal y como se describe en el apartado de Electroforesis bidimensional.

5.1.1.2 Proteína intracelular procedente de líneas celulares

Se retiró el medio de cultivo y se lavó la placa 2 veces con el tampón PBS frío. A continuación se añadieron 250 µl por placa de tampón de lisis RIPA [tris 200 mM pH 7.4, NaCl 130 mM, glicerol 10%, SDS 0.1%, tritón x-100 1%, $MgCl_2$ 10 mM] con un cóctel de inhibidores de proteasas y un cóctel de inhibidores de fosfatasas ambos a una dilución 1/100 (Sigma-Aldrich), y se dejó la placa en hielo durante 30 minutos agitando cada cierto tiempo. A continuación, se despegaron las células que aún estaban adheridas a la placa con un raspador. El lisado celular se pasó 7 veces a través de una jeringa de 1 ml con aguja de 30G de grosor (BD Vacutainer) para conseguir disgregar todas las células. Finalmente se centrifugaron los lisados a 18000 g durante 10 minutos a 4ºC y se almacenó el sobrenadante a -80ºC hasta su uso.

5.1.1.3 Proteína intracelular procedente de tejido

Se separaron aproximadamente 0.1 g de tejido (mucosa de estómago o TAS) en un tubo *eppendorf* de 2 ml al cual se añadieron 250 µl de tampón de lisis RIPA y un cóctel de inhibidores de proteasas, así como un cóctel de inhibidores de fosfatasas ambos a una dilución 1/100. Los tejidos se homogeneizaron mecánicamente utilizando un homogenizador automático *TissueLyser II* (Qiagen, Tokio, Japón) durante 3 minutos a 30 Hz. Posteriormente las muestras de mucosa se centrifugaron durante 10 minutos y las de grasa 30 minutos, en ambos casos a 18000 g a 4ºC. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -80ºC hasta su uso.

5.1.2 Cuantificación de proteína

La cuantificación se realizó mediante el kit *RC DC Protein Assay* siguiendo las instrucciones del fabricante (Biorad, CA, EUA). Este kit es apto para muestras procesadas con tampones que contienen detergentes y reductores como el tampón 2D. La cuantificación se realizó a 750 nm mediante un lector *VersaMax ELISA Microplate Reader* (Molecular Devices, CA, EUA).

5.1.3 Inmunoprecipitación de ghrelina

La inmunoprecipitación de ghrelina se realizó con 1 mg de proteína procedente de muestras frescas de secretoma y mucosa de estómago. Cada inmunoprecipitación se realizó en un volumen total de 1 ml de RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y 2 µg de anticuerpo policlonal antighrelina (Santa Cruz Biotechnology) a 4ºC durante la noche. Las muestras fueron incubadas con bolitas de agarosa cubiertas de proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) a 4ºC durante dos horas, y a continuación, centrifugadas y lavadas tres veces en tampón RIPA frío y tres veces en agua ultrapura. Las proteínas unidas a las bolitas de proteína A/G fueron eluidas en tampón diferente según el tipo de técnica a la que estarían destinadas:

- Las muestras destinadas a ensayos de *western blot* se hirvieron durante 5 minutos en tampón Laemmli (TL) [SDS 2% (p/v), tris 80 mM pH 6.8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1% y β-mercaptoetanol 1%].
- Las muestras destinadas a identificación por espectrometría de masas fueron eluidas en ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% a 4ºC.

5.1.4 Inmunodetección mediante *western blot*

Las proteínas de interés se inmunodetectaron mediante la técnica analítica *western blot* en la cual se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas de una muestra por su peso molecular, que posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para ser detectadas con anticuerpos específicos contra la proteína a estudio.



Figura 18. Esquema de trabajo para inmunodetección de proteínas por *western blot.*

5.1.4.1 Preparación de la muestra

La cantidad total de proteína de la muestra usada varió entre 10 y 70 µg dependiendo del tipo de anticuerpo y el kit de quimioluminiscencia usados. En el caso del plasma se usaron 3-5 µl de muestra. Las muestras se diluyeron en agua ultrapura para obtener un volumen total de 20 µl al que finalmente se le añadió 5 µl de TL 5x [SDS 10% (p/v), tris 400 mM pH 6.8, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.5% y β-mercaptoetanol 5%]. Tras la añadir el tampón, las muestras se hirvieron a 100℃ en un *termoblock* durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. En el caso de que no se fueran a utilizar inmediatamente, se congelaron a -20ºC hasta su uso.

5.1.4.2 Electroforesis monodimensional

Se utilizó la electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli [270]. Los geles se prepararon en dos fases:

- Fase separadora: Los porcentajes de acrilamida variaron según el tamaño de la proteína que se pretendía separar. Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida 29:1 30%, tris 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, persulfato de amonio (APS) 10% y tetrametiletilenediamina (TEMED).
- Fase concentradora: El porcentaje de acrilamida fue siempre 5%. Se prepararon a partir de soluciones stock de acrilamida/bisacrilamida 29:1 30%, tris 1 M pH 6.8, SDS 10%, APS 10% y TEMED.

Las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarse en el gel. Se utilizó una calle para cargar una mezcla de proteínas con pesos moleculares conocidos (*Precision Plus Protein Standard*, Bio-Rad) para determinar el peso de las proteínas analizadas.

La electroforesis se realizó en el tampón de electroforesis [tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%] a un voltaje constante de 60 v hasta que el frente visible de azul de bromofenol pasó al gel separador, y posteriormente se mantuvo a 90 v constantes hasta el final de la separación.

5.1.4.3 Transferencia

Se utilizó el método de transferencia húmeda para traspasar las proteínas separadas en gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad). La transferencia se realizó en tampón de transferencia a 4ºC [tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%] a 200 mA constantes en frío y el tiempo varió en función del tamaño de la proteína de interés. Para péptidos pequeños como la ghrelina la transferencia se realizó durante 50 minutos, para proteínas con un peso molecular superior a 250 kDa durante 2 horas y 30 minutos, y en los pesos intermedios durante 1 hora y 30 minutos.

5.1.4.4 Tinción con rojo Ponceau

La eficacia de la transferencia se comprobó mediante la tinción Ponceau [rojo Ponceau S 0.1% (p/v), ácido acético 1%]. Se lavó el exceso con solución de lavado de Ponceau [ácido acético 1%] y se escaneó la membrana con un escáner *CanoScan LiDE 210* (Canon, Japón) a una resolución de 600 ppp. Las imágenes obtenidas sirvieron como control de carga en el caso de muestras de secretoma y plasma ya que no se pudo encontrar una proteína secretada de forma constitutiva como ocurre con la β-actina o el GAPDH a nivel intracelular para utilizar como control de carga. A continuación las membranas se lavaron 5 minutos con solución de lavado [PBS pH 7.4, tween-20 0.3%].

5.1.4.5. Bloqueo de la membrana

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo durante 1 hora en agitación. Dependiendo de las especificaciones del anticuerpo usado para la inmunodetección, se utilizó como

solución de bloqueo leche en polvo desnatada comercial (Dietisol) o albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich), ambos al 5% disueltos en PBS con tween-20 0.1%.

5.1.4.6 Inmunodetección

Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo específico contra la proteína a detectar diluido en solución de bloqueo durante toda la noche en agitación a 4ºC (Tabla 1). Al día siguiente se hizo un lavado de 1 hora en agitación con solución de lavado y posteriormente se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Thermo-Scientific, MA, EUA) diluido en solución de bloqueo (Tabla 1). Tras la incubación, se lavó la membrana 1 hora con solución de lavado y se indujo la reacción de quimioluminiscencia mediante la incubación con el sustrato *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). En la inmunodetección de ghrelina se utilizó un kit más sensible (*Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*, Thermo Scientific). Para la visualización se utilizaron placas radiográficas Mamoray (Agfa Healthcare, Bélgica), que se revelaron utilizando una máquina reveladora automática o manualmente.

Anticuerpo primario	Referencia	Mw (kDa)	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
β-actina	A 5316	42	Sigma-Aldrich	1:5000	anti-ratón	1:10000
Ghrelina (C-18)	sc-10368	3	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	anti-cabra	1:10000
p-mTOR (Ser2448)	2971	289	Cell Signalling	1:1000	anti-conejo	1:5000
mTOR	2972	289	Cell Signalling	1:1000	anti-conejo	1:5000
p-S6K1 (Thr389)	9205	70	Cell Signalling	1:1000	anti-conejo	1:5000
S6K1	9202	70	Cell Signalling	1:1000	anti-conejo	1:5000
Nesfatina-1	H-003-22	50	Phoenix pharmaceuticals	1:1000	anti-conejo	1:5000
GAPDH	AM4300	36	Applied Biosystems	1:5000	anti-ratón	1:10000
Calponina-1	sc-58707	34	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	anti-ratón	1:5000

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios con sus correspondientes anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

5.1.4.7 Análisis de resultados

Una vez reveladas las placas se escanearon a una resolución de 600 ppp (*CanoScan LiDE 210*) y se realizó la densitometría de las bandas mediante el programa de procesado y análisis de imagen *ImageJ*. Los resultados se expresan en porcentajes relativos al control de cada grupo.

5.1.5 Inmunoensayo enzimático para NUCB2/nesfatina-1

Los niveles de la proteína NUCB2/nesfatina-1 se determinaron en el plasma y el secretoma de estómago de rata utilizando para ello un kit comercial de inmunoensayo enzimático (EIA) (Phoenix Pharmaceuticals, INC, Burlingame, CA, EUA). El kit está dirigido contra la nesfatina-1 de 82 aa, pero puede reconocer también la proteína entera NUCB2 ya que contiene dicho fragmento. El rango de detección es de 0.1 a 1000 ng/ml. El protocolo seguido fue el especificado en las instrucciones del kit. La cuantificación se realizó a 450 nm mediante un lector *VersaMax ELISA Microplate Reader* (Molecular Devices).

Los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 se expresan en ng/ml. En los resultados de explantes de estómago los niveles de NUCB2/nesfatina-1 se corrigen por el peso del estómago en el medio de cultivo y se representan en ng/ml/gramos de tejido.

5.1.6 Radioinmunoensayo (RIA) de ghrelina

Los niveles de ghrelina total se determinaron en el plasma y secretoma de estómago de las ratas utilizando kits de RIA comerciales que utiliza ghrelina marcada con I^{125}. Para medir la ghrelina en los experimentos realizados con tratamientos de rimonabant se utilizó el kit de RIA de ghrelina (total) de Millipore, cuyo límite de sensibilidad es de 93 pg/ml. La medición de ghrelina en los experimentos de tratamientos con AM281 y en el ensayo dosis-respuesta de rimonabant *in vitro* se realizó utilizando el kit de RIA de ghrelina total de Phoenix Pharmaceuticals, INC. El límite de detección de este kit es de 10 pg/ml.

En ambos casos el protocolo seguido fue el especificado en las instrucciones del kit. Para los secretomas de estómago se realizó una dilución previa 1:40 en el tampón de ensayo proporcionado por el fabricante. La radiactividad se midió mediante un contador γ (Wizard 1470, Wallac). Las concentraciones de ghrelina se calcularon automáticamente utilizando el programa RIAcalc-LBK (Wallac). Los

niveles circulantes de ghrelina total se expresan en pg/ml. En los resultados de explantes de estómago los niveles de ghrelina total se corrigen por el peso del estómago en el medio de cultivo y se representan en pg/ml/gramos de tejido.

5.1.7 Inmunohistoquímica

Las muestras de estómago a estudio se realizaron en la Plataforma de Inmunohistoquímica disponible en el Servicio de Anatomía Patológica-Departamento de Ciencias Morfológicas (CHUS). La fijación de las muestras se realizó por inmersión en formalina tamponada neutra 10% e inclusión en parafina. Las secciones de 4 µm de ancho se montaron en portaobjetos FLEX IHC (Dako, Glostrup, Dinamarca).

La inmunodetección se realizó de forma automática en un equipo *AutostainerLink 48* (Dako). El protocolo seguido fue el siguiente:

1) Bloqueo durante 5 min con el reactivo de bloqueo de peroxidasa EnVision FLEX (Dako).

2) Incubación con el anticuerpo primario específico contra la proteína de interés durante 30 minutos.

3) Incubación con el anticuerpo secundario + sistema de detección correspondientes (Tabla 2).

4) Revelado durante 10 min con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako).

5) Tinción de los núcleos durante 9 minutos con hematoxilina EnVision FLEX (Dako).

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Sistema de detección
Ghrelina (C-18)	Santa Cruz Biotechnology	1:500	anti-cabra	LSAB (15')+ sistema HRP (15')
CB1 (H-150)	Santa Cruz Biotechnology	1:50	anti-conejo	EnVision FLEX/HRP (20')
Sinaptofisina	Dako	sin diluir	anti-ratón	EnVision FLEX/HRP (20')

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios con sus correspondientes anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

5.2 Estudios de expresión de ARNm

5.2.1 Extracción de ARN

Se pesaron 0.1 g de tejido (mucosa o TAS) y se introdujeron en un *eppendorf* de 2 ml con 800 µl del agente TRIzol® y una bola de metal para ser homogenizado mecánicamente mediante el uso de un *TissueLyser II* durante 3 minutos a 30 Hz. Tras la homogenización, la muestra se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 8ºC y se recogió el sobrenadante.

Se añadieron 160 µl de cloroformo, se agitó el *eppendorf* por inversión y se incubó aproximadamente durante 3 minutos hasta verse bien diferenciadas las dos capas. Posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4ºC, se recogió el sobrenadante con cuidado de no tocar la interfase blanquecina.

Se añadieron 400 µl de isopropanol, se agitó el *eppendorf* por inversión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante por decantación. A partir de esta centrifugación la muestra debe permanecer siempre en hielo.

Posteriormente se añadieron 800 µl de etanol 75% diluido en H_2O DEPC (H_2O bidestilada con dietilpirocarbonato 0.1%). Se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4ºC y se eliminó el sobrenadante decantando cuidadosamente. Una vez seco, se resuspendió el *pellet* en 25 µl de H_2O DEPC.

Por último se cuantificó el ARNm en un *NanoDrop 2000c Spectophotometer* (Thermo Scientific).

5.2.2 Tratamiento con DNasas

Se utilizó el kit comercial *Ambion® DNA-free™* siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, CA, EUA). Para el tratamiento se calculó el volumen necesario para retrotranscribir 2 µg de ARN en un volumen máximo de 12.5 µl de H_2O DEPC. Se añadió a la muestra una mezcla con 1.5 µl de tampón y 1 µl de DNasa I. Se incubó el *eppendorf* en el termociclador *Illumina Eco Real Time PCR System* (Cultek S.L.U., España) durante 30 minutos a 37ºC. Tras la incubación se pasó *el eppendorf* a hielo. Se añadieron 2 µl del reactivo de inactivación de la DNasa y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se centrifugó la muestra a 10000 g durante 1.5 minutos y se recogieron 10 µl de sobrenadante. La muestra se congeló a -80ºC hasta su uso.

5.2.3 Retrotranscripción

Para generar el ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA). En primer lugar se preparó una mezcla con 2 µl de tampón de retrotranscripción 10x, 0.8 µl de mezcla de dNTP 25x (100 mM), 2 µl de cebadores de retrotranscripción aleatorios 10x, 1 µl de transcriptasa reversa MultiScribe y 4.2 µl de H_2O DEPC. Se pipetearon 10 µl de la mezcla sobre 10 µl de la muestra y se colocó en el termociclador utilizando el siguiente programa: 10 minutos a 25ºC; 120 minutos a 37ºC; 5 minutos a 85ºC, y se mantuvo a 4ºC hasta la recogida de las muestras.

5.2.4 PCR cuantitativa

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se realizó mediante el sistema de sondas comerciales TaqMan® (Tabla 3) utilizando los reactivos (*TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG*) y placas suministrados por Applied Biosystems. La primera vez que se utilizó un gen o un tejido se hizo siempre una prueba de diluciones: sin diluir, 1:50, 1:500, 1:5000. Se consideraron correctas las diluciones con aproximadamente 3 CT (ciclo umbral) entre una y otra, y se escogió aquella dilución con 20-30 CTs.

Se preparó la mezcla (1 µl de sonda y 10 µl de la Master Mix por pocillo) para cada gen, tanto para el gen problema como para el gen constitutivo. Después de añadir 11 µl de mezcla por pocillo, se adicionaron 9 µl del ADNc correspondiente obtenido tras la retrotranscripción a cada pocillo de la placa. Finalmente la placa se introdujo en el equipo de PCR a tiempo real *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando el protocolo estándar de 2 horas de duración. En todos los experimentos se analizaron las muestras por duplicado.

Los resultados se analizaron utilizando el software proporcionado por el aparato. Los niveles de expresión de todos los genes se normalizaron según los niveles de expresión del gen constitutivo HPRT1 (fosforribotransferasa hipoxantina 1). Los resultados se expresan como unidades arbitrarias relativos al valor medio del grupo control.

Gen	Referencia
HPRT1	Rn01527840-m1
GHRL	Rn01425835-m1
CB1	Rn00562880-m1
NUCB2	Rn01510621-m1
Calponina-1	Rn00582058-m1
GAPDH	Rn0177563-g1

Tabla 3. Lista de sondas/cebadores utilizados en este trabajo suministrados por Applied Biosystems (Life Technologies).

5.3 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media±SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el software *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc, CA, EUA). Se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney para comparar grupos 2 a 2, considerando una probabilidad $p<0.05$ significativa y una $p<0.01$ muy significativa.

6 TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Las técnicas proteómicas se realizaron en la Unidad de Proteómica del Hospital Clínico Universitario de Santiago. Concretamente los pasos previos a la identificación por espectrometría de masas se realizaron en la sala blanca de bajo presión positiva minimizando así la contaminación de las muestras por queratinas. La identificación por espectrometría de masas así como la interpretación de resultados y la creación de tablas con todas las proteínas identificadas fue realizada por la responsable de la Unidad en el momento de la realización (Dra. Jana Alonso).

6.1 Electroforesis bidimensional (2-DE)

Esta técnica permite separar las muestras en dos fases o dimensiones en función de su punto isoeléctrico (pI) y su masa molecular (Mw). Se utilizaron las muestras de proteína procedentes de los secretomas de estómago procesados según se ha descrito anteriormente, que fueron resuspendidas en tampón de carga para 2-DE (urea 5 M, tiourea 2 M, tributilfosfina (TBP) 2 mM, ditiotreitol (DTT) 65 mM, CHAPS 65 mM y NDSB-256 0.15 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

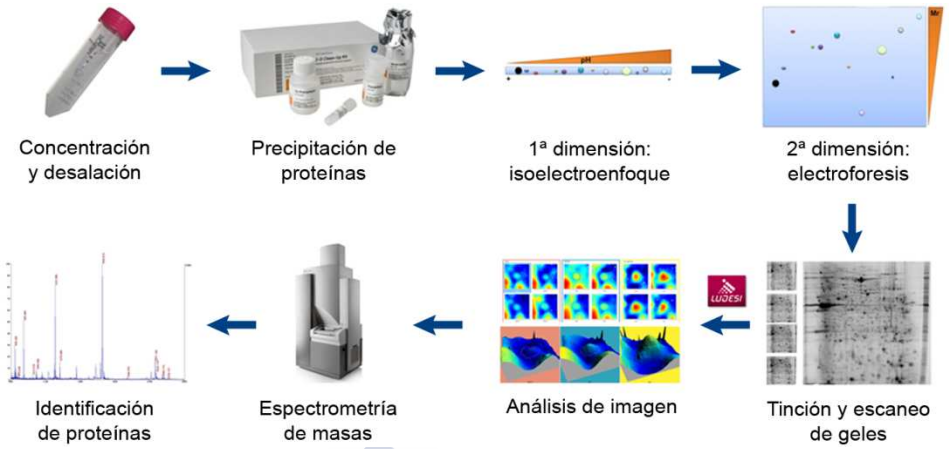


Figura 19. Esquema del flujo de trabajo llevado a cabo para el estudio de la secreción de estómago mediante técnicas proteómicas.

6.1.1 Primera dimensión: isoelectroenfoque (IEF)

En esta primera fase se separaron las proteínas según su pI mediante la aplicación de un campo eléctrico a lo largo de una tira del 4% de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado.

El primer paso fue preparar las muestras separando 300 µg de proteína en 250 µl de tampón 2-DE, y añadir una mezcla de anfolitos SERVALYT^{TM} para ayudar a la estabilización del isoelectroenfoque (SERVA Electrophoresis, Alemania) [pH 2-4 0.05%, pH 3-10 0.1%, pH 9-11 0.05%]. Se utilizaron tiras comerciales ReadyStrip^{TM} IPG Strips (Bio-Rad, CA, EUA) con rango de pH de 3 a 10 y una longitud de 17 cm. Para cargar las muestras en las tiras se utilizaron bandejas de rehidratación (Bio-Rad, CA, EUA) donde se pipeteó la muestra a lo largo del carril de la bandeja, y a continuación se colocó la tira con la parte del gel hacia abajo de forma que éste quedó en contacto con la muestra. Tras 5 minutos, se cubrió completamente la tira con aceite mineral (Bio-Rad, CA) y se dejó hidratar de forma pasiva toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se colocó la tira en la bandeja de isoelectroenfoque (Bio-Rad) correspondiente a su longitud; para facilitar el contacto con electrodos se utilizaron papeles de filtro humedecidos con agua ultrapura. Finalmente se cubrió la tira con aceite mineral y se introdujo la bandeja en el aparato de isoelectroenfoque *Protean IEF Cell* (Bio-Rad). EL IEF se realizó a 20ºC durante 10-12 horas mediante el programa establecido por la casa comercial formado por 4 fases: acondicionamiento

15 minutos a 250 v, incremento del voltaje hasta 10000 v, enfoque de 10000 a 60000 v, y mantenimiento a 500 v. Una vez finalizado el programa, se retiró la tira, se secó el exceso de aceite mineral en papel de filtro y se almacenó a -20ºC en la bandeja de rehidratación con la parte del gel hacia arriba hasta su uso.

.

6.1.2 Segunda dimensión: SDS-PAGE

La electroforesis de la segunda dimensión se realizó utilizando un método similar al descrito para la electroforesis monodimensional. Para ello se prepararon geles de poliacrilamida del tamaño correspondiente a la longitud de la tira de IEF utilizando un porcentaje de acrilamida del 12%. En este caso no se hizo una fase concentradora, sino que se preparó un gel de agarosa 0.5% en tampón de electroforesis para sumergir la tira de IEF antes de su polimerización de manera que la tira quede en contacto con la superficie del gel de poliacrilamida.

Antes de depositar las tiras sobre los geles de acrilamida, estas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de equilibrado (urea 4 M, tiourea 2 M, DTT 2%, tris 1 M (pH 6.8), SDS 2%, glicerol 30%, azul de bromofenol y H_2O ultrapura). Transcurrido el tiempo de incubación, se cubrió la superficie superior del gel con la mezcla de agarosa precalentada a 95ºC para inmediatamente colocar la tira de IEF sobre la superficie del gel de acrilamida. Se esperó unos minutos a que polimerizara la agarosa y se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis.

La separación de proteínas en la segunda dimensión se realizó a voltaje constante de 45 v por gel durante 1 hora, y a continuación manteniendo un voltaje de 60 v por gel usando el sistema *PROTEAN Plus Dodeca Cell* (BioRad) con refrigeración líquida a 17ºC hasta que el frente visible de azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel.

6.1.3 Tinción de geles de poliacrilamida con fluorescencia *(*Sypro Ruby)

Al terminar la electroforesis, los geles se depositaron en cubetas y se incubaron durante una hora en agitación con una solución de fijación [metanol 10%, ácido acético 7%]. Tras este tiempo la solución se sustituyó por la tinción fluorescente Sypro Ruby (Lonza) que se incubó durante 16 horas en agitación y oscuridad. Tras la tinción, se lavó el exceso de Sypro Ruby no unido a las proteínas con la solución de fijación en agitación y oscuridad durante una hora. Por último se sustituyó la solución por H_2O ultrapura y se escaneó el gel con una resolución de 16 bits y 200

µm a una longitud de onda de 488 nm mediante un escáner *Typhoon Scanner 9410* (GE). Los geles se almacenaron a 4ºC al vacío en un tampón compuesto por tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1% y azida sódica 0.01%.

6.2 Inmunodetección en geles 2-DE

Esta técnica es una variante de la inmunodetección clásica, en la cual los geles que se transfieren a la membrana de nitrocelulosa proceden de una electroforesis 2-DE. En la primera dimensión se emplearon tiras comerciales *Immobiline DryStrip pH 6-11, 7 cm* (GE). Para ello se separaron 100 µg de proteína en 125 µl de tampón de carga [urea 5 M, tiourea 2 M, TBP 2 mM, DTT 65 mM, CHAPS 65 mM, NDSB-256 0.15 mM e isopropanol 10%] y se añadió la mezcla de anfolitos correspondiente [pH 3–10 0.25%, pH 9–11 0.25%]. El IEF se realizó a 20ºC durante 9 horas utilizando el programa estándar del equipo para tiras de 7 cm, en el que el enfoque se produce entre 4000 y 20000 v. Posteriormente, las tiras se sumergieron inmediatamente en el tampón de hidratación [urea 4 M, tiourea 2 mM, DTT 12 mM, tris 50 mM pH 8.8, SDS 2%, glicerol 30%] durante 20 minutos.

Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida del 12%. Junto a la tira se colocó un trozo de papel de filtro empapado con marcador de pesos moleculares conocidos.

El protocolo seguido en la electroforesis y los pasos siguientes es similar al descrito en el apartado anterior de inmunodetección. Las imágenes de *western blot* comparadas entre sí se obtuvieron mediante la realización simultánea de IEF, 2ª dimensión, transferencia y revelado.

6.3 Análisis de imagen diferencial

El análisis diferencial de los geles 2-DE permitió identificar diferencias cualitativas y cuantitativas entre los grupos experimentales. En el análisis de este trabajo se compararon las imágenes de 3 grupos de 4 geles 2-DE cada uno (cada gel correspondiente a una muestra concreta de un solo animal independiente). Para poder comparar las imágenes, las condiciones de obtención de los geles fueron las mismas (geles, IEF, electroforesis y tinción), intentando obtener patrones de manchas lo más homogéneos posibles dentro de cada grupo experimental.

El análisis se llevó a cabo utilizando el software de análisis de imagen *Ludesi REDFIN BASIC* (Ludesi, Suecia, http://www.ludesi.com). Este análisis permitió un

control óptimo sobre las potenciales variaciones derivadas de la técnica. Para la detección de las manchas, segmentación y co-localización en los geles se siguió un protocolo estricto que aseguró un alto nivel de exactitud. Se midieron las intensidades de cada una de las manchas, normalizadas con la intensidad de fondo de los geles. Esta normalización permitió eliminar diferencias sistemáticas en los geles como son variaciones de la intensidad en la tinción, tiempo de escaneado y carga proteica; permitiendo una cuantificación y comparación adecuada de los diferentes geles. La varianza de los geles dentro de cada grupo se observó mediante la realización de un análisis de los componentes principales (PCA) antes de aplicar del análisis estadístico. Las manchas que presentaron un incremento de cambio mayor de 2 y una varianza de $p<0.001$ utilizando el test estadístico ANOVA, se consideraron diferencias muy significativas y fueron seleccionadas para su escisión e identificación por espectrometría de masas. Posteriormente se empleó el test Mann-Whitney para determinar las diferencias entre cada grupo considerándose significativo $p<0.05$.

6.4 Digestión proteica en gel

Las manchas seleccionadas se cortaron del gel de forma manual. Se utilizó un transiluminador *Dark Reader DR46B Transilluminator* (Clare Chemical Research, CO, EUA) que permitió observar la tinción fluorescente en oscuridad. Empleando una punta de pipeta de 200 µl se cortaron las secciones de gel en donde se encontraban las manchas. Los trozos de gel se introdujeron en tubos *eppendorf* individuales con aproximadamente 100 µl de H_2O ultrapura.

Antes de la identificación mediante el espectrómetro de masas fue necesario realizar una serie de modificaciones químicas de las proteínas seguido de una digestión proteolítica en gel. Se siguió el siguiente protocolo:

- Se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con 190 µl de solución de lavado [bicarbonato amónico 50 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA):50% metanol (Scharlau, España)]. Posteriormente se dejaron 10 minutos en 100 µl de acetonitrilo 100% (Scharlau) para deshidratar los geles y se secaron mediante una centrífuga de evaporación a vacío (*Savant SpeedVac Concentrator*, Thermo Scientific).
- Se redujeron los puentes disulfuro de la muestra incubando 30 minutos a 56ºC con 40 µl de DTT 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Tras este paso se realizaron 2

lavados de 10 minutos con 190 µl de la solución de lavado, para luego volver a deshidratar la muestra 10 minutos con 100 µl de acetonitrilo 100% y secar a vacío.

- A continuación se alquilaron las cisteínas 20 minutos en oscuridad con 40 µl de iodoacetamida 55 mM (Sigma-Aldrich) en bicarbonato amónico 50 mM. Posteriormente se repitieron los pasos de lavado, deshidratación y secado a vacío realizados en el paso anterior.
- Se añadió tripsina porcina 20 ng/µl (Promega, WI, EUA) en bicarbonato amónico 20 mM y se incubó a 37ºC durante 16 horas.
- Tras la digestión, se extrajeron los péptidos resultantes incubando durante 20 minutos con una solución de acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.5% (Scharlau, España). Este paso se realizó 3 veces para obtener la mayor cantidad posible de péptidos (40-50-40 µl).
- Finalmente se unieron las tres extracciones peptídicas, se concentraron a vacío y se resuspendieron en ácido fórmico 0.5%, para realizar la identificación.

6.5 Espectrometría de masas

6.5.1 Identificación de proteínas digeridas procedentes de 2-DE

Para su análisis mediante espectrometría de masas, se depositaron 0.5 µl del extracto peptídico resuspendido en aproximadamente 5 µl de 0.5% HCOOH, junto con 0.5 µl de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (3 mg en 1 ml de acetonitrilo 50% en TFA 0.1%) en una placa de 384 posiciones *Opti-TOF MALDI plate* (Applied Biosystems, CA) utilizando el método de capa fina.

La identificación de péptidos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas en tándem con fuente de ionización MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) *4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer* (Applied Biosystems) Los análisis de huella peptídica se adquirieron en modo “reflectrón” positivo, con un láser de Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*), operante a una longitud de onda de 335nm y con una media de 1000 disparos de láser por espectro. Para la calibración interna de los espectros, se tuvieron en cuenta al menos tres picos de autolisis de tripsina. Todos los espectros de fragmentación MS/MS se realizaron seleccionando iones padre (o precursores) con una resolución relativa de 300 (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) y supresión de metaestables.

Para realizar el análisis automático de los datos de MS se usó el software *4000 Series Explorer v3.5* (Applied Biosystems, CA). Los datos de los espectros de

MS y MS/MS se procesaron con el software *GPS Explorer v3.6* dotado con el motor de búsqueda *Mascot v2.1* (Matrix Science). Las identificaciones se obtuvieron utilizando la base de datos no redundante (SwissProt release 56.0), con una tolerancia para el precursor de 30 ppm, y de 0.35 Da para los fragmentos de MS/MS, un fallo en el corte de tripsina, oxidación de la metionina como modificación variable, y carbamidometilación de cisteínas como modificación fija. Todos los resultados de los espectros y de la base de datos fueron revisados manualmente. Se consideraron identificaciones significativas aquellas cuyo valor de identificación (según el algoritmo Mowse) fue mayor de 56 ($p<0.05$), y con un intervalo de confianza de 98. En el caso de espectros MS/MS, el intervalo de confianza fue superior a 95.

6.5.2 Identificación de ghrelina por espectrometría de masas

Se utilizaron las muestras procedentes de la inmunoprecipitación de ghrelina de mucosa y secretoma de estómago eluidas en TFA 0.1% como se describe en el apartado de inmunoprecipitación. Para la identificación mediante espectrometría de masas se utilizó una mezcla de matriz 1:1 (3 mg y 5 mg de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico).

6.6 Predicción de proteínas secretadas

Las proteínas identificadas se analizaron en el servidor *SecretomeP 2.0* (Centre for Biological Sequence Analysis: http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/), un método de predicción basado en la secuencia, capaz de identificar si las proteínas son secretadas tanto para las rutas clásicas como no clásicas de secreción [271]. Para cada secuencia aminoacídica introducida de la proteína (en formato FASTA), el servidor predice la posibilidad de que la proteína siga la ruta de secreción no clásica, otorgando los valores NN más altos (hasta un máximo de 1.00) a las proteínas que siguen las rutas de secreción clásica (aquellas proteínas con péptido señal). Las proteínas que obtuvieron una puntuación NN superior a 0.5 se consideraron secretadas por rutas de secreción no clásicas.

6.7 Análisis de la interacción entre proteínas

Se usó el software *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity Systems, CA, EUA) para examinar posibles interacciones entre todas las proteínas identificadas en los distintos secretomas estudiados por proteómica. Las rutas interactivas fueron generadas para representar las relaciones potenciales tanto directas como indirectas entre las proteínas secretadas. Los valores de probabilidad proporcionados por el software surgen a partir de un valor $p<0.05$. Sólo se escogieron las redes con al menos un 10% de participación entre todas las proteínas identificadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 PAPEL DE LA INTERACCIÓN ENTRE GHRELINA Y CB1 MEDIADA POR LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MTOR/S6K1 A NIVEL GÁSTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA

1.1 Efecto de la administración de ghrelina y rimonabant sobre la ingesta

Con el objetivo de comprobar si el bloqueo farmacológico del receptor CB1 a nivel periférico puede afectar a la acción central de la ghrelina en la regulación de la ingesta, se midió la ingesta de comida en animales tratados con ghrelina y rimonabant bajo diferentes estados nutricionales.

La inyección icv de ghrelina indujo un aumento de la ingesta a 1, 2 y 4 horas tras la administración. Estos incrementos fueron más evidentes en el grupo con alimentación ad líbitum (Control: 0.29±0.13, 0.42±0.15 y 0.65±0.30 vs Ghrelina: 1.45±0.16, 1.66±0.22 y 1.77±0.24 gramos de comida ingerida en 1, 2 y 4 horas, respectivamente; Figura 20A), que en los animales sometidos a ayuno nocturno (Control: 4.65±0.67, 5.46±0.79 y 7.02±0.79 vs Ghrelina: 6.74±0.55, 7.05±0.77 y 8.88±0.72 g de comida ingerida, respectivamente; Figura 20B).

El tratamiento periférico con rimonabant disminuyó la ingesta basal en animales en ayuno nocturno (Control: 4.65±0.67 vs Rimonabant: 2.74±0.39 g de comida ingerida en 1 hora; $p<0.05$; Figura 20B). Sin embargo, este tratamiento no tuvo efecto estadísticamente significativo en los animales ad líbitum (Control: 0.298±0.13 vs Rimonabant: 0.128±0.09 g de comida ingerida; diferencias no significativas; Figura 20A).

La acción orexigénica de la ghrelina fue bloqueada por la inyección periférica de rimonabant tanto en animales en ayuno (Ghrelina: 6.74±0.55 vs Rimonabant+ ghrelina: 3.08±0.37 g de comida ingerida; $p<0.01$; Figura 20B) como en animales saciados (Ghrelina: 1.45±0.163 vs Rimonabant+ghrelina: 0.306±0.12 g de comida ingerida; $p<0.01$; Figura 20A).

La vagotomía quirúrgica bloqueó el efecto anorexigénico del rimonabant tanto sobre la ingesta basal como la ingesta estimulada por ghrelina (Figura 20C).

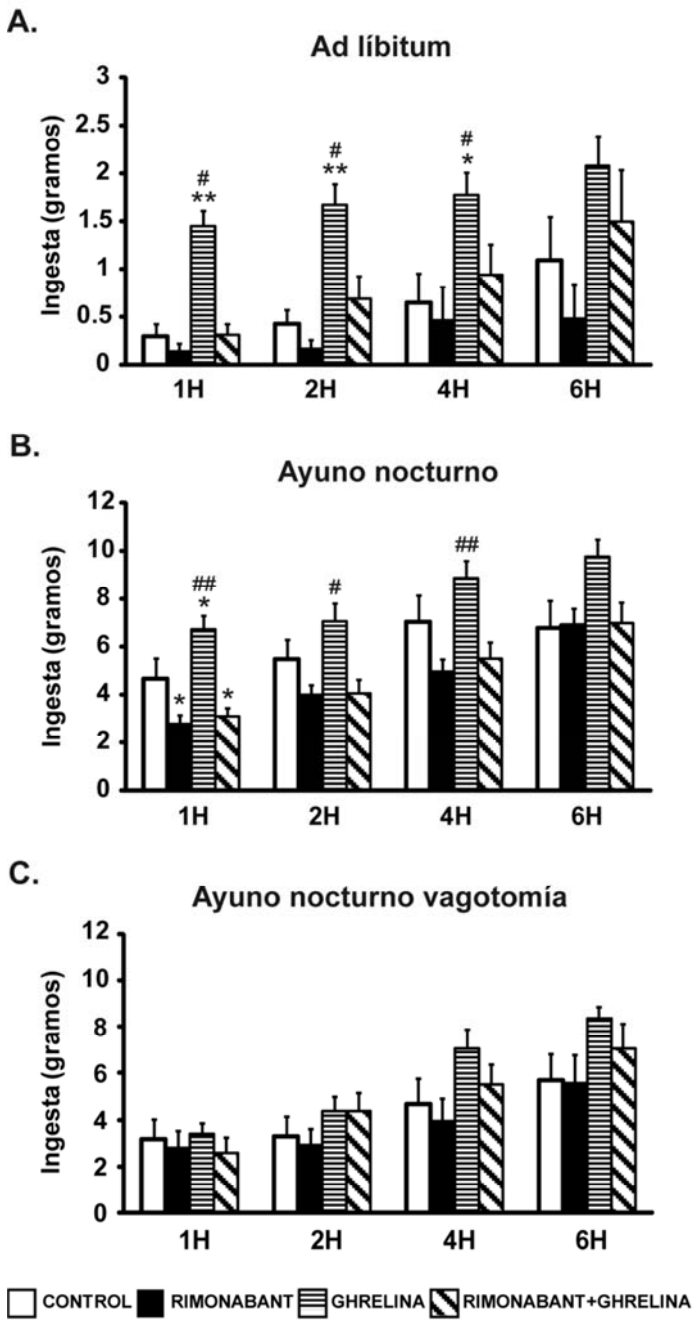


Figura 20. Ingesta de comida en ratas tras el tratamiento con ghrelina/rimonabant/vehículo bajo diferentes estados nutricionales: A) ad líbitum, B) ayuno nocturno, C) ayuno nocturno sometidos previamente a vagotomía quirúrgica. *vs Control, #vs Rimonabant+ghrelina.

1.2 Estudio de la localización de la ghrelina y los receptores CB1 en el tejido gástrico

Para investigar si el receptor CB1 está presente en las células endocrinas del estómago, se realizaron análisis inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos frente a CB1 y ghrelina en secciones de *fundus* gástrico de ratas ad líbitum. Se encontró tinción positiva para ghrelina y CB1 en pequeñas células dispersas situadas principalmente en la base de las glándulas gástricas (Figura 21A y B). Identificamos estas células como neuroendocrinas en base a su tamaño, su morfología y su distribución. Además la tinción positiva de la sinaptofisina confirmó la naturaleza neuroendocrina de estas células (Figura 21C). El control negativo sin anticuerpos primarios de ghrelina o CB1 se muestra en la Figura 21D.

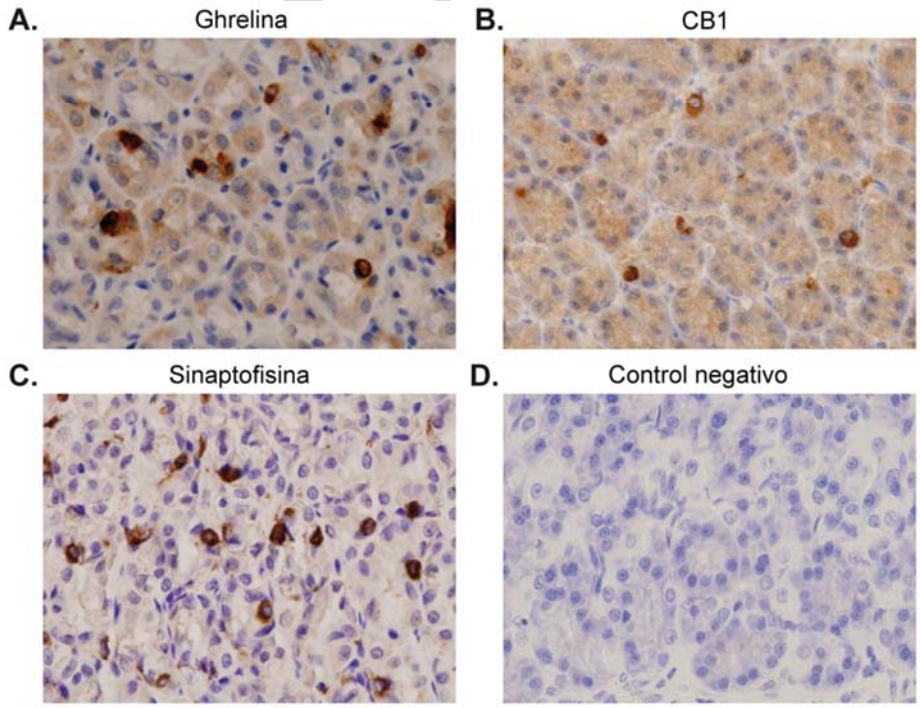


Figura 21. Estudios inmunohistoquímicos de localización de ghrelina (A) y CB1 (B) en *fundus* gástrico de ratas alimentadas ad líbitum. C) Marcaje de células neuroendocrinas con sinaptofisina. D) Control negativo de los anticuerpos correspondientes. Ampliación 40x.

1.3 Efecto del rimonabant sobre la producción gástrica y los niveles plasmáticos de ghrelina

Con el objeto de estudiar la interacción entre ghrelina y CB1 a nivel gástrico, se bloqueó farmacológicamente el receptor CB1 mediante el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con rimonabant.

El tratamiento con rimonabant ip en ratas ad líbitum no afectó a la secreción de ghrelina gástrica, ni en ratas sometidas a simulacro de operación ni en ratas vagotomizadas (Figura 22A). La vagotomía quirúrgica incrementó la secreción gástrica de ghrelina en ratas ad líbitum (AL C: 7884.0±419 pg/ml/g tejido vs AL V: 11758±1043 pg/ml/g tejido; $p<0.05$). Como se esperaba, la restricción de comida de 36 horas incrementó los niveles de secreción de ghrelina gástrica con respecto a los animales ad líbitum (AL C: 7884.0±419 pg/ml/g tejido vs Ayuno C: 11060.0±559.5 pg/ml/g tejido; $p<0.01$; Figura 22A y B). Sorprendentemente, el tratamiento con rimonabant en los animales en ayuno revirtió el aumento de los niveles de ghrelina gástrica inducidos por la privación de la comida (Ayuno C: 11060.0±559.5 pg/ml/g tejido vs Ayuno R: 7796±430.9 pg/ml/g tejido; $p<0.01$). El efecto del rimonabant no se produjo en animales vagotomizados sometidos a privación de la comida (Ayuno V: 8749±832 vs Ayuno V+R: 10649±1314 pg/ml/g tejido; diferencias no significativas; Figura 22B).

En concordancia con los datos *ex vivo*, el tratamiento con rimonabant no afectó a los niveles circulantes de ghrelina en los animales ad líbitum (Figura 22C). En animales en ayuno se observaron niveles aumentados de ghrelina circulante con respecto al grupo ad líbitum (AL C: 1797±73 vs Ayuno C: 3559±462 pg/ml; $p<0.01$), pero en animales vagotomizados permanecieron inalterados (AL V: 1984±87.2 vs Ayuno V: 2039±138 pg/ml) (Figura 22C y D). De forma parecida a la secreción de ghrelina gástrica, el bloqueo farmacológico del receptor cannabinoide impidió el incremento de los niveles circulantes de ghrelina inducidos por la privación de la comida (Ayuno C: 3559±462 pg/ml vs Ayuno R: 2211±141 pg/ml; $p<0.05$; Figura 22D).

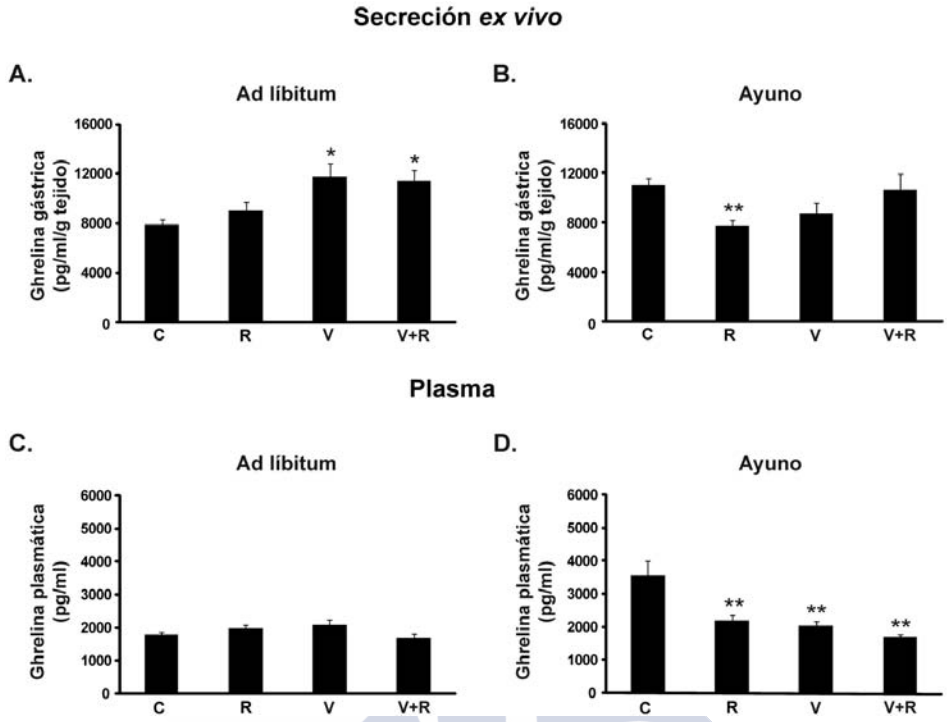


Figura 22. Secreción gástrica de ghrelina de explantes de estómago obtenidos de animales alimentados ad líbitum (A) o animales en ayuno de 36 horas (B) y niveles plasmáticos de ghrelina de animales alimentados ad líbitum (C) o en ayuno de 36 horas (D) sometidos a diferentes tratamientos *in vivo* (vehículo/rimonabant) o procedimientos quirúrgicos (vagotomía /operación simulada). *vs control. C: Control; R: Rimonabant, V: Vagotomía; V+R: Vagotomía +rimonabant.

Los análisis por qPCR mostraron un descenso de los niveles de ARNm de ghrelina en animales sometidos a vagotomía quirúrgica (AL C: 1±0.15 unidades arbitrarias vs AL V: 0.78±0.04 unidades arbitrarias; AL R: 0.9±0.23 vs AL V+R: 0.57±0.08 unidades arbitrarias; $p<0.05$; Figura 23A).

El ayuno de 36 horas no afectó a la expresión de ARNm de ghrelina gástrica con respecto a los animales ad líbitum, aunque se observó una ligera tendencia hacia el aumento (AL C: 1±0.15 vs Ayuno C: 1.05±0.13 unidades arbitrarias; diferencias no significativas; Figuras 23A y B). Sin embargo, en animales en ayuno el tratamiento con rimonabant disminuye ligeramente los niveles de ARNm de ghrelina (Ayuno C: 1.05±0.13 vs Ayuno R: 0.8±0.05 unidades arbitrarias), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 23B). Los niveles de ARNm de ghrelina no cambiaron en animales vagotomizados en ayuno (Ayuno C: 1.05±0.13 vs Ayuno

V: 1.1±0.11 unidades arbitrarias). Además, la administración de rimonabant no indujo ningún efecto en animales sometidos a vagotomía quirúrgica (Figura 23B).

El tratamiento con rimonabant incrementó el contenido de ghrelina en el estómago, únicamente en animales en ayuno (Ayuno R: 120.68% ghrelina/β-actina vs Ayuno C; $p<0.01$; Figura 23D). Además, como se muestra en la imagen representativa del *western blot* en la Figura 23, los animales en ayuno presentaron contenido más bajo de ghrelina en el estómago en comparación con los animales alimentados (Ayuno C: 62.7% sobre el AL C; $p<0.01$) (Figura 23C y D).

En ratas ad líbitum la administración de rimonabant ip no afectó a los niveles gástricos de ARNm de CB1 ni en animales sometidos a operación simulada ni a vagotomía (Figura 23E). Sin embargo, la vagotomía per se disminuye la expresión de ARNm de CB1 (AL C: 1.05±0.11 vs AL V: 0.44±0.05, $p<0.01$; AL V+R: 0.34±0.05; $p<0.01$; Figura 23E).

Al contrario de lo que ocurre con la ghrelina, en animales en ayuno los niveles de ARNm de CB1 disminuyen significativamente después de la administración periférica de rimonabant (Ayuno C: 1.06±0.13 vs Ayuno R: 0.36±0.03 unidades arbitrarias; $p<0.01$; Figura 23F).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

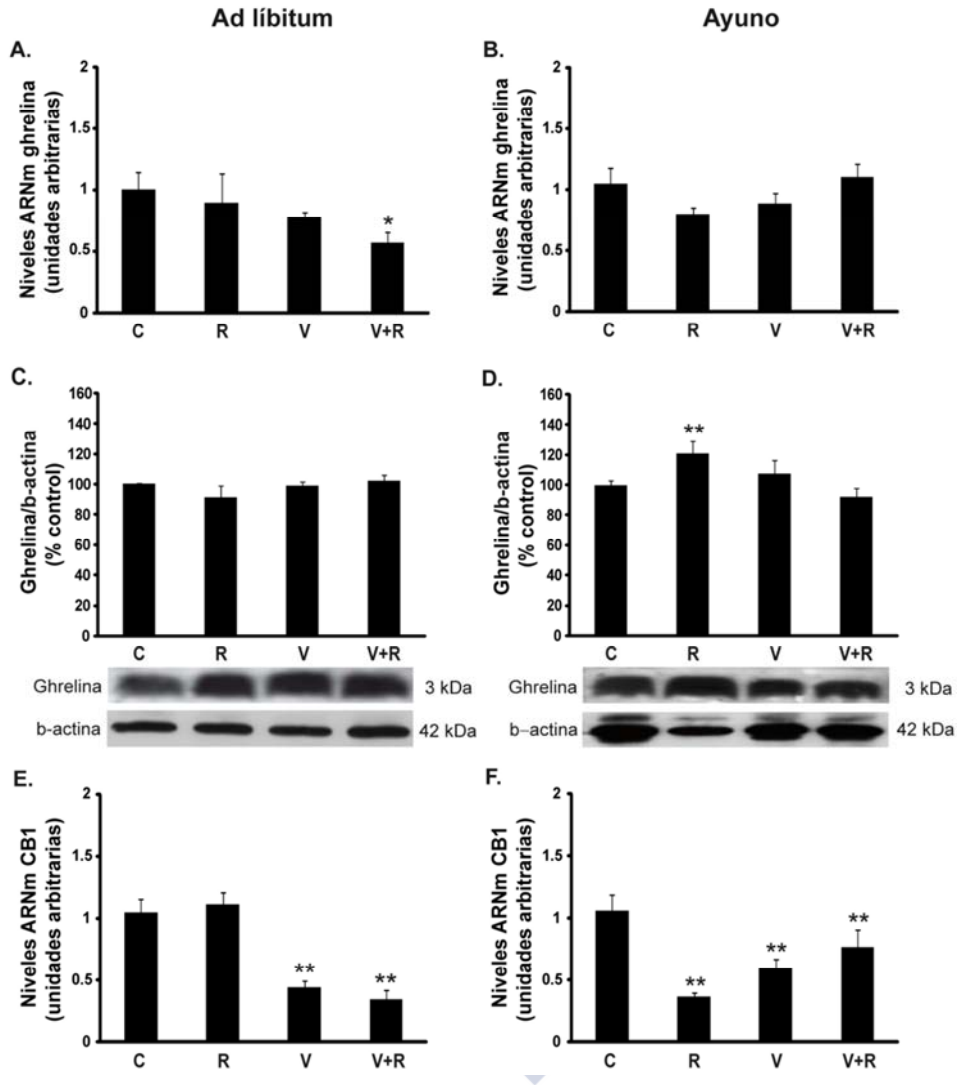


Figura 23. Niveles de expresión de ARNm de ghrelina en animales alimentados ad líbitum (A) o animales en ayuno de 36 horas (B). Niveles de ghrelina y *western blot* representativo de la mucosa de animales ad líbitum (C) o animales en ayuno de 36 horas (D). Niveles de ARNm del receptor CB1 en la mucosa gástrica de animales ad líbitum (E) o en ayuno de 36 horas (F). Los animales recibieron distintos tratamientos (vehículo/rimonabant) y procedimientos quirúrgicos (vagotomía/operación simulada). *vs control. C: Control; R: Rimonabant, V: Vagotomía; V+R: Vagotomía+rimonabant.

Para observar si el efecto del bloqueo farmacológico de CB1 *in vivo* sobre la secreción de ghrelina gástrica se reproducía *in vitro*, se añadió rimonabant 1 µM en los explantes de tejido gástrico. Al igual que lo que ocurre *in vivo*, los animales

vagotomizados con alimentación ad líbitum mostraron un aumento de la secreción gástrica de ghrelina (AL C: 7571±538 pg/ml/g tejido vs AL V: 12218±1115 pg/ml/g tejido; p<0.01; Figura 24A). Los explantes gástricos de animales en ayuno mostraron niveles más elevados de secreción de ghrelina que los pertenecientes a animales alimentados (AL C: 7571±538 pg/ml/g tejido vs Ayuno C: 11394±901 pg/ml/g tejido) (Figura 24A y B). Sin embargo, en contraste con los datos de experimentos *in vivo*, el rimonabant añadido directamente en los estómagos de animales privados de comida no pudo revertir el aumento de los niveles de secreción de ghrelina gástrica inducido por el ayuno (Ayuno C: 11394±901 pg/ml/g tejido vs Ayuno R: 12739±2294 pg/ml/g tejido; diferencias no significativas; Figura 24B). Los explantes obtenidos de animales vagotomizados en situación de ayuno presentaron una disminución no significativa de la secreción gástrica de ghrelina en comparación con el grupo control (Figura 24B).

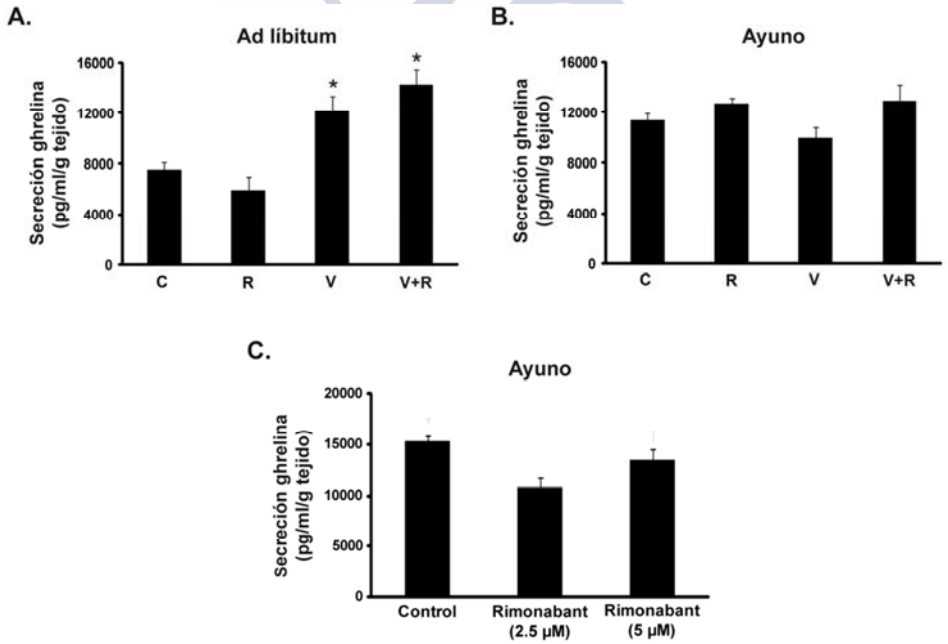


Figura 24. Secreción gástrica de ghrelina de explantes de tejido bajo diferentes tratamientos *in vitro* (vehículo/rimonabant 1 µM), obtenidos de animales con alimentación ad líbitum (A) o animales en ayuno de 36 horas (B) sometidos a vagotomía o simulación quirúrgica. *vs control. C: Control; R: Rimonabant, V: Vagotomía; V+R: Vagotomía+rimonabant. C) Secreción gástrica de ghrelina con diferentes tratamientos *in vitro* de rimonabant (vehículo, 2.5 y 5 µM) en explantes de estómago de animales en ayuno, n=10-12.

Para verificar la falta de efecto de la adición directa de rimonabant en los estómagos procedentes de animales privados de comida, se testaron dos dosis adicionales de rimonabant (2.5 y 5 µM). Estas dosis no pudieron evitar el incremento de los niveles de secreción de ghrelina gástrica inducido por el ayuno (Control: 15351±1826 vs Rimonabant 2.5 µM: 10792±560 vs Rimonabant 5 µM: 13466±3050 pg/ml/g tejido; diferencias no significativas; Figura 24C).

1.4 Papel de la ruta de señalización de mTOR/S6K1 en la interacción de ghrelina y CB1 a nivel gástrico

Se ha demostrado que la ruta de señalización de mTOR/S6K1 regula la producción de ghrelina en el estómago y la ingesta de comida. Con el objetivo de determinar si está ruta intracelular está implicada en el mecanismo de regulación de la ingesta mediado por la interacción entre ECS y ghrelina, se estudió el efecto de la administración ip de rimonabant sobre la ruta de señalización de mTOR en estos animales. En estado de ayuno, el bloqueo gástrico de CB1 debido al tratamiento de rimonabant indujo la activación de mTOR, cuantificada como la fosforilación de mTOR en el residuo S2448, que se expresa como porcentaje de fosfo-mTOR /mTOR total (pmTOR/mTOR) (C: 100 vs R: 224.58±42.83% pmTOR/mTOR; $p<0.05$; Figura 25A). En cuanto a la activación de la S6K1 gástrica tras el tratamiento con rimonabant, cuantificada como la fosforilación de S6K1 en T389, se produce de una manera similar a la activación de mTOR (C: 100 vs R: 143.58±6.47% pS6K1/S6K1; diferencias no significativas; Figura 25B).

Con el fin de reconfirmar el papel de la ruta intracelular mTOR/S6K1 como mediador intracelular de la acción del rimonabant sobre la producción de ghrelina, se estudió el efecto del rimonabant en un modelo de bloqueo farmacológico de esta ruta. Para ello se realizó un tratamiento con rapamicina ip durante 6 días y se sometieron los animales a 36 horas de ayuno antes del sacrificio. La administración de rimonabant no pudo revertir el bloqueo de la ruta mTOR/S6K1 provocado por la rapamicina (Ra: 104.5±16.92% vs Ra+R: 87.75±13.85% pmTOR/mTOR; Figura 25A). Además, en concordancia con estudios previos, la vía intracelular se inhibió por el tratamiento de rapamicina (C: 100 vs Ra: 43.86±5.20% pS6K1/S6K1), y bajo esta condición, el rimonabant no indujo a la fosforilación de S6K1 (Ra+R: 64.41±10.13% pS6K1/S6K1) (Figura 25B).

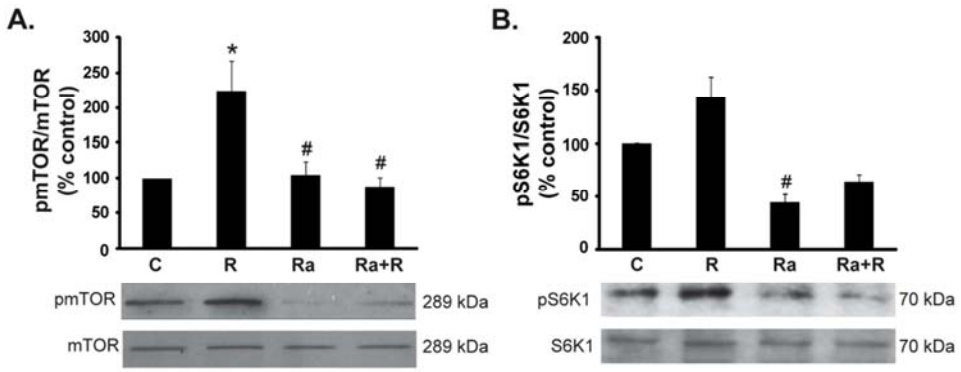


Figura 25. Histogramas de las densitometrías e imágenes representativas de *western blot* de pmTOR/mTOR (A) y pS6K1/S6K1 (B) en mucosa gástrica de animales en estado de ayuno tratados con rimonabant ip y/o rapamicina administrada ip crónicamente durante una semana. *p<0.05 vs control; $^{\#}$p<0.05 vs rimonabant. C: control, R: rimonabant, Ra: rapamicina; Ra+R: rapamicina+rimonabant.

La inhibición de la ruta de mTOR mediante el tratamiento crónico con rapamicina bloqueó el efecto del rimonabant sobre la secreción gástrica de ghrelina (Figura 26A), los niveles circulantes de ghrelina (Figura 26B) y la expresión de ARNm de ghrelina en la mucosa gástrica (Figura 26C). Además, los grupos que recibieron el tratamiento de rapamicina mostraron niveles más elevados de secreción de ghrelina gástrica (C: 11060±559 vs Ra: 16452±5489 pg/ml/g tejido; R: 7796±4741 vs Ra+R: 2337±4741 pg/ml/g tejido, p<0.01; Figura 26A). De manera similar, los niveles plasmáticos de ghrelina aumentaron en animales tratados con rapamicina (C: 3559±445 vs Ra: 4350±375 pg/ml/g tejido; R: 2211±141 vs Ra+R: 3160±504 pg/ml/g tejido, p<0.01; Figura 26B).

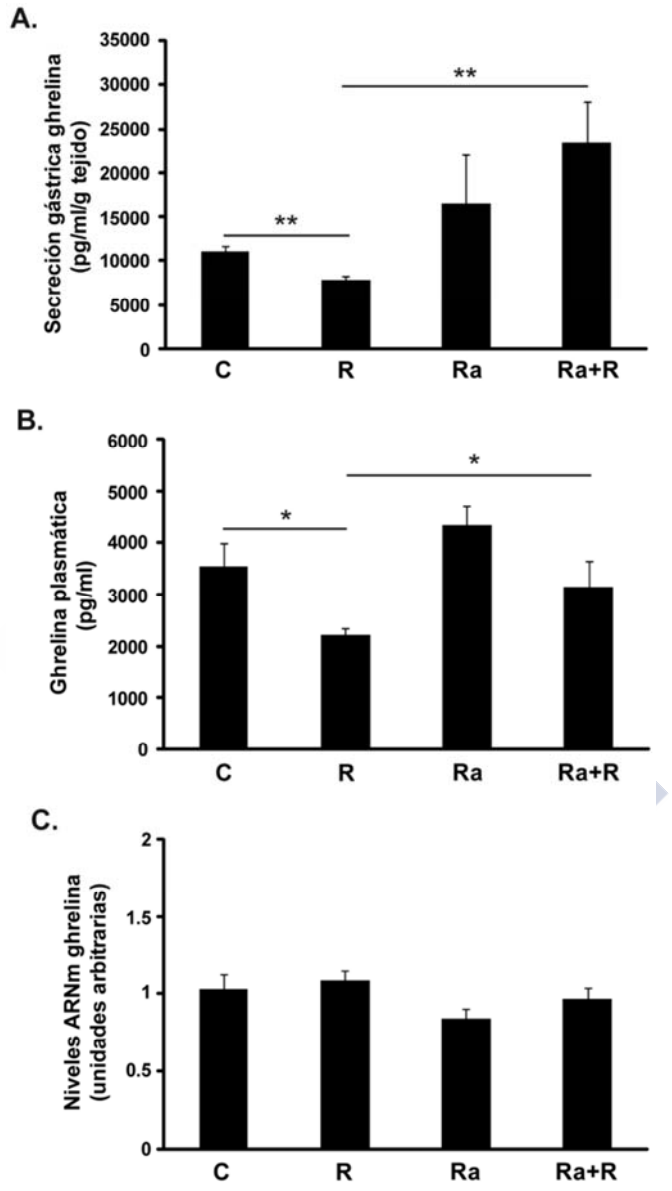


Figura 26. Secreción gástrica de ghrelina (A), niveles plasmáticos de ghrelina (B) y niveles de ARNm de ghrelina en mucosa gástrica (C) de animales en estado de ayuno tratados con rimonabant ip y/o rapamicina administrada ip crónicamente durante 6 días. C: control, R: rimonabant, Ra: rapamicina; Ra+R: rapamicina+rimonabant.

1.5 Efecto del AM281 sobre la regulación de ghrelina y mTOR gástricos

Para confirmar el efecto inhibitorio del bloqueo del receptor CB1 periférico sobre la secreción de ghrelina del estómago y los niveles plasmáticos de ghrelina mediado por la ruta de señalización mTOR/S6K1, se realizó el tratamiento con un antagonista de CB1 alternativo, el AM281, en animales en ayuno.

Al igual que lo que ocurría con rimonabant, la administración ip de AM281 disminuyó los niveles elevados de secreción gástrica de ghrelina inducidos por el ayuno (Control: 26170±2786 pg/ml/g tejido vs AM281: 14222.78±1329.3 pg/ml/g tejido; $p<0.01$; Figura 27A).

En concordancia con los datos *ex vivo*, el bloqueo farmacológico del receptor CB1 con AM281 evitó el aumento de los niveles circulantes de ghrelina inducidos por la privación de la comida (Control: 1424±99.96 pg/ml vs AM281: 876±67.25 pg/ml; $p<0.01$; Figura 27B).

Corroborando el efecto del rimonabant sobre la ruta de mTOR/S6K1, el bloqueo del receptor CB1 gástrico con el tratamiento ip de AM281 indujo la activación de mTORC1 como se demuestra por la fosforilación de mTOR (Control: 100 vs AM281: 166.72±10.66% pmTOR/mTOR; $p<0.05$; Figura 27C). Al igual que con el tratamiento de rimonabant, la administración periférica de AM281 produce la activación de S6K1, diana de mTOR, en la mucosa gástrica, aunque los niveles de fosforilación de S6K1 no alcanzaron significación estadística (Control: 100 vs AM281: 116.71±9.04% pS6K1/S6K1; diferencias no significativas; Figura 27D).

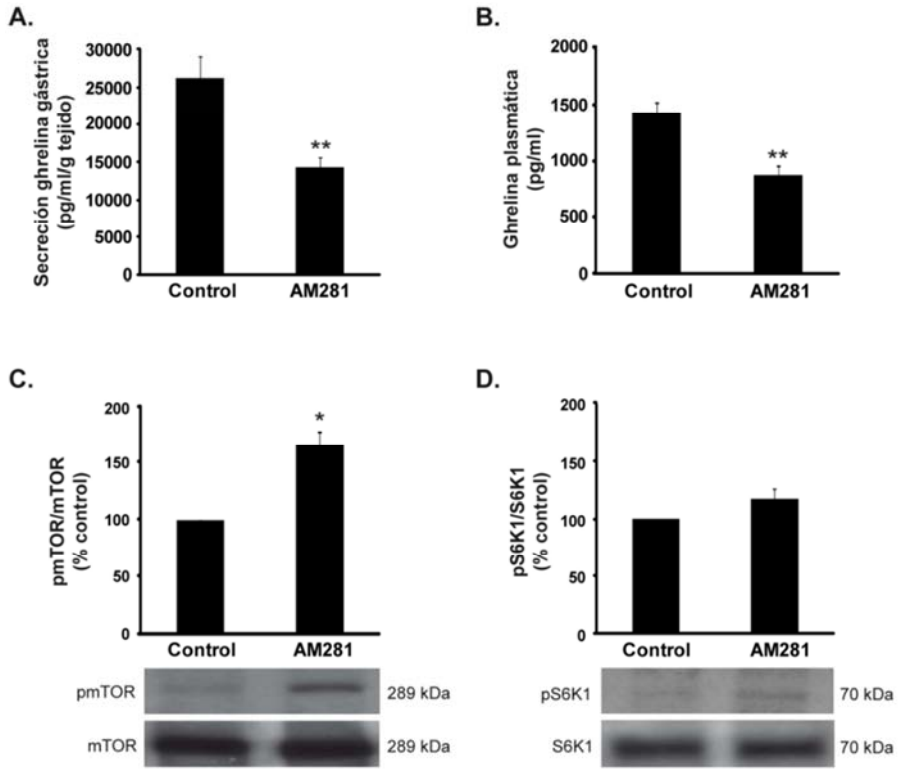


Figura 27. Tratamiento *in vivo* con AM281 (3 mg/Kg ip) o vehículo de animales en ayuno de 36 horas; n=10-12. Secreción gástrica de ghrelina de explantes de tejido (A). Niveles plasmáticos de ghrelina (B). Imágenes representativas de *western blot* e histogramas de las densitometrías de pmTOR/mTOR (C) y pS6K1/S6K1 (D) en mucosa gástrica. *p<0.05, **p<0.01**.**

2 CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA NUCB2/NESFATINA-1 EN EL ESTÓMAGO, TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y PLASMA

2.1 Influencia de la edad y el sexo en los niveles de NUCB2/nesfatina-1

Los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 aumentaron dramáticamente con la edad en ratas macho (2 semanas: 3.44±0.3 ng/ml vs 4 semanas: 5.65±0.42 ng/ml, 6 semanas: 11.47±2.63 ng/ml y 8 semanas: 10.82±2.13 ng/ml; $p<0.01$ vs Machos 2 semanas; Figura 28). En contraste, en ratas hembra los valores plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 permanecieron constantes a lo largo del desarrollo (2 semanas: 5.74±1.19 ng/ml; 4 semanas: 4.94±0.39 ng/ml, 6 semanas: 5.18±0.38 ng/ml y 8 semanas: 5.26±0.64 ng/ml; Figura 28).

En animales adultos jóvenes, de 6 y 8 semanas de edad, las ratas macho presentaron niveles de NUCB2/nesfatina-1 en plasma más elevados que las ratas hembra (Machos: 11.47±2.63 vs Hembras: 5.18±0.39 ng/ml de 6 semanas; Machos: 10.82±2.13 vs Hembras: 5.26±0.64 ng/ml de 8 semanas; $p<0.05$; Figura 28).

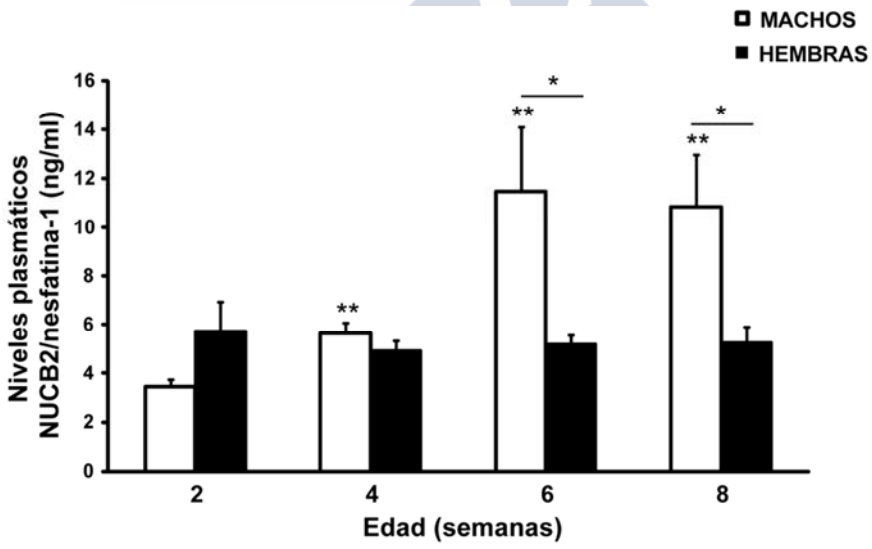


Figura 28. Concentraciones plasmáticas de NUCB2/nesfatina-1 en machos y hembras de diferentes edades (2, 4, 6 y 8 semanas). n=10. **p<0.01 vs Machos 2 semanas. *p<0.05 Machos vs Hembras de la misma edad.

En contraste con los datos observados en los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1, la secreción de NUCB2/nesfatina-1 del tejido gástrico fue elevada en el periodo perinatal tanto en machos como en hembras, disminuyendo después del destete (Machos: 5.15±0.99 ng/ml/g en 2 semanas, 1.63±0.37 ng/ml/g en 4 semanas, 0.54±0.14 ng/ml/g en 6 semanas y 0.81±0.11 ng/ml/g en 8 semanas; $p<0.01$ vs Machos 2 semanas; Hembras: 4.98±0.89 ng/ml/g en 2 semanas; 2.61 ±0.29 ng/ml/g en 4 semanas; 1.17±0.09 ng/ml/g en 6 semanas y 0.99±0.11 ng/ml/g en 8 semanas; $p<0.01$ vs Hembras 2 semanas; Figura 29A).

A pesar de que no se observó la banda de 9,7 kDa correspondiente al péptido nesfatina-1, la detección de NUCB2 por *western blot* en la mucosa oxíntica mostró dos bandas de aproximadamente 50 kDa (Figura 29B) tal y como había sido descrito previamente por otros autores [208,217,272,273]. La expresión proteica de NUCB2 aumentó en ratas macho (2 semanas: 100±3.70%, 4 semanas: 128.27±6.5% vs 6 semanas: 83.69±3.73% y 8 semanas: 67.01±4.51% NUCB2/GAPDH; $p<0.01$ vs Machos 2 semanas; $p<0.01$ y $p\leq0.05$ vs Machos 4 semanas) y ratas hembra (2 semanas: 105.07±1.98%, 4 semanas: 143.05±5.17% vs 6 semanas: 93.49±9.29% y 8 semanas: 96.52±5.53% NUCB2/GAPDH; $p<0.05$ vs Hembras 2 semanas; $p<0.05$ vs Hembras 4 semanas) (Figura 29B).

Tanto en ratas macho como en ratas hembra se encontraron niveles de ARNm de NUCB2 significativamente elevados justo después del destete en machos (2 semanas: 1.01±0.05, 4 semanas: 1.42±0.10 vs 6 semanas: 1.29±0.13 y 8 semanas: 1.14±0.09 unidades arbitrarias; $p<0.05$ vs Machos 2 semanas) y hembras (2 semanas: 1.02±0.07, 4 semanas: 1.43±0.15, .6 semanas: 1.14±0.12 y 8 semanas: 1.12±0.09 unidades arbitrarias; $p<0.05$ vs Hembras 2 semanas; Figura 29C).

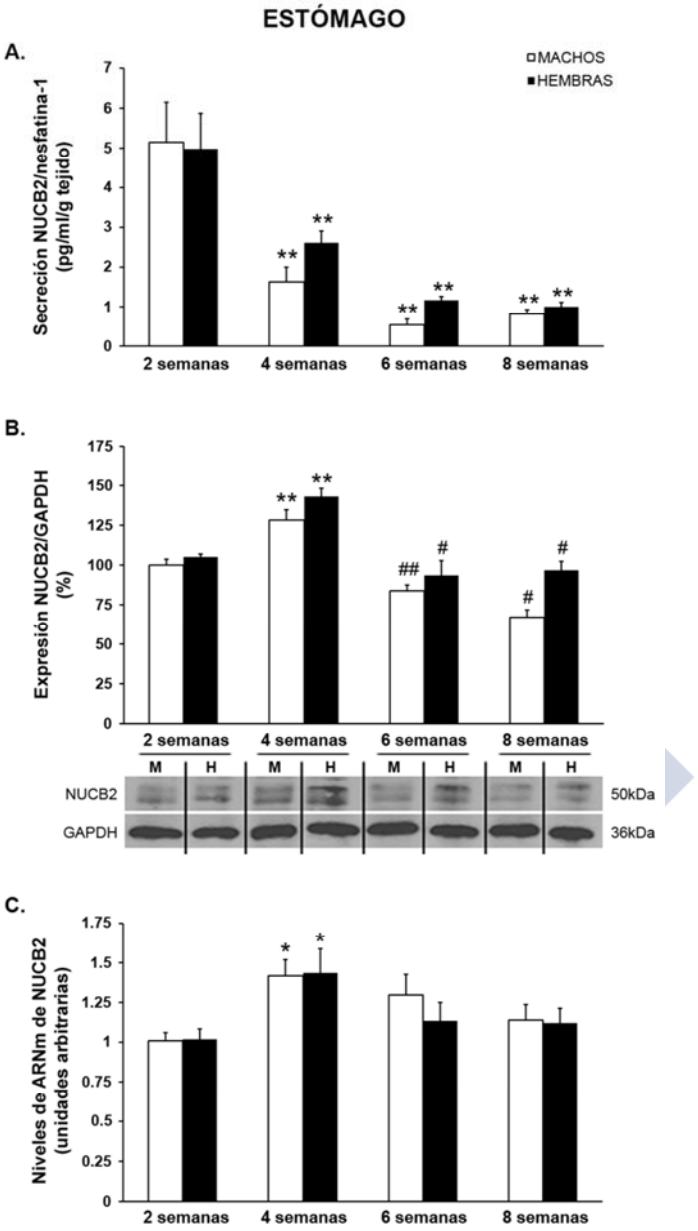


Figura 29. Niveles gástricos de NUCB2/nesfatina-1 en machos y hembras de diferentes edades (2-8 semanas). A) Secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 de explantes de tejido. B) Expresión de NUCB2/GAPDH en la mucosa gástrica; las líneas divisorias indican cortes e inserciones del mismo gel. C) Expresión de ARNm de NUCB2 en mucosa gástrica. *p<0.05, **p≤0.01 vs 2 semanas de su mismo sexo; $^{\#}$p<0.05, $^{\#\#}$p<0.01 vs 4 semanas de su mismo sexo; n=6-10.

Puesto que la producción de NUCB2/nesfatina-1 gástrica no explicó las variaciones en los niveles circulantes, se evaluó la expresión de ARNm y proteína de NUCB2 en el tejido adiposo subcutáneo (TAS) de los diferentes grupos. En hembras, los niveles de ARNm alcanzaron su máximo a las 4 semanas de edad (2 semanas: 1.01±0.06, 4 semanas: 1.86±0.22, 6 semanas: 0.88±0.14, 8 semanas: 1.03±0.21 unidades arbitrarias; $p<0.01$ vs 2 semanas; $p<0.01$ vs 4 semanas; Figura 30A). Sin embargo, en machos, la expresión más elevada de NUCB2 se observó a las 6 semanas de edad (2 semanas: 1.01±0.06, 4 semanas: 1.31±0.17, 6 semanas: 1.50±0.14, 8 semanas: 0.99±0.06 unidades arbitrarias; $p<0.01$ vs 2 semanas; $p<0.01$ vs 6 semanas; Figura 30A). En cambio, el contenido proteico de NUCB2 en grasa subcutánea disminuyó marcadamente en hembras de 4 semanas (2 semanas: 70.03±6.42%, 4 semanas: 41.92±9.18% vs 6 semanas: 60.06±18.76% y 8 semanas: 50.21±8.74% NUCB2/GAPDH; $p<0.01$; Figura 30B). En machos, la expresión proteica de NUCB2 en grasa subcutánea disminuyó a las 6 semanas de edad (2 semanas: 100±1.83%, 4 semanas: 74.24±12.65% vs 6 semanas: 46.15±12.96% y 8 semanas: 40.75±13.61% NUCB2/GAPDH; $p<0.01$; Figura 30B).

A diferencia de lo observado en la mucosa gástrica donde se detectaron dos bandas de aproximadamente 50 kDa, en el tejido adiposo subcutáneo se observó una única banda, lo cual concuerda con la bibligrafía previa [199,205,209].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

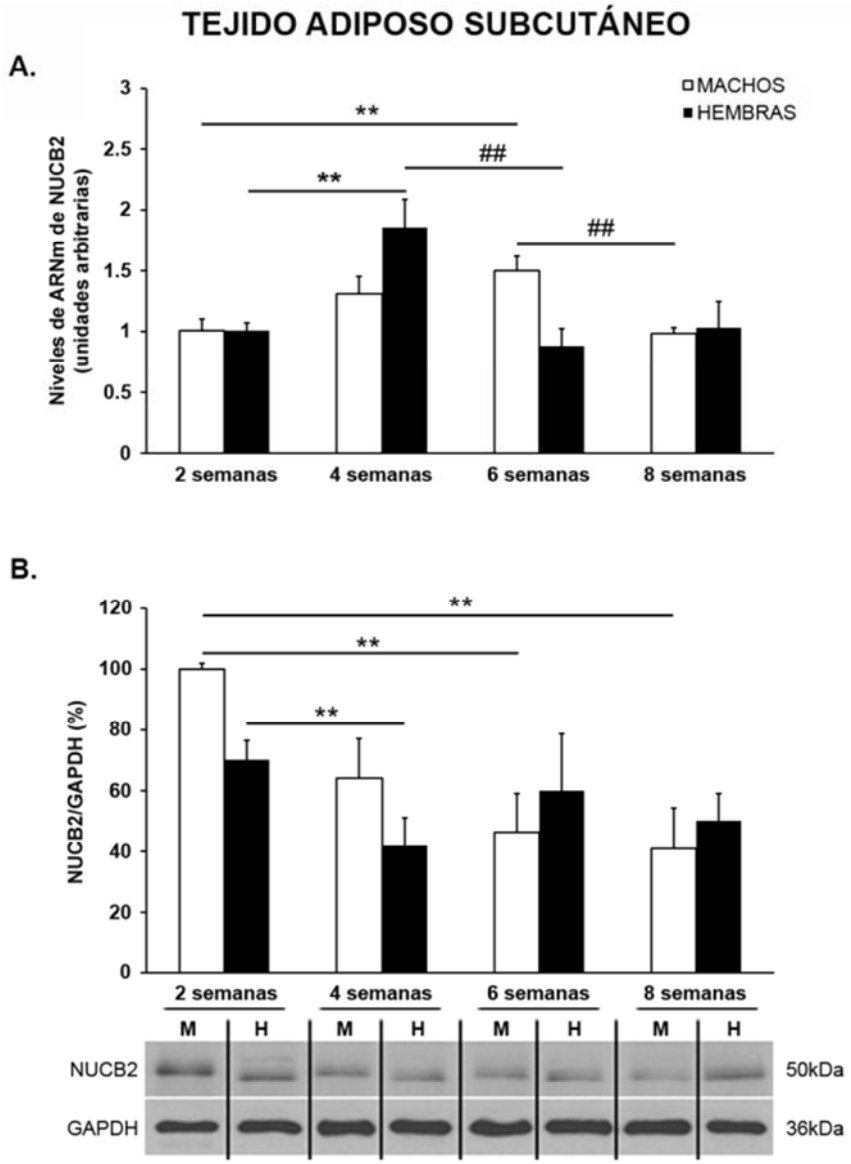


Figura 30. Expresión de NUCB2 en tejido adiposo subcutáneo de machos y hembras de diferentes edades (2-8 semanas). A) Expresión de ARNm de NUCB2, B) Histograma de las densitometrías e imagen de *western blot* representativa de NUCB2; las líneas divisorias indican cortes e inserciones del mismo gel. **p<0.01 vs 2 semanas de su mismo sexo; $^{\#\#}$p<0.01 vs 4 o 6 semanas de su mismo sexo; n=6-10.

2.2 Efecto de la lactancia sobre la secreción de NUCB2/nesfatina-1

Teniendo en cuenta las variaciones encontradas a las 4 semanas en la producción de NUCB2/nesfatina-1, el siguiente objetivo fue estudiar si la lactancia y el destete afectan a la regulación de NUCB2/nesfatina-1; para ello se analizaron los niveles de esta hormona en animales cuyo destete se realizó a las 3 semanas de edad (C), y en animales con retraso del destete (RD) sometidos a lactancia prolongada hasta las 4 semanas de edad.

Los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 no se vieron afectados por el retraso del destete ni en ratas macho ni hembra (Figura 31A).

Las hembras todavía lactantes debido al retraso del destete presentaron una mayor secreción de NUCB2 por el estómago con respecto a los animales alimentados con dieta sólida, como se demostró al medir los niveles de NUCB2 mediante *western blot* en los secretomas gástricos (C: 95.2±13% vs RD: 125.36±11.02% NUCB2; $p<0.05$; Figura 31B). En la expresión de ARNm de NUCB2 en mucosa gástrica se observó una tendencia al aumento en hembras aún lactantes (C: 1.02±0.08 vs RD: 1.29±0.18 unidades arbitrarias; diferencias no significativas; Figura 31C). En cambio el contenido proteico en la mucosa del estómago permaneció invariable (C: 108.89±24.77 vs RD: 114.53±22.81% NUCB2/GAPDH; diferencias no significativas; Figura 31D).

En contraste con las hembras, los machos que fueron sometidos al retraso del destete no mostraron cambios en la secreción gástrica de NUCB2 (Figura 31B), mRNA (Figura 31C) o expresión de NUCB2 en la mucosa gástrica (Figura 31D).

Los ensayos de *western blot* realizados para determinar el efecto de la lactancia en la regulación de NUCB2/nesfatina-1 en el tejido adiposo mostraron un mayor contenido de NUCB2 en grasa subcutánea de hembras todavía lactantes (C: 88.17±11.58% vs RD: 120.21±11.81% NUCB2/GAPDH; $p<0.05$; Figura 29F) sin cambios en los niveles de ARNm (Figura 31D). En machos, no se observaron diferencias en la expresión de ARNm o de proteína NUCB2 (Figura 31 E yF).

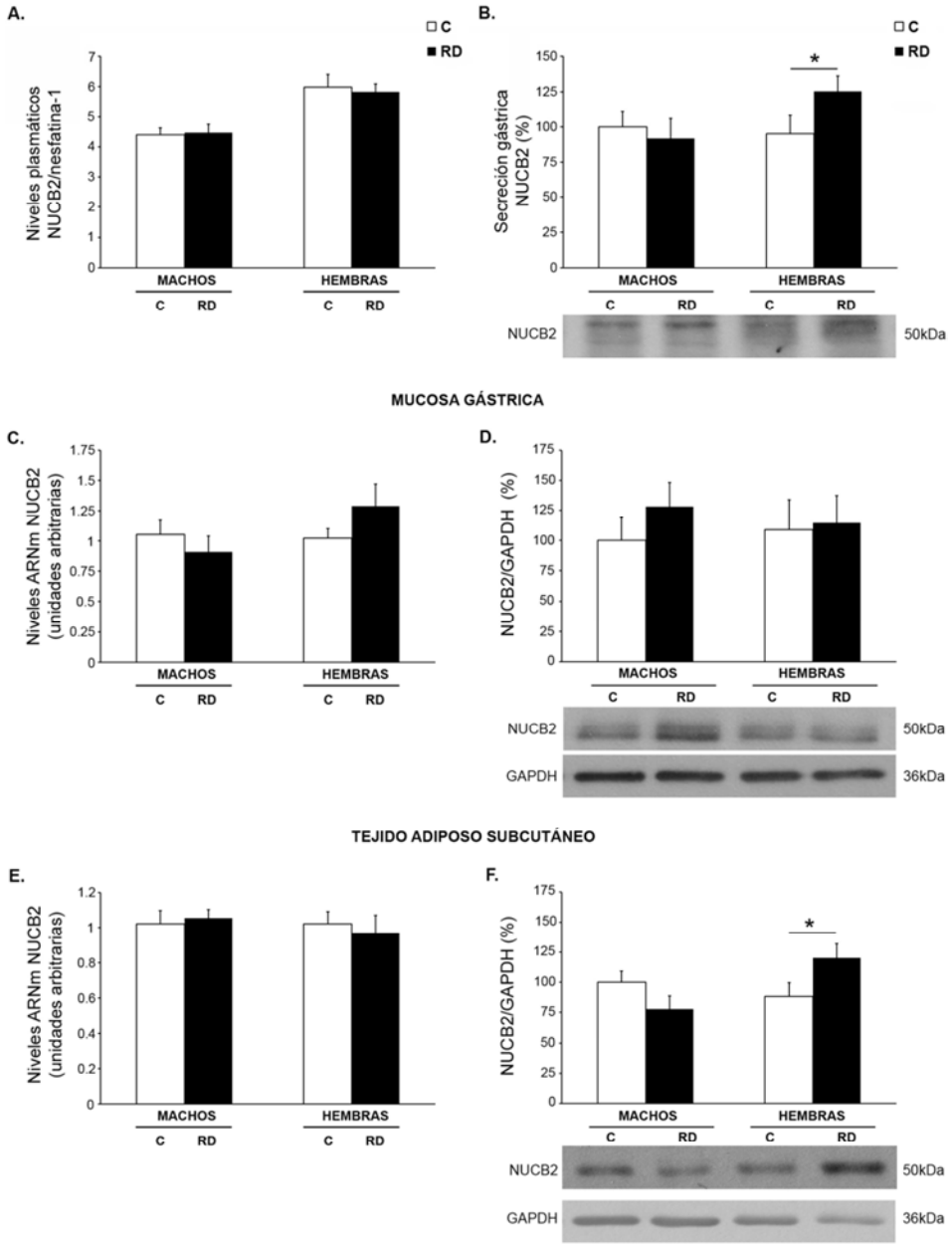


Figura 31. Niveles de NUCB2/nesfatina-1 en machos y hembras de 4 semanas de edad. Niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 (A). Densitometría e imagen representativa de *western blot* de la secreción de NUCB2 de explantes de tejido gástrico, (B). Expresión de ARNm de NUCB2 en mucosa gástrica y tejido adiposo subcutáneo (C y E). Expresión proteica de NUCB2/GAPDH en mucosa gástrica y tejido adiposo subcutáneo (D y F). C: control; RD: retraso del destete. *p<0.05. n=6-10.

2.3 Efecto de los estrógenos y la testosterona sobre la producción de NUCB2/nesfatina-1

Para estudiar si los esteroides gonadales afectan a la regulación de los niveles de NUCB2/nesfatina-1, se realizaron tratamientos con testosterona y estrógenos en ratas adultas, macho y hembra respectivamente, sometidas a gonadectomía quirúrgica.

Los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 aumentaron en animales orquidectomizados tratados exógenamente con testosterona (C: 6.67±0.67 ng/ml, ORQX: 7.05±0.60 ng/ml y ORQX+T: 11.24±0.79 ng/ml; $p<0.01$; Figura 32A). Sin embargo, ni la ovariectomía ni el tratamiento con estrógenos afectaron a los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 en ratas hembra (Figura 32B).

La medida de la secreción de NUCB2/nesfatina-1 desde explantes de tejido gástrico extraídos de machos adultos sometidos a orquidectomía quirúrgica y/o tratamiento con testosterona revelaron que la testosterona indujo un incremento de la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago (C: 1.41±0.16 ng/ml/g, ORQX: 1.65±0.1 ng/ml/g y ORQX+T: 2.87±0.49 ng/ml/g; $p<0.01$; Figura 32C). La secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago no se vio afectada por la ovariectomía o el reemplazo con estrógenos en ratas ovariectomizadas (C: 2.06±0.17 ng/ml/g, OVX: 2.32±0.23 ng/ml/g, OVX+E2: 2.59±0.47 ng/ml/g; Figura 32D).

La orquidectomía provocó la disminución de los niveles gástricos de ARNm de NUCB2 que no fue revertido por el tratamiento con testosterona (C: 1.04±0.11, ORQX: 0.73±0.08 y ORQX+T: 0.65±0.05 unidades arbitrarias; $p<0.05$; Figura 32E). El contenido proteico de NUCB2 en la mucosa gástrica disminuyó tras el tratamiento con testosterona (C: 100±2.01%, ORQX: 99±10.08% y ORQX+T: 70±6.47% NUCB2/GAPDH; $p<0.01$; Figura 32G). Los niveles de ARNm y proteína NUCB2 en la mucosa gástrica no variaron en hembras tras el tratamiento con estrógenos (Figura 32F y H).

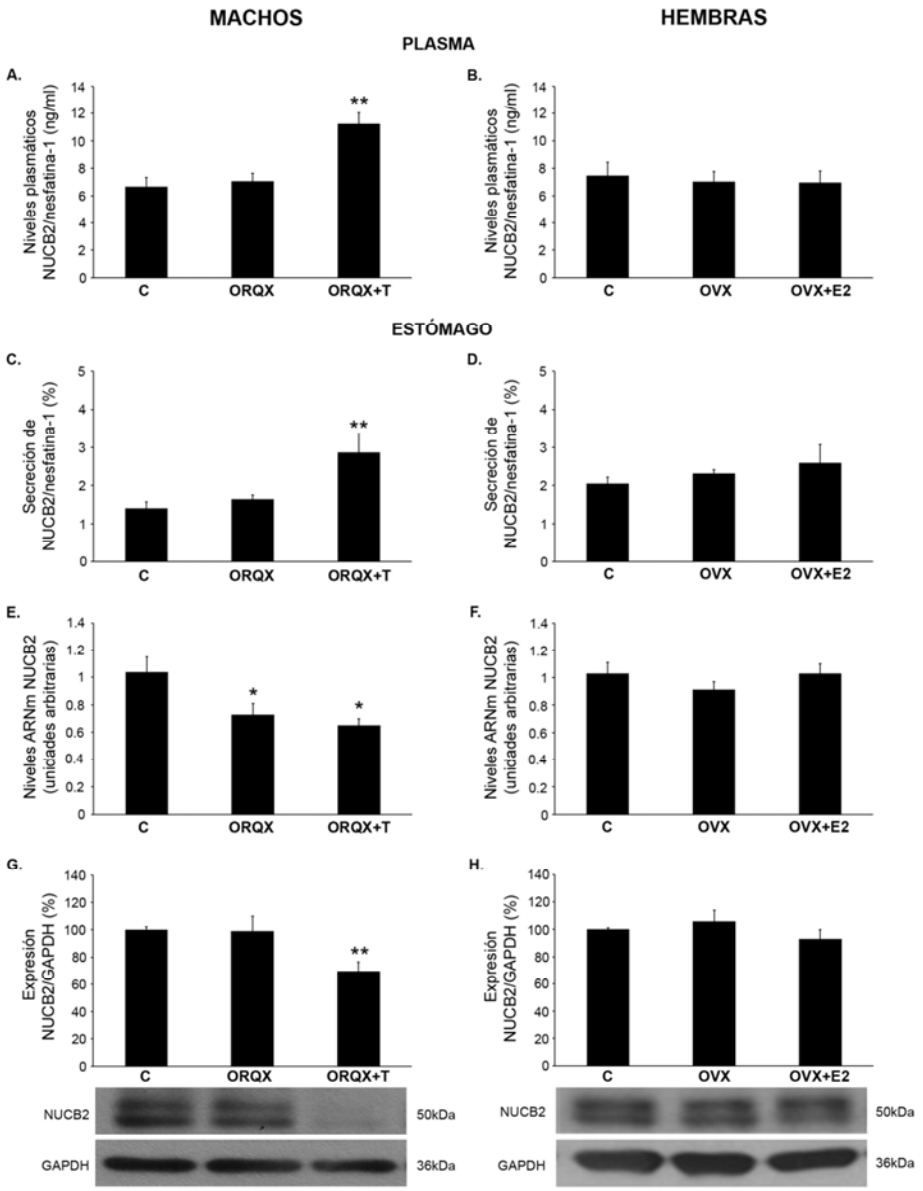


Figura 32. Niveles de NUCB2/nesfatina-1 en ratas de 8 semanas bajo diferentes condiciones; C: operación simulada, ORQX/OVX: orquidectomía u ovariectomía, ORQX+T/OVX+E2: tratamiento con T o E2 en animales sometidos a orquidectomía u ovariectomía respectivamente. Niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 en machos (A) y hembras (B). Secreción de NUCB2/nesfatina-1 de explantes de tejido gástrico de machos (C) y hembras (D). Niveles de ARNm de NUCB2 en mucosa gástrica en machos (E) y hembras (F). Expresión de NUCB2/GAPDH en mucosa gástrica de machos (G) y hembras (H). *p<0.05, **p<0.01 vs control. n=6-10.

En el tejido adiposo subcutáneo la orquidectomía quirúrgica provocó un descenso significativo de los niveles de ARNm de NUCB2 (C: 1.033±0.09 vs ORQX: 0.75±0.05 unidades arbitrarias; $p<0.05$; Figura 33A), que fue revertido tras el reemplazo de la testosterona (ORQX+T: 1.00±0.19 unidades arbitrarias). La expresión proteica de NUCB2 también disminuyó en el tejido subcutáneo de machos después de la orquidectomía y se recuperó a los niveles control después del reemplazo con T (C: 100±2.01%, ORQX: 78±10.9% y ORQX+T: 103±18.5% NUCB2/GAPDH; diferencias no significativas; Figura 33C).

A diferencia de lo observado en el estómago, se demostró que la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el tejido adiposo subcutáneo estaba directamente regulada por los niveles de estrógenos. La ausencia de estrógenos tras la ovariectomía quirúrgica indujo un aumento no significativo de los niveles de ARNm de NUCB2 en la grasa subcutánea (C: 1.04±0.11, OVX: 1.55±0.17, OVX+E2: 1.17±0.18 unidades arbitrarias; Figura 33B). La ovariectomía provocó un aumento significativo de NUCB2 en los depósitos de grasa subcutánea (C: 100±3.2%, OVX: 137±6.02%, OVX+E2: 127±24.3% NUCB2/GAPDH; $p<0.05$; Figura 33D).

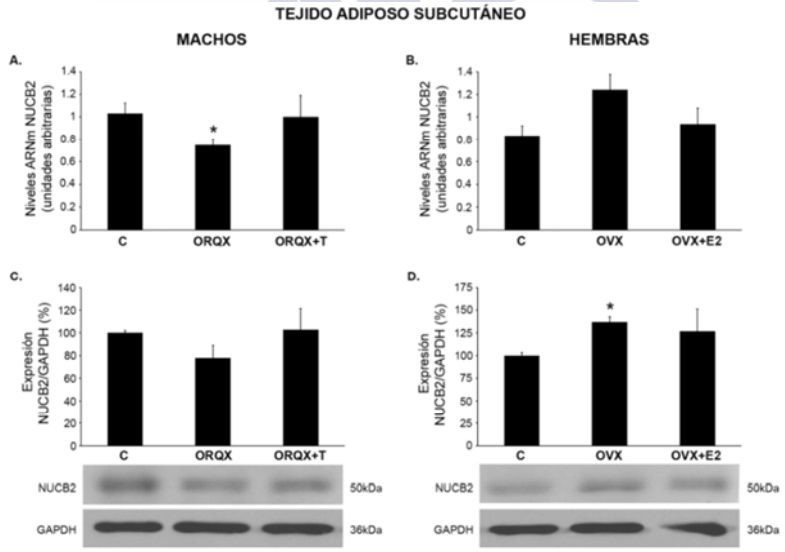


Figura 33. Niveles de NUCB2/nesfatina-1 en tejido adiposo subcutáneo de machos y hembras de 8 semanas bajo diferentes condiciones; C: operación simulada, ORQX/OVX: orquidectomía u ovariectomía quirúrgica, ORQX+T/OVX+E2: tratamiento con T o E2 en animales sometidos a orquidectomía u ovariectomía respectivamente. Expresión de ARNm de NUCB2 en machos (A) y hembras (B). Histogramas de las densitometrías e imágenes representativas de *western blot* de NUCB2 en machos (C) y hembras (D). *$p<0.05$ vs control. n=6-10.

3 ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL SECRETOMA DE ESTÓMAGO EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES

3.1 Optimización y validación de la incubación de explantes de estómago de rata para su estudio por proteómica

Para realizar el análisis proteómico del secretoma de estómago se siguió el protocolo de explantes gástricos previamente utilizado para estudios fisiológicos de ghrelina y NUCB2/nesfatina-1, sin embargo, fueron necesarias ciertas modificaciones entre ellas la utilización de medio de cultivo sin rojo fenol. Con el fin de minimizar una posible degradación proteica y la contaminación con proteínas exógenas se optimizaron las condiciones de procesado e incubación del tejido gástrico hasta obtener los mejores patrones de secreción en geles de electroforesis bi-dimensional (2-DE). De esta manera las condiciones establecidas como más optimas fueron las siguientes: lavar el tejido tres veces KRH, no añadir inhibidores de proteasas y fosfatasas en el medio de incubación, y un tiempo de incubación de 2 horas (Figura 34). Además se establecieron las condiciones para la 2-DE, utilizándose un rango de pH de 3 a 10, 300 µg de proteína para geles de 17 cm y un 12% de acrilamida.

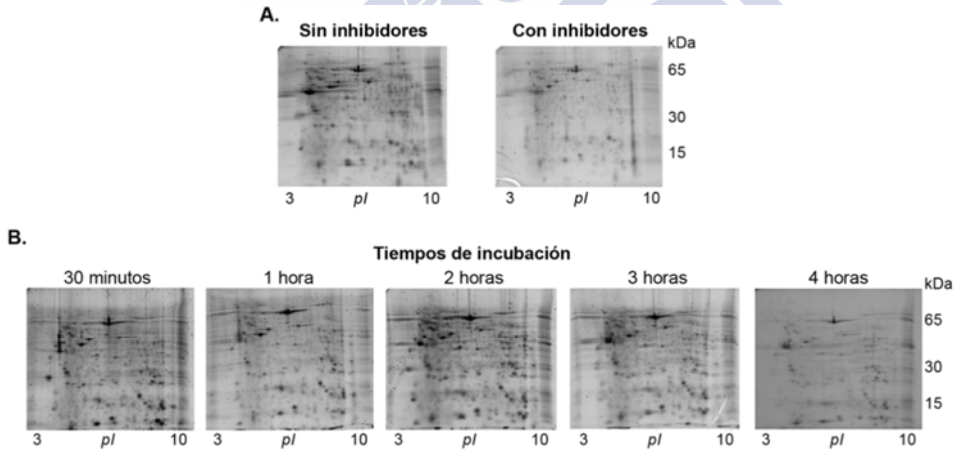


Figura 34. Imágenes representativas de geles de 2-DE de los distintos procesos de optimización de los secretomas de estómago. A) Geles 2-DE de secretomas con ausencia y presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas en el medio de incubación; B) Optimización de los tiempos de secreción: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas.

La ghrelina es el péptido gástrico conocido de mayor relevancia en la regulación de la ingesta, y previamente hemos demostrado la variación de sus niveles en el secretoma de estómago con el estado nutricional mediante RIA. Por este motivo, se consideró que su detección sería un buen método para validar la utilidad de nuestro modelo para el análisis proteómico del secretoma gástrico. Debido a que el punto isoeléctrico (pI) de la ghrelina es de 10.6 y no se encuentra dentro del rango de pH analizado en este proyecto, se decidió realizar un ensayo de inmunoprecipitación para identificar este péptido directamente por espectrometría de masas. Este análisis detectó un pico de 3188.20 m/z en el secretoma y de 3188.01 m/z en la mucosa del estómago que coinciden con el peso molecular teórico de la ghrelina (3188 Da) (Figura 35A y B). Además, este pico se identificó por MS y MS/MS como ghrelina con una puntuación de 118, indicando identidad u homología ($p<0.05$) (Figura suplementaria 2). La inmunoprecipitación también nos permitió detectar la ghrelina mediante inmunodetección (Figura 35C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

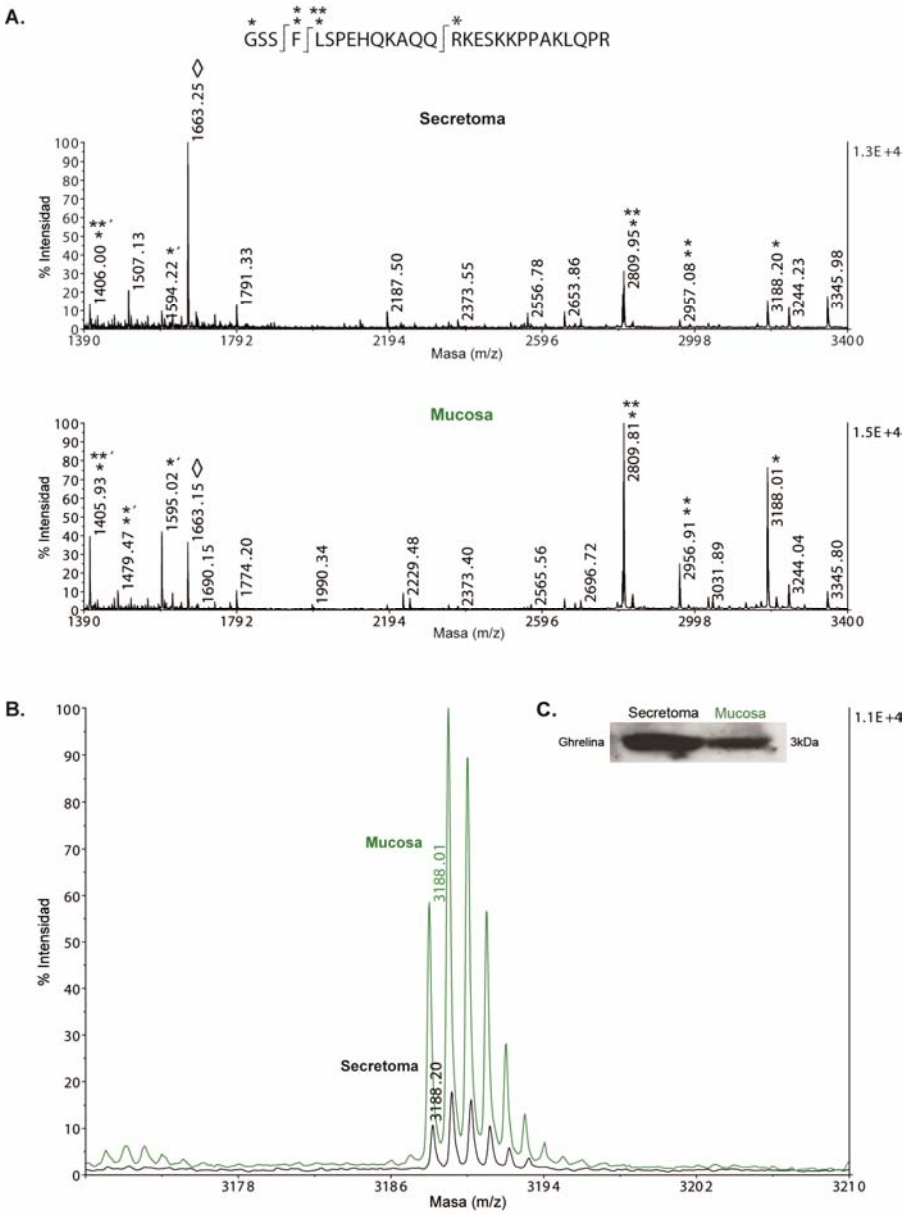


Figura 35. Identificación de la ghrelina mediante inmunoprecipitación en muestras de mucosa y secretoma gástrico de rata. A) Espectros representativos del análisis MALDI-TOF/MS de la inmunoprecipitación de ghrelina. * péptido ghrelina de 3188 cuya secuencia aminoacídica es GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR; ** fragmento tras la pérdida del tripéptido GSS; *** fragmento sin el tetrapéptido GSSF; ◊ fragmento más pequeño detectado; *` iones dicargados respectivos de cada fragmento. B) Superposición del pico de 3188 correspondiente a la ghrelina en el secretoma (negro) y la mucosa (verde). C) Imagen representativa del *western blot* de la inmunoprecipación de ghrelina.

3.2 Análisis diferencial de secretomas de estómago de rata en distintas condiciones de alimentación: ad líbitum, ayuno y realimentación

Siguiendo la metodología comentada en el apartado de electroforesis bidimensional, obtuvimos las imágenes de los geles procedentes de experimentos de secreción independientes (4 muestras distintas de animales independientes de cada uno de los grupos experimentales). Se realizó un análisis de imagen diferencial utilizando un software específico para 2-DE con el fin de determinar las diferencias de secreción entre estómagos de ratas sometidas a distintas condiciones nutricionales: alimentación control, ayuno de 48 horas y realimentación de 1 hora tras 48 horas de ayuno (Figura 36A, B y C).

El análisis de componentes principales (PCA) comparando el patrón de manchas confirmó la baja variabilidad de los secretomas dentro del mismo grupo. Además, este análisis mostró que los secretomas del grupo control difieren de una manera marcada de los otros dos, mientras que los secretomas de los grupos ayuno y realimentación presentaron una similitud mayor entre ellos (Figura 36D).

El número medio de manchas detectadas fue de 769.5±SD0.6, 772.0±SD1.6 y 769.5±SD0.5 en los geles de control, ayuno y realimentación respectivamente. Al comparar los 3 secretomas se encontraron 65 diferencias estadísticamente significativas realizando un test de ANOVA con un $p<0.001$ y un cambio en los niveles de expresión al menos mayor de 2 (Figura suplementaria 3). Mediante el análisis por espectrometría de masas se identificaron 54 proteínas diferentes (Tabla suplementaria 1); de estas, el análisis de predicción *SecretomeP* clasificó como secretadas el 65% (Tabla 4 y Figura 36E). Entre ellas, 22 proteínas se encontraron elevadas en los secretomas control, 4 en ayuno, 3 en realimentación y 14 presentaron un aumento tanto en ayuno como en realimentación con respecto al grupo control. Cinco proteínas fueron asignadas a la vía clásica de secreción predicha por la presencia de péptido señal: α-amilasa pancreática y anhidrasa carbónica 9 elevadas en el secretoma control; la proteína disulfido-isomerasa A3 y homólogo de lambda-cristalina elevadas en ayuno y realimentación en comparación con el control; y la subunidad α de la flavoproteína de transferencia de electrones, presente en los geles en dos manchas. Otras proteínas de interés, secretadas por la vía no clásica, fueron la galectina-3 y eIF4E elevadas en los secretomas control, y la superoxido dismutasa (Cu-Zn) incrementada en realimentación.

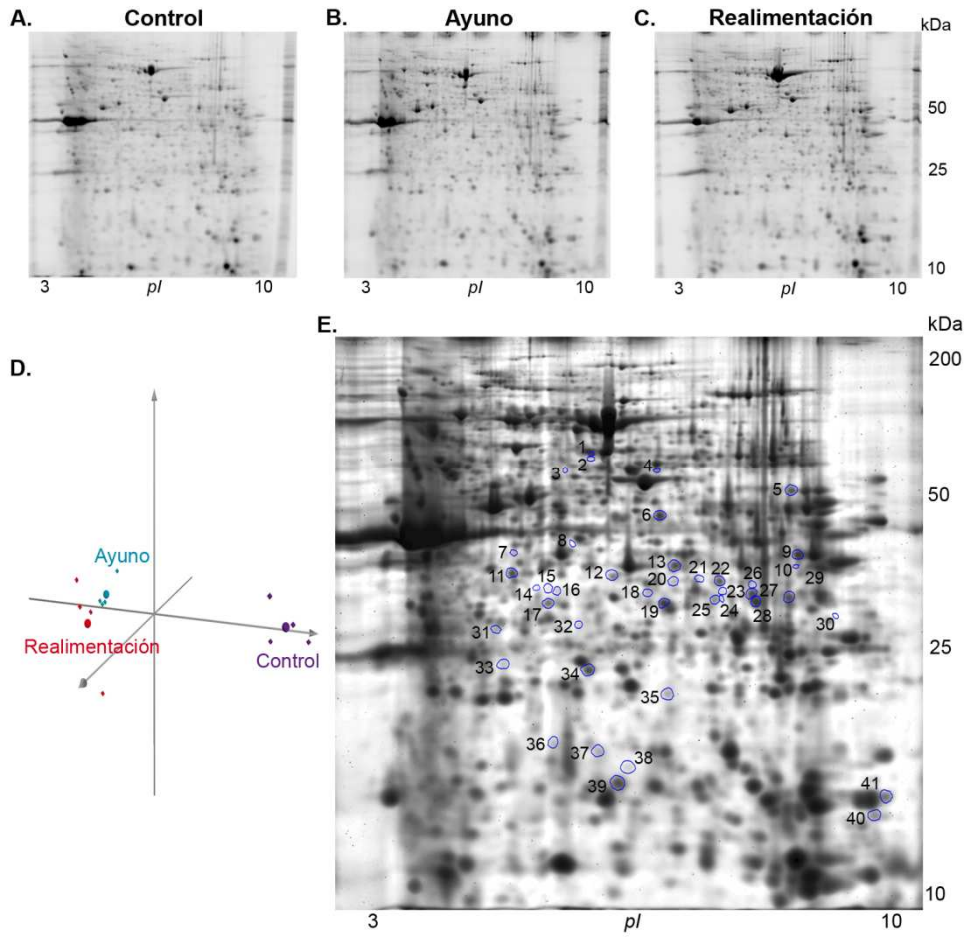


Figura 36. Análisis diferencial de secretomas gástricos con alimentación control vs ayuno vs realimentación. A, B y C) Imágenes representativas 2-DE de los secretomas de estómago procedentes de ratas en distintos estados nutricionales. D) Análisis PCA. E) Localización y numeración de las manchas secretadas diferencialmente.

Nº de mancha	*SecretomeP 2.0*	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
5	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT	A>R>C
31	0.506	Beta-actin-like protein 2	ACTBL_MOUSE	C>A=R
24	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT	C>A=R
40, 41	0.516	Calponin-1	CNN1_RAT	A=R>C
9	0.531	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_RAT	R>C=A
33	0.533	Inosine triphosphate pyrophosphatase	ITPA_MOUSE	C>A=R
11	0.537	Spermidine synthase	SPEE_MOUSE	A=R>C
13	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT	A=R>C
8	0.551	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_RAT	C>A=R
34	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT	C>A=R
21	0.573	S-formylglutathione hydrolase	ESTD_RAT	C>A=R
19	0.575	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	3HIDH_RAT	A>R>C
20	0.575	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	3HIDH_RAT	C>A=R
15	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT	C>A=R
17	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT	A=R>C
35	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	A=R>C
13	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT	A=R>C
30	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	C>A=R
27, 29	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	A=R>C
25, 28	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	R>C=A
3	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT	C>A>R
4	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT	C>A=R
38	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	C>R>A
39	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	A=R>C
7	0.630	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	ODBB_RAT	C>A=R
6	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitocondrial	IVD_RAT	A>C=R
11	0.638	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	ODPB_RAT	A=R>C
1	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT	A=R>C
18	0.663	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1_RAT	A=R>C
22	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	FAHD2_RAT	A>R>C
23	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	FAHD2_RAT	C>A=R
37	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT	R>A>C
10	0.731	Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_RAT	C>A=R

(Tabla 4, continúa en la página siguiente)

Nº de mancha	*SecretomeP 2.0*	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
34	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3_RAT	C>A=R
32	0.775	Eukaryotic translation initiation factor 4E	IF4E_RAT	C>A=R
30	0.780	Galectin-3	LEG3_RAT	C>A=R
36	0.833	Transgelin-2	TAGL2_RAT	C>R>A
2	PS	Pancreatic alpha-amylase	AMYP_MOUSE	C>A=R
1	PS	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_RAT	A=R>C
12	PS	Lambda-crystallin homolog	CRYL1_RAT	A=R>C
26	PS	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA_RAT	C>A=R
27	PS	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA_RAT	A=R>C
14, 16	PS	Carbonic anhydrase 9	CAH9_MOUSE	C>A=R

Tabla 4. Lista de proteínas identificadas en el análisis diferencial de los secretomas de estómago en diferentes condiciones nutricionales. Las proteínas se muestran ordenadas según el índice otorgado por el software *SecretomeP* que considera secreción por via no clásica un índice mayor de 0.5, y clásicas aquellas que contienen péptido señal (PS). Los niveles de presencia en cada tipo de alimentación se indican en la última columna siendo C: control; A: Ayuno; R: Realimentación.

Para determinar las rutas interactivas en las que están implicadas las proteínas secretadas identificadas, se realizaron dos tipos de análisis empleándose el software *Ingenuity Pathway Analysis*. En el primer análisis, en el que no se tuvo en cuenta la abundancia de las proteínas en el secretoma, se asociaron las proteínas secretadas a enfermedades inflamatorias, inmunológicas y hematológicas, y a procesos de metabolismo de aminoácidos, bioquímica de moléculas pequeñas y organización y ensamblaje celular (Figuras suplementarias 4 y 5). Además, al realizar el análisis incluyendo la abundancia de las proteínas en el secretoma de estómago, muchas proteínas diferencialmente secretadas se agruparon como implicadas en enfermedades metabólicas, y muchas de ellas asociadas al metabolismo de lípidos y al desarrollo y función del sistema cardiovascular (Figuras suplementarias 6 y 7).

Con el fin de validar el análisis diferencial, tras una búsqueda bibliográfica, se seleccionaron entre todas las proteínas secretadas identificadas, la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) implicada en glucolisis y la calponina-1 que juega un papel en la contracción del músculo liso.

3.3 Caracterización de la presencia de GAPDH en plasma y estómago de animales bajo diferentes condiciones nutricionales o patológicas

Con el objetivo de confirmar que GAPDH se secreta por las células gástricas, demostramos la presencia de GAPDH en el medio de cultivo de dos líneas celulares derivadas de estómago humano, AGS y KATO-III (Figura 37A).

En cuanto a los modelos animales, la expresión de ARNm y proteína de GAPDH analizada por qPCR y *western blot* respectivamente, no cambió con el estado nutricional (Figura 37B y C). Sin embargo, en concordancia con los resultados del análisis diferencial, la inmunodetección en los secretomas mostró que los niveles de GAPDH estaban elevados tras la realimentación (RA) en comparación con el control y el ayuno (RA: 151.19±20.71% vs C: 100±9.13%, Ayuno: 94.52±18.26% GAPDH; $p<0.05$; Figura 37D, Tabla 4, mancha nº 9). El aumento de la secreción se reflejó en los niveles circulantes, ya que la realimentación incrementó significativamente los valores plasmáticos de GAPDH (C: 100±20.83%, Ayuno: 119.07±28.72%, RA: 213.09±46.25%; $p<0.01$ vs C; $p<0.05$ vs Ayuno; Figura 37E).

Como observamos que los niveles plasmáticos y de secreción gástrica de GAPDH estaban regulados por el estado nutricional, decidimos examinar los valores de GAPDH en animales obesos. De manera similar a los resultados observados con la variación del estado nutricional, la expresión de ARNm y proteína de GAPDH permaneció invariable en animales alimentados con dieta HF (Figura 37F y G). No obstante, las ratas DIO mostraron un descenso significativo de la secreción gástrica de GAPDH en comparación con sus controles (C: 100±29.3% vs DIO: 13.99±8.26%; $p<0.05$; Figura 37H). Esta disminución se observó también en los niveles plasmáticos de GAPDH en ratas DIO, aunque no fue estadísticamente significativa (C: 100±37.26% vs DIO: 29.18±10.67%; diferencias no significativas; Figura 37I). Estos resultados sugirieron que los niveles circulantes de GAPDH podrían cambiar bajo diferentes situaciones metabólicas y patológicas debido a variaciones directas en la secreción gástrica.

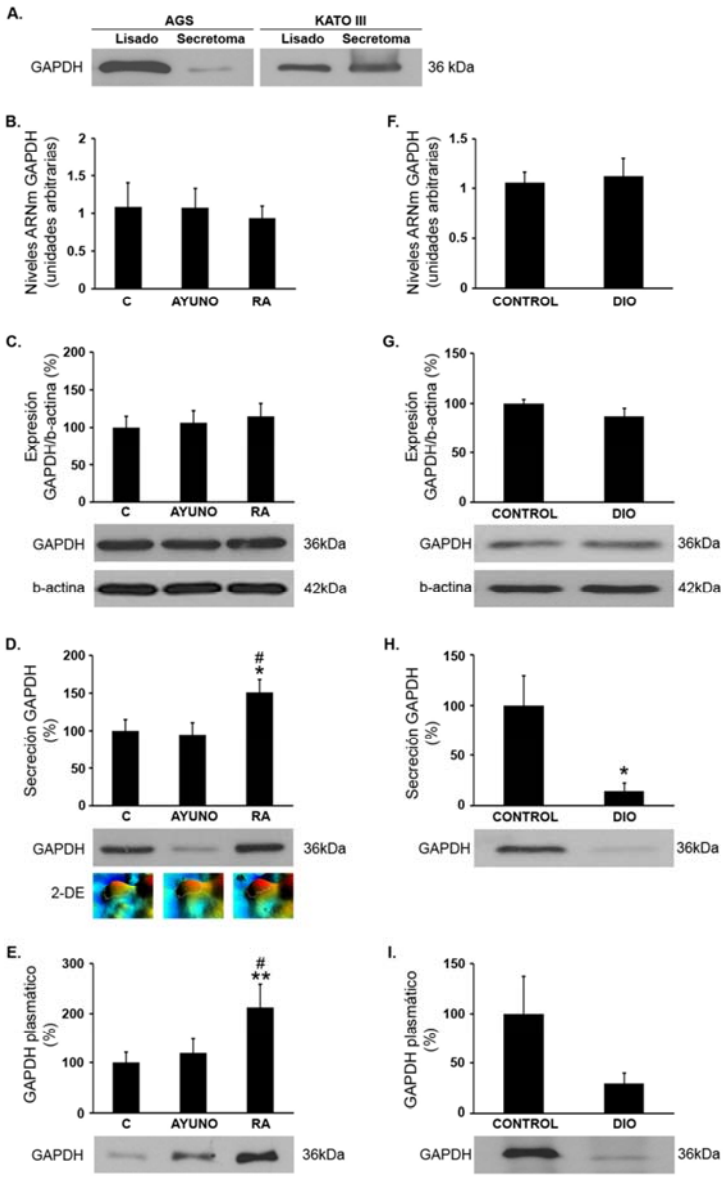


Figura 37. Caracterización de GAPDH. Presencia de GAPDH en lisado y secretoma celular de dos líneas celulares gástricas (A). Niveles de ARNm de GAPDH en mucosa gástrica (B, F). Imágenes representativas de *western blot* e histogramas de cuantificación de las bandas de la expresión proteica en mucosa gástrica (C, G), secreción gástrica (D, H) y los niveles plasmáticos (E, I) de GAPDH, e imágenes representativas de GAPDH en los geles 2-DE (D). C: control, RA: realimentación, DIO: obesidad inducida por la dieta. n=6-10. *p<0.05; **p<0.01 vs control; #p<0.05 vs ayuno.

3.4 Caracterización de las isoformas de calponina-1 en plasma y secretomas gástricos de animales bajo diferentes condiciones nutricionales o patológicas

La calponina-1 es una proteína de 34 kDa que se expresa principalmente en músculo liso, aunque se han descrito otras isoformas de menor peso molecular en otros tejidos [274,275]. En el análisis diferencial de secretoma de estómago, hemos identificado dos isoformas de aproximadamente 17 kDa y punto isoeléctrico básico, por lo que decidimos para la validación realizar *western blot* bidimensional (2D) en un rango de pH de 6 a 11. En la Figura 38A se muestran las imágenes representativas de *western blot* 2D de secretomas gástricos en diferentes situaciones nutricionales. Las dos manchas esperadas por su peso molecular y su pI como las isoformas identificadas en la 2-DE (Figura 36E, Tabla 4, manchas nº 40 y 41), se muestran en el área ampliada con mayor exposición. Las densitometrías de las manchas 40 y 41 de los *western blot* 2D de cuatro experimentos independientes se expresaron como porcentajes respecto a los niveles de secreción del control (Figura 38B y C). El ayuno y la realimentación aumentaron significativamente la secreción de ambas isoformas de la calponina-1 con respecto al control (Figura 38B y C). Estos datos corroboraron los resultados obtenidos en el análisis proteómico (Figura 36E, Tabla 4, manchas 40 y 41).

Además se detectaron siete manchas separadas por su punto isoeléctrico, con un peso molecular de aproximadamente 34 kDa que corresponden cada una de ellas a formas fosforiladas de la misma proteína. La cuantificación de estas siete machas se representa en la figura 36D, mostrando que estas isoformas siguen la misma tendencia que las isoformas de 17 kDa, aumentando la secreción significativamente tras la realimentación en todas las isoformas en comparación con su control. Sin embargo, el incremento de la secreción en situación de ayuno sólo fue significativo en la isoforma A (Figura 38D, $p<0.05$). Además, el aumento de la secreción tras la realimentación fue significativo en las manchas A y B en comparación con el ayuno (Figura 38D, $p<0.05$).

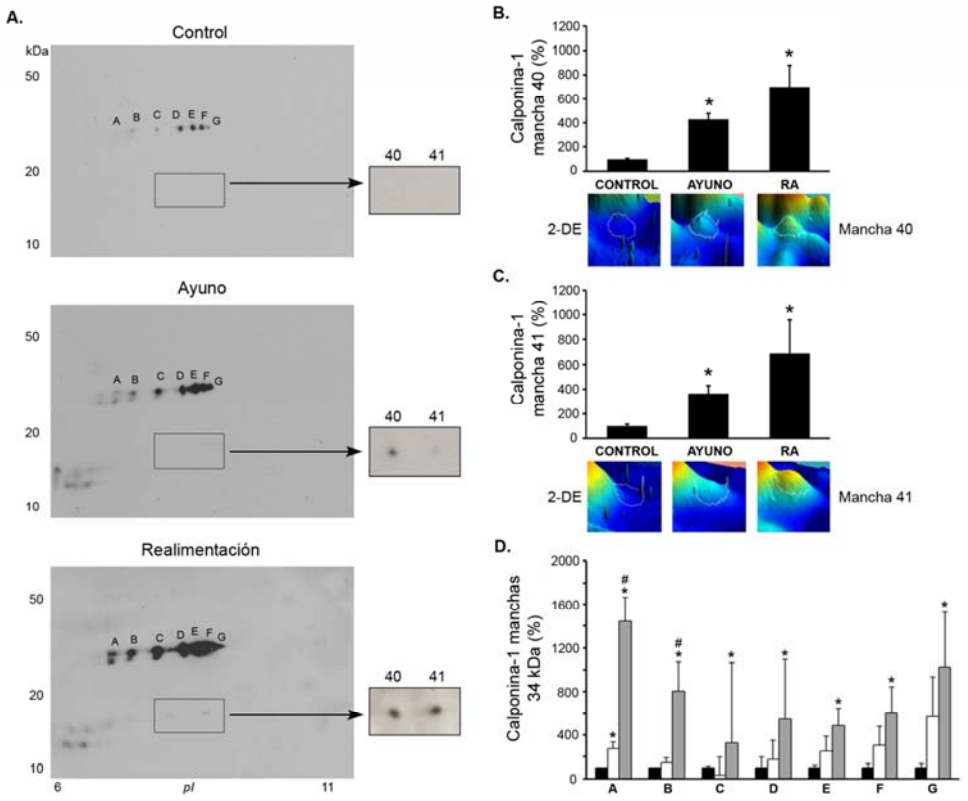


Figura 38. Secreción gástrica de calponina-1. Los niveles de calponina-1 se midieron mediante *western blot* 2D en secretomas de estómago de animales en distintas situaciones nutricionales: alimentación control, ayuno de 48 horas y realimentación de 1 hora tras el ayuno (RA). Imágenes representativas de *western blot* 2D (A). Imágenes representativas de las manchas 40 (B) y 41 (C) en los geles 2-DE. Histogramas de la cuantificación de las manchas de *western blot* 2D de las isoformas 40 (B), 41 (C) y las isoformas más abundantes con peso molecular de 34 kDa (D). n=4. *p<0.05 vs control; #p<0.05 vs ayuno.

Después de confirmar que los niveles de secreción de las isoformas de calponina-1 detectadas en el análisis 2-DE varían con el estado nutricional, el siguiente objetivo fue caracterizar la regulación de la expresión y secreción de esta proteína por el estómago. La calponina-1 se ha descrito principalmente en músculo liso por lo que testamos la presencia de calponina-1 en las líneas celulares AGS y Kato-III derivadas del epitelio glandular de la mucosa gástrica. Se detectó una banda de 34 kDa de calponina-1 tanto en el lisado como el secretoma celular de ambas líneas celulares (Figura 39A), indicando que la calponina-1 se expresa y secreta por las células de la mucosa del estómago; a pesar de que no se detectaron isoformas de menor peso molecular.

La expresión de calponina-1 se detectó además en la mucosa gástrica mediante qPCR y *western blot* en los animales a estudio. Los animales en ayuno exhibieron una disminución no significativa de los niveles de ARNm en comparación con los ad líbitum que fue parcialmente revertida con la realimentación (C: 1.33±0.46, Ayuno: 0.67±0.14, RA: 1.03±0.31 unidades arbitrarias; diferencias no significativas; Figura 39B). Sin embargo no se observaron cambios en la expresión de proteína (Figura 39C). Al igual que en las líneas celulares, no se detectó la banda de calponina-1 de 17 kDa en la mucosa de estómago.

En concordancia con los resultados del *western blot* 2D, la secreción de calponina-1 de 34 kDa se elevó significativamente después de la realimentación (C: 100±11.57%, Ayuno: 107.71±12.3%, RA: 136.33±11.04%; $p<0.05$; Figura 39D). Los cambios en la secreción de la calponina-1 de 34 kDa se reflejaron en los niveles circulantes con un aumento de los niveles de calponina-1 de 34 kDa en el ayuno ($p<0.05$) y tras la realimentación ($p<0.01$) (C: 100±9.69% vs Ayuno: 172.4±29.47%, RA: 267.2±54.95%; Figura 39F). El *western blot* monodimensional demostró que los niveles de secreción de calponina-1 se elevaron significativamente tras la realimentación, sin embargo no se observó la elevación esperada en situación de ayuno (C: 100±12.07%, Ayuno: 76.3±17.91%, RA: 219.43±47.63%; $p<0.05$ vs C; $p<0.01$ vs Ayuno; Figura 39E). En el *western blot* 2D se detectaron varias isoformas de aproximadamente 15-17 kDa cuyos niveles fueron más elevados que las manchas seleccionadas 40 y 41, que podrían enmascarar los cambios de estas isoformas en el *western blot* 1D (Figura 38A). La realimentación también provocó el aumento de los niveles circulantes de la calponina-1 de 17 kDa, produciéndose además una elevación de los niveles plasmáticos en animales en ayuno como en la

calponina-1 de 34 kDa (C: 100±13.3% vs Ayuno: 145.34±12.03%, RA: 155.67±18.96%; p<0.05 vs C; Figura 39G).

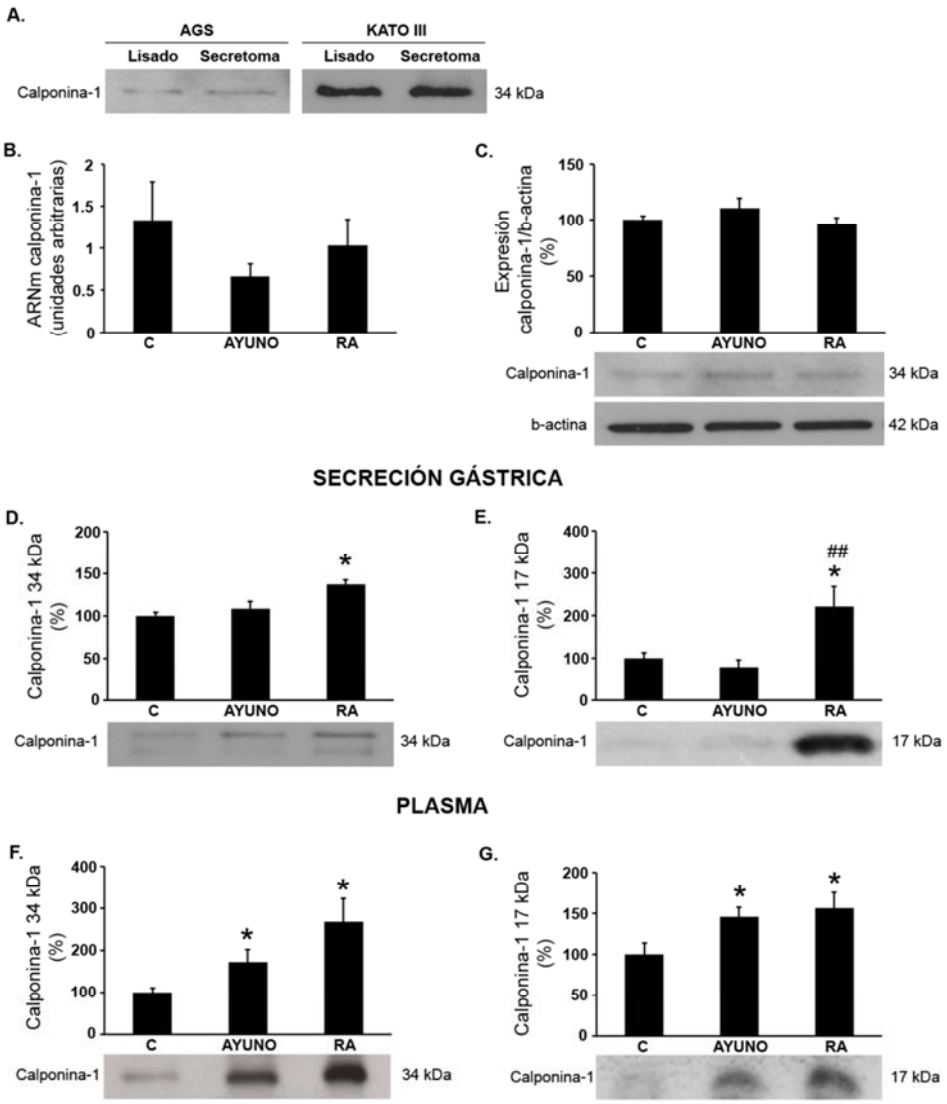


Figura 39. Regulación de la calponina-1 en diferentes condiciones nutricionales; C: alimentación control, Ayuno: 48 horas y RA: realimentación de 1 hora tras 48 horas de ayuno. Presencia de la calponina-1 de 34 kDa en lisado y secretoma celular de dos líneas celulares gástricas (A), Niveles de ARNm de calponina-1 (B). Expresión de calponina-1/β-actina en mucosa gástrica (C). Niveles de calponina-1 de 34 y 17 kDa en explantes gástricos (D, E) y plasma (F, G) respectivamente. n=6-8. *p<0.05; **p<0.01 vs C; #p<0.05 vs Ayuno.

Debido al interés en conocer si la secreción gástrica de calponina-1 está alterada en situaciones patológicas, examinamos los niveles de calponina-1 en el modelo DIO. Las ratas alimentadas con dieta alta en grasa mostraron un ligero descenso de los niveles de ARNm en comparación con los controles, a pesar de que este cambio no fue estadísticamente significativo (C: 1.11±0.19 vs DIO: 0.76±0.16 unidades arbitrarias; diferencias no significativas; Figura 40A). La expresión de proteína no cambió en la mucosa gástrica de animales obesos (Figura 40B); sin embargo, sorprendentemente, la secreción gástrica de calponina-1 disminuyó dramáticamente en animales obesos en comparación con los controles, tanto la isoforma de 34 kDa (C: 100±39.47% vs DIO: 11.43±5.76%; $p<0.05$; Figura 40C) como la de 17 kDa (C: 100±43.01% vs DIO: 11.85±4.44%; $p<0.05$; Figura 40D). Por otro lado, la dieta alta en grasa no afectó a los niveles plasmáticos de calponina-1 (Figura 40E y F), indicando que los niveles circulantes de calponina-1 en animales obesos podrían estar regulados por otros tejidos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

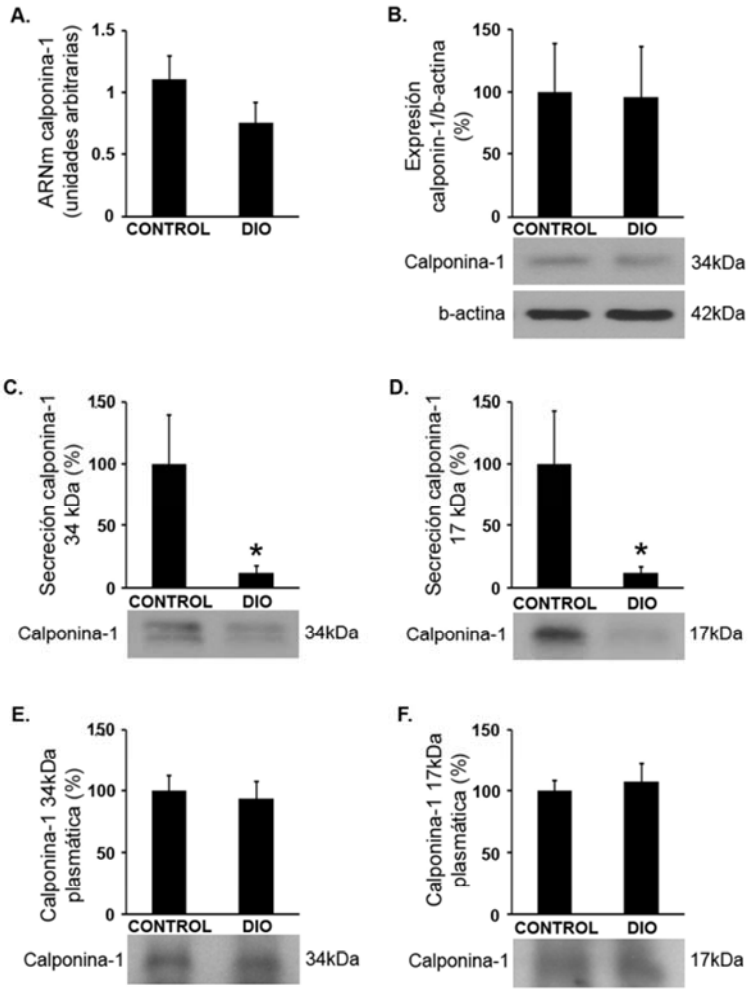


Figura 40. Caracterización de la calponina-1 en el modelo DIO. Niveles de ARNm de calponina-1 (A) y expresión proteica de calponina-1/β-actina en mucosa gástrica (B). Determinación de los niveles de calponina-1 de 34 y 17 kDa en explantes gástricos (C, D) y plasma (E, F) respectivamente, mostrándose imágenes representativas de *western blot* e histogramas de cuantificación de las bandas. n=6-10 *p<0.05.



DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 PAPEL DE LA INTERACCIÓN ENTRE GHRELINA Y CB1 MEDIADA POR LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MTOR/S6K1 A NIVEL GÁSTRICO EN LA REGULACIÓN DE LA INGESTA

La obesidad es una enfermedad que ha aumentado exponencialmente en los últimos años hasta llegar a considerarse uno de los principales problemas de salud pública en los países desarrollados. Las terapias existentes han sido muy poco efectivas, por la tanto, es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir esta patología. En los últimos años la investigación en la lucha contra la obesidad se ha centrado en el estudio de los mecanismos homeostáticos que defienden el mantenimiento del peso corporal, entre ellos el sistema cannabinoide endógeno ha cobrado especial relevancia. Numerosos estudios han sugerido que el sistema endocannabinoide está implicado en el apetito y la ingesta [138]. Una de las terapias más exitosas hasta la fecha en el campo de la obesidad se basaba en el tratamiento farmacológico con rimonabant, un inhibidor del receptor endocannabinoide CB1; sin embargo este fármaco fue retirado del mercado por sus efectos secundarios a nivel de SNC. El desarrollo de fármacos que actúen exclusivamente sobre el receptor endocannabinoide a nivel periférico podría regular la ingesta y el peso corporal sin producir efectos secundarios adversos a nivel central. Por ello, es esencial conocer los mecanismos de acción del receptor CB1 a nivel periférico implicados en la regulación del balance energético.

Varias aproximaciones experimentales han demostrado con anterioridad el efecto reductor de la ingesta que posee el rimonabant. Los datos presentados en este trabajo demuestran que la inyección periférica de rimonabant revierte el efecto orexigénico producido por la administración central de ghrelina (Figura 20A y B). Además, fue sorprendente descubrir que que el rimonabant per se era capaz de inducir la disminución de la ingesta basal, aunque únicamente en animales sometidos a ayuno nocturno (Figura 20B). Sin embargo, los efectos anorexigénicos del rimonabant desaparecieron en animales que habían sido previamente sometidos a una intervención de vagotomía quirúrgica, en la cual se interrumpe la comunicación entre el estómago y cerebro a través del nervio vago (Figura 20C). Este descubrimiento muestra que la comunicación vagal es clave para los efectos del ECS sobre la regulación del apetito. Este hallazgo fue sugerido previamente por Gómez y colaboradores, quienes demostraron que el tratamiento sistémico con

capsaicina, que destruye las aferencias amielínicas viscerales, bloquea el efecto inhibitorio sobre la ingesta del rimonabant [176]. Sin embargo, otro estudio publicado por Madsen y col. demostró que las aferencias vagales intactas no son necesarias para la acción anorexigénica del rimonabant [276]. La principal diferencia entre el trabajo de Madsen y col. y el estudio presente fue la vía de administración. En el estudio previo, el rimonabant se administró por vía oral, mientras que en nuestro trabajo y el trabajo de Gómez el rimonabant se administró intraperitonealmente.

Por lo tanto, los datos mostrados sugieren que la administración periférica de rimonabant en animales hambrientos es interpretada a nivel gástrico como una señal de saciedad. Se ha demostrado repetidamente que los animales en estado de ayuno presentan niveles elevados de ghrelina con efectos orexigénicos mediados principalmente a través del nervio vago [84,106]. Los resultados de este trabajo demuestran que el rimonabant periférico actúa localmente a nivel gástrico para reducir la secreción de ghrelina y consecuentemente, inducir la disminución de la ingesta.

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en este trabajo de tesis mostraron que las células neuroendocrinas productoras de ghrelina se localizan próximas a las células CB1-positivas en el estómago y presentan patrones de distribución similares (Figura 21). En ratas se ha descrito la expresión de CB1 en elementos neurales colinérgicos pre- y post-ganglionares que inervan el músculo liso y los vasos sanguíneos localizados en la mucosa y la submucosa [148]. Sin embargo, estos estudios no demostraron la localización de estos receptores en las células neuroendocrinas del estómago.

Tras demostrar el efecto anorexigénico del rimonabant sobre la ingesta basal e inducida por ghrelina y la positividad de CB1 y ghrelina en las células neuroendocrinas del estómago, a continuación se estudió si estos sistemas interactuaban a nivel local en el estómago para regular el balance energético. Para ello, se empleó un modelo de cultivo de tejido gástrico previamente desarrollado y validado por nuestro grupo [84,90,91]. Con este modelo se demostró que la administración periférica de rimonabant revierte el incremento de la secreción gástrica de ghrelina inducida por el ayuno (Figura 22B). Sin embargo, en animales alimentados ad líbitum, que exhiben niveles basales de secreción de ghrelina, la administración no produjo ningún efecto (Figura 22A). Estos datos apoyan los resultados obtenidos en los estudios de ingesta en los cuales la administración de

rimonabant no modificó la ingesta en animales ad líbitum (Figura 20A). Sin embargo, indujo un fuerte efecto anorexigénico en animales sometidos a ayuno nocturno (Figura 20B). A la luz de estos descubrimientos, podemos afirmar que el efecto anorexigénico de los antagonistas de los receptores CB1 (rimonabant y AM281) está mediado por la inhibición de la secreción gástrica de ghrelina. Además, en concordancia con la falta de efecto del rimonabant sobre la ingesta en animales vagotomizados (Figura 20C), los estudios gástricos del presente trabajo mostraron que la vagotomía suprimió la inhibición de ghrelina producida por el rimonabant (Figura 22B), lo cual, a su vez indica que la comunicación vagal estómago-cerebro debe estar operativa para asegurar la interacción eficiente entre ghrelina y CB1. En consecuencia, en los experimentos *in vitro* en los cuales se aplicó el tratamiento con rimonabant a los explantes de tejido gástrico una vez aislado el estómago del organismo (por tanto en los que la comunicación vagal no estaba operativa), el rimonabant no afectó a la secreción gástrica de ghrelina (Figura 24). Para corroborar estos resultados y evaluar si la secreción de ghrelina por el estómago se refleja en los niveles circulantes de ghrelina, se midieron los niveles plasmáticos de ghrelina en los grupos experimentales. Como se muestra en la sección de resultados (Figuras 22D y 27B), tanto la administración periférica de rimonabant como de AM281 disminuyó los niveles de ghrelina en plasma. Por tanto, los niveles circulantes de ghrelina son un reflejo de las variaciones en la secreción de ghrelina por el estómago. Estos datos corroboran los descubrimientos de otros autores que describieron la regulación de los niveles plasmáticos de ghrelina mediante el tratamiento con diferentes agonistas y antagonistas del receptor CB1 [181,182].

Los estudios de secreción, expresión proteica y niveles de ARNm de ghrelina en tejido gástrico permitieron establecer el mecanismo gástrico de regulación de la ghrelina por cannabinoides. El mecanismo mencionado se hizo evidente con el hallazgo de la disminución de secreción de ghrelina por el estómago encontrada tras el tratamiento ip con rimonabant (Figura 22B); esta reducción en la secreción de ghrelina fue acompañada por el aumento del contenido en ghrelina presente en la mucosa gástrica medida por *western blot* (Figura 23D), sin observarse variaciones en los niveles de ARNm de ghrelina (Figura 23B). Además, se observó un aumento de la secreción gástrica de ghrelina en los animales en ayuno en comparación con el grupo ad líbitum (Figura 22A y B); este hecho se reflejó en el contenido de ghrelina dentro de las células como se demostró por *western blot* (Figura 23E y F). El

conjunto de los datos presentados en este trabajo ratifican el mecanismo fisiológico de la regulación de la secreción gástrica de ghrelina que había sido previamente descrito por nuestro grupo en otras condiciones experimentales [91].

En los mismos modelos experimentales se analizaron los niveles de expresión de ARNm de CB1 en la mucosa gástrica por qPCR, siendo especialmente interesante la disminución significativa de los niveles de ARNm de CB1 en los estómagos de animales en ayuno tras el tratamiento periférico de rimonabant, y la ausencia de efecto de este fármaco sobre la expresión de estos receptores en los animales saciados (Figura 23E y F). Estos datos refuerzan los resultados que demuestran los efectos del rimonabant sobre la regulación de la ghrelina y el control de la ingesta, observados exclusivamente en animales en ayuno. La disminución de los receptores CB1 inducida por el rimonabant podría estar asociada con la reducción de la liberación de ghrelina por el estómago [46]. Al contrario, la vagotomía quirúrgica provocó la disminución de la expresión de los receptores CB1 tanto en animales alimentados ad líbitum como en ayuno, lo que podría explicar la ausencia de efecto del rimonabant sobre la ingesta encontrada en los animales sometidos a vagotomía quirúrgica (Figura 20C).

El siguiente paso se centró en la búsqueda del mecanismo intracelular responsable de la interacción entre ghrelina y el ECS en el estómago. Xu y colaboradores demostraron que la inhibición de la señalización gástrica de mTOR provoca un incremento de los niveles de ARNm de ghrelina, de ARNm de GOAT y de pre-proghrelina en la mucosa y un aumento de la ghrelina circulante, indicando la existencia de una relación inversa entre la vía de señalización de mTOR/S6K1 gástrica y la producción de ghrelina durante los cambios del estado energético [85]. Por ello, se estudió el posible papel de la ruta de mTOR/S6K1 como mediador de la interacción gástrica entre la ghrelina y el ECS. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, los presentes datos son los primeros en demostrar que la administración de rimonabant o AM281 en animales en ayuno activa la ruta de señalización de mTOR/S6K1, como se comprobó por el aumento significativo de la fosforilación de mTOR (Figuras 25A y 27C) y la tendencia hacia el incremento de la fosforilación de S6K1, una molécula diana de mTOR (Figuras 25B y 27D). En concordancia con nuestros resultados, se había descrito previamente que el ayuno induce la disminución de la fosforilación de mTOR en la mucosa gástrica, y nosotros hemos demostrado que la administración de rimonabant revierte este efecto (Figura

25A). Además, de acuerdo con los resultado previos, en el presente proyecto la disminución de la secreción gástrica de ghrelina (Figuras 26A y 27A) y el descenso de sus niveles circulantes (Figuras 26B y 27B) observados en los animales en ayuno tratados con antagonistas de CB1 coincidieron con la activación de la ruta mTOR/S6K1 (Figura 25A y B y Figura 27C y D).

Finalmente, confirmamos nuestros resultados empleando un modelo *in vivo* en el cual se bloqueó farmacológicamente la ruta de mTOR/S6K1 con el objetivo de demostrar el papel clave de esta ruta intracelular en el sistema gástrico. Con este fin, se analizó el efecto de la administración de rimonabant en animales sometidos a tratamiento crónico de rapamicina.

En los animales tratados con rapamicina, el tratamiento con rimonabant no tuvo efecto sobre la fosforilación de mTOR o S6K1 (Figura 25A y B). Además, la inyección de rimonabant a ratas con bloqueo farmacológico de la ruta de mTOR en ayuno, no produjo efecto sobre la secreción gástrica de ghrelina, la expresión de ARNm de ghrelina o los niveles circulantes de ghrelina (Figura 26), demostrando en consecuencia que para que se produzca la interacción entre el ECS y la ghrelina a nivel gástrico se requiere la ruta de mTOR funcional. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de la implicación de otras rutas de señalización en este sistema, y los estudios futuros deberían centrarse en la identificación de otras rutas de transducción de señales adicionales involucradas en este mecanismo de regulación gástrica, por ejemplo AMPK está implicada en la interacción entre ghrelina y CB1 en otros tejidos periféricos como hígado, corazón y tejido adiposo [186].

En resumen, estos datos demuestran por primera vez que las células gástricas perciben el bloqueo farmacológico del receptor CB1 mediante el tratamiento periférico de rimonabant como una señal comparable a la ingesta de comida, como se demostró por la activación de la ruta de mTOR/S6K1. En consecuencia, el tejido gástrico responde inhibiendo la secreción de ghrelina que se encuentra normalmente aumentada en condiciones de ayuno, lo que da lugar a una reducción de la ingesta debida a la disminución de la señalización orexigénica al cerebro mediada por las conexiones vagales. En conclusión, se ha demostrado la existencia de un mecanismo gástrico formado por la interacción entre el sistema cannabinoide endógeno (CB1) y la ghrelina que está mediada por la ruta de señalización de mTOR y, provoca un efecto fisiológico en la regulación de la ingesta que para ser efectivo requiere que la comunicación vagal se encuentre operativa.

2 CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA NUCB2/NESFATINA-1 EN EL ESTÓMAGO, TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO Y PLASMA

La nesfatina-1 se descubrió en 2006 como un nuevo péptido anorexigénico derivado de la proteína NUCB2 en las principales áreas hipotalámicas reguladoras de la ingesta y del peso corporal [188]. Posteriormente se detectó en otros tejidos periféricos, siendo el estómago uno de los órganos de mayor expresión. Diferentes investigadores han estudiado la acción anorexigénica de nesfatina-1 y la regulación de sus niveles gástricos y circulantes en distintas situaciones metabólicas [198]. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre la regulación de los niveles de NUCB2/nesfatina-1 a lo largo del desarrollo, y además no existen datos de la secreción directa por el estómago.

Bajo este contexto, en este trabajo el estudio de NUCB2/nesfatina-1 se ha centrado en la regulación de sus niveles circulantes durante el desarrollo postnatal y su producción en tejidos periféricos. Así, se ha demostrado que la edad, los esteroides sexuales y las modificaciones de la dieta regulan la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el estómago y el tejido adiposo subcutáneo. La valoración de los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 en diferentes etapas de desarrollo mostró que los niveles circulantes de esta hormona se mantuvieron constantes en el caso de ratas hembra a lo largo de la vida (Figura 28). Sin embargo, en ratas macho, estos niveles aumentaron a las 4 semanas de edad, observándose un pico en la concentración de NUCB2/nesfatina-1 a las 6 semanas que continuó elevada hasta las 8 semanas (Figura 28). En los estadíos adultos (6 y 8 semanas) se observó un claro dimorfismo sexual con niveles significativamente más altos en ratas macho que en ratas hembra.

Un estudio previo de Mohan y colaboradores sugiere que el papel potencial de NUCB2/nesfatina-1 en la fisiología del desarrollo de ratas en crecimiento depende de la edad y el tejido [218]. Sin embargo, hasta ahora, no existía ningún estudio que haya analizado la producción de NUCB2/nesfatina-1 por parte del tejido adiposo y gástrico a lo largo de las distintas etapas de la vida. Los resultados mostrados sugieren que en machos existen dos periodos relevantes en la regulación de los niveles de NUCB2/nesfatina-1. La primera etapa se produce a las 4 semanas de edad, cuando los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 aumentan significativamente (Figura 28). Este hecho tiene lugar inmediatamente después del

destete, que es la transición de la lactancia a la alimentación sólida y está asociado con modificaciones severas en la morfología y secreción del estómago, como se ha demostrado previamente con la ghrelina [91].

Se ha descrito que el estómago es una fuente importante de NUCB2/nesfatina-1, siendo 10 veces superior la expresión de NUCB2 en este órgano que en el cerebro [208]. Por todo esto, decidimos explorar mediante el uso del sistema de explantes gástrico la implicación del estómago en la modulación de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1. Se observó que la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago en machos disminuía justo después del destete (Figura 29A), y este patrón fue inverso al que se encontró en los niveles plasmáticos (Figura 28). En hembras, a pesar de la falta de variación de los niveles circulantes con la edad, la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 también disminuyó drásticamente tras el destete (Figura 29A). Además se observó que existe una regulación dinámica que coordina la expresión de ARNm, la expresión proteica y la secreción de NUCB2/nesfatina-1 del estómago para modular la producción gástrica del péptido, de manera similar a lo descrito previamente por nuestro grupo para la regulación de la ghrelina [91]. Corroborando este mecanismo, la disminución en la secreción de NUCB2/nesfatina-1 en los explantes gástricos se reflejó en un incremento del contenido de NUCB2 en la mucosa gástrica a las 4 semanas de edad (Figura 29C); este aumento fue promovido por la elevación de la expresión de ARNm de NUCB2 detectada en la mucosa gástrica (Figura 29B). Estos datos coinciden con los resultados previos que mostraron una expresión menor de NUCB2 en la mucosa gástrica en la etapa adulta en comparación con el periodo perinatal [218], y la variación asociada a la edad en la distribución de la células NUCB2/nesfatina-1 positivas en el estómago durante el periodo perinatal cuando la dieta cambió de leche materna a pienso comercial [218].

Para investigar en profundidad el efecto del destete en la producción de NUCB2/nesfatina-1, se utilizó el modelo de retraso del destete [91], en el cual las crías se mantuvieron lactando con la madre hasta las 4 semanas de edad, una semana más de lo habitual. El retraso del destete no afectó a los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 ni en machos ni en hembras (Figura 31A), lo cual en ratas hembra, concuerda con los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 que no varían con la edad. No obstante, las ratas hembra sometidas al retraso del destete presentaron una elevación de la secreción de NUCB2 por el estómago (Figura 31B)

sin cambios en los niveles de NUCB2 en la mucosa gástrica (Figura 31D), probablemente debido al aumento de los niveles de ARNm (Figura 31C) que compensaron el incremento de la secreción. Estos datos corroboraron los niveles elevados de secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 detectados en ratas lactantes (de 2 semanas de edad) en comparación con los animales destetados. En ratas macho, no se encontraron diferencias en la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 (Figura 31B), mRNA (Figura 31C) o contenido de NUCB2 en la mucosa gástrica (Figura 31D) en animales que eran todavía lactantes en comparación con aquellos animales destetados a la edad habitual (3 semanas). Estos resultados fueron sorprendentes ya que el modelo del retraso del destete no reprodujo el aumento de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 a las 4 semanas de edad (Figura 28) que acompañó a la disminución de la secreción gástrica (Figura 29A). Sin embargo, a pesar de la semejanza en edad con sus respectivos controles, hay que tener en cuenta que los animales con retraso del destete presentan niveles más bajos de testosterona (Figura suplementaria 1); lo cual podría interferir en la producción de NUCB2/nesfatina-1 de alguna manera. De hecho, en animales con niveles semejantes de testosterona (2 y 4 semanas de edad), se observó claramente que el destete disminuye la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago (Figura 29A).

Para aclarar la discrepancia entre los datos de secreción gástrica y los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1, consideramos la posibilidad de la implicación de otros tejidos en la regulación de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1. En 2010, Ramanjaneya y col. describieron por primera vez que la nesfatina-1 es una adipoquina producida mayoritariamente en los depósitos subcutáneos que está regulada por el estado metabólico [209]. Así, nuestros resultados mostraron, tanto en machos como en hembras, que la regulación de los niveles de ARNm en el tejido adiposo se ve afectada con la edad variando la expresión de NUCB2 a las 4 y 6 semanas de edad (Figura 30).

Al contrario de lo que ocurre con la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 en hembras, el contenido de NUCB2 en TAS aumentó con el retraso del destete (Figura 31F) a pesar de que no se observaron cambios en los niveles de ARNm (Figura 31E); esta acumulación intracelular en el contenido en NUCB2 sin variaciones en los niveles de ARNm estaría indicando que se está produciendo una disminución en la secreción de NUCB2 desde la grasa. Bajo esta hipótesis, los efectos opuestos del retraso del destete en ambos tejidos, estómago y TAS,

sugieren que podrían estar modulando el equilibrio en los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 como se muestra por la ausencia de variaciones de los niveles circulantes tras el retraso del destete. El conjunto de estos datos revelan por primera vez la existencia de una comunicación entre el estómago y el tejido adiposo para regular los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1. La existencia de esta comunicación fue apoyada por la elevada secreción de NUCB2/nesfatina-1 del estómago y la menor producción en la grasa procedente de ratas lactantes que se observa en los animales de 2 y 4 semanas de edad (Figuras 29 y 30).

Los resultados mostrados describen un dimorfismo sexual en la producción de NUCB2/nesfatina-1. En primer lugar, los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 se encontraron significativamente elevados en ratas macho adultas (6 y 8 semanas) en comparación con las hembras de la misma edad, observándose un pico en los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 a las 6 semanas de edad (Figura 28), que coincide en ratas macho con la pubertad que comienza con un aumento en los niveles de testosterona (Figura suplementaria 1). En ratas hembra, la pubertad se produce a las 4 semanas, como se muestra por el incremento del peso del útero que refleja la elevación de los niveles de estrógenos (Figura suplementaria 1). En ratas hembra, los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 no variaron con la pubertad; sin embargo, la expresión de NUCB2 en el TAS cambió durante la pubertad temprana en hembras (4 semanas) y machos (6 semanas) (Figura 30A y B). Estos resultados sugieren que la liberación de NUCB2/nesfatina-1 desde el TAS aumentó con el inicio de la pubertad, como se dedujo por el aumento de la expresión de ARNm (Figura 30A) y la disminución del contenido de NUCB2 (Figura 30B) a las 4 semanas en hembras y a las 6 semanas en machos. Es posible que esta modulación se produzca para suplir la demanda del organismo durante periodos específicos de la vida; debido a que los niveles de estrógenos y testosterona regulan esta modulación, se sugiere que ambas hormonas podrían actuar en el estómago y/o el TAS para regular la producción de NUCB2/nesfatina-1. Para investigar esta posibilidad, se utilizó un modelo de administración de testosterona y estrógenos (T/E2) a animales adultos que fueron sometidos previamente a gonadectomía quirúrgica para reproducir el efecto de las variaciones de testosterona y estrógenos durante la pubertad sobre la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1. El tratamiento con testosterona incrementó los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 (Figura 32A) y la secreción de NUCB2/nesfatina-1 desde los explantes gástricos (Figura

32C). Además, corroborando la dinámica de la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el tejido gástrico, el aumento de la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 se reflejó en un descenso de la cantidad de NUCB2 en la mucosa gástrica medida por *western blot* (Figura 32G); sin encontrar diferencias en los niveles de ARNm, que se mostraron disminuidos por el efecto de la orquidectomía (Figura 32E). Estos datos muestran firmemente el efecto estimulador de la testosterona sobre la secreción gástrica y los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 y explica el dimorfismo sexual en los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 entre machos y hembras. Nuestros estudios de la regulación de NUCB2/nesfatina-1 en el TAS mostraron que la supresión de los niveles de testosterona mediante orquidectomía quirúrgica provocó la disminución de los niveles de ARNm de NUCB2 (Figura 33A), aunque el contenido de NUCB2 en el TAS permanece constante, sugiriendo que en este tejido la secreción de NUCB2/nesfatina-1 podría disminuir también en ausencia de testosterona. Además, el tratamiento con testosterona revirtió el efecto de la orquidectomía (Figura 33A). En conjunto, estos datos mostraron que la testosterona no sólo afecta a la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 sino que también está implicada en la producción de NUCB2 en el TAS en ratas macho. Además, estos resultados explican la ausencia de efecto del retraso del destete sobre la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el estómago y el TAS descrita previamente, ya que los animales con retraso del destete presentan niveles de testosterona menores que los destetados a la edad habitual (Figura suplementaria 1), y este factor podría enmascarar el efecto de la lactancia.

En ratas hembra, en concordancia con la ausencia de variaciones de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 durante la pubertad, el tratamiento con estrógenos no afectó a los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1 (Figura 32B). Además, el tratamiento con dosis suprafisiológicas de estrógenos no tuvo ningún efecto sobre la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por los explantes gástricos (Figura 32D), los niveles de ARNm (Figura 32F) o la expresión de NUCB2 en la mucosa gástrica (Figura 32H). Sin embargo, la ausencia de estrógenos en animales sometidos a ovariectomía quirúrgica indujo un incremento de los niveles de ARNm de NUCB2 en el TAS (Figura 33B), y este cambio provocó la elevación de la acumulación de NUCB2 en la grasa subcutánea (Figura 33D), probablemente como una consecuencia de la disminución de la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el TAS en ausencia de estrógenos. Estos datos sugieren que el incremento de los

niveles de estrógenos en el periodo de la pubertad, que comienza a las cuatro semanas en ratas hembra, es responsable del aumento de la secreción de NUCB2/nesfatina-1 desde el TAS pero no afecta a la secreción gástrica. A las 4 semanas, se producen 2 procesos fisiológicos en ratas hembra. El primero de ellos es el destete y tiene un efecto directo sobre la disminución de la secreción gástrica de NUCB2/nesfatina-1 (Figuras 29A y 31B). El otro proceso implica el aumento de los niveles de estrógenos característico de esta edad; este cambio induce el incremento de la liberación de NUCB2 por el TAS. En el estómago y el TAS se producen efectos opuestos, el primero inhibitorio, y el segundo estimulador que se contrarrestan para mantener estables los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1. Este trabajo demostró que estos niveles permanecieron constantes desde el nacimiento hasta la edad adulta, reforzando el mecanismo propuesto de la interacción entre estómago y grasa para regular los niveles de NUCB2/nesfatina-1.

Nuestros datos son concordantes con los trabajos previos que muestran que la nesfatina-1 es indispensable para el inicio normal de la pubertad en ratas hembra [212]. García-Galiano y colaboradores mostraron que la expresión de NUCB2 a nivel hipotalámico aumenta durante la pubertad, y que el bloqueo hipotalámico de NUCB2 mediante la infusión de oligonucleótidos contra NUCB2 retrasa la apertura vaginal y disminuye los niveles séricos y ováricos de la hormona luteinizante (LH). Además, nuestro trabajo muestra que la producción de NUCB2/nesfatina-1 en TAS también aumentó durante la pubertad como una consecuencia del incremento de los niveles de estrógenos. Nuestros datos sugieren por primera vez que los niveles periféricos de NUCB2/nesfatina-1 podrían proporcionar una pista sobre el inicio de la pubertad, especialmente la implicación del TAS en este proceso. La grasa corporal influye en el comienzo de la pubertad y la maduración sexual [277], y nuestros datos sugieren que la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el TAS podría estar implicada en el inicio de la pubertad y la madurez sexual, como se ha descrito previamente para otras adipoquinas como la leptina [278]. En concordancia con estos resultados, en individuos macho tanto humanos, como rata y ratón, la expresión de NUCB2/nesfatina-1 en los testículos aumenta gradualmente durante la transición de la pubertad a la etapa adulta [212]. En conjunto, los datos indican que la producción de NUCB2/nesfatina-1 en órganos periféricos podría estar diseñada para cubrir las demandas del organismo durante la pubertad y, por lo tanto, actuar como nexo de unión entre metabolismo y función reproductora.

Los datos de este trabajo son consistentes con el estudio previo de Li y col. el cual mostró que no se producían variaciones de los niveles de NUCB2/nesfatina-1 con la edad en ratones hembra [219]. Además, el trabajo mencionado indicó que el ratio de NUCB2-nesfatina-1 plasmática/g de tejido adiposo disminuye severamente en ratones viejos (24 meses) en comparación con ratones jóvenes (2 y 6 meses). Nuestros resultados explican este hecho ya que los datos muestran la elevación de la producción de NUCB2/nesfatina-1 en el tejido adiposo en la pubertad, coincidiendo con la elevación de los niveles de estrógenos y testosterona. La disminución de la producción de NUCB2/nesfatina-1 por el tejido adiposo sugerida por Li y col. en la vejez podría estar relacionada con el descenso de los niveles de los estrógenos característicos de esta etapa. Este hecho es muy interesante ya que a la nesfatina-1 se le ha atribuido un efecto sobre el metabolismo de la glucosa [195,279]; la disfunción en el metabolismo de la glucosa y enfermedades cardiovasculares asociadas, características de la vejez, podrían ser parcialmente debidas a la disminución de la producción de NUCB2/nesfatina-1 por el tejido adiposo. Además, varios estudios han demostrado que los niveles de NUCB2/nesfatina-1 están negativamente correlacionados con la DMT2 [215,280].

En resumen, existe un claro dimorfismo sexual en la contribución de los diferentes tejidos a los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1. En machos, la testosterona es el regulador más potente de los niveles plasmáticos de NUCB2/nesfatina-1, estimulando la producción de NUCB2/nesfatina-1 tanto a nivel gástrico como en tejido adiposo. A pesar de la ausencia de efecto en la producción gástrica de NUCB2/nesfatina-1, los estrógenos están implicados en la producción en el TAS. Sin embargo, el destete, un proceso fisiológico que está relacionado con cambios morfológicos en el estómago, afecta a la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago y el TAS en machos y en hembras.

En conclusión, el estómago y el tejido adiposo subcutáneo participan en la regulación de los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1 para permitir al organismo adaptarse a los diferentes requerimientos en cada etapa de la vida. Se deberían realizar más estudios para determinar si el descenso de los niveles de las hormonas sexuales propia de la edad avanzada, es responsable de la deficiencia en NUCB2/nesfatina-1 y concomitantemente de la disfunción del metabolismo y las patologías cardiovasculares asociadas.

3 ANÁLISIS DIFERENCIAL DEL SECRETOMA DE ESTÓMAGO EN DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES

En el presente proyecto se ha puesto a punto el modelo de secreción gástrica para su estudio por proteómica. Empleando electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF/MS) se llevó a cabo un análisis comparativo entre secretomas de estómago obtenidos a partir de animales sometidos a alimentación ad líbitum, ayuno y a realimentación tras el ayuno. El análisis permitió la identificación de 35 proteínas secretadas diferencialmente entre los tres estados nutricionales estudiados.

Con el objetivo de identificar nuevas señales liberadas por el estómago, se eligió la proteómica ya que se ha revelado como una herramienta importante en la caracterización de proteínas secretadas de células y/o tejidos [281,282]. El cultivo de explantes de tejido gástrico es un modelo adecuado para el estudio del secretoma gástrico puesto que permite el análisis de la secreción directa a partir de estómago eliminando interferencias producidas por otros órganos. Estudios previos publicados por nuestro grupo demuestran la viabilidad de este tejido manteniendo su actividad secretora incluso 3 horas después de haber sido escindido del organismo [84]. A pesar de que el protocolo para la secreción gástrica ya había sido establecido, fueron necesarias ciertas modificaciones para su aplicación al análisis proteómico con el fin de minimizar la lisis proteica y evitar contaminaciones con proteínas de otros orígenes (por ejemplo, proteínas del propio alimento o procedentes de la sangre que irriga el tejido). La primera aproximación consistió en valorar la necesidad de añadir inhibidores de proteasas y fosfatasas en el medio de cultivo de los explantes con el fin de evitar la degradación debida a la presencia de estas enzimas en el estómago; como consecuencia de esto se comprobó que no existía una mejora apreciable con el uso de estos inhibidores.

El segundo aspecto metodológico en el que nos centramos fue estudiar el proceso de lavado del tejido inmediatamente anterior a la incubación de los explantes. Las características intrínsecas del estómago, como la presencia de microflora bacteriana o restos alimenticios, hicieron necesario un riguroso lavado del tejido. Sin embargo, un factor clave fue la manipulación del tejido, que debe realizarse cuidadosamente, ya que la mucosa gástrica es muy frágil y, uno de los

principales problemas en el análisis proteómico de secretomas es la contaminación por fragmentación celular como se ha observado en este y otros estudios [247].

El siguiente paso necesario para la optimización del método consistió en la realización de un estudio tiempo dependiente que nos permitió determinar que el tiempo óptimo de incubación del explante gástrico es de dos horas de incubación. Después de este tiempo, la secreción de proteínas disminuye probablemente debido a la degradación de la muestra (Figura 34). Se observó como el tiempo idóneo de incubación de tejido estomacal para su estudio por proteómica coincide con el tiempo utilizado para los estudios fisiológicos de ghrelina y NUCB2/nesfatina-1.

A pesar de que el modelo de secreción ya había sido validado en estudios anteriores mediante la detección de hormonas gástricas por RIA, ELISA y *western blot*, fue necesaria la revalidación del modelo tras las modificaciones realizadas para los estudios proteómicos mencionados anteriormente. Para ello se decidió identificar la ghrelina mediante técnicas proteómicas. La ghrelina no puede detectarse mediante 2-DE debido a que su punto isoeléctrico no se encuentra dentro del rango de pH estudiado. Por este motivo realizamos una inmunoprecipitación que permitió la identificación directa de ghrelina mediante MALDI-TOF/MS-MS, confirmando la validez del modelo de explantes para el análisis proteómico del secretoma gástrico.

Tras haber llevado a cabo la optimización del protocolo, fue posible aplicar el método de 2-DE para realizar el análisis comparativo de los secretomas gástricos de animales en diferentes situaciones nutricionales. La electroforesis bidimensional permite resolver proteínas de muestras complejas que no pueden separarse por electroforesis monodimensional, sin embargo la técnica presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, la presencia de proteínas abundantes en la muestra puede estar ocultando proteínas de interés de menor abundancia. Así, en el estudio de la secreción gástrica observamos un gran número de proteínas en el rango ácido del gel probablemente enzimas gástricas, que impiden detectar proteínas secretadas de baja concentración en el secretoma gástrico. Además, las técnicas proteómicas basadas en geles presentan ciertas limitaciones como la dificultad de resolver proteínas de peso molecular muy bajo, y proteínas muy básicas o muy ácidas [283]. Por lo tanto, las principales gastroquinas conocidas que se caracterizan por un peso molecular muy bajo pueden no ser detectadas mediantes aproximaciones proteómicas, como por ejemplo: el Mw de la ghrelina es 3.3 kDa, la obestatina 2.5 kDa y la nesfatina-1 9.7 kDa.

Otro punto que debe ser discutido es la presencia de proteínas no secretadas. La utilización de un software de predicción de proteínas secretadas mediante la secuencia proteica nos permitió distinguir proteínas no secretadas de aquellas que pueden ser secretadas por vías clásicas y no clásicas [271], indicando que aproximadamente el 64% del total de proteínas identificadas se clasificaron como secretadas. Este porcentaje de proteínas secretadas es coherente con estudios previos similares realizados en otros explantes de tejidos o células [284–287]. En nuestro caso, estas proteínas contaminantes proceden de la fragmentación celular asociada a la manipulación de las muestras. Aunque se ha intentado optimizar el proceso para minimizar esta contaminación, un lavado más minucioso implicaría una mayor manipulación del tejido con el consiguiente desprendimiento de células de la mucosa. Además, debe tenerse en cuenta que el epitelio de la mucosa gástrica está sometido a una continua renovación [288].

Es importante destacar la novedad de nuestro diseño experimental, ya que este es el primer análisis realizado hasta la fecha del secretoma directo de estómago. Concretamente, la aproximación tecnológica empleada en este trabajo, no se había aplicado con anterioridad al estudio de la regulación de la ingesta mediada por el estómago.

En referencia a las proteínas secretadas identificadas, hemos encontrado proteínas comunes a aquellas que habían sido descritas previamente en fluido gástrico humano como superóxido dismutasa (Cu-Zn) (SOD1), peroxirredoxina-1 (PRX1), aldehido deshidrogenasa, proteína tipo β-actina 2, GAPDH, proteína disulfido isomerasa A3, transgelina-2, galectina-3 y α-amilasa pancreática [289,290]. Además, con excepción de la calponina-1, la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa β, la isovaleril-CoA deshidrogenasa, la sulfito oxidasa, la tiosulfato sulfutransferasa y la anhidrasa carbónica 9, las demás proteínas identificadas en este trabajo habían sido detectadas previamente en el secretoma de líneas celulares gástricas [291,292].

En 2006, se demostró que el ayuno induce cambios en la expresión de la α-amilasa pancreática, la transgelina y el GAPDH en el intestino delgado de ratón [258]; proteínas que también han sido identificadas en el presente estudio. Leanerts y col. demostraron que en comparación con ratones ad líbitum se produce una disminución de la expresión de transgelina en situación de ayuno acorde con nuestros resultados; sin embargo observaron un aumento de la expresión de la α-amilasa pancreática mientras que nosotros detectamos una disminución de la

secreción gástrica en estado de ayuno; posiblemente esta diferencia se debe a que la expresión y secreción de esta proteína no sigan la misma regulación [258].

En relación con otros estudios previos del perfil proteico en diferentes estados nutricionales, mencionar que la expresión de superoxido dismutasa SOD1 se encontró disminuída en ayuno en grasa perirrenal en comparación con animales ad líbitum, mientras que nosotros detectamos un aumento de la secreción en ayuno con respecto al control ad líbitum, y una disminución en comparación con los animales realimentados [250]. La peróxido reductasa dependiente de tiorredoxina (PRX3) aumenta tras la restricción calórica en la hipófisis en vacas [251], efecto contrario al que observamos en el descenso de los niveles de secreción gástrica en ayuno. Además algunas de las proteínas identificadas como peroxirredoxina-1, GAPDH, purin nucleosido fosforilasa, electron tranfer flavoproteína α, SOD1 y aldehído deshidrogenasa presentan cambios de fosforilación/defosforilación en el hígado de ratones entre ayuno y realimentación [252].

En nuestro trabajo hemos detectado que la alimentación ad líbitum produjo una disminución de la sulfito oxidasa que podría jugar un papel en la acumulación de triglicéridos, y un descenso de la secreción de δ(3,5)-δ(2,4)-dienoil-CoA isomerasa, una proteína clave en la β-oxidación de ácidos grasos insaturados, que se ha encontrado hipoacetilada en el hígado de animales ad líbitum [254]. Además los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la elevación de la secreción gástrica en animales ad líbitum de eIF4e, proteína implicada en la síntesis de proteínas, la anhidrasa carbónica 9 que se ha descrito que participa en lipogénesis o la subunidad β de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa que está envuelta en la producción de acetil-CoA.

Otra proteína interesante es la galectina-3; en este trabajo se ha detectado un incremento de su secreción en la alimentación control en comparación con los otros grupos analizados. La galectina-3 se expresa en la superficie de la mucosa gástrica e intestinal [293] y se sabe que regula la respuesta inmune y la inflamación [294], produciéndose la sobreexpresión y rápida secreción por las células epiteliales gástricas en respuesta a la adhesión de *H. pilori* [295]. Además, se ha demostrado que el tratamiento con galectina-3 recombinante estimula la proliferación en adipocitos [296] y se ha encontrado que la adiponectina reduce su expresión en monocitos [297]. Se ha descrito que los niveles circulantes de galectina-3 están elevados en pacientes con DMT2 y obesidad, y también están positivamente

correlacionados con el IMC [298]. Sin embargo, los ratones deficientes en el gen de la galectina-3 (LGALS3$^{-/-}$) alimentados con dieta alta en grasa presentan un aumento del peso corporal, mayor cantidad de TAV total, y niveles plasmáticos elevados de insulina y glucosa en ayuno, HOMA-IR y marcadores de inflamación sistémica en comparación con los animales WT, indicando un papel protector de la galectina-3 en diabetes e inflamación inducidas por obesidad [299]. No podemos saber qué porcentaje de galectina-3 circulante proviene del estómago; sin embargo, los estudios de expresión de ARNm y proteína indican que los tejidos donde más se expresa son en estómago, intestino, vejiga y pulmón (The Human Protein Atlas, http://www.proteinatlas.org/).

Por otra parte, debería ser mencionada la presencia de varias enzimas antioxidantes como SOD1, PRX1 y PRX3. En los últimos años se le ha atribuido un papel fundamental a las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la regulación de la homeostasis energética. En el hipotálamo, los ROS mitocondriales participan en la detección y respuesta a la disponibilidad de lípidos y glucosa [300,301]. Además se ha descrito que los ROS hipotalámicos modulan la regulación de la ingesta de comida inducida por ghrelina [102], insulina [302] y serotonina [303]. En el estómago, el tratamiento con ghrelina provocó el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa y otros parámetros antioxidantes en ratas diabéticas [304]. Además, se descubrió que los niveles circulantes de ghrelina están asociados con la elevación del estrés oxidativo en sujetos obesos [305]. También se ha demostrado que distintos tipos de dieta y la restricción de la ingesta de comida modulan los niveles de enzimas antioxidantes (p.e. peroxirredoxinas y SOD) [306–309], que además están disminuidos en obesidad [310]. Por lo tanto, el papel de las enzimas antioxidantes en el secretoma gástrico y su posible función en la señalización de la ingesta deben ser investigados.

La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una proteína clásica conocida por su papel en la glucolisis. No obstante, nuevos estudios han proporcionado pruebas de que se trata de una proteína multifactorial que está presente en diferentes localizaciones subcelulares para desarrollar diversas funciones: regulación de la expresión génica, transporte vesicular, señalización celular mediada por receptor, mantenimiento de la integridad del ADN, respuesta a estrés oxidativo, apoptosis y autofagia [311]. Se ha demostrado la presencia de GAPDH en el suero [312], y recientemente se ha descubierto que el GAPDH

extracelular presenta actividad antimicrobiana [313], inhibe la invasión celular [314], actúa como un receptor de transferrina autocrino multifuncional para la incorporación de hierro celular [315] y es un factor secretado por patógenos implicado en la adhesión y/o virulencia [316]. GAPDH es secretado por las cepas patogénicas de E. coli y se une a las células del colon Caco-2 en el proceso de adhesión [317], y su detección se emplea como un método para detectar *Lactobacilli* adheridas a la mucosa intestinal [318].

GAPDH se considera una proteína constitutiva que se emplea como gen de referencia en diferentes técnicas experimentales a pesar de que numerosos estudios han demostrado que los niveles de GAPDH varían en diferentes situaciones [319,320]. Se ha descrito previamente que los niveles de ARNm de GAPDH cuantificados por *northern blot* disminuyen en la mucosa oxíntica de ratas privadas de comida durante 48 horas [321]. Los resultados del análisis diferencial 2-DE se han confirmado mediante *western blot* mostrando una elevación de GAPDH en el secretoma gástrico tras una hora de realimentación en comparación con las condiciones de ayuno y ad líbitum. Este efecto se observó también en los niveles plasmáticos de GAPDH (Figura 37).

Se han descrito niveles elevados de ARNm de GAPDH en adipocitos pero no en el hígado de ratas genéticamente obesas (fa/fa) [322]; sin embargo se encontró GAPDH significativamente elevado en el hígado de un modelo de rata de DMT2 con obesidad e hiperglicemia [323]. Los niveles proteicos de GAPDH también aumentaron en el músculo esquelético de mujeres con sobrepeso y obesidad mórbida en comparación con mujeres control delgadas [324]. En este trabajo de tesis, no observamos cambios en los niveles de ARNm y proteína de GAPDH en la mucosa gástrica, sin embargo la secreción gástrica disminuyó drásticamente en animales DIO, y este descenso se vio reflejado en los niveles plasmáticos de GAPDH (Figura 37). El aumento de la expresión de GAPDH en obesidad se ha asociado a su función en la glucolisis, sin embargo, consideramos que un posible papel del GAPDH secretado por el estómago podría ser su participación en la regulación de la microbiota intestinal, la cual se encuentra alterada en individuos obesos [325].

La segunda proteína seleccionada por su potencial interés como factor regulador de la ingesta fue la calponina-1, también denominada como calponina H1 y calponina básica. La calponina-1 es una proteína de unión a actina implicada en la

contracción del músculo liso de diferentes órganos, por ejemplo el estómago, no obstante se ha detectado también en otros tipos celulares [326–329]. Debe destacarse que éste es el primer trabajo en el que se demuestra la expresión de calponina-1 en la mucosa gástrica del estómago (Figura 39). Además, detectamos por primera vez la presencia de calponina-1 en la secreción gástrica y el plasma (Figura 37 y 39).

Con el objeto de validar las dos manchas identificadas como calponina-1 en el análisis proteómico, se realizó *western blot* 2D del secretoma de estómago. Se observaron 7 formas fosforiladas distintas de la calponina-1 de aproximadamente 34 kDa; cuatro de ellas con el mismo patrón se habían descrito previamente en el músculo liso del estómago [275]. Se ha descrito que la fosforilación-defosforilación de los residuos de calponina-1 modula su capacidad de unión a la actina [327,330]. Además en estudios previos se detectaron distintas isoformas de la calponina-1 de menor peso molecular en el intestino delgado y en el músculo liso de útero y vesicular biliar, donde se demostró que estas isoformas no son productos resultantes de la proteolisis de la calponina de 34 kDa [274,275]. La cuantificación de dos manchas de aproximadamente 17 kDa, cuyos pesos moleculares y puntos isoeléctricos se correspondían con las machas identificadas en la 2-DE, demostró su elevación en los secretomas gástricos de animales en ayuno y realimentados con respecto al control, confirmando los resultados proteómicos (Figura 38). Recientemente se ha descrito que la serodeprivación causa un aumento de la expresión de calponina en células de músculo liso vascular [331] y en fibroblastos de pulmón, donde se inhibe la sobreexpresión tras la suplementación del medio con BSA [332]. En este trabajo, el ayuno no afectó a la expresión proteica de calponina-1 (Figura 39C); la discrepancia con la bibliografía podría ser debida a que las publicaciones mencionadas evalúan la expresión de calponina total mientras que nosotros hemos usado un anticuerpo específico contra la calponina-1.

Se ha demostrado como el ratón deficiente para el gen de la calponina-1 (C57BL/6-CNh1$^{tm/sst}$) presenta un aumento acusado de la ingesta de comida y agua, de la actividad locomotora y una disminución de la población de neuronas del PVN, sin variaciones en el peso corporal [333]. En concordancia con las acciones anorexigénicas de la calponina-1 sugeridas por los datos del animal KO, los presentes datos mostraron que la realimentación indujo un incremento de la secreción gástrica de calponina-1 (Figura 39), posiblemente para reducir la ingesta

actuando como una señal de saciedad. Además los cambios en la secreción gástrica de calponina-1 inducidos por el estado nutricional se reflejaron en los niveles circulantes de calponina-1 (Figura 39), sugiriendo que la calponina-1 gástrica podía estar implicada en la regulación central de la ingesta como una parte de los circuitos estómago-cerebro responsable de la regulación del balance energético.

Se ha descrito que la calponina-1 podría inhibir la motilidad gastrointestinal [334]. Además, el estrés oxidativo incrementa la expresión de calponina-1 en músculo liso gástrico, sugiriendo un importante papel en los desórdenes gastrointestinales asociados con estrés oxidativo [335]. Es conocido que la motilidad gástrica está alterada en pacientes obesos, y en concordancia, el presente trabajo mostró que la secreción de calponina-1 se redujo en animales con obesidad inducida por la dieta. Sin embargo, no se produjeron variaciones en los niveles plasmáticos de calponina-1 en animales obesos (Figura 40), indicando que otros tejidos podrían estar participando en la regulación de los niveles de calponina-1 en esta patología. Los niveles de ARNm de calponina-1 disminuyen con la acumulación de gotas lipídicas intracelulares en células del músculo liso de la aorta tratadas con colesterol [336]. Además se ha descrito en estudios previos que ratas con diabetes inducida por aloxana, un análogo tóxico de la glucosa que destruye células β pancreáticas, presentan una disminución de calponina-1 en la próstata [337], y que la sobreexpresión de calponina-1 suprime la diferenciación y la producción de insulina en la línea tumoral de células acinares pancreáticas AR42J [329], sugiriendo una posible implicación de la calponina-1 en la regulación del metabolismo de la glucosa. Bajo este contexto, será necesario realizar nuevos estudios para conocer la regulación de los niveles de calponina-1 en otros tejidos y su implicación en la obesidad y otras patologías asociadas como la DMT2.

Debemos mencionar que la eficacia de la técnica para detectar proteínas secretadas es limitada. A pesar de haber considerado exclusivamente las proteínas clasificadas como secretadas por el *secretomeP;* hemos detectado numerosas enzimas metabólicas citosólicas o mitocondriales no esperadas *a priori* en el secretoma. No podemos descartar que la presencia de algunas de estas proteínas en el secretoma de estómago pueda deberse a contaminación por rotura celular. Desafortunadamente, los tiempos tan cortos de incubación (3 horas) propios del modelo de secreción gástrica, nos impidieron realizar aproximaciones más apropiadas para la el estudio proteómico de secretomas como la incorporación de

amino acidos marcados con isótopos estables tipo SILAC o CILAIR que permiten detectar proteínas secretadas directamente por el tejido a estudio excluyendo proteínas contaminantes [338,339]. No obstante, la presencia de proteínas conocidas en otras localizaciones subcelulares o extracelulares a las descritas tradicionalmente podría permitir la identificación de nuevas funciones para estas proteínas [340].

En resumen, este trabajo representa la primera aproximación proteómica para la identificación de proteínas gástricas secretadas que varían con el estado nutricional. Entre las proteínas identificadas, el GAPDH se eleva tras la realimentación y varias isoformas distintas de la calponina-1 están reguladas por diferentes condiciones nutricionales. Estas y otras proteínas secretadas identificadas en este trabajo pueden considerarse gastroquinas potenciales implicadas en la regulación de la ingesta.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Los receptores CB1 periféricos modulan la ingesta a través de un mecanismo que implica la regulación gástrica de ghrelina y que requiere la comunicación vagal estómago-cerebro intacta.
2. Los receptores CB1 gástricos se localizan en las células neuroendocrinas del estómago donde modulan la secreción de ghrelina gástrica a nivel intracelular a través de la ruta de señalización de mTOR.
3. La producción de NUCB2/nesfatina-1 se encuentra regulada en las distintas etapas del desarrollo presentando un claro dimorfismo sexual.
4. Los cambios hormonales como las variaciones de los niveles de estrógenos y testosterona asociados con la pubertad regulan la secreción de NUCB2/nesfatina-1 por el estómago y el tejido adiposo subcutáneo.
5. Las modificaciones de la dieta asociadas con el destete ejercen un fuerte efecto sobre la producción de NUCB2/nesfatina-1 y desencadenan una interacción entre el estómago y el tejido adiposo subcutáneo para modular los niveles circulantes de NUCB2/nesfatina-1.
6. El modelo de explantes gástricos previamente descrito por nuestro grupo es adecuado para el estudio por proteómica de la secreción directa del estómago.
7. La aplicación de la electroforesis bidimensional junto con la espectrometría de masas al estudio de secretomas de estómago permitió identificar 35 proteínas diferencialmente secretadas al comparar alimentación ad líbitum con ayuno y realimentación.
8. Entre las proteínas identificadas en el estudio proteómico del secretoma de tejido gástrico se encontró la proteína GAPDH, más abundante en situación de realimentación, y cuya secreción disminuye en obesidad inducida por la dieta.
9. Se identificaron isoformas distintas de la calponina-1 aumentadas en situación de ayuno y realimentación, pero disminuida en situación de obesidad, viéndose reflejada la secreción de calponina-1 en sus niveles plasmáticos con las variaciones nutricionales, pero no en situación de obesidad. Esta y otras proteínas identificadas podrían considerarse potenciales señales reguladoras de la ingesta.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



APÉNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

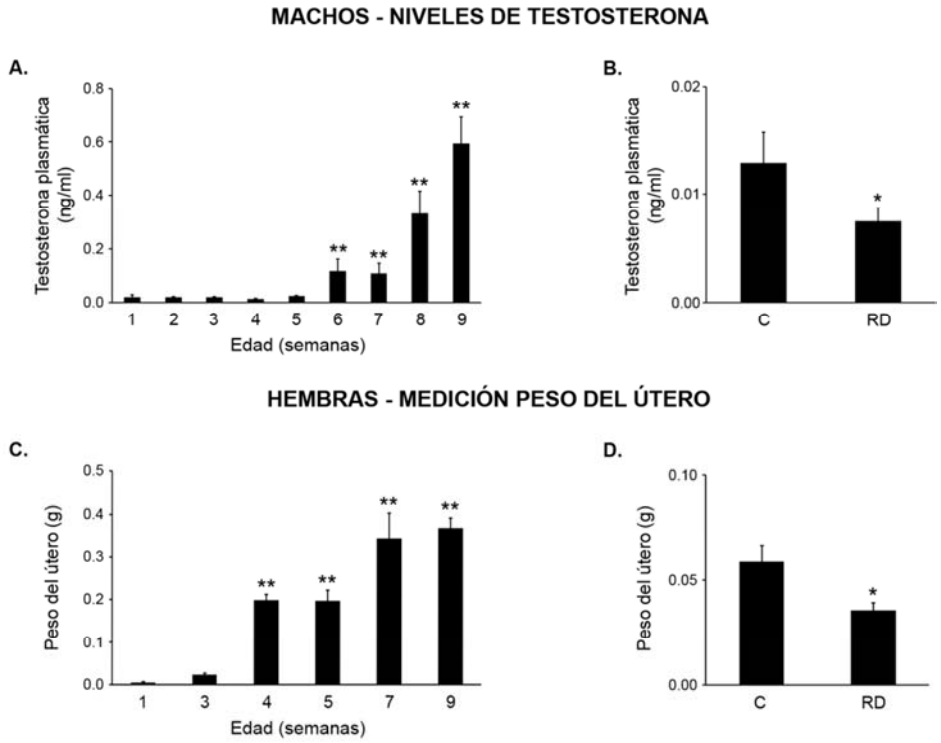


Figura suplementaria 1. Niveles plasmáticos de testosterona medidos por RIA en ratas macho de diferentes edades (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 semanas (A) y jóvenes sometidos a retraso del destete (4 semanas) (B). Peso del útero de ratas hembras de diferentes edades (1, 3, 4, 5, 7 y 9 semanas) (C) y jóvenes sometidas a retraso del destete (4 semanas) (D). C: control, RD: retraso del destete. n=10. *p<0.5; **p<0.01. Modificada de [91].

Identificación de ghrelina

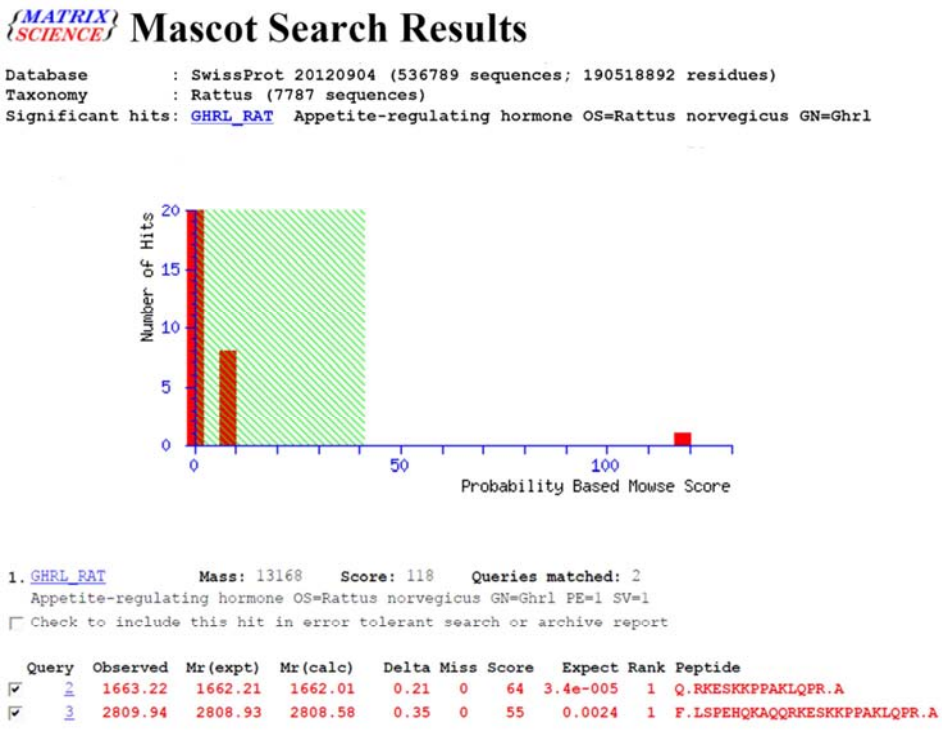


Figura suplementaria 2. Identificación de la ghrelina mediante espectrometría de masas. En el "Mowse Score" la puntuación de los iones es -10*Log(P), donde P es la probabilidad de que la identificación observada sea un evento aleatorio. Puntuaciones de iones individuales mayores de 41 indican identidad u homología ($p<0.05$). Las puntuaciones de las proteínas derivan de las puntuaciones de los iones como una forma no probabilística para clasificar las proteínas encontradas.

Análisis diferencial control vs ayuno vs realimentación

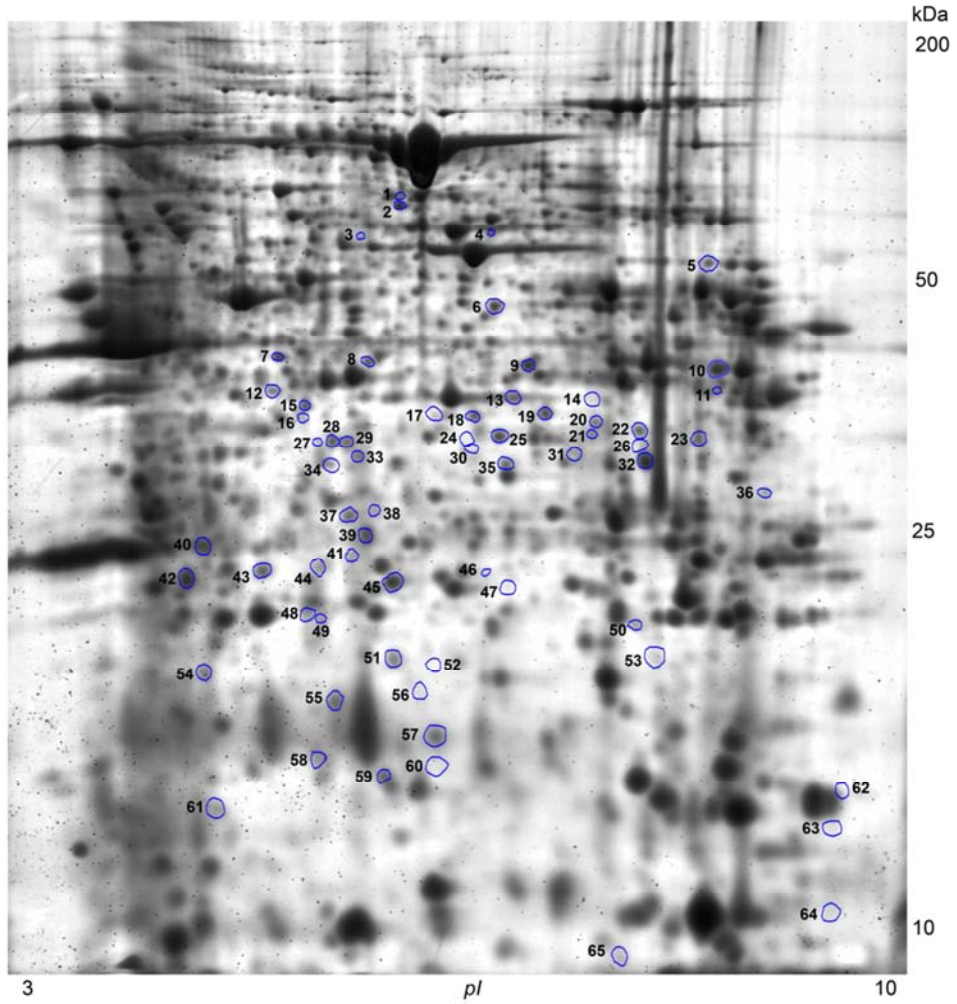


Figura suplementaria 3. Localización de las manchas secretadas diferencialmente identificadas en el análisis compatativo de secretomas gástricos con alimentación control vs ayuno vs realimentación.

Nº de mancha	*SecretomeP 2.0*	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
1	0.653	Sulfite oxidase, mitochondrial	SUOX_RAT	A=R>C
1	PS	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3_RAT	A=R>C
2	PS	Pancreatic alpha-amylase	AMYP_MOUSE	C>A=R
3	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT	C>A>R
4	0.627	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2_RAT	C>A=R
5	0.501	Fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_RAT	A>R>C
6	0.634	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitocondrial	IVD_RAT	A>R=C
7	0.630	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	ODBB_RAT	C>A=R
8	0.551	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1_RAT	C>A=R
9	0.405	Aldose reductase	ALDR_RAT	C>A=R
10	0.531	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_RAT	R>A=C
11	0.731	Thiosulfate sulfurtransferase	THTR_RAT	R>A>C
12	0.537	Spermidine synthase	SPEE_MOUSE	C>A=R
12	0.638	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	ODPB_RAT	A=R>C
13	0.612	Pyridoxal kinase	PDXK_RAT	A=R>C
13	0.543	Ester hydrolase C11orf54 homolog	CK054_RAT	A=R>C
13	0.400	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT	A=R>C
14	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	FAHD2_RAT	A>R>C
15	0.4	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_RAT	C>A=R
16	0.496	Phosphoglycolate phosphatase	PGP_MOUSE	C>A=R
17	PS	Lambda-crystallin homolog	CRYL1_RAT	A=R>C
18	0.460	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	PIPNA_RAT	C>A=R
19	0.573	S-formylglutathione hydrolase	ESTD_RAT	C>A=R
20	0.674	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	FAHD2_RAT	C>A=R
21	0.514	Purine nucleoside phosphorylase	PNPH_RAT	C>A=R
22	PS	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA_RAT	C>A=R
23	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	A=R>C
23	0.465	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GBLP_RAT	A=R>C
24	0.460	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	PIPNA_RAT	A=R>C
25	0.575	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	3HIDH_RAT	C>A=R
26	PS	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA_RAT	A=R>C
27, 29	PS	Carbonic anhydrase 9	CAH9_MOUSE	C>A=R
28	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT	C>A=R
30	0.663	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1_RAT	R>A>C
31	0.360	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2_MOUSE	R>A=C

(Tabla suplementaria 1, continúa en la página siguiente)

Nº de mancha	*SecretomeP 2.0*	Nombre de la proteína	Código Uniprot	Presencia
31, 32	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	R>A=C
33	0.484	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	HDHD2_RAT	C>A=R
34	0.583	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT	A=R>C
35	0.575	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	3HIDH_RAT	A=R>C
36	0.780	Galectin-3	LEG3_RAT	C>A=R
36	0.626	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1_RAT	C>A=R
37	0.299	Putative ATP-dependent Clp protease proteolytic	CLPP_MOUSE	C>A=R
38	0.775	Eukaryotic translation initiation factor 4E	IF4E_RAT	C>A=R
39	0.386	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	IDI1_RAT	C>A=R
40	0.427	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR1_RAT	A=R>C
41		Proteína no identificada		C>A=R
42	0.388	Lactoylglutathione lyase	LGUL_RAT	C>A=R
43	0.533	Inosine triphosphate pyrophosphatase	ITPA_MOUSE	C>A=R
44	0.336	Peroxiredoxin-6	PRDX6_RAT	C>A=R
45	0.759	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3_RAT	C>A=R
45	0.568	Proteasome subunit beta type-4	PSB4_RAT	C>A=R
46	0.401	Proteasome subunit beta type-3	PSB3_RAT	C>A=R
47	0.598	Peroxiredoxin-1	PRDX1_RAT	A=R>C
48	0.445	Adenine phosphoribosyltransferase	APT_RAT	C>A=R
49		Proteína no identificada		C>A=R
50	0.081	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_RAT	C>A=R
51	0.406	Putative hydrolase RBBP9	RBBP9_RAT	C>A=R
52		Proteína no identificada		A=R>C
53	0.109	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	ROA3_RAT	C>A=R
54, 58, 59	0.421	Elongation factor 1-gamma	EF1G_RAT	C>A=R
55	0.833	Transgelin-2	TAGL2_RAT	C>R>A
56	0.728	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SODC_RAT	R>A>C
57	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	C>R>A
60	0.628	Transgelin	TAGL_RAT	A=R>C
61		Proteína no identificada		C>A=R
62, 63	0.516	Calponin-1	CNN1_RAT	C>A=R
64	0.490	Cytochrome c, somatic	CYC_RAT	A=R>C
65		Proteína no identificada		C>A=R

Tabla suplementaria 1. Análisis diferencial del secretoma de estómago en diferentes situaciones nutricionales. Proteínas totales identificadas ordenadas según los números de mancha correspondientes a la Figura suplementaria 3. *SecretomeP:* el índice otorgado por dicho software, SP: la proteína contiene péptido señal, C: control ad líbitum, A: ayuno, R: realimentación.

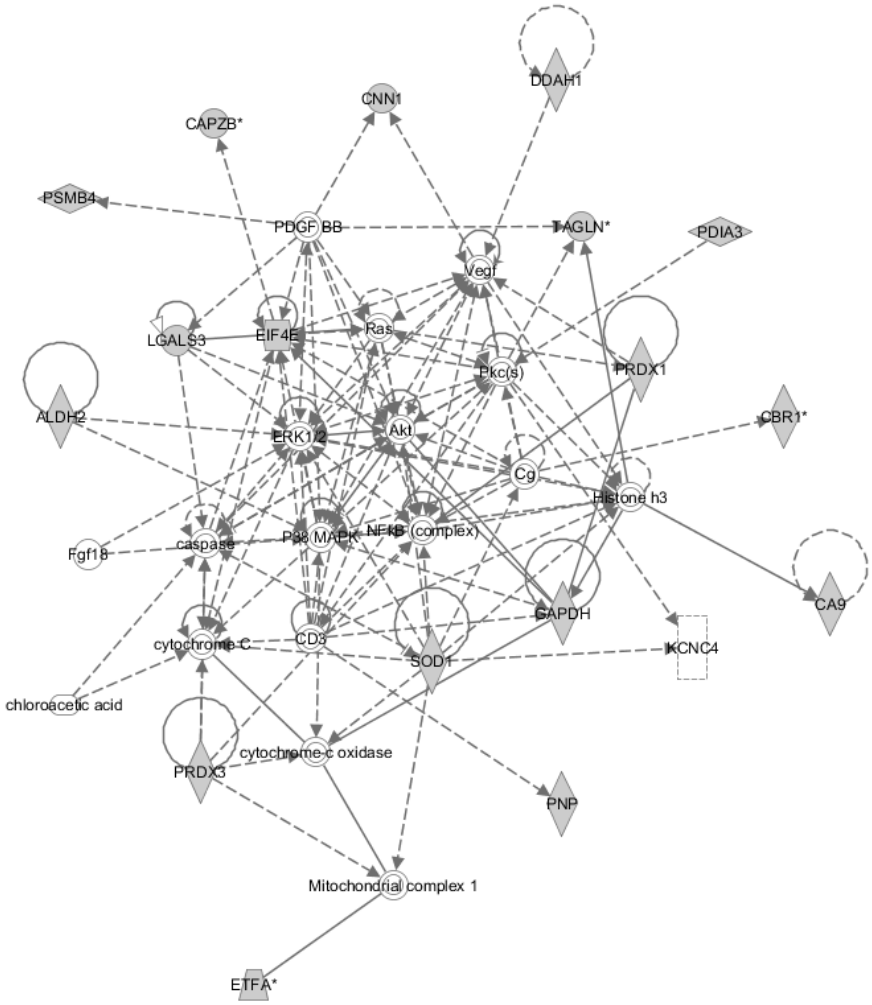


Figura suplementaria 4. Red de interacciones 1 de las proteínas secretadas diferencialmente por el estómago: enfermedades hematológicas, inmunológicas e inflamatorias. Las proteínas identificadas se muestran con el nombre de su gen. Las líneas continuas representan interacciones directas, mientras que las discontinuas indirectas. Las flechas que van de un nodo proteico a otro indican que ese nodo actúa sobre el otro. Las líneas que carecen de flecha indican unión de las proteínas. Las líneas que presentan otra línea perpendicular al final de la misma representan inhibición. Los símbolos de los nodos significan: cuadrado: citoquina, rombo vertical: enzima, rombo horizontal: peptidasa, óvalo horizontal: regulador de la transcripción, trapecio: transportador y círculo: otros tipos. Se indican con un astérico las proteínas de la red identificadas en el secretoma de estómago.

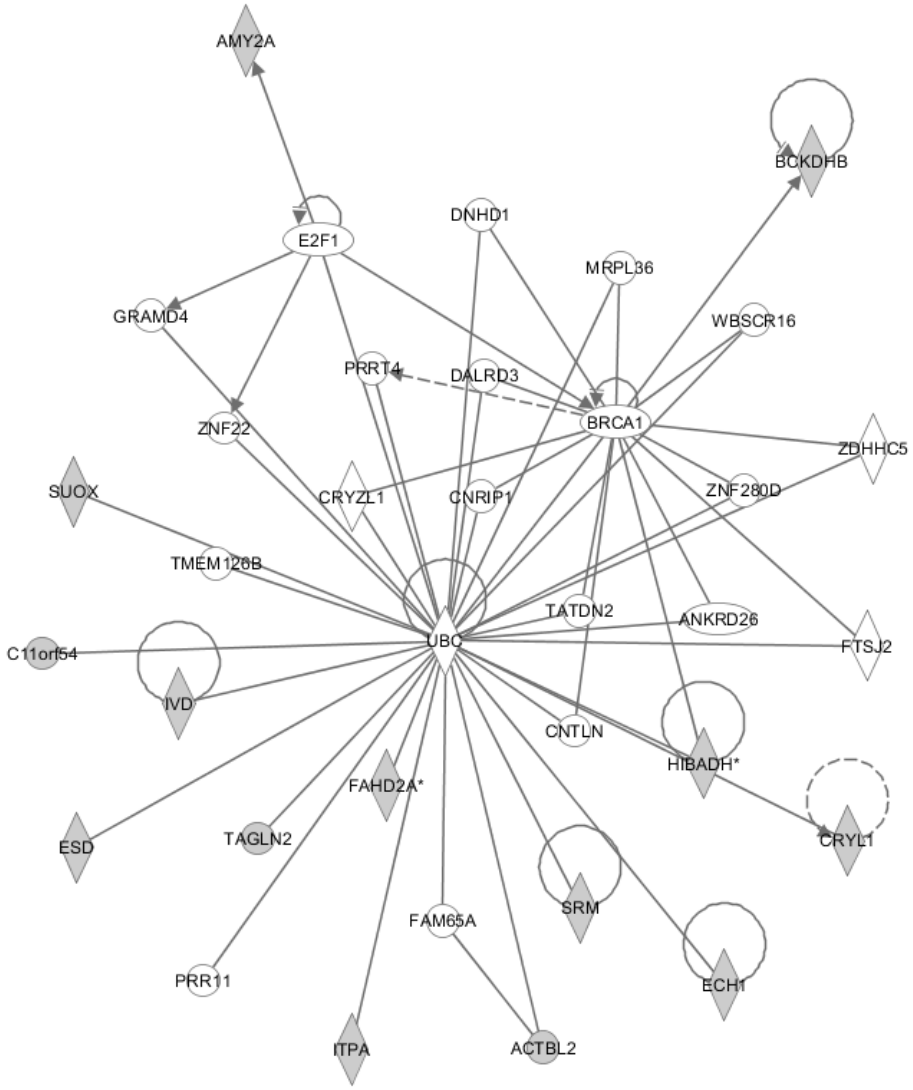


Figura suplementaria 5. Red de interacciones 2 de las proteínas secretadas diferencialmente por el estómago: metabolismo de aminoácidos, procesos bioquímicos de pequeñas moléculas y organización y ensamblaje celular. Descripción en Figura suplementaria 4.

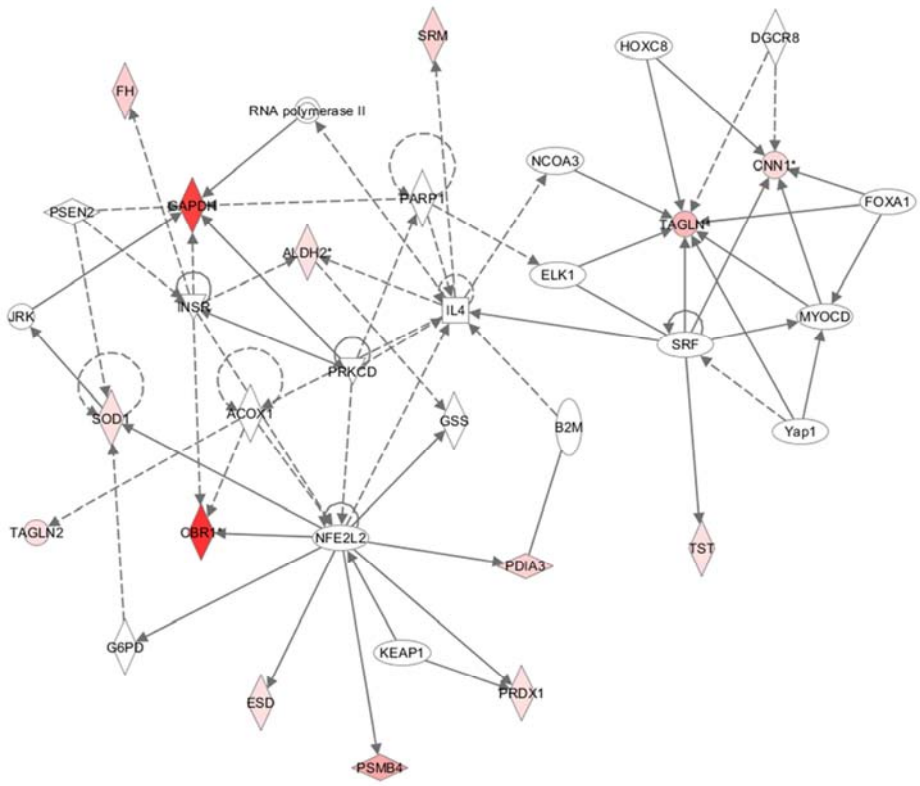


Figura suplementaria 6. Red de interacciones de las proteínas secretadas diferencialmente por el estómago considerando la abundancia en el secretoma: enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y desórdenes psicológicos. Las proteínas identificadas se muestran con el nombre de su gen. Las líneas continuas representan interacciones directas, mientras que las discontinuas indirectas. Las flechas que van de un nodo proteico a otro indican que ese nodo actúa sobre el otro. Las líneas que carecen de flecha indican unión de las proteínas. Los símbolos de los nodos representan, cuadrado: citoquina, rombo vertical: enzima, rombo horizontal: peptidasa, óvalo horizontal: regulador de la transcripción, trapecio: transportador y círculo: otros tipos. Se representan en color las proteínas identificadas en el análisis de secretoma de estómago.

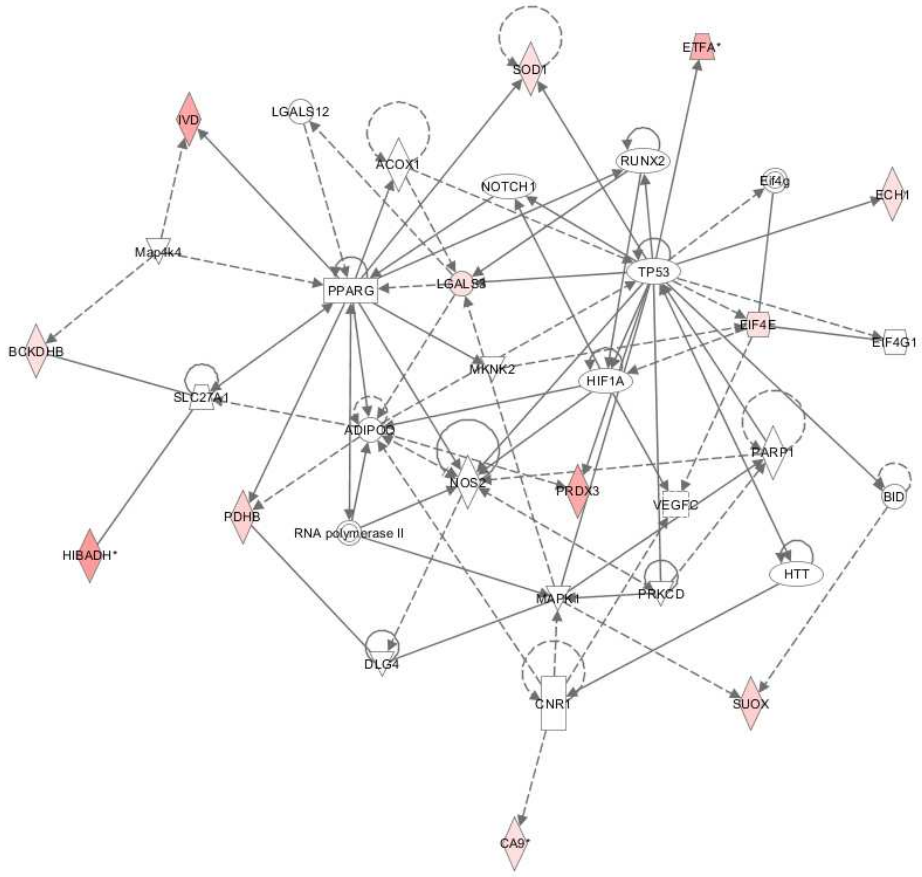


Figura suplementaria 7. Red de las proteínas secretadas diferencialmente por el estómago considerando su abundancia en el secretoma: desarrollo y función del sistema cardiovascular, metabolismo de lípidos, muerte celular y supervivencia. Descripción en Figura suplementaria 6.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

[1] Rodríguez-Artalejo F, Graciani A, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Zuluaga MC, López-García E, Gutiérrez-Fisac JL, Taboada JM, Aguilera MT, Regidor E, Villar-Álvarez F, Banegas JR. [Rationale and methods of the study on nutrition and cardiovascular risk in Spain (ENRICA)]. Rev Española Cardiol 2011;64:876–682.

[2] Pérez-Farinós N, López-Sobaler AM, Dal Re MA, Villar C, Labrado E, Robledo T, Ortega RM. The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. Biomed Res Int 2013;2013:1–7.

[3] Qi L, Cho Y. Gene-environment interaction and obesity. Nutr Rev 2008;66:684–694.

[4] Bray GA. Medical consequences of obesity. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2583–2589.

[5] Witkamp RF. Current and future drug targets in weight management. Pharm Res 2011;28:1792–1818.

[6] Kral JG, Näslund E. Surgical treatment of obesity. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007;3:574–583.

[7] Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric bypass surgery. Int J Obes (Lond) 2009;33 Suppl 1:S33–S40.

[8] Beckman LM, Beckman TR, Sibley SD, Thomas W, Ikramuddin S, Kellogg TA, Ghatei MA, Bloom SR, le Roux CW, Earthman CP. Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass surgery. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2011;35:169–180.

[9] Le Roux CW, Welbourn R, Werling M, Osborne A, Kokkinos A, Laurenius A, Lönroth H, Fändriks L, Ghatei MA, Bloom SR, Olbers T. Gut hormones as mediators of appetite and weight loss after Roux-en-Y gastric bypass. Ann Surg 2007;246:780–785.

[10] Lee WJ, Chen CY, Ser KH, Chong K, Chen SC, Lee PC, Liao Y Di, Lee SD. Differential influences of gastric bypass and sleeve gastrectomy on plasma nesfatin-1 and obestatin levels in patients with type 2 diabetes mellitus. Curr Pharm Des 2013;19:5830–5835.

[11] Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. Science 2005;307:1909–1914.

[12] Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. J Endocrinol 2013;220:T25–T46.

[13] Schwartz M, Woods S, Porte D, Seeley RJ, Baskin D. Central nervous system control of food intake. Nature 2000;404:661–671.

[14] Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. Obesity 2006;14 Suppl 1:1S–8S.

[15] Stanley S, Wynne K, Mcgowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. Physiol Rev 2005;85:1131–1158.

[16] Cota D, Proulx K, Seeley RJ. The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. Gastroenterology 2007;132:2158–2168.

[17] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. J Cell Sci 2004;117:5479–5487.

[18] Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. Science 2001;294:1102–1105.

[19] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Foufelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. Nature 2004;428:569–574.

[20] Cota D, Proulx K, Smith K a B, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science 2006;312:927–930.

[21] Saper C, Chou T, Elmquist J. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. Neuron 2002;36:199–211.

[22] Rolls ET. Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. Physiol Behav 2005;85:45–56.

[23] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425–432.

[24] Harwood HJ. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. Neuropharmacology 2012;63:57–75.

[25] Lee M, Wu Y, Fried S. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. Mol Aspects Med 2013;34:1–11.

[26] Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. Physiol Behav 2009;97:199–204.

[27] Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. Diabetes Metab 2008;34:2–11.

[28] Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. Am J Med Sci 2005;330:280–289.

[29] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool E a, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 1995;83:1263–1271.

[30] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science 1995;269:543–546.

[31] Farooqi I, Jebb S, Langmack G, Lawrence E, Cheetham C, Prentice A, Hughes I, McCamish M, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. N Engl J Med 1999;341:879–884.

[32] Considine R V, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro J. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med 1996;334:292–295.

[33] Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. Nature 1998;394:790–793.

[34] Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 2000;289:2122–2125.

[35] Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. Diabetes 1995;44:147–151.

[36] Neary MT, Batterham RL. Gut hormones: implications for the treatment of obesity. Pharmacol Ther 2009;124:44–56.

[37] Cummings D, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. J Clin Invest 2007;117:13–23.

[38] Powley TL. The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and a cephalic phase hypothesis. Psychol Rev 1977;84:89–126.

[39] Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. Nutrition 2000;16:858–865.

[40] Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab 2006;3:153–165.

[41] Wren AM, Bloom SR. Gut hormones and appetite control. Gastroenterology 2007;132:2116–2130.

[42] Boron W, Boulpaep EL. Medical physiology : a cellular and molecular approach. 2009.

[43] Krinke G. The Laboratory Rat, 1st Edition. 2000.

[44] Konturek S, Konturek J, Pawlik T, Brzozowki T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. J Physiol Pharmacol 2004;55:137–154.

[45] Berthoud H-R. The vagus nerve, food intake and obesity. Regul Pept 2008;149:15–25.

[46] Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. J Neurosci 2004;24:2708–2715.

[47] Young B, Heath JW. Wheater's Histología funcional, 4st Edition. 2000.

[48] Stengel A, Taché Y. Gastric peptides and their regulation of hunger and satiety. Curr Gastroenterol Rep 2012;14:480–488.

[49] Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The "Normal" Endocrine Cell of the Gut: Changing Concepts and New Evidences. Ann N Y Acad Sci 2004;1014:1–12.

[50] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999;402:656–660.

[51] Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. BMC Genomics 2007;8:298.

[52] Zhu X, Cao Y, Voodg K, Steiner DF. On the Processing of Proghrelin to Ghrelin. J Biol Chem 2006;281:38867–38870.

[53] Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. Neuropharmacology 2010;58:2–16.

[54] Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. Biochem Biophys Res Commun 2000;279:909–913.

[55] Stengel A, Keire D, Goebel M, Evilevitch L, Wiggins B, Taché Y, Reeve JR. The RAPID method for blood processing yields new insight in plasma concentrations and molecular forms of circulating gut peptides. Endocrinology 2009;150:5113–5118.

[56] Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou M, Sugimoto H, Chiba S, Kawahara Y, Tanaka E, Yoshimatsu H, Uchimura N, Kangawa K, Kojima M. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. Regul Pept 2009;156:47–56.

[57] Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:3062–3065.

[58] Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. Gut 2005;54:18–24.

[59] Yang J, Brown M, Liang G, Grishin N, Goldstein J. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell 2008;132:387–396.

[60] Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, Zigman JM. Colocalization of ghrelin O -acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;297:134–141.

[61] Lim CT, Kola B, Grossman A, Korbonits M. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. Endocr J 2011;58:707–710.

[62] Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Differential distribution of ghrelin- O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. Biochem Biophys Res Commun 2010;392:67–71.

[63] Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. Endocrinology 2005;146:2255–2264.

[64] Kirchner H, Gutierrez J, Solenberg P. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. Nat Med 2009;15:741–745.

[65] McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard a D. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. Mol Endocrinol 1997;11:415–423.

[66] Gnanapavan S, Kola B, Bustin S, Morris D, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman A, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:2988–2991.

[67] Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:879–887.

[68] Barreiro ML, Suominen JS, Gaytán F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M. Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. Biol Reprod 2003;68:1631–1640.

[69] Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath TL, Culler MD. A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. Neuroendocrinology 2005;81:339–349.

[70] Müller TD, Müller A, Yi C-X, Habegger KM, Meyer CW, Gaylinn BD, Finan B, Heppner K, Trivedi C, Bielohuby M, Abplanalp W, Meyer F, Piechowski CL, Pratzka J, Stemmer K, Holland J, Hembree J, Bhardwaj N, Raver C, Ottaway N, Krishna R, Sah R, Sallee FR, Woods SC, Perez-Tilve D, Bidlingmaier M, Thorner MO, Krude H, Smiley D, DiMarchi R, Hofmann S, Pfluger PT, Kleinau G, Biebermann H, Tschöp MH. The orphan receptor Gpr83 regulates systemic energy metabolism via ghrelin-dependent and ghrelin-independent mechanisms. Nat Commun 2013;4:1968.

[71] 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, Kangaw K, Nakao K. Stomach Is a Major Source of Circulating Ghrelin, and Feeding State Determines Plasma Ghrelin-Like Immunoreactivity Levels in Humans. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:4753–4758.

[72] Dornonville de la Cour C, Björkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Håkanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. Regul Pept 2001;99:141–150.

[73] Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 2000;141:4255–4261.

[74] Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. Peptides 2002;23:531–536.

[75] Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron 2003;37:649–661.

[76] Banks W, Tschöp M, Robinson S, Heiman M. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. J Pharmacol Exp Ther 2002;302:822–827.

[77] Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature 2000;407:908–913.

[78] Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. Eur J Endocrinol 2001;145:669–673.

[79] Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. Nat Med 2002;8:643–644.

[80] Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 2001;50:1714–1719.

[81] Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. Endocrinology 2003;144:2765–2767.

[82] Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5510–5514.

[83] Toshinai K, Mondal M, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:1220–1225.

[84] Seoane LM, Al-Massadi O, Caminos JE, Tovar SA, Dieguez C, Casanueva FF. Sensory stimuli directly acting at the central nervous system regulate gastric ghrelin secretion. An ex vivo organ culture study. Endocrinology 2007;148:3998–4006.

[85] Xu G, Li Y, An W, Li S, Guan Y, Wang N, Tang C, Wang X, Zhu Y, Li X, Mulholland MW, Zhang W. Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake. Endocrinology 2009;150:3637–3644.

[86] Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. Cell Tissue Res 2010;339:493–504.

[87] Al Massadi O, Pardo M, Roca-Rivada A, Castelao C, Casanueva FF, Seoane LM. Macronutrients act directly on the stomach to regulate gastric ghrelin release. J Endocrinol Invest 2010;33:599–602.

[88] Arosio M, Ronchi C, Beck-Peccoz P, Gebbia C, Giavoli C, Cappiello V, Conte D, Peraccho M. Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:5101–5104.

[89] Schüssler P, Kluge M, Yassouridis A, Dresler M, Uhr M, Steiger A. Ghrelin levels increase after pictures showing food. Obesity 2012;20:1212–217.

[90] Seoane L, Al-Massadi O, Barreiro F, Dieguez C, Casanueva F. Growth hormone and somatostatin directly inhibit gastric ghrelin secretion. An in vitro organ culture system. J Endocrinol Invest 2007;30:22–25.

[91] Al-Massadi O, Crujeiras AB, Gonzalez RC, Pardo M, Dieguez C, Casanueva FF, Seoane LM. Age, sex, and lactating status regulate ghrelin secretion and GOAT mRNA levels from isolated rat stomach. AJP Endocrinol Metab 2010;299:E341–E350.

[92] Wren A, Small C, Ward H, Murphy K, Dakin C, Taheri S, Kennedy A, Roberts G, Morgan D, Ghatei M, Bloom S. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 2000;141:4325–4328.

[93] Benso A, Casanueva F, Ghigo E, Granata R. The Ghrelin System. 2013.

[94] Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. Biochem Biophys Res Commun 2000;276:905–908.

[95] Konturek PC, Brzozowski T, Pajdo R, Nikiforuk A, Kwiecien S, Harsch I, Drozdowicz D, Hahn EG, Konturek SJ. Ghrelin-a new gastroprotective factor in gastric mucosa. J Physiol Pharmacol 2004;55:325–336.

[96] Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest 2000;23:493–495.

[97] Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 2001;409:194–198.

[98] Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:4679–4684.

[99] Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan J-L, Wang Q-P, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. Endocrinology 2003;144:1506–1512.

[100] 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;60:1177–1185.

[101] López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez C V, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. Cell Metab 2008;7:389–399.

[102] Andrews ZB, Liu Z-W, Walllingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao X-B, Horvath TL, Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. Nature 2008;454:846–851.

[103] Ramírez S, Martins L, Jacas J, Carrasco P, Pozo M, Clotet J, Serra D, Hegardt FG, Diéguez C, López M, Casals N. Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. Diabetes 2013;62:2329–2337.

[104] Lage R, Vázquez MJ, Varela L, Saha AK, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Diéguez C, López M. Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. FASEB J 2010;24:2670–2679.

[105] Martins L, Fernández-Mallo D, Novelle MG, Vázquez MJ, Tena-Sempere M, Nogueiras R, López M, Diéguez C. Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. PLoS One 2012;7:e46923.

[106] Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima 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;123:1120–1128.

[107] Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. Endocrinology 2003;144:5184–5187.

[108] Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Clinical endocrinology and metabolism. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2004;18:517–530.

[109] Arnold M, Mura A, Langhans W, Geary N. Gut vagal afferents are not necessary for the eating-stimulatory effect of intraperitoneally injected ghrelin in the rat. J Neurosci 2006;26:11052–11060.

[110] Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda T, Muzzin P, Schurmann A, Szanto I, TSchop M, Rohner-Jeanrenaud F. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. J Clin Invest 2006;116:1983–1993.

[111] Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, Woods SC, Smiley DL, Tschöp M, Pfluger P. Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. FASEB J 2011;25:2814–2822.

[112] Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, Whitworth HS, Guschina I a, Evans B a J, Mode A, Zigman JM, Wells T. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. Mol Endocrinol 2009;23:914–924.

[113] Sun Y, Ahmed S, Smith R. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. Mol Cell Biol 2003;23:7973–7981.

[114] Zigman J, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus J, Lee C. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. J Clin Invest 2005;115:3564–3572.

[115] Goldstein JL, Zhao T, Li RL, Sherbet DP, Liang G, Brown MS. Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2011;76:121–127.

[116] Zhang J V, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, Luo C-W, Rauch R, Klein C, Hsueh AJW. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. Science 2005;310:996–999.

[117] Bresciani E, Rapetti D, Donà F, Bulgarelli I, Tamiazzo L, Locatelli V, Torsello A. Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. J Endocrinol Invest 2006;29:RC16–18.

[118] Zhang J V., Klein C, Ren P-G, Kass S, Donck L V., Moechars D, Hsueh AJW. Response to Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake." Science (80-) 2007;315:766d–766d.

[119] Seoane LM, Al-Massadi O, Pazos Y, Pagotto U, Casanueva FF. Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. J Endocrinol Invest 2006;29:RC13–15.

[120] Gourcerol G, Coskun T, Craft L, Mayer J, Heiman M, Wang L, Million M, St.-Pierre D, Taché Y. Preproghrelin-derived Peptide, Obestatin, Fails to Influence Food Intake in Lean or Obese Rodents. Obesity 2007;15:2643–2652.

[121] Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vázquez MJ, Wiedmer P, Castañeda TR, DiMarchi R, Tschöp M, Schurmann A, Joost H-G, Williams LM, Langhans W, Diéguez C. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. Endocrinology 2007;148:21–26.

[122] Kobelt P, Wisser A, Stengel A, Goebel M. Peripheral obestatin has no effect on feeding behavior and brain Fos expression in rodents. Peptides 2008;29:1018–1027.

[123] Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach L-O, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. Endocrinology 2007;148:13–20.

[124] Grönberg M, Tsolakis A V, Magnusson L, Janson ET, Saras J. Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues: immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas, and mammary glands. J Histochem Cytochem 2008;56:793–801.

[125] Granata R, Settanni F, Gallo D. Obestatin promotes survival of pancreatic β-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of β-cell mass and function. Diabetes 2008;57:967–979.

[126] Gurriarán-Rodríguez U, Al-Massadi O, Roca-Rivada A, Crujeiras A, Gallego R, Pardo M, Seoane L, Pazos Y, Casanueva F, Camiña J. Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. J Cell Mol Med 2011;15:1927–1940.

[127] Touw M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. J Psychoactive Drugs n.d.;13:23–34.

[128] Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. J Am Chem Soc 1964;86:1646–1647.

[129] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 1990;346:561–564.

[130] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 1993;365:61–65.

[131] Atwood BK, Mackie K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. Br J Pharmacol 2010;160:467–479.

[132] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev 2002;54:161–202.

[133] Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. J Clin Investig Investig 2003;112:423–431.

[134] Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Muñoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, Mechoulam R, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. Diabetologia 2008;51:476–487.

[135] Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB 1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. J Clin Investig Investig 2005;115:1298–1305.

[136] Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. Eur J Biochem 1995;232:54–61.

[137] Quarta C, Bellocchio L, Mancini G, Mazza R, Cervino C, Braulke LJ, Fekete C, Latorre R, Nanni C, Bucci M, Clemens LE, Heldmaier G, Watanabe M, Leste-Lassere T, Maitre M, Tedesco L, Fanelli F, Reuss S, Klaus S, Srivastava RK, Monory K, Valerio A, Grandis A, De Giorgio R, Pasquali R, Nisoli E, Cota D, Lutz B, Marsicano G, Pagotto U. CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. Cell Metab 2010;11:273–285.

[138] Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. Endocr Rev 2006;27:73–100.

[139] De Petrocellis L, Di Marzo V. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. J Neuroimmune Pharmacol 2010;5:103–121.

[140] Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 1992;258:1946–1949.

[141] Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N, Schatz A, Gopher A, Almog S, Martin B, Compton D, Pertwee R, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 1995;50:83–90.

[142] Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. Drug Discov Today 2010;15:474–483.

[143] Bradshaw HB, Walker JM. The expanding field of cannabimimetic and related lipid mediators. Br J Pharmacol 2005;144:459–465.

[144] Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett 1994;350:240–244.

[145] Akbas F, Gasteyger C, Sjödin a, Astrup a, Larsen TM. A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. Obes Rev 2009;10:58–67.

[146] Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis a. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand. AAPS PharmSci 1999;1:E4.

[147] Gatley SJ, Lan R, Volkow ND, Pappas N, King P, Wong CT, Gifford AN, Pyatt B, Dewey SL, Makriyannis A. Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. J Neurochem 1998;70:417–423.

[148] Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, Coruzzi G, Soldani G. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. Br J Pharmacol 2002;135:1598–1606.

[149] Hornby PJ, Prouty SM. Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. Br J Pharmacol 2004;141:1335–1345.

[150] Massa F, Mancini G, Schmidt H, Steindel F, Mackie K, Oliet S, Geisslinder G, Lutz B. Alterations in the hippocampal endocannabinoid system in diet-induced obese mice. J Neurosci 2010;30:6273–6281.

[151] Di Marzo V, Goparaju S, Wang L, Liu J. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. Nature 2001;410:822–825.

[152] Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrié P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. Int J Obes Relat Metab Disord 2004;28:640–648.

[153] Bajzer M, Olivieri M, Haas MK, Pfluger PT, Magrisso IJ, Foster MT, Tschöp MH, Krawczewski-Carhuatanta KA, Cota D, Obici S. Cannabinoid receptor 1 (CB1) antagonism enhances glucose utilisation and activates brown adipose tissue in diet-induced obese mice. Diabetologia 2011;54:3121–3131.

[154] Hollister LE. Hunger and appetite after single doses of marihuana, alcohol, and dextroamphetamine. Clin Pharmacol Ther 1971;12:44–49.

[155] Williams C, Rogers P, Kirkham T. Hyperphagia in pre-fed rats following oral δ 9-THC. Physiol Behav 1998;65:343–346.

[156] Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, Parolaro D, Massi P. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. J Neuroimmunol 2005;159:97–105.

[157] Simiand J, Keane M, Keane PE, Soubrié P. SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. Behav Pharmacol 1998;9:179–181.

[158] Werner N, Koch J. Effects of the cannabinoid antagonists AM281 and AM630 on deprivation-induced intake in Lewis rats. Brain Res 2003;967:290–292.

[159] Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl) 1999;143:315–317.

[160] Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. Eur J Pharmacol 2000;392:147–156.

[161] Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. Br J Pharmacol 2002;136:550–557.

[162] Verty AN, McFarlane JR, McGregor IS, Mallet PE. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake. Endocrinology 2004;145:3224–3231.

[163] Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng F-J, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. J Neurosci 2006;26:6643–6650.

[164] Hilairet S, Bouaboula M, Carrière D, Le Fur G, Casellas P. Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. J Biol Chem 2003;278:23731–23737.

[165] Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons: kinetics and role in influencing neurochemical phenotype. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010;299:G63–69.

[166] Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. PLoS One 2008;3:e1797.

[167] Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G. Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. Nat Neurosci 2010;13:281–283.

[168] Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci 1991;11:563–583.

[169] Devlin MG, Christopoulos A. Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. J Neurochem 2002;80:1095–1102.

[170] Kearn C, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? Mol Pharmacol 2005;67:1697–1704.

[171] Verty ANA, McGregor IS, Mallet PE. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 attenuates feeding induced by Delta9-tetrahydrocannabinol. Brain Res 2004;1020:188–195.

[172] Melis T, Succu S, Sanna F, Boi A, Argiolas A, Melis MR. The cannabinoid antagonist SR 141716A (Rimonabant) reduces the increase of extra-cellular dopamine release in the rat nucleus accumbens induced by a novel high palatable food. Neurosci Lett 2007;419:231–235.

[173] Kirkham TC, Williams CM. Synergistic efects of opioid and cannabinoid antagonists on food intake. Psychopharmacology (Berl) 2001;153:267–270.

[174] Lockie SH, Czyzyk TA, Chaudhary N, Perez-Tilve D, Woods SC, Oldfield BJ, Statnick MA, Tschöp MH. CNS opioid signaling separates cannabinoid receptor 1-mediated effects on body weight and mood-related behavior in mice. Endocrinology 2011;152:3661–3667.

[175] Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. Trends Endocrinol Metab 2006;18:27–37.

[176] Gómez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo M, Bilbao A, Arco I Del, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodrıguez de Fonseca F. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. J Neurosci 2002;22:9612–9617.

[177] Tucci SA, Rogers EK, Korbonits M, Kirkham TC. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. Br J Pharmacol 2004;143:520–523.

[178] Alen F, Crespo I, Ramírez-López MT, Jagerovic N, Goya P, de Fonseca FR, de Heras RG, Orio L. Ghrelin-induced orexigenic effect in rats depends on the metabolic status and is counteracted by peripheral CB1 receptor antagonism. PLoS One 2013;8:1–7.

[179] Soria-Gómez E, Massa F, Bellocchio L, Rueda-Orozco PE, Ciofi P, Cota D, Oliet SHR, Prospéro-García O, Marsicano G. Cannabinoid type-1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit stimulated food intake. Neuroscience 2014;263:46–53.

[180] Rigamonti AE, Giordani C, Bonomo SM, Cella SG, Müller EE. Early tolerance to the hypophagic effect of the cannabinoid receptor antagonist SR141716 does not impede blockade of an orexigenic stimulus. Eur J Pharmacol 2006;542:116–120.

[181] Zbucki RL, Sawicki B, Hryniewicz A, Winnicka MM. Cannabinoids enhance gastric X/A-like cells activity. Folia Histochem Cytobiol 2008;46:219–224.

[182] Cani PD, Montoya ML, Neyrinck AM, Delzenne NM, Lambert DM. Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. Br J Nutr 2004;92:757–761.

[183] Kasacka I, Arciszewska E, Winnicka MM, Lewandowska A. Effects of CP 55,940--agonist of CB1 cannabinoid receptors on ghrelin and somatostatin producing cells in the rat pancreas. Folia Histochem Cytobiol 2012;50:111–117.

[184] Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. J Biol Chem 2005;280:25196–25201.

[185] Lim CT, Kola B, Feltrin D, Perez-Tilve D, Tschöp MH, Grossman AB, Korbonits M. Ghrelin and cannabinoids require the ghrelin receptor to affect cellular energy metabolism. Mol Cell Endocrinol 2013;365:303–308.

[186] Kola B, Wittman G, Bodnár I, Amin F, Lim CT, Oláh M, Christ-Crain M, Lolli F, van Thuijl H, Leontiou CA, Füzesi T, Dalino P, Isidori AM, Harvey-White J, Kunos G, Nagy GM, Grossman AB, Fekete C, Korbonits M. The CB1 receptor mediates the peripheral effects of ghrelin on AMPK activity but not on growth hormone release. FASEB J 2013;27:5112–5121.

[187] Kola B, Korbonits M. Shedding light on the intricate puzzle of ghrelin's effects on appetite regulation. J Endocrinol 2009;202:191–198.

[188] Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 2006;443:709–712.

[189] Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. Endocrinology 2007;148:5088–5094.

[190] Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, Yamada M, Mori M. Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. PLoS One 2012;7:e50918.

[191] Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, Barnikol HU, Hilschmann N. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. Biol Chem Hoppe Seyler 1994;375:497–512.

[192] Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma}, stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. Endocrinology 2010;151:2494–2503.

[193] Taniguchi N, Taniura H, Niinobe M, Takayama C, Tominaga-Yoshino K, Ogura A, Yoshikawa K. The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. J Biol Chem 2000;275:31674–31681.

[194] Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G, Quintieri AM, Cerra MC. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. Cell Mol Life Sci 2013;70:495–509.

[195] Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Otero MF, Pereira E, Rubio J, Martínez I, Seoane LM, Gualillo O, Calaza M, García-Caballero T, Portolés M, Roselló-Lletí E, Diéguez C, Rivera M, González-Juanatey JR, Lago F. Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion, and mobilization of GLUT-4. Endocrinology 2013;154:4757–4767.

[196] Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Shimasaki T, Mitsutomi K, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. J Neurochem 2013;124:90–99.

[197] Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. Clin Endocrinol (Oxf) 2010;73:484–490.

[198] Stengel A, Mori M, Taché Y. The role of nesfatin-1 in the regulation of food intake and body weight: recent developments and future endeavors. Obes Rev 2013;14:859–870.

[199] Tagaya Y, Osaki A, Miura A, Okada S, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Shimizu H, Mori M. Secreted nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. Protein Pept Lett 2012;19:997–1004.

[200] Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. Endocrinology 2008;149:1295–1301.

[201] Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jego S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi P-H. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. Neuroscience 2008;155:174–181.

[202] Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. Neuroscience 2008;156:563–579.

[203] Goebel M, Stengel A, Lambrecht N, Wang L, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. Neurosci Lett 2009;452:241–246.

[204] Zhang A, Li X, Jiang C, Lin L, Shi R, Chen J, Oomura Y. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. World J Gastroenterol 2010;16:1735–1741.

[205] Osaki A, Shimizu H, Ishizuka N, Suzuki Y, Mori M, Inoue S. Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. Neurosci Lett 2012;521:46–51.

[206] García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Vazquez MJ, Sangiao-Alvarellos S, Romero-Ruiz A, Pinilla L, Diéguez C, Gaytán F, Tena-Sempere M. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. Endocrinology 2012;153:1959–1971.

[207] Catak Z, Aydin S, Sahin İ, Kuloglu T, Aksoy A, Dagli AF. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. Neuropeptides 2014;48:167–177.

[208] Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. Endocrinology 2009;150:232–238.

[209] Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeva HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. Endocrinology 2010;151:3169–3180.

[210] Garcés MF, Poveda NE, Sanchez E, Sánchez AY, Bravo SB, Vázquez MJ, Diéguez C, Nogueiras R, Caminos JE. Regulation of NucB2/Nesfatin-1 throughout rat pregnancy. Physiol Behav 2014;133C:216–222.

[211] Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Lembke V, Ahnis A, Elbelt U, Lambrecht NWG, Ordemann J, Klapp BF, Kobelt P. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects. Histochem Cell Biol 2013;139:909–918.

[212] García-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, Castellano JM, Romero M, Aguilar E, Gaytán F, Diéguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. J Neurosci 2010;30:7783–7792.

[213] Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. Biochem Biophys Res Commun 2013;434:434–438.

[214] Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, Lambrecht NWG, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. Endocrinology 2009;150:4911–4919.

[215] Li Q-C, Wang H-Y, Chen X, Guan H-Z, Jiang Z-Y. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. Regul Pept 2010;159:72–77.

[216] Tan BK, Hallschmid M, Kern W, Lehnert H, Randeva HS. Decreased cerebrospinal fluid/plasma ratio of the novel satiety molecule, nesfatin-1/NUCB-2, in obese humans: evidence of nesfatin-1/NUCB-2 resistance and implications for obesity treatment. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:E669–673.

[217] Li Z, Xu G, Li Y, Zhao J, Mulholland M, Zhang W. mTOR-dependent modulation of gastric nesfatin-1/NUCB2. Cell Physiol Biochem 2012;29:493–500.

[218] Mohan H, Unniappan S. Ontogenic pattern of nucleobindin-2/nesfatin-1 expression in the gastroenteropancreatic tissues and serum of Sprague Dawley rats. Regul Pept 2012;175:61–69.

[219] Li J-B, Nishida M, Kaimoto K, Asakawa A, Chaolu H, Cheng K-C, Li Y-X, Terashi M, Koyama KI, Amitani H, Sakoguchi T, Ushikai M, Ikeda S, Aoyama K, Horiuchi M, Li J-Z, Inui A. Effects of aging on the plasma levels of nesfatin-1 and adiponectin. Biomed Reports 2014;2:152–156.

[220] Aydin S. The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. Peptides 2010;31:2236–2240.

[221] Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. Cell Metab 2009;10:355–365.

[222] Suzuki S, Takagi K, Miki Y, Onodera Y, Akahira J-I, Ebata A, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T. Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. Cancer Sci 2012;103:136–143.

[223] Zegers D, Beckers S, Mertens IL, Van Gaal LF, Van Hul W. Association between polymorphisms of the Nesfatin gene, NUCB2, and obesity in men. Mol Genet Metab 2011;103:282–286.

[224] Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. Peptides 2011;32:36–43.

[225] Price C, Samson W, Ferguson A. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. Brain Res 2008;1230:99–106.

[226] Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. Peptides 2008;29:2159–2168.

[227] Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wisser A-S, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. Regul Pept 2009;157:84–91.

[228] Pan W, Hsuchou H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. Peptides 2007;28:2223–2228.

[229] Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. Endocrinology 2009;150:662–671.

[230] Gonzalez R, Perry RLS, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Ceddia RB, Unniappan S. Nutrient responsive nesfatin-1 regulates energy balance and induces glucose-stimulated insulin secretion in rats. Endocrinology 2011;152:3628–3637.

[231] Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. Neuroreport 2010;21:1008–1011.

[232] Iwasaki Y, Yada T. Vagal afferents sense meal-associated gastrointestinal and pancreatic hormones: mechanism and physiological role. Neuropeptides 2012;46:291–297.

[233] Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. Endocr J 2009;56:537–543.

[234] Tagaya Y, Miura A, Okada S, Ohshima K, Mori M. Nucleobindin-2 is a positive modulator of EGF-dependent signals leading to enhancement of cell growth and suppression of adipocyte differentiation. Endocrinology 2012;153:3308–3319.

[235] Stengel A, Goebel M, Taché Y. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. Obes Rev 2011;12:261–271.

[236] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell 2006;124:471–484.

[237] Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell 2002;110:163–175.

[238] Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. Endocrinology 2005;146:1473–1481.

[239] Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. Cell Metab 2012;16:104–112.

[240] Xu G, Li Y, An W, Zhao J, Xiang X, Ding L, Li Z, Guan Y, Wang X, Tang C, Zhu Y, Wang N, Li X, Mulholland M, Zhang W. Regulation of gastric hormones by systemic rapamycin. Peptides 2010;31:2185–2192.

[241] Pavlou MP, Diamandis EP. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? J Proteomics 2010;73:1896–1906.

[242] Lodish H, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, P Matsudaira, D Baltimore and JD. Molecular Cell Biology, 4th edition. W. H. Freeman; 2000.

[243] Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. Proteomics 2011;11:691–708.

[244] Van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA. Intracellular sorting and transport of proteins. Prog Biophys Mol Biol 2003;83:1–45.

[245] Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:148–155.

[246] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. Nature 2003;422:193–7.

[247] Pardo M, Roca-Rivada A, Seoane LM, Casanueva FF. Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research. Endocrine 2012;41:374–383.

[248] Barceló-Batllori S, Gomis R. Proteomics in obesity research. Proteomics - Clin Appl 2009;3:263–278.

[249] De Roos B, McArdle HJ. Proteomics as a tool for the modelling of biological processes and biomarker development in nutrition research. Br J Nutr 2008;99 Suppl 3:S66–71.

[250] Faulconnier Y, Chilliard Y, Torbati MBM, Leroux C. The transcriptomic profiles of adipose tissues are modified by feed deprivation in lactating goats. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics 2011;6:139–149.

[251] Kuhla B, Albrecht D, Bruckmaier R, Viergutz T, Nürnberg G, Metges CC. Proteome and radioimmunoassay analyses of pituitary hormones and proteins in response to feed restriction of dairy cows. Proteomics 2010;10:4491–4500.

[252] Wilson-Grady JT, Haas W, Gygi SP. Quantitative comparison of the fasted and re-fed mouse liver phosphoproteomes using lower pH reductive dimethylation. Methods 2013;61:277–286.

[253] Ishihara K, Nakata K, Yamagishi N, Iwasaki S, Kiriike N, Hatayama T. A comparative proteomic analysis of the rat brain during rebound hyperphagia induced by space-restriction. Mol Cell Biochem 2005;276:21–29.

[254] Yang L, Vaitheesvaran B, Hartil K, Robinson A, Hoopmann M, Eng J, Kurland I, Bruce J. The fasted/fed mouse metabolic acetylome: N6-acetylation differences suggest acetylation coordinates organ-specific fuel switching. J Proteome Res 2011;10:4134–4149.

[255] Culwell TF, Thulin CD, Merrell KJ, Graves SW. Influence of diet on the proteome of Drosophila melanogaster as assessed by two-dimensional gel electrophoresis and capillary liquid chromatography-mass spectrometry: the hamburger effect revisited. J Biomol Tech 2008;19:244–250.

[256] Bertram H, Larsen L, Chen X, Jeppesen P. Impact of high-fat and high-carbohydrate diets on liver metabolism studied in a rat model with a systems biology approach. J Agric Food Chem 2012;60:676–684.

[257] Ahmed S, Kashem MA, Sarker R, Ahmed EU, Hargreaves G a, McGregor IS. Neuroadaptations in the striatal proteome of the rat following prolonged excessive sucrose intake. Neurochem Res 2014;39:815–824.

[258] Lenaerts K, Sokolovic M, Bouwman F, Lamers W, Mariman E, Renes J. Starvation induces phase-specific changes in the proteome of mouse small intestine. J Proteome Res 2006;5:2113–2122.

[259] Harthoorn LF, Schipper RG, Loof A, Vereijken PFG, Van Heerde WL, Dransfield E. Salivary biomarkers associated with perceived satiety and body mass in humans. Proteomics Clin Appl 2007;1:1637–1650.

[260] Harden CJ, Perez-Carrion K, Babakordi Z, Plummer SF, Hepburn N, Barker ME, Wright PC, Evans C a, Corfe BM. Evaluation of the salivary proteome as a surrogate tissue for systems biology approaches to understanding appetite. J Proteomics 2012;75:2916–2923.

[261] Bouwman FG, de Roos B, Rubio-Aliaga I, Crosley LK, Duthie SJ, Mayer C, Horgan G, Polley AC, Heim C, Coort SLM, Evelo CT, Mulholland F, Johnson IT, Elliott RM, Daniel H, Mariman ECM. 2D-electrophoresis and multiplex immunoassay proteomic analysis of different body fluids and cellular components reveal known and novel markers for extended fasting. BMC Med Genomics 2011;4:24.

[262] Bertile F, Schaeffer C, Le Maho Y, Raclot T, Van Dorsselaer A. A proteomic approach to identify differentially expressed plasma proteins between the fed and prolonged fasted states. Proteomics 2009;9:148–158.

[263] Wu W, Chung MCM. The gastric fluid proteome as a potential source of gastric cancer biomarkers. J Proteomics 2013;90:3–13.

[264] Greger R, Windhorst U. Comprehensive Human Physiology. Springer. 1996.

[265] Lee K, Kye M, Jang JS, Lee OJ, Kim T, Lim D. Proteomic analysis revealed a strong association of a high level of alpha1-antitrypsin in gastric juice with gastric cancer. Proteomics 2004;4:3343–3352.

[266] Kon OL, Yip T-T, Ho MF, Chan WH, Wong WK, Tan SY, Ng WH, Kam SY, Eng AK, Ho P, Viner R, Ong HS, Kumarasinghe MP. The distinctive gastric fluid proteome in gastric cancer reveals a multi-biomarker diagnostic profile. BMC Med Genomics 2008;1:54.

[267] Paulo J, Lee L, Wu B, Repas K, Banks P, Conwell D, Steen H. analysis of endoscopically (ePFT) collected gastroduodenal fluid using in-gel tryptic digestion followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Proteomics Clin … 2010;4:715–725.

[268] Loei H, Tan HT, Lim TK, Lim KH, So JB-Y, Yeoh KG, Chung MCM. Mining the gastric cancer secretome: identification of GRN as a potential diagnostic marker for early gastric cancer. J Proteome Res 2012;11:1759–1772.

[269] Marimuthu A, Subbannayya Y, Sahasrabuddhe NA, Balakrishnan L, Syed N, Sekhar NR, Katte T V, Pinto SM, Srikanth SM, Kumar P, Pawar H, Kashyap MK, Maharudraiah J, Ashktorab H, Smoot DT, Ramaswamy G, Kumar R V, Cheng Y, Meltzer SJ, Roa JC, Chaerkady R, Prasad TSK, Harsha HC, Chatterjee A, Pandey A. SILAC-based quantitative proteomic analysis of gastric cancer secretome. Proteomics Clin Appl 2013;7:355–366.

[270] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680–685.

[271] Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel 2004;17:349–356.

[272] Stengel A, Goebel-Stengel M, Jawien J, Kobelt P, Taché Y, Lambrecht NWG. Lipopolysaccharide increases gastric and circulating NUCB2/nesfatin-1 concentrations in rats. Peptides 2011;32:1942–1947.

[273] Riva M, Nitert MD, Voss U, Sathanoori R, Lindqvist A, Ling C, Wierup N. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. Cell Tissue Res 2011;346:393–405.

[274] Bonetto V, Eriste E, Jonsson AP, Efendic S, Jörnvall H, Sillard R. Isolation of peptides from porcine intestinal tissue that induce extracellular acidification in CHO cells: identification of the active peptide as IGF-I and characterization of a fragment of calponin H1 processed at a dibasic site. Arch Biochem Biophys 2001;385:276–282.

[275] Draeger A, Gimona M, Stuckert A, Celis J, Small J. Calponin developmental isoforms and a low molecular weight variant. FEBS Lett 1991;291:24–28.

[276] Madsen AN, Jelsing J, van de Wall EHEM, Vrang N, Larsen PJ, Schwartz GJ. Rimonabant induced anorexia in rodents is not mediated by vagal or sympathetic gut afferents. Neurosci Lett 2009;449:20–23.

[277] Bohler H, Mokshagundam S, Winters SJ. Adipose tissue and reproduction in women. Fertil Steril 2010;94:795–825.

[278] Carro E, Pinilla L, Seoane LM, Considine R, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. Neuroendocrinology 1997;66:375–377.

[279] Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu J-N. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. Biochem Biophys Res Commun 2010;391:1039–1042.

[280] Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2012;120:91–95.

[281] Brown K, Formolo C, Seol H, Marathi R. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. Expert Rev Proteomics 2012;9:337–345.

[282] Mukherjee P, Mani S. Methodologies to decipher the cell secretome. Biochim Biophys Acta 2013;1834:2226–2232.

[283] Westermeier R, Naven T, Höpker H. Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design, 2nd, Completely Revised Edition. 2008.

[284] Pardo M, García A, Antrobus R, Blanco MJ, Dwek RA, Zitzmann N. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. J Proteome Res 2007;6:2802–2811.

[285] Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. Expert Rev Proteomics 2007;4:239–248.

[286] Roca-Rivada A, Alonso J, Al-Massadi O, Castelao C, Peinado JR, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M. Secretome analysis of rat adipose tissues shows location-specific roles for each depot type. J Proteomics 2011;74:1068–1079.

[287] Roca-Rivada A, Al-Massadi O, Castelao C, Senín LL, Alonso J, Seoane LM, García-Caballero T, Casanueva FF, Pardo M. Muscle tissue as an endocrine organ: comparative secretome profiling of slow-oxidative and fast-glycolytic rat muscle explants and its variation with exercise. J Proteomics 2012;75:5414–5425.

[288] Croft D, Pollock D, Coghill N. Cell loss from human gastric mucosa measured by the estimation of deoxyribonucleic acid (DNA) in gastric washings. Gut 1966.

[289] Liang CRMY, Tan S, Tan HT, Lin Q, Lim TK, Liu Y, Yeoh KG, So J, Chung MCM. Proteomic analysis of human gastric juice: a shotgun approach. Proteomics 2010;10:3928–3931.

[290] Kam SY, Hennessy T, Chua SC, Gan CS, Philp R, Hon KK, Lai L, Chan WH, Ong HS, Wong WK, Lim KH, Ling KL, Tan HS, Tan MM, Ho M, Kon OL. Characterization of the human gastric fluid proteome reveals distinct pH-dependent protein profiles: implications for biomarker studies. J Proteome Res 2011;10:4535–4546.

[291] Loei H, Tan HT, Lim TK, Lim KH, So JB-Y, Yeoh KG, Chung MCM. Mining the gastric cancer secretome: identification of GRN as a potential diagnostic marker for early gastric cancer. J Proteome Res 2012;11:1759–1772.

[292] Marimuthu A, Subbannayya Y, Sahasrabuddhe N, Balakrishnan L, Syed N, Sekhar N, Katte T, Pinto S, Srikanth S, Kumar P, Pawar H, Kashyap M. SILAC-based quantitative proteomic analysis of gastric cancer secretome. Proteomics - Clin Appl 2013;7:355–366.

[293] Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. J Histochem Cytochem 2009;57:41–50.

[294] Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. Biochim Biophys Acta 2006;1760:616–635.

[295] Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS, High NJ. Galectin-3 binds to Helicobacter pylori O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to H. pylori adhesion. Cell Microbiol 2006;8:44–54.

[296] Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu F-T, Levine J a. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. Obesity 2007;15:32–39.

[297] Weber M, Sporrer D, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Wurm S, Stögbauer F, Kopp A, Bala M, Schäffler A, Buechler C. Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes. FEBS Lett 2009;583:3718–3724.

[298] Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer M, Schnitzbauer A, Schaffler A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:1404–1411.

[299] Pejnovic N, Pantic J, Jovanovic IP, Radosavljevic G, Milovanovic M, Nikolic I, Zdravkovic N, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 Deficiency Accelerates High-Fat Diet–Induced Obesity and Amplifies Inflammation in Adipose Tissue and Pancreatic Islets. Diabetes 2013;62:1932–1944.

[300] Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. Diabetes 2007;56:152–160.

[301] Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Périquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. Diabetes 2006;55:2084–2090.

[302] Jaillard T, Roger M. Hypothalamic Reactive Oxygen Species Are Required for Insulin-Induced Food Intake Inhibition An NADPH Oxidase–Dependent Mechanism. Diabetes 2009;58:1514–1549.

[303] Fang X-L, Shu G, Yu J-J, Wang L-N, Yang J, Zeng Q-J, Cheng X, Zhang Z-Q, Wang S-B, Gao P, Zhu X-T, Xi Q-Y, Zhang Y-L, Jiang Q-Y. The anorexigenic effect of serotonin is mediated by the generation of NADPH oxidase-dependent ROS. PLoS One 2013;8:e53142.

[304] Coskun ZM, Sacan O, Karatug A, Turk N, Yanardag R, Bolkent S, Bolkent S. Regulation of oxidative stress and somatostatin, cholecystokinin, apelin gene expressions by ghrelin in stomach of newborn diabetic rats. Acta Histochem 2013;115:740–747.

[305] Suematsu M, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Matsumoto K, Kitagawa N, Akatsuka H, Hori Y, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y. Decreased circulating levels of active ghrelin are associated with increased oxidative stress in obese subjects. Eur J Endocrinol 2005;153:403–407.

[306] Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2007;146:632–643.

[307] Hiroi M, Nagahara Y, Miyauchi R, Misaki Y, Goda T, Kasezawa N, Sasaki S, Yamakawa-Kobayashi K. The combination of genetic variations in the PRDX3 gene and dietary fat intake contribute to obesity risk. Obesity (Silver Spring) 2011;19:882–887.

[308] Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L, Gazzah N, Alsaif MA, Hammami M. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. Nutr Metab (Lond) 2011;8:65.

[309] Antonopoulou E, Kentepozidou E, Feidantsis K, Roufidou C, Despoti S, Chatzifotis S. Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European sea bass (Dicentrarchus labrax). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2013;165:79–88.

[310] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González J a. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci 2011;12:3117–3132.

[311] Sirover MA. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. Biochim Biophys Acta 2011;1810:741–751.

[312] Griffiths J, Shaw S. Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (total and isoenzyme activity) in the early diagnosis of myocardial infarction. Clin Chem 1977;23:245–249.

[313] Wagener J, Schneider JJ, Baxmann S, Kalbacher H, Borelli C, Nuding S, Küchler R, Wehkamp J, Kaeser MD, Mailänder-Sanchez D, Braunsdorf C, Hube B, Schild L, Forssmann W-G, Korting H-C, Liepke C, Schaller M. A peptide derived from the highly conserved protein GAPDH is involved in tissue protection by different antifungal strategies and epithelial immunomodulation. J Invest Dermatol 2013;133:144–153.

[314] Yamaji R, Chatani E, Harada N, Sugimoto K, Inui H, Nakano Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading. Biochim Biophys Acta 2005;1726:261–271.

[315] Sheokand N, Kumar S, Malhotra H, Tillu V, Raje CI, Raje M. Secreted glyceraldehye-3-phosphate dehydrogenase is a multifunctional autocrine transferrin receptor for cellular iron acquisition. Biochim Biophys Acta 2013;1830:3816–3827.

[316] Seidler KA, Seidler NW. Role of extracellular GAPDH in Streptococcus pyogenes virulence. Mo Med 2013;110:236–240.

[317] Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla M a, Aguilar J, Badía J, Baldoma L. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:1190–1203.

[318] Kinoshita H, Imoto S, Suda Y, Ishida M, Watanabe M, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Horii A, Saito T. Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Anim Sci J 2013;84:150–158.

[319] Srinathan SK, Langer JC, Wang JL, Rubin DC. Enterocytic gene expression is altered in experimental gastroschisis. J Surg Res 1997;68:1–6.

[320] Ferguson BS, Nam H, Hopkins RG, Morrison RF. Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. PLoS One 2010;5:e15208.

[321] Yamada H, Chen D, Monstein HJ, Håkanson R. Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. Biochem Biophys Res Commun 1997;231:835–838.

[322] Dugail I, Quignard-Boulange a, Bazin R, Le Liepvre X, Lavau M. Adipose-tissue-specific increase in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and mRNA amounts in suckling pre-obese Zucker rats. Effect of weaning. Biochem J 1988;254:483–487.

[323] Seo E, Park E-J, Park M-K, Kim DK, Lee H-J, Hong S-H. Differential Expression of Metabolism-related Genes in Liver of Diabetic Obese Rats. Korean J Physiol Pharmacol 2010;14:99–103.

[324] Hittel DS, Hathout Y, Hoffman EP, Houmard JA. Proteome analysis of skeletal muscle from obese and morbidly obese women. Diabetes 2005;54:1283–1288.

[325] Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Stavrou G. Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. ISRN Obes 2014;2014:651895.

[326] Walsh MP, Carmichael JD, Kargacin GJ. Characterization and confocal imaging of calponin in gastrointestinal smooth muscle. Am J Physiol 1993;265:C1371–1378.

[327] Abouzaglou J, Bénistant C, Gimona M, Roustan C, Kassab R, Fattoum A. Tyrosine phosphorylation of calponins. Inhibition of the interaction with F-actin. Eur J Biochem 2004;271:2615–2623.

[328] Liu Y, Deng B, Zhao Y, Xie S, Nie R. Differentiated markers in undifferentiated cells: expression of smooth muscle contractile proteins in multipotent bone marrow mesenchymal stem cells. Dev Growth Differ 2013;55:591–605.

[329] Morioka T, Koyama H, Yamamura H. Role of H1-calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells. Diabetes 2003;52:760–760.

[330] Nakamura F, Mino T, Yamamoto J, Naka M, Tanaka T. Identification of the regulatory site in smooth muscle calponin that is phosphorylated by protein kinase C. J Biol Chem 1993;268:6194–6201.

[331] Wang J, Yan C-H, Li Y, Xu K, Tian X-X, Peng C-F, Tao J, Sun M-Y, Han Y-L. MicroRNA-31 controls phenotypic modulation of human vascular smooth muscle cells by regulating its target gene cellular repressor of E1A-stimulated genes. Exp Cell Res 2013;319:1165–1175.

[332] Paek DS, Sakurai R, Saraswat A, Li Y, Khorram O, Torday JS, Rehan VK. Metyrapone Alleviates Deleterious Effects of Maternal Food Restriction on Lung Development and Growth of Rat Offspring. Reprod Sci 2014.

[333] Bannai M, Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Hori M, Nishihara M, Takahashi K, Yamamura H, Taniguchi S, Katsuki M, Ozaki H, Karaki H. Increased locomotor activity, increased food and water intake and decreased PVN neurons in H1 calponin gene-deficient mice. J Vet Med Sci 2003;65:153–155.

[334] Wang X, Wu K, Zhang Z, Lan M, Jin J, Fan D. [The effect of calponin and caldesmon in regulation of the gastrointestinal motility during pathophysiological adaptation]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2001;40:459–462.

[335] Al-Shboul OA, Mustafa A, Mohammad M, Al-Shehabat M, Yousef A, Al-Hashimi F. Effect of Oxidative Stress on the Expression of Thin Filament-Associated Proteins in Gastric Smooth Muscle Cells. Cell Biochem Biophys 2014.

[336] Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:13531–13536.

[337] Gobbo MG, Taboga SR, Ribeiro DL, Góes RM. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. Micron 2012;43:326–333.

[338] Ong S-E, Foster LJ, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. Methods 2003;29:124–130.

[339] Roelofsen H, Dijkstra M, Weening D, de Vries MP, Hoek A, Vonk RJ. Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes. Mol Cell Proteomics 2009;8:316–324.

[340] Butler G, Overall C. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. Nat Rev Drug Discov 2009;8:935–948.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Para llevar a cabo esta tesis doctoral Lucía López Senín fue financiada con una beca FPU (Referencia AP2009-5244) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Gobierno de España).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA


USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA