



TESIS DOCTORAL

FAMILIA NR4A:
PROTEÍNAS IMPLICADAS EN
LA HOMEOSTASIS
ENERGÉTICA

Sonia Pérez Sieira



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

— CIMUS —

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

-2017-







Portada: Modelos moleculares 3D de NR4A1
Figura superior (Flaig, Greschik, Peluso-Iltis, & Moras, 2005). ***Con permiso de Journal of Biological Chemistry, Molecular & Cellular Proteomics.***
Figura inferior (Li, et al., 2015). ***Con permiso de Nature.***



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**FAMILIA NR4A:
PROTEÍNAS IMPLICADAS EN
LA HOMEOSTASIS
ENERGÉTICA**

Tesis doctoral

Sonia Pérez Sieira

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
— CIMUS —**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

-2017-



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

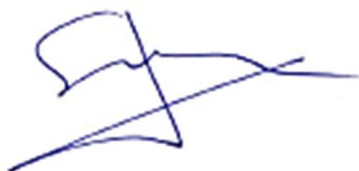
Dra. Sulay Tovar Carro, Investigadora Contratada programa Ramón y Cajal del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

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

Certifican que la tesis: "Familia NR4A: proteínas implicadas en la homeostasis energética" elaborada por Sonia Pérez Sicira ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia "Ramón Domínguez" del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela y en el Centro de Investigaciones en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la USC (CIMUS), estimando que los objetivos del Plan de Investigación, así como las actividades formativas necesarias exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, han sido cumplidos, y no incurren en las causas de abstención establecidas en la ley 40/2015 y por lo tanto, como directores de la misma consideran la tesis concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firman la presente autorización:

Fdo. Sulay Tovar Carro



Fdo. Carlos Diéguez González

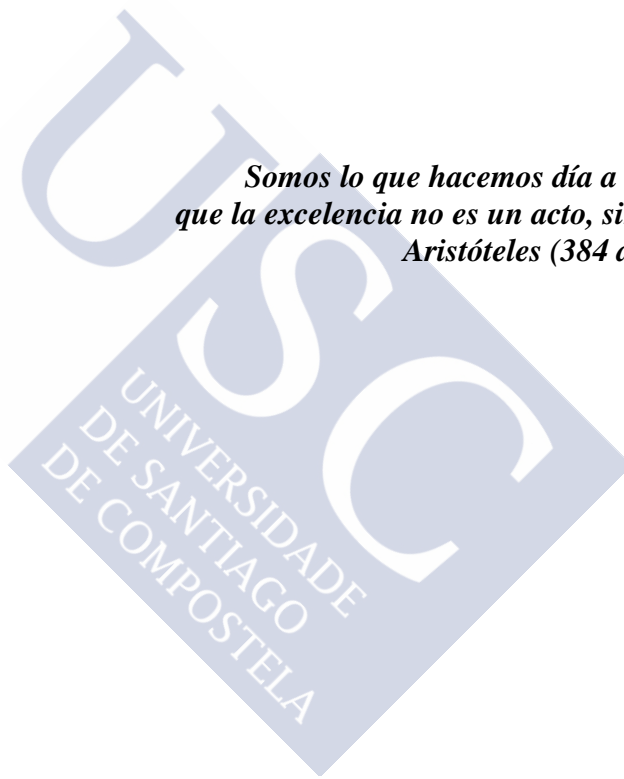


Fdo. Sonia Pérez Sicira





*Somos lo que hacemos día a día. De modo
que la excelencia no es un acto, sino un hábito.*
Aristóteles (384 a.C.-322 a.C.)







A mi familia
A Marcos
A MIS HIJOS Álex e Íker





ÍNDICE



ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Obesidad.....	25
1.1 Síndrome metabólico.....	27
1.2 La genética de la obesidad.....	29
2. Homeostasis energética.....	29
2.1 Regulación de la homeostasis energética.....	32
2.1.1 Regulación central: Hipotálamo.....	32
2.1.2 Regulación periférica de la homeostasis.....	38
2.1.2.1 El tracto gastrointestinal.....	38
2.1.2.2 El hígado y su función en el metabolismo.....	39
2.1.2.3 El tejido adiposo como órgano endocrino.....	42
2.1.2.4 Estrógenos en la homeostasis energética.....	43
2.1.3 Sistema nervioso autónomo: conexión entre central y periferia.....	44
2.1.3.1 Inervación WAT.....	45
2.1.3.2 Inervación BAT.....	45
2.1.3.3 Inervación hígado.....	45
3. Tejido adiposo.....	47
3.1 Introducción.....	47
3.2 Fisiología.....	48
3.2.1 Fisiología tejido adiposo blanco.....	48
3.2.2 Fisiología tejido adiposo pardo.....	49
3.3 Función energética del tejido adiposo.....	51
3.3.1 Almacenamiento.....	51
3.3.2 Lipogénesis.....	52
3.3.3 Lipólisis.....	54
3.3.4 Alteraciones tejido adiposo: Lipodistrofia.....	56
SEÑALES REGULADORAS DE LA HOMEOSTASIS DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON LOS OBJETIVOS DE ESTA TESIS	
4. NR4A.....	57
4.1 Descubrimiento.....	57
4.2 Estructura.....	58
4.2.1 Estructura génica.....	58
4.2.2 Estructura proteica.....	59
4.3 Isotipos.....	60
4.3.1 <i>Nur77</i>	60
4.3.2 <i>Nurr1</i>	60
4.3.3 <i>Nor-1</i>	61
4.4 Distribución/Localización.....	61
4.5 Superfamilia de receptores nucleares.....	62

	<u>Pág.</u>
4.6 Señalización.....	63
4.7 Acciones biológicas.....	64
4.7.1 Apoptosis.....	64
4.7.2 Regulación.....	65
4.7.3 Acciones biológicas en la periferia.....	65
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	67
MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
1. Animales de experimentación.....	73
1.1 Modelos animales utilizados.....	73
1.1.1 Ratones C57BL/6J.....	73
1.1.2 Ratas Sprague-Dawley.....	74
1.1.3 Ratas Dwarf.....	75
1.1.4 Ratón knock-out de leptina: <i>ob/ob</i>	75
1.2 Estabulación.....	75
1.3 Obtención de las muestras.....	75
1.4 Sedación.....	75
1.5 Modelos experimentales <i>in vivo</i>	76
1.5.5 Análisis por sistema de calorimetría indirecto, TSE.....	76
1.5.6 Expresión de <i>Nur77</i> , <i>Nor-1</i> , <i>Nurr1</i> en tejido adiposo blanco.....	77
1.5.6.1 Ayuno.....	77
1.5.6.2 Restricción alimenticia crónica en machos adultos.....	77
1.5.6.3 Ayuno y tratamiento con leptina: ratones <i>ob/ob</i>	77
1.5.6.4 Dieta alta/baja en grasas.....	78
1.5.6.5 Desarrollo postnatal y dimorfismo sexual.....	78
1.5.6.6 Efectos hormonas gonadales.....	78
1.5.6.7 Estado tiroideo.....	78
1.5.6.8 Gestación.....	79
2. Técnicas experimentales.....	79
2.1 Extracción ARN total.....	79
2.1.1 Extracción ARN en tejidos.....	79
2.1.2 Aislamiento ARN.....	79
2.1.3 Precipitación ARN.....	80
2.1.4 Lavado ARN.....	80
2.2 Cuantificación.....	80
2.3 Retrotranscripción.....	81
2.4 PCR tiempo real.....	81
2.5 Diseño Cebadores.....	86
2.6 Western Blot.....	86
2.6.1 Extracción proteínas.....	86
2.6.2 Electroforesis.....	87
2.6.3 Transferencia.....	88

	<u>Pág.</u>
2.6.4 Inmunodetección.....	89
2.6.5 Soluciones.....	89
2.6.6 Cuantificación western blot.....	90
2.7 Medición de otros parámetros.....	91
2.7.1 Extracción triacilglicéridos.....	91
2.7.2 Análisis triacilglicéridos.....	91
2.7.3 Análisis NEFAS.....	91
2.7.4 Análisis colesterol.....	92
2.7.5 Test de glucosa e insulina.....	92
2.7.6 Tinción Hematoxilina/eosina.....	92
2.7.7 Medición insulina y leptina.....	92
3. Análisis estadístico y representaciones gráficas.....	93
RESULTADOS.....	95
OBJETIVO 1.....	97
1.1. Los ratones hembra KO para <i>Nur77</i> alimentados con dieta alta en grasa han incrementado su peso corporal y su adiposidad.....	97
1.2 La supresión de <i>Nur77</i> disminuye el gasto energético en hembras alimentadas con HFD.....	97
1.3 Las hembras KO <i>Nur77</i> alimentadas con HFD han aumentado el almacenamiento de grasa hepática.	100
1.4 Las hembras <i>Nur77</i> KO alimentadas con HFD muestran descenso en la lipólisis en tejido adiposo blanco.....	100
1.5 La supresión de <i>Nur77</i> en hembras incrementa los niveles de CIDEA en BAT.....	103
1.6 Los ratones hembra <i>Nur77</i> KO tienen niveles séricos normales de NEFAs, TG, colesterol e insulina pero incrementan los niveles de leptina y glucosa basal.....	105
1.7 Contenido de TG y señalización de insulina en músculo.....	105
1.8 Homeostasis de la glucosa en ratones <i>Nur77</i> deficientes alimentados con dieta alta en grasa	107
OBJETIVO 2.....	110
2.1 Influencia de la privación de alimentos, la leptina y la composición de alimentos en la expresión de NR4A.	110
2.2 Influencia de la edad y el género en la expresión de ARNm de NR4A.....	113
2.3 Influencia de las hormonas hipofisarias.....	116
2.4 Efectos del embarazo.....	118
DISCUSIÓN.....	119
BLOQUE I: <i>Nur77</i>	
BLOQUE II: FAMILIA NR4A	
CONCLUSIONES.....	129
AGRADECIMIENTOS.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137



ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS





ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- **ACC** *Acyl-coa Carboxilase*
- **ADP** *Adenosin diphosphate*
- **Adra2** *Adrenergic receptor α 2*
- **Adra3** *Adrenergic receptor α 3*
- **AgRP** *Agouti related protein*
- **AMPK** *AMP-activated protein kinase*
- **ARC o ARQ** *Arcuate hypothalamic nucleus*
- **ATGL** *Adipose triglyceride lipase*
- **ATP** *Adenosin triphosphate*
- **BAT** *Brown adipose tissue*
- **cAMP** *Cyclic Adenosin monophosphate*
- **CPT-1** *Carnitine palmitoyltransferase*
- **DG** *Diglicerido*
- **DIO** *Diet induced obesity*
- **DM** *Diabetes mellitus*
- **DMH** *Dorsal medial nucleus of hypothalamus*
- **FA** *Ácido graso(Fatty acid)*
- **FADH2** *1,5-dihydroflavin adenine dinucleotide*
- **FAS** *Fatty acid syntase*
- **GH** *Growth hormone*
- **GLUT-4** *Glucose transporter 4*
- **GnRH** *Gonadotropin-releasing hormone*
- **HDL** *High density lipoprotein*
- **HFD** *High fat diet*
- **HSL** *Hormone sensitive lipase*
- **IL-6** *Interleukine-6*
- **IRS-1** *Insulin receptor substrate 1*
- **IRS-2** *Insulin receptor substrate 2*
- **JNK** *C-Jun N-terminal kinasa*
- **KO** *Knock-out*
- **LD** *Lipid droplet*
- **LDL** *Low density lipoprotein*
- **LHA** *Lateral anterior hypothalamic nucleus*
- **LPL** *Lipoprotein lipase*
- **NADH** *Nicotinamide adenine dinucleotide*
- **NADPH** *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

- **ND** *Normal diet*
- **NEFA** *Non esterified fatty acid*
- **NPY** *Neuropeptido Y*
- **NR4A** *Nuclear receptor 4A family.*
- **ObR** *Receptor de leptina*
- **PCK 1 o PEPCK1** *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*
- **PGC1 α** *Peroxisome-proliferator activated receptor γ coactivator 1 α*
- **PI3K** *Phosphoinositide-3-kinase*
- **POMC** *Proiomelanocortine*
- **PPAR α** *Peroxisome-proliferator activated receptor α*
- **PPAR γ** *Peroxisome-proliferator activated receptor γ*
- **PVN** *Paraventricular hypothalamic nucleus*
- **SCD-1** *Stearoyl-coa desaturase*
- **SNP** *Sistema nervioso periférico*
- **SNS** *Sistema nervioso central*
- **SREBPs** *Sterol-regulatory-element binding protein*
- **TG o TAG** *Triglicérido o triacilglicérido*
- **TNF α** *Tumor necrosis factor α*
- **TRH** *Thyrotropin releasing hormone*
- **TSH** *Thyroid stimulating hormone*
- **UCP-1** *Uncoupling protein-1*
- **VHFD** *very high fat diet*
- **VLDL** *Very low-density lipoprotein*
- **VMH** *Ventromedial hypothalamic nucleus*
- **WAT** *White adipose tissue*
- **WT** *wild type*
- El resto de abreviaturas son de uso común o se encuentran detalladas en el texto.

INTRODUCCIÓN





INTRODUCCIÓN

1. Obesidad

La obesidad es uno de los principales problemas de salud mundial y las tasas de obesidad aumentan de manera constante año tras año. En 1998 se la consideró *epidemia mundial* por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a que en ese año había más de mil millones de adultos con sobrepeso (de los que por lo menos 300 millones eran clínicamente obesos) con lo que se había convertido en uno de los principales factores que contribuían a la aparición de enfermedades crónicas (cardiopatías, diabetes, osteoartritis, etc.).

La obesidad se define como una condición física en la que una persona tiene un índice de masa corporal (IMC) (tabla 1) que supera unos valores establecidos. El IMC es una medida de la relación entre peso y altura. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos por el cuadrado de su altura en metros. Proporciona una medida útil del sobrepeso y la obesidad en la población puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. La utilidad médica para determinar un índice de masa corporal es que se correlaciona fuertemente con el contenido total de grasa corporal en los adultos. Según la OMS, un IMC igual o superior a 25 kg / m² determina sobrepeso. Un IMC igual o superior a 30 determina obesidad.

Fuente	Bajo peso	Normal	Sobrepeso	Obesidad		
				Grado 1	Grado 2	Grado 3
OMS	< 18.5	18.5-24.9	> 25	30.0-34.9	35.0-39.9	> 40

Tabla 1. Clasificación de la obesidad en adultos de acuerdo con el IMC. Elaboración propia.

La OMS reconoce a la obesidad como una enfermedad y la asocia a las enfermedades crónicas no transmisibles, por cuya causa se producen alrededor de 60% de todas las defunciones y 47% de la carga de la morbilidad mundial incrementándose. Además, considera que esos porcentajes aumentarán notablemente en el presente siglo, principalmente por la evolución de las tendencias demográficas y de los modos de vida. La obesidad se está acercando a proporciones epidémicas en muchos países industrializados. Es un grave problema, no solo en adultos sino también, cada vez más, en niños. La incidencia de la obesidad en niños y jóvenes está incrementando. Muchos estudios sugieren que el 25% de los niños pueden ser obesos. Las implicaciones en la salud a largo plazo sugieren que el aumento en la esperanza de vida intergeneracional no ocurra y estos niños tendrán una vida más corta que sus padres a causa de complicaciones de salud asociadas con el aumento de peso (Daniels, 2006) (Sargent & Moore, 2009).

El creciente consumo de alimentos con elevada densidad energética, pero pobres en nutrientes, con altos niveles de azúcar y grasas saturadas, y también la marcada disminución en la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización, han llevado a agravar enormemente este problema.

Según datos de la OMS, desde 1980, la obesidad se ha más que doblado en todo el mundo. En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 años o más tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. En datos estadísticos, en 2014, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesos. Sin embargo, mucho más preocupante es el hecho de que la tasa de obesidad infantil y adolescente ha aumentado enormemente. Se estima que 42 millones de niños menores de 5 años tenían sobrepeso o eran obesos en 2015, lo que representa un aumento de alrededor de 11 millones en los últimos 15 años.

Si bien el sobrepeso y la obesidad tiempo atrás eran considerados un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos están aumentando en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos. En los países en desarrollo con economías emergentes el incremento porcentual del sobrepeso y la obesidad en los niños ha sido un 30% superior al de los países desarrollados. A medida que más y más niños y adolescentes se están convirtiendo en obesos, están empezando a desarrollar factores de riesgo de enfermedades crónicas que generalmente se observan mucho más tarde en la vida (dislipidemia, hipertensión, hiperinsulinemia, diabetes tipo 2, etc.) (Mitchell, Catenacci, Wyatt, & Hill, 2011).

La obesidad, incluido el sobrepeso como un estado previo a esta enfermedad, es un problema crónico en el que se entremezclan factores genéticos, ambientales y de estilos de vida que conducen a un trastorno metabólico. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas. Tiene lugar cuando el equilibrio entre el aporte de energía (ingesta) y el gasto energético (actividad, ejercicio) se interrumpe, es decir, se consume más alimento que la que se utiliza, conllevando a un acúmulo excesivo de grasa. Aunque mucha gente tiene una dieta restringida en calorías y el ejercicio puede llevar a una reducción en la ganancia de peso, para mucha gente esto no es suficiente y la pérdida de peso no puede mantenerse. Hay muchos factores ambientales que predisponen a los individuos a una ganancia de peso, por ejemplo, libre disposición de alimentos de alto contenido calórico y estilo de vida sedentarios (Bloom, et al., 2008). Los factores genéticos también contribuyen a este desequilibrio. Por ejemplo, la hipótesis del “gen-ahorro” propone que los humanos, particularmente propensos a pasar hambre han evolucionado para favorecer el almacenamiento de un exceso de calorías en forma de grasa (Bloom, et al., 2008) (Sargent & Moore, 2009).

Aparte del problema que de por sí representa la obesidad, los expertos advierten de que sus efectos más negativos se producen porque actúa como un agente que exagera y agrava a corto plazo y de forma muy evidente patologías graves en adultos como la diabetes tipo 2, la hipertensión, las complicaciones cardiovasculares (especialmente la cardiopatía

isquémica), dislipidemia (la obesidad visceral está asociada con altos niveles de triglicéridos, bajo colesterol HDL e incremento en LDL), e incluso algunos tipos de cáncer (cáncer endometrial, esofágico, renal, pancreático, ovárico, de pecho, colorrectal y de tiroides). La obesidad también está asociada con un espectro de enfermedades en el hígado conocidos como trastorno de hígado graso no-alcohólico (NAFLD) o esteatohepatitis no-alcohólica (NASH). Manifestaciones de esta desorden incluyen hepatomegalia, funciones del hígado anormal, histología del hígado anormal incluyendo esteatosis macrovesicular, esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis (Matteoni, et al., 1999) (Mitchell, Catenacci, Wyatt, & Hill, 2011).

1.1 SÍNDROME METABÓLICO

Este síndrome, también denominado “cuarteto de la muerte”, “síndrome plurimetabólico” o simplemente “síndrome metabólico”, definido desde 1998, es una constelación de cuatro anormalidades metabólicas tales como obesidad, glucosa elevada en sangre, presión sanguínea alta, dislipidemia (reducción de lipoproteínas de alta densidad o colesterol “bueno”) o hipertrigliceridemia y, unida a estas cuatro, el sedentarismo; Hay distintos consensos diagnósticos para definir dicho síndrome pero la gran mayoría están relacionados con la presencia en una misma persona de tres de las cuatro anormalidades antes citadas. Independientemente del modo de definirlo, hacerlo es muy importante dado que su presencia eleva de forma marcada la probabilidad de distintas comorbilidades incluidas eventos cardiovasculares (Greenwood, Bloom, & Murphy, 2011).

Se ha estimado que 347 millones de personas en todo el mundo tienen diabetes y que muchas de ellas mueren a consecuencia de niveles altos de glucosa en sangre. Aunque el síndrome metabólico comprende muchos factores, la mayoría, sino todos, pueden mejorar con la pérdida de peso.

Entender la regulación del peso corporal es vital para identificar las potenciales dianas terapéuticas. El control del peso corporal implica una regulación coordinada de la ingesta y el gasto energético para promover valores estables de almacenamiento de energía en órganos como el tejido adiposo y el hígado. Este proceso, llamado homeostasis energética, es el resultado de la integración neuronal y las señales hormonales desde la periferia y las señales neuronales dentro del sistema nervioso central para el mantenimiento del peso corporal (Greenwood, Bloom, & Murphy, 2011).

1.2 LA GENÉTICA DE LA OBESIDAD

El peso corporal y el apetito están regulados por un complejo sistema neuronal que integra señales homeostáticas, emocionales, hedónicas y cognitivas para regular el balance energético. Esta compleja red está influenciada por múltiples factores, como mecanismos epigenéticos, genéticos y medioambientales.

La genética de la enfermedad es compleja y varía desde los modelos de obesidad monogénica y sindrómica hasta las formas multifactoriales y poligénicas más frecuentes. La originada en un gen único disfuncional (obesidad monogénica) representa un pequeño número de casos severos, que aparecen en la niñez y se acompañan de diferentes trastornos neuroendocrinos, del desarrollo y la conducta (Bell, Walley, & Froguel, 2005).

Se ha observado en múltiples estudios (Hill & Peters, 1998) que la contribución ambiental a la epidemia de obesidad es un hecho evidente. Sin embargo, el fuerte componente genético de la obesidad se ha establecido en numerosos estudios sobre gemelos y familiares (Bouchard, 1993) (Arner, 2000). El análisis de algunos de estos estudios sugiere que un 50-70% de la variación en el índice de masa corporal es atribuible a diferencias genéticas (Allison, et al., 1996).

Los últimos avances han proporcionado una visión de los mecanismos moleculares, celulares y de comportamiento que afectan a este sistema de control homeostático. Esto se pone de relieve por la obesidad severa que resulta de la disfunción de cualquiera de varios de sus componentes clave (Morton, 2006). Aunque es demasiado simplista reducir un comportamiento tan complejo como la alimentación a una serie de interacciones moleculares, los descubrimientos de los últimos años han identificado las moléculas de señalización que afectan a la ingesta de alimentos y que son fundamentales para la homeostasis energética normal. La aplicación de la genética molecular de ratones ha sido especialmente importante en este esfuerzo. Por ejemplo, varias formas monogénicas de la obesidad humana se identificaron mediante la búsqueda de mutaciones homólogas a los que causan la obesidad en ratones (Montague, et al., 1997) (Vaisse, Clement, Guy-Grand, & Froguel, 1998) (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000)

Aunque tales síndromes de obesidad monogénicas son raros (Barsh, Farooqi, & O'Rahilly, 2000), el uso de modelos murinos para estudiar la obesidad humana indica que existe una homología sustancial entre las especies de mamíferos en la organización funcional del sistema de regulación de peso. La identificación de moléculas que controlan la ingesta de alimentos ha generado nuevos objetivos para el desarrollo de fármacos en el tratamiento de la obesidad y trastornos relacionados (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000). Utilizando nuevos procedimientos en la tecnología del DNA se han podido identificar una serie de obesidades de tipo monogénico en roedores. Asimismo, se han descrito varias formas raras de obesidad monogénica en los humanos, encontrándose mutaciones para los genes que codifican para la leptina, el receptor de la leptina, la pro-opiomelanocortina, la prohormona convertasa-1 y el receptor de la melanocortina- 4. Todas estas formas de obesidad van asociadas con obesidad mórbida juvenil. Los mecanismos responsables del exceso de acumulación de grasa en estas formas de obesidad son desconocidos, aunque se sabe que comparten algunos hechos fisiopatológicos semejantes a las formas genéticas de obesidad en ratones (Arner, 2000) (Barsh, Farooqi, & O'Rahilly, 2000).

Es evidente que de los análisis de segregación y del escaneo amplio del genoma humano se obtienen diferentes respuestas que hacen pensar que en la obesidad intervienen varios genes que, en combinación con el medio ambiente, dan lugar a la aparición de

obesidad. Es decir, esta patología en la mayoría de los casos es una enfermedad poligénica en la que varios polimorfismos genéticos, a través de la interacción con el medio, dan lugar a un depósito excesivo de grasa corporal. Por tanto, es muy probable que no exista un solo tipo de obesidad sino varios genotipos con fenotipos similares. Entre los genes implicados en la etiología de la obesidad se encuentran genes metabólicos, genes que codifican para péptidos que controlan las señales de hambre y saciedad, genes reguladores del gasto energético y genes reguladores del crecimiento y diferenciación de los adipocitos.

2. Homeostasis energética

El fisiólogo francés Claude Bernard fue el primero en introducir el concepto de homeostasis cuando acuñó la frase "medio interior" hace más de 150 años. También fue el primero en sugerir que el sistema nervioso central regulaba de manera directa los niveles de glucosa en sangre (Bernard, 1855). Posteriormente, varios investigadores describieron una serie de modelos que apoyaron el papel de la glucosa, así como otras señales periféricas en la regulación central de la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la homeostasis de la glucosa (Woods, Seeley, Porte, & Schwartz, 1998).

En 1953, Kennedy (Kennedy, 1953) propuso que las señales inhibitorias generadas en proporción a depósitos de grasa corporal actuaban en el cerebro para reducir la ingesta de alimentos. Por lo tanto, cuando la pérdida de peso inducida por la restricción calórica reducía el nivel de estas señales inhibitorias, aumentaba la ingesta de alimentos hasta que el déficit de energía se corregía. Este modelo, sin embargo, no explicaba cómo se controlaba la ingesta de energía durante las comidas individuales. Veinte años más tarde, Gibbs y Smith (Gibbs, Young, & Smith, 1973) propusieron que las señales generadas durante una comida (denominan "factores de saciedad"), incluyendo péptidos secretados desde el tracto gastrointestinal, proporcionaban información al cerebro que inhibía la alimentación y conducía a la finalización de la comida. Un modelo que parece unir las dos hipótesis, es un modelo en el cual un cambio en la adiposidad corporal se acopla a cambios compensatorios de la ingesta de alimentos. Esto se resume en la obra de Douglas Coleman culminada con el trabajo de Jeffrey Friedman con la identificación de la leptina como hormona sintetizada por el adipocito. Identificaron y nombraron esta sustancia química como leptina (Friedman, Leptin, leptin receptors and the control of body weight, 1997) (Friedman & Halaas, 1998). El descubrimiento de la leptina y simultáneos avances en herramientas moleculares han sido un catalizador en el estudio y la comprensión de la regulación central de la ingesta de alimentos, así como el balance de energía y la homeostasis de la glucosa (figura 1) (Williams & Elmquist, 2012).

energía gastada) que a su vez determina la cantidad de combustible almacenado en forma de grasa corporal (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000).

La última década ha visto un creciente reconocimiento de que existe una compleja interacción entre el sistema nervioso central y la actividad de numerosos órganos que participan en la homeostasis energética. La homeostasis de energía incluye la regulación de los niveles de nutrientes en los órganos de almacenamiento claves (por ejemplo, la grasa en el tejido adiposo y el glucógeno en el hígado), así como en la sangre (por ejemplo, glucosa). Para lograr esto, el cerebro recibe información continua sobre las reservas de energía y los flujos en los órganos críticos, sobre el alimento ingerido y absorbido, y sobre las necesidades energéticas basales de los tejidos (Woods & D'Alessio, 2008) (figura 2). El cerebro a su vez controla los tejidos que tienen papeles importantes en la homeostasis energética, como el hígado y el sistema esquelético muscular, así como la secreción de hormonas clave metabólicamente activas, principalmente a través del sistema nervioso autónomo. El cerebro es así capaz de responder a las demandas en curso, así como a través de respuestas imprevistas bien coordinados, para evitar el déficit en las reservas de energía mientras se mantiene la homeostasis bioquímica (Woods & D'Alessio, 2008) (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000) (Woods, Seeley, Porte, & Schwartz, 1998) (Woods, 2005).

Los mecanismos para el control de la ingesta de alimentos implican principalmente una interacción entre intestino, el cerebro, el tejido adiposo y el hígado, entre los órganos principales. El parasimpático, simpático, y otros sistemas son necesarios para la comunicación entre el centro de saciedad del cerebro y los otros órganos. Estos circuitos neuronales incluyen una variedad de péptidos y hormonas, lo que sugiere su relevancia fisiológica en la regulación de la ingesta de alimentos y la homeostasis de energía. Además distintos ejes neuroendocrinos, como el hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HPT) juegan un papel clave en la regulación de la homeostasis energética.

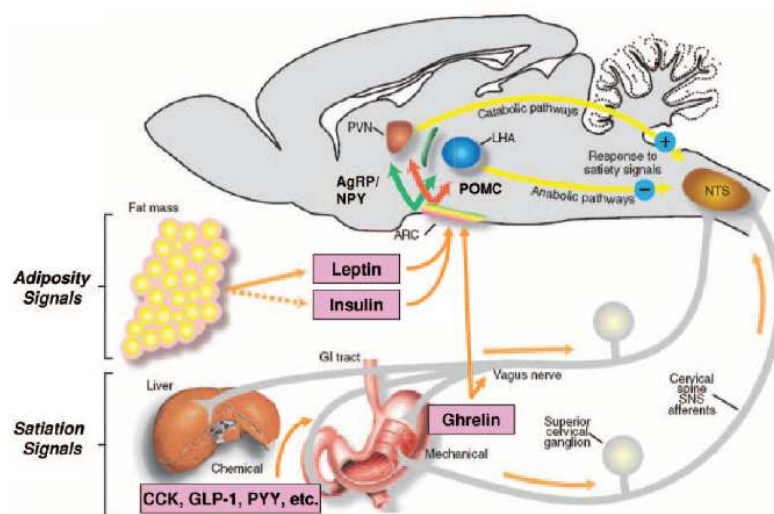


Fig. 2. Distintos niveles de control de la homeostasis energética. Figura adaptada (Woods & D'Alessio, Central control of body weight and appetite , 2008). *Con permiso de J Clin Endocrinol Metab.*

2.1 REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

2.1.1 Regulación central: hipotálamo

La búsqueda para entender el papel que juega el cerebro en el control del balance energético corporal ha continuado durante más de un siglo, desde que se observó una ganancia rápida de peso corporal en pacientes con tumores neuroendocrinos. Las observaciones iniciales de Mohr en 1840 (Mohr, 1840) y Frohlich en 1901 (Frohlich, 1901) respecto a los adenomas hipofisarios llevaron a la hipótesis de que la obesidad relacionada con adenoma estaba causada por daños en el hipotálamo.

Ya hace 100 años que se describía la obesidad en pacientes con tumores hipotalámicos (Brobeck, 1946), pero por esa época se pensaba que la hipófisis regulaba la mayoría de las funciones endocrinas y que las alteraciones en esta glándula conducían a desordenes metabólicos (Abizaid & TL., 2008). En la actualidad se sabe que no es la única responsable. El uso de tecnologías cada vez más sofisticadas han dado lugar a la clonación del gen de la obesidad *ob*, (leptina), observando que la mutación de este gen causaba obesidad en roedores (Zhang, et al., 1994) lo que provocó una ola de descubrimientos de otras hormonas metabólicas, neuropéptidos y vías de señalización, y ha establecido su relación con las estructuras neuronales clave en el hipotálamo (Friedman & Halaas, 1998) (Elmqvist, Elias, & Saper, 1999) (Gao & Horvath, 2008).

Desde los años 1940, se ha puesto en relieve la importancia del hipotálamo en la regulación del peso corporal y pronto se identificaron los primeros núcleos en el hipotálamo medio basal como reguladores clave de la ingesta y del peso corporal, así como de la homeostasis energética y de la glucosa (Williams, Scott, & Elmqvist, 2011) demostrando además que estas neuronas actúan como nexo fundamental en la jerarquía neuronal que controla el balance de energía del cuerpo. Actualmente, se conoce que el hipotálamo juega un papel crítico en la regulación del balance. Varios experimentos sobre la neurobiología de la obesidad establecieron el hipotálamo medio basal como nexo fundamental en la jerarquía neuronal que controla el balance de energía del cuerpo. Actualmente, se conoce que el hipotálamo juega un papel crítico en la regulación del balance energético.

La confirmación de la importancia del hipotálamo para la regulación de la ingesta y del balance energético se obtuvo del estudio con animales usando lesiones cerebrales de estructuras hipotalámicas (Hetherington & Ranson, 1942) (Hetherington & Ranson, 1940). Se realizaron distintos experimentos donde se lesionaron en distintos grupos de rata varios núcleos hipotalámicos que incluyen VMH, PVH y DMH. Las lesiones de estos núcleos inducían hiperfagia y obesidad (Brobeck, 1946), mientras que las lesiones en el hipotálamo lateral conducía a hipofagia (Anand & Brobeck, 1951). Este estudio, llevó a la propuesta de un modelo de “centro dual” que identifica el VMH como “centro de saciedad” y el LH como “centro del hambre (Stellar, 1954) (Bray, Fisler, & York, 1990). Posteriores estudios con lesiones químicas, o como las aplicaciones farmacológicas de varias drogas y hormonas o bien la estimulación o inhibición local de poblaciones de neuronas, soportan

las observaciones iniciales que conducen al modelo de “centro dual” (Gao & Horvath, 2008). Esta hipótesis de centro dual ha dominado el terreno durante varias décadas hasta que un número de estudios comenzaron a llevar datos que mostraban que ni el VMH ni las estructuras adyacentes eran únicamente centros de saciedad, ni que el hipotálamo lateral mantenía únicamente el apetito (Valenstein & Mittleman, 1984) (Abizaid & TL., 2008).

No solo el trabajo con lesiones en animales, sino también las evidencias obtenidas de las descripciones clínicas en pacientes con tumores mostraron que un daño grave en las áreas hipotalámicas medio basales, en particular el núcleo hipotalámico ventromedial, estaba claramente asociado con un incremento de la ingesta, obesidad mórbida y resistencia a la insulina, mientras que un daño en estructuras hipotalámicas más laterales se asociaban con anorexia y adipsia (falta de sed) (Anand & Brobeck, 1951). Además, la estimulación eléctrica del VMH daba lugar a un descenso en la alimentación, mientras que la estimulación de la región hipotalámica lateral incrementaba el apetito (Valenstein & Mittleman, 1984) (Abizaid & TL., 2008). Estos datos sugerían que el hipotálamo medio basal era un centro saciador y que el hipotálamo lateral era un centro orexigénico (Elmqvist, Elias, & Saper, 1999).

La noción de “centros” específicos del cerebro que controlan la ingesta de alimentos y el peso corporal se ha sustituido por el de vías neuronales discretas que generan respuestas integradas a entradas aferentes relacionadas con el cambio en almacenamiento del combustible corporal (Woods, Seeley, Porte, & Schwartz, 1998) (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000).

El hipotálamo está estrechamente relacionado con el sistema endocrino, debido a su relación íntima con la hipófisis, que se encuentra justo debajo del suelo del hipotálamo. La hipófisis en sí es divisible en dos regiones principales: la más posterior, es la neurohipófisis o *pars nervosa*, y la más anterior, es la adenohipófisis (glandular). La hipófisis sirve como enlace entre el hipotálamo y el sistema endocrino lo que permite a neuropéptidos y monoaminas producidos en el hipotálamo afectar a los diversos tejidos diana. Anatómicamente el hipotálamo se divide en tres grandes dominios, las regiones posteriores, tuberal y anterior. Cada una de estas tres regiones se subdivide en las áreas medial y lateral. Los distintos núcleos del hipotálamo constituyen los dominios funcionales del hipotálamo en varias áreas. Los núcleos hipotalámicos conocidos incluyen el núcleo arcuato (ARC o ARQ), el núcleo paraventricular (PVN), el área hipotalámica lateral (LHA), el núcleo dorsomedial (DMN) y el núcleo ventromedial (VMN) (figura 3). Estas regiones hipotalámicas contienen poblaciones de neuronas que se proyectan a diferentes subconjuntos de neuronas preganglionares para general distintos patrones de respuesta autónoma de acuerdo a estímulos específicos.

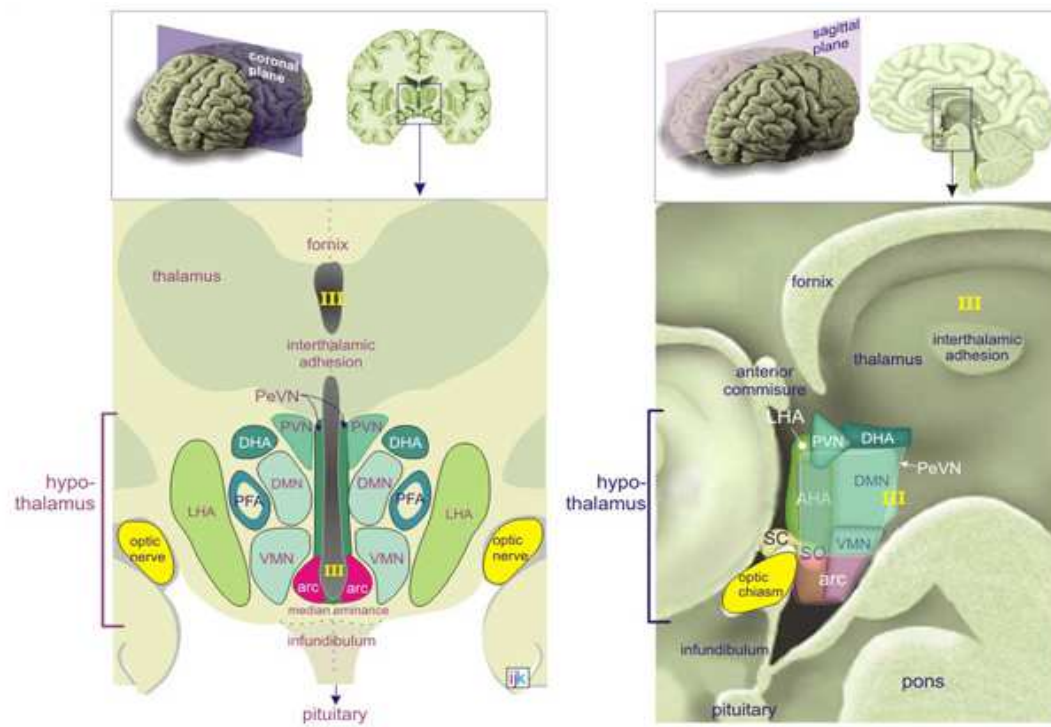


Fig. 3. Localización anatómica de los núcleos hipotalámicos en un corte coronal (izquierda) y sagital (derecha) de cerebro humano. Imagen adaptada. (Peyron, et al., 2000). Con permiso de Nature medicine.

NUCLEOS HIPOTALÁMICOS

Los núcleos principales del hipotálamo que están implicados en la alimentación y la saciedad son el núcleo arcuato del hipotálamo, el núcleo del hipotálamo dorsomedial, el núcleo ventromedial del hipotálamo y el núcleo paraventricular.

Núcleo Arcuato (ARC)

El ARC participa en el control de la conducta alimenticia, así como la secreción de varias hormonas de la hipófisis.

Se sitúa cerca del tercer ventrículo y por encima de la eminencia media. Esta área del núcleo arcuato-eminencia media es un área en donde la barrera hematoencefálica se encuentra modificada, permitiendo la entrada de péptidos periféricos y proteínas (Schwartz, et al., 1991). El ARC contiene grupos de neuronas que expresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado a agouti (AgRP), que son péptidos que aumentan la ingesta (orexigénicos) y contiene también al precursor de melanocortinas

proopiomelanocortinas (POMC) y transcrito relacionado con cocaína-anfetamina (CART), los cuales son péptidos anorexigénicos. Los axones de estas neuronas se proyectan a neuronas de segundo orden, localizadas principalmente en el núcleo paraventricular (PVN) donde se secretan las hormonas anorexigénicas, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina.

Cuando las señales de adiposidad (insulina y leptina) llegan al ARC, los péptidos anorexigénicos se liberan y activan circuitos catabólicos. Al contrario la activación de vías anabólicas lleva a la liberación de péptidos orexigénicos y ocurre cuando las señales de adiposidad que llegan al cerebro son bajas, indicando la necesidad de restablecer los almacenamientos de energía. Todas estas características le permiten al ARC integrar señales hormonales para la homeostasis energética.

Núcleo paraventricular (PVN)

Se encuentra adyacente a la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. En él convergen numerosas vías neuronales implicadas en el balance energético, incluyendo proyecciones de neuronas NPY del ARC, orexinas y derivados del péptido POMC. Todo esto, hace que el PVN desempeñe un papel importante en la integración de señales nutricionales con la glándula tiroidea y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Neary, Goldstone, & Bloom, 2004).

El PVN es muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta como colecistocinina (CCK), NPY o ghrelina. Estos péptidos pueden actuar mediante la proteína quinasa sensible a AMP (AMPK). Estas proyecciones desde otros núcleos, así como la de los péptidos periféricos, pueden regular la actividad de diferentes neuronas integrando señales nutricionales con el eje hipofisario y tiroideo.

Núcleo ventromedial hipotalámico (VMH)

Es ampliamente conocido como el centro de la saciedad. Ha sido identificado como un sitio diana de la leptina, la cual actúa en el hipotálamo inhibiendo la ingesta de alimentos, estimulando el gasto energético y por lo tanto causando la pérdida de peso.

Los primeros experimentos con lesiones que afectan en el hipotálamo demostraron que el área hipotalámica lateral es responsable de la transmisión de señales orexigénicas y la pérdida de esta región produce inanición. Los núcleos hipotalámicos mediales (VMH y en menor medida, DMH) son los responsables de las sensaciones de saciedad y las lesiones en estas regiones del hipotálamo resultan en hiperfagia y obesidad. Estos núcleos son responsables de la integración y el procesamiento de las señales periféricas y centrales de la homeostasis energética, y de inducir los cambios en el comportamiento alimentario y/o gasto energético requerido para mantener la homeostasis energética (Kalra, et al., 1999).

El VMH puede aumentar directamente la actividad de las neuronas POMC mediante microcircuitos, estimulando su actividad excepto en estado de ayuno en el que disminuye, además de proyectar hacia otros núcleos hipotalámicos y al tronco cerebral.

La importancia del VMH en la regulación de la homeostasis energética ha sido demostrada por estudios en los que se describe la existencia de receptores de leptina (ObRb) y activación neuronal inducida por leptina: inyecciones selectivas de leptina en el VMH reducen la ingesta y el peso corporal en ratas (Irani, Le, Dunn-Meynell, & Levin, 2008).

El VMH fue el primer sitio hipotalámico que se identificó como importante en la termorregulación por BAT. La estimulación eléctrica de VMH aumentaba la temperatura interescapular de BAT, un efecto que fue suprimido por el bloqueo β -adrenérgico (Seoane-Collazo, et al., 2015). Varios estudios (Seoane-Collazo, et al., 2015) observaron un papel clave de proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el VMH, como un regulador negativo de la activación de BAT a través del SNS, integrando diversas señales periféricas como hormonas tiroideas (THs), estradiol (E2), leptina y proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B), y fármacos tales como nicotina y liraglutide (Seoane-Collazo, et al., 2015).

Núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH)

El DMH participa en la estimulación de la actividad gastrointestinal.

Este núcleo tiene extensas conexiones con otros núcleos hipotalámicos mediales y laterales y sirve como integrador y procesador de información de esos núcleos. El núcleo DMH está relacionado con la modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño-vigilia, ritmo circadiano y actividad locomotora (Elmqvist, Elias, & Saper, 1999).

Área hipotalámica lateral (LHA)

Esta zona cerebral contiene neuronas sensibles a la glucosa que son estimuladas por la hipoglicemia y es crucial en mediar la marcada hiperfagia inducida por la disminución de la glucemia (Bernardis & Bellinger, 1996). En él se sintetizan dos tipos de péptidos: hipocretinas (orexinas) y MCH. Se caracterizan por emitir proyecciones a un amplio número de zonas del SNC (córtex, tálamo o sistema límbico) participando en numerosas funciones tales como aprendizaje, memoria, emoción, y respuestas motoras en función del estado energético ya que están reguladas por numerosas hormonas, entre ellas, ghrelina y leptina.

Los núcleos hipotalámicos se comunican unos con otros y con otras partes del cerebro mediante la liberación de neuropéptidos específicos. Existen numerosas fibras que discurren longitudinalmente atravesando el área hipotalámica lateral.

En general, las fibras cortas intrahipotalámicas establecen un alto grado de cooperación entre los núcleos hipotalámicos. En particular, existen numerosas conexiones recíprocas entre el núcleo medial y núcleo del área lateral del hipotálamo. Las conexiones directas e indirectas a las neuronas simpáticas y parasimpáticas preganglionares explican los efectos del hipotálamo en los órganos inervados por el sistema nervioso autónomo. Además, el hipotálamo actúa sobre los órganos endocrinos mediante el control de la hipófisis anterior. En consecuencia, las enfermedades o lesiones del hipotálamo pueden perturbar las funciones controladas por el sistema endocrino, como las funciones sexuales, el crecimiento y el metabolismo (Brodal, 2010).

El modelo de melanocortina ha tenido mucha importancia en la explicación del control neuronal del balance energético. En este modelo, el núcleo arcuato es considerado una región crítica. Las neuronas dentro del arcuato están anatómicamente colocadas próximas a capilares fenestrados en la base del hipotálamo, dándoles acceso a señales humorales que están restringidas en otras regiones del cerebro (Cone, et al., 2001) (Gao & Horvath, 2008).

En realidad, estas neuronas responden rápidamente a fluctuaciones en nutrientes (Schwartz & Porte, 2005) y en hormonas metabólicas. Estas neuronas son también inervadas por axones que contienen los principales neurotransmisores y expresan receptores para la mayoría de hormonas metabólicas (Kalra, et al., 1999) (Van den Pol, 2003), lo que implica que existe un extenso control neuronal. Finalmente, proyectan ampliamente al cerebro y periféricamente tanto directa como indirectamente.

La regulación de las rutas hipotalámicas está influenciada por señales que llevan la información sobre los estados metabólicos y nutricionales. Existen hormonas como la leptina, ghrelina y la insulina que informan de la disponibilidad de nutrientes al hipotálamo. Estas hormonas, segregadas en proporción a las reservas energéticas corporales y/o estado nutricional, regulan el balance energético teniendo en cuenta el gasto de energía y. En el núcleo hipotalámico arcuato predomina la integración de estas señales periféricas transmitidas por la sangre. Considerando la implicación de las neuronas del Arcuato en la regulación del balance energético, adquieren gran importancia las neuronas que producen tanto neuropéptido Y (NPY) como péptido derivado agouti (AgRP) y las neuronas que contienen péptido derivado proopiomelanocortina (POMC), debido a que estas neuronas responden directamente a leptina, ghrelina e insulina (Williams & Elmquist, 2012). Cada una de estas poblaciones neuronales proporciona proyecciones superpuestas a otras partes clave del hipotálamo, incluyendo el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo dorsomedial, y el área hipotalámica lateral, ejerciendo efectos opuestos sobre el gasto energético y la alimentación. Las hormonas parecen ejercer efectos estructurales importantes durante el desarrollo hipotalámico (Bouret S. , 2013).

2.1.2 Regulación periférica de la homeostasis: Tracto gastrointestinal, hígado y tejido adiposo

2.1.2.1 EL TRACTO GASTROINTESTINAL

En un principio se pensó que el control del apetito era un proceso regulado exclusivamente en el sistema nervioso central. Con el tiempo, se determinó que en él también participaban señales periféricas. Así, se demostró la importancia de la leptina y el tejido adiposo en lo que se conoce como regulación a largo plazo, la influencia del eje adrenal en la ingestión de alimentos o la importancia de señales procedentes del páncreas o del tracto gastrointestinal en la regulación de la ingesta a corto plazo (Zhang, et al., 1994). Estas señales periféricas llegan al sistema nervioso central por vía neuronal (a través del nervio vago) o por vía humoral (como secreciones endocrinas que se vierten al torrente sanguíneo) (Crespo, et al., 2009).

Desde que Starling y Bayliss (1902) identificaron la secretina como molécula encargada de las secreciones pancreáticas, sabemos que el tracto gastrointestinal (GI) no sólo es un sistema donde se almacenan y se procesan los alimentos, sino que también es determinante en su propia regulación, en el control de la ingesta y en el balance energético. Sin embargo, no ha sido hasta tiempos más recientes cuando se han identificado las señales que participan en esta regulación. Existen numerosos péptidos que son liberados desde el estómago o el intestino y participan en las sensaciones de saciedad o de hambre, que por vía neuronal o humoral van a originar la activación de diferentes regiones cerebrales, induciendo la ingesta o su cese. Se establece así una conexión recíproca entre cerebro y tracto GI. Estos péptidos de origen GI son en su mayoría señales de saciedad, y su descubrimiento ha supuesto un enorme avance científico en el campo del desarrollo de fármacos antiobesidad (Crespo, et al., 2009).

La mayoría de las hormonas de origen gastrointestinal que intervienen en el control de la ingestión de alimentos son hormonas anorexigénicas como colecistoquinina (CCK), péptido tirosina-tirosina (PYY), polipéptido pancreático (PP), polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP), etc. También se liberan hormonas orexigénicas, destacando la ghrelina. La mayor parte de la ghrelina circulante procede de células de las glándulas del fundus del estómago, aunque en menor medida se sintetiza también a lo largo del intestino, en ciertas regiones del sistema nervioso central o en tejidos periféricos como páncreas, riñones, etc. (Van der Lely, Tschöp, Heiman, & Ghigo, 2004) (Crespo, et al., 2009).

Este sistema regulador del tracto gastrointestinal puede estar bloqueado por ingesta excesiva de nutrientes y/o polimorfismos genéticos y alteraciones. Por ejemplo, los animales DIO muestran alteración de la señalización entérica de glucosa. Esta alteración tiene lugar en la transmisión de las señales del sensor entérico de glucosa hacia el hipotálamo o en la transmisión de señales desde el hipotálamo a los tejidos periféricos (Knauf, et al., 2008).

2.1.2.2 EL HÍGADO Y SU FUNCIÓN EN EL METABOLISMO

Por su situación estratégica en el cuerpo el hígado es el primer órgano que recibe los nutrientes absorbidos del tracto intestinal a través de la circulación portal y realiza una gran variedad de funciones metabólicas de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis. Entre las funciones metabólicas del hígado encontramos el procesamiento y la redistribución de la glucosa y los ácidos grasos, principales combustibles metabólicos del cuerpo. Además posee una maquinaria enzimática para la modificación y detoxificación de compuestos absorbidos desde el tracto gastrointestinal. No sorprende por lo tanto que las lesiones hepáticas, agudas o crónicas puedan alterar su capacidad biosintética y metabólica, produciendo diversos trastornos clínicos (Gonzales de Buitrago & Arilla, 2000).

La principal función del hígado es suministrar una fuente continua de energía para el cuerpo. Esta función está estrictamente regulada por una serie de factores hormonales y neurales, que permiten modificar el flujo de combustible de acuerdo a las necesidades del momento. Es así como en condición absorptiva, gran parte de los nutrientes que llegan por la circulación portal, son metabolizados, distribuidos al resto de órganos o tejidos o almacenados como sustancias de reservas para ser movilizados posteriormente en condición post absorptiva cuando se cesa la absorción de nutrientes desde el intestino delgado (Gonzales de Buitrago & Arilla, 2000).

Las funciones básicas del hígado se pueden resumir en: detoxificación de la sangre y eliminación de fármacos y de hormonas, como la tiroxina y las hormonas esteroideas; síntesis de ácidos biliares y excreción de pigmentos biliares; metabolismo proteico, lipídico y de hidratos de carbono; almacenamiento de vitaminas y de hierro, en forma de ferritina y producción de factores de coagulación, como el fibrinógeno o la protrombina (Guyton & Hall, 2006).

Casi todas las células del organismo metabolizan los lípidos pero algunos aspectos fundamentales del metabolismo de los lípidos tienen lugar en el hígado. Las funciones concretas del hígado en el metabolismo de los lípidos son: β -oxidación de los ácidos grasos para aportar energía a otros tejidos corporales como el músculo esquelético y el corazón; formación de la mayor parte de las lipoproteínas; biosíntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos; síntesis de grasas a partir de proteínas y de hidratos de carbono. De todas estas funciones, la β -oxidación hepática de los ácidos grasos puede considerarse entre las más importantes, debido a su importancia para la gluconeogénesis hepática a partir del ATP que se genera en este proceso (Guyton & Hall, 2006).

El organismo no puede prescindir de los servicios del hígado en el metabolismo de las proteínas durante más de unos días sin consecuencias muy graves e incluso mortales, al contrario de lo que ocurre con en el metabolismo glucídico y lipídico. Las funciones más importantes del hígado en el metabolismo proteico son: desaminación de los aminoácidos; síntesis de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales;

síntesis de proteínas plasmáticas; interconversión de los distintos aminoácidos y síntesis de otros compuestos a partir de los aminoácidos (Guyton & Hall, 2006).

En el metabolismo de los hidratos de carbono, el hígado realiza funciones tales como: almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno; conversión de galactosa y fructosa en glucosa; gluconeogénesis; síntesis de compuestos químicos importantes a partir de los intermediarios del metabolismo de los hidratos de carbono (Guyton & Hall, 2006).

La regulación de la concentración de glucosa en la sangre es uno de los procesos más controlados por el cuerpo. Esta sustancia es el principal combustible del cerebro, los eritrocitos y la médula suprarrenal. En la homeostasis de la glucosa el hígado, ocupa un papel central por su capacidad para almacenarla como glucógeno (glucogenogénesis hepática), y para producirla a partir del glucógeno almacenado, (glucogenólisis), o sintetizarla por gluconeogénesis, a partir de precursores no glucídicos, en condiciones de ayuno o ejercicio. Los sustratos para la gluconeogénesis hepática son el lactato obtenido de la oxidación incompleta de la glucosa en las células anaerobias, los aminoácidos glucogénicos provenientes de la proteólisis muscular, activada por cortisol, y el glicerol obtenido de las grasas almacenadas en el tejido adiposo, previa activación mediante fosforilación de la lipasa sensible a hormonas por acción de las hormonas hipoglucemiantes. El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, resulta de las interrelaciones de varias vías del metabolismo de la glucosa, estrictamente reguladas por múltiples señales, que previenen el funcionamiento al mismo tiempo de vías antagónicas (Gonzales de Buitrago & Arilla, 2000).

La glucosa liberada por el hígado puede provenir de dos fuentes diferentes: de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis (figura 4) a partir de precursores no glucídicos. La glucogenólisis ocurre en el citosol de todas las células mientras que la gluconeogénesis tiene lugar, exclusivamente en el hígado y la corteza renal, los dos únicos tejidos que poseen la maquinaria enzimática necesaria para este proceso. Sin embargo, se ha demostrado que la enzima glucosa-6-fosfatasa también está presente en el intestino delgado, lo que hace de este tejido un tercer sitio gluconeogénico posible (Croset, et al., 2001).

Las vías metabólicas de la glucólisis (figura 4) y de la gluconeogénesis constituyen redes enzimáticas complejas que no pueden disociarse porque poseen varias etapas comunes reversibles próximas al equilibrio. La orientación del flujo metabólico entre la glucólisis y la gluconeogénesis depende de las enzimas que constituyen las etapas claves del control de la vía, ya que catalizan reacciones opuestas y alejadas del equilibrio termodinámico. Además, los intermediarios de la gluconeogénesis/glucólisis son comunes con otras vías metabólicas distintas y algunas de las enzimas claves se localizan también en compartimentos intracelulares distintos (retículo endoplásmico, núcleo, mitocondria) con propiedades y/o regulaciones muy particulares. Además, en el hígado existen diferentes zonas metabólicas, de modo que la distribución cuantitativa de las enzimas de las dos vías varía según la localización proximal o distal de las células a lo largo del eje vascular hepático (Jungermann & Kietzmann, 1996).

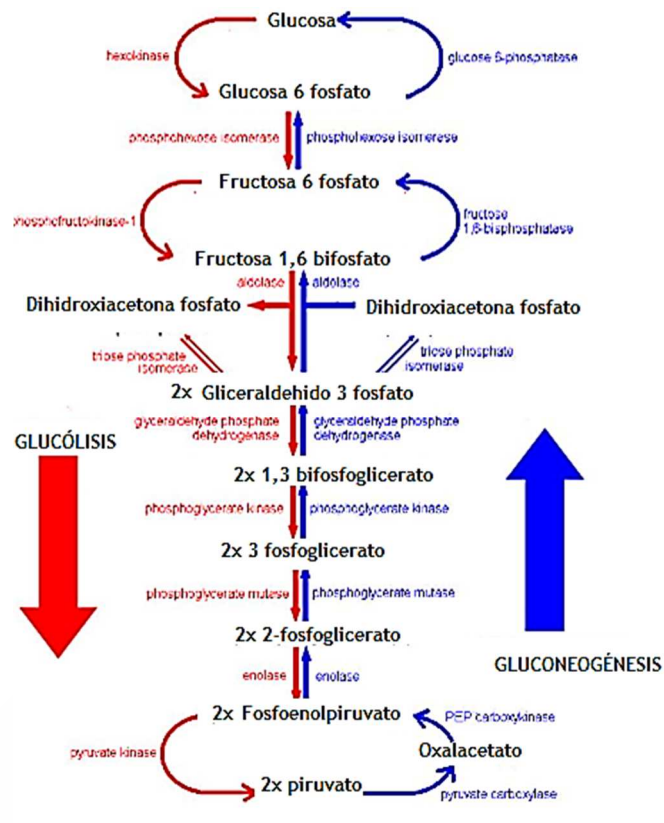


Fig. 4. Gluconeogénesis y glucólisis. Imagen de acceso libre

La gluconeogénesis hepática se controla por: el suministro y la disponibilidad de sustratos formadores de glucosa, por la glucosa que es su producto final, por el estado hormonal del organismo y finalmente, por el estado energético celular.

En términos de fisiología integrada, la regulación transcripcional constituye una parte crucial del control de la glucólisis y de la gluconeogénesis. El estado nutricional del organismo así como algunas hormonas (la insulina, el glucagón o los glucocorticoides) producen una modificación significativa del contenido hepático en enzimas glucolíticas y gluconeogénicas a largo plazo, mediante modificaciones postranscripcionales.

Actualmente se asume que un período de ayuno prolongado induce la expresión de las principales enzimas de la gluconeogénesis (PEPCK, piruvato carboxilasa y Glucosa-6-fosfatasa) y disminuye aquella de las enzimas glucolíticas (glucoquinasa, fosfofructoquinasa-2 y piruvato quinasa) (Pilkis & Granner, 1992).

Por último, la insulina y el glucagón ejercen efectos antagónicos sobre el nivel de expresión de algunos genes: la insulina induce la expresión de la piruvato quinasa y de la glucoquinasa y reprime la de la PEPCK y la de la Glucosa-6-fosfatasa (Barthel & Schmol, 2003), mientras que el glucagón y el AMPc funcionan de forma opuesta a la insulina disminuyendo la expresión de la piruvato quinasa y de la glucoquinasa y sobreexpresando la Glucosa-6-fosfatasa (Nordlie, Foster, & Lange, 1999).

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK o PCK1, específica de hígado) cataliza la reacción exergónica que lleva a la síntesis del fosfoenolpiruvato a partir del oxalacetato

y del GTP. Se considera generalmente como la segunda enzima de la gluconeogénesis. Esta enzima está distribuida de manera relativamente equiparable entre el compartimento citosólico y el mitocondrial en el hombre, mientras que su localización en la rata es mayoritariamente citosólica (Lardy & Hughes, 1984).

2.1.2.3 EL TEJIDO ADIPOSO COMO ÓRGANO ENDOCRINO

Inicialmente, el tejido adiposo se había considerado como un compartimento de almacenaje inerte para triglicéridos, cuya visión ha cambiado con el trabajo pionero de los laboratorios Spiegelman and Flier (Cook, et al., 1987) a mediados de 1980s donde por primera vez se ha visto que los adipocitos son una fuente abundante de una proteína de secreción específica llamada adiposina o factor de complemento D. En 1994, el grupo de Jeffrey Friedman (Zhang, et al., 1994) identificó la leptina como un factor celular específicamente secretado, deficiente en ratones ob/ob que media el eje hormonal entre la grasa y el cerebro (Scherer, 2006). Los adipocitos, no sólo desempeñan un papel crucial en la regulación de la síntesis y degradación de los triglicéridos, sino que sintetizan una serie de hormonas y factores diversos que van desde la leptina, hormona reguladora de la ingesta, a la adiponectina, una hormona que aumenta la sensibilidad a la insulina, pasando por factores implicados en la hemodinámica vascular y citoquinas como el TNF- α y la IL-1. Alteraciones en la expresión de los genes que codifican para estos péptidos pueden estar, asimismo, implicados en la génesis de algunos tipos de obesidad.

De las diversas proteínas secretadas por el adipocito, la leptina es una de las más importantes, ya que a través de esta hormona el tejido adiposo blanco se comunica con el sistema nervioso central y participa en la regulación neuroendocrina de la homeostasis energética. El descubrimiento de la leptina supuso el poder el focalizar la atención en el papel de las proteínas secretas por el tejido adiposo. La leptina tiene efectos en el balance energético y en el apetito y está también implicada en la regulación de la función neuroendocrina e inmune (Ahima & Flier, 2000). Es una hormona segregada principalmente por los adipocitos que juega un papel importante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos centrales sobre el apetito y periféricos sobre el gasto energético (Havel, 1999). Los niveles de leptina circulantes están directamente relacionados con la adiposidad, pero ésta no es el único factor determinante de los niveles de leptina. Por ejemplo, la concentración de leptina circulante disminuye en condiciones de ayuno o restricción calórica y aumenta en relación al aumento de adiposidad.

La obesidad, resultado de un incremento de la masa grasa, con aumento en el tamaño y número de células adiposas, se caracteriza también por incremento en la expresión génica de citocinas, hormonas, factores de crecimiento y otras moléculas. Estos cambios en la función endocrina del tejido adiposo, subsecuentemente promueven alteraciones locales y sistémicas que conducen a las patologías asociadas con el incremento en la masa grasa. Aunque la red de vías neuroendocrinas que regulan la homeostasis energética no se conoce del todo, lo que ahora se sabe nos permite vislumbrar la diversidad de funciones en las que participa la célula adiposa.

2.1.2.4 ESTRÓGENOS EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Los receptores de estrógeno en la regulación metabólica

Datos recientes demuestran que machos y hembras difieren en la regulación del peso corporal y la homeostasis a nivel del SNC (Clegg, Benoit, Barrera, & Woods, 2003) (Clegg, Brown, Woods, & Benoit, 2006). Tanto la testosterona como los estrógenos influyen en el metabolismo, la homeostasis energética, la ingesta de alimentos y la distribución de la grasa corporal, en parte a través de receptores hormonales colocalizados con neuropéptidos inducidos por el hambre (orexigénicos) y por la saciedad (anorexigénicos) dentro del hipotálamo.

El receptor de estrógenos (ER) nuclear clásico fue clonado en 1985 (Green, et al., 1986) y renombrado como receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$ / ESR1) cuando se descubrió un segundo receptor de estrógeno nuclear (receptor de estrógeno β ($ER\beta$ / ESR2) 10 años después (Kuiper, Enmark, Pelto-Huikko, Nilsson, & Gustafsson, 1996). Los subtipos de ER se expresan diferencialmente en el cerebro (Kuiper, Enmark, Pelto-Huikko, Nilsson, & Gustafsson, 1996) (Merchenthaler, Lane, Numan, & Dellovade, 2004) y en muchos casos su distribución difiere según el sexo. ESR1 media los efectos anti-obesidad de los estrógenos; la delección del receptor aumenta la adiposidad y causa el síndrome metabólico en ratones tanto machos como hembras (Heine, Taylor, Iwamoto, Lubahn, & Cooke, 2000). ESR2 es menos eficaz en este sentido; su delección no promueve la obesidad ni ninguna de las consecuencias metabólicas asociadas con la obesidad (Ohlsson, et al., 2000).

Posteriormente, varios estudios (Musatov, et al., 2007) han observado que la silenciación específica de ESR1 en el núcleo ventromedial disminuía la sensibilidad a la pérdida de peso inducida por 17 β -estradiol (estrógeno activo), así como la disminución del gasto energético y el aumento de la deposición de la grasa visceral, implicando al receptor ESR1 del núcleo hipotalámico VMH en la homeostasis energética (Musatov, et al., 2007). Más recientemente, la supresión de la expresión de ESR1 en neuronas del VMH usando el promotor del factor esteroideogénico-1 (SF1) en un modelo de ratón transgénico, produjo resultados similares. En este modelo, el peso corporal aumentó significativamente en hembras pero no en ratones transgénicos machos. En particular, los ratones hembra transgénicos ganaron una cantidad significativa de tejido adiposo visceral perigonal y manifestaban una termogénesis desregulada, probablemente un efecto de la reducción de la actividad simpática a nivel del tejido adiposo pardo (Musatov, et al., 2007). Estos hallazgos muestran que la actividad de ESR1, específicamente en el VMH, es fundamental para la regulación del gasto energético en las hembras.

Además de estas acciones, los estrógenos ejercen su acción actuando junto con otras moléculas orgánicas. Los estrógenos interactúan con la leptina: Los estrógenos pueden promover la acción catabólica de la leptina en el cerebro. Los niveles más altos de estrógenos se han asociado con una mayor sensibilidad a la leptina (Clegg, Riedy, Smith, Benoit, & Woods, 2003) (Clegg, et al., 2003).

Los estrógenos influyen en la sensibilidad a la insulina. La manipulación de los niveles de esteroides gonadales influye en la sensibilidad a la insulina (Clegg, Benoit, Barrera, & Woods, 2003) (Clegg, Brown, Woods, & Benoit, 2006), lo que sugiere que la cantidad relativa de andrógenos y E2 son determinantes clave de la sensibilidad del cerebro a las acciones catabólicas de la insulina. Cuando hay proporcionalmente menos estrógeno, la sensibilidad a la insulina en el CNS aumenta.

2.1.3 EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO: conexión entre central y periferia

El sistema nervioso autónomo (SNA) regula y coordina las funciones que son involuntarias, inconscientes y automáticas (Marino, Xu, & Hill, 2011).

Los centros superiores del Sistema Nervioso Autónomo se localizan en la zona lateral gris de la médula espinal, en el bulbo raquídeo y en el hipotálamo, y de ellos surgen nervios que llegan hasta los distintos órganos. Se divide en dos sistemas: el simpático y el parasimpático. Las funciones de uno y otro son antagónicas, logrando así un balance funcional que tiende a mantener la homeostasis corporal.

Este sistema se encarga de conectar las neuronas del SNC con el resto de sistemas corporales y órganos. Las conexiones con los diferentes órganos diana de este sistema son tanto motores como sensitivos, habiendo tanto aferencias como eferencias. Se trata pues de un sistema que envía información desde zonas concretas del encéfalo hasta los órganos, provocando en ellos una reacción o actuación específica mientras que a la vez recapta información sobre su estado la envía el encéfalo, donde podrá ser procesada y actuar en consecuencia.

Tras recibir la información sobre el estado nutricional mediante nervios aferentes y señales periféricas (nutrientes y hormonas), el hipotálamo manda la respuesta integrada a los órganos periféricos para la modulación de la homeostasis energética. Hay dos formas por las que el hipotálamo se conecta con la periferia: mediante la estimulación del sistema nervioso autónomo y la liberación de hormonas desde la hipófisis. El sistema nervioso autónomo incluye el sistema nervioso simpático (SNS), que promueve de la movilización de combustibles almacenados, y el sistema nervioso parasimpático (PSNS), involucrado en procesos principalmente anabólicos opuestos a los del SNS. El sistema nervioso autónomo desempeña un papel clave en la respuesta a las señales centrales, innervando tejidos metabólicos periféricos incluyendo el tejido adiposo blanco y marrón, hígado, páncreas y músculo esquelético (Marino, Xu, & Hill, 2011). El SNS actúa mediante la transmisión de la noradrenalina (o norepinefrina) que actuará en tejidos que presenten los receptores estimuladores β -adrenérgicos tipo 1, 2 y 3 o sobre los receptores inhibitorios α -adrenérgicos.

2.1.3.1 Inervación autónoma del tejido adiposo blanco

Históricamente, el control de la lipólisis del tejido adiposo blanco, se ha focalizado sobre factores circulantes, principalmente en las catecolaminas secretadas por la glándula adrenal y la inhibición de la lipólisis a la insulina pancreática. Sin embargo, usando modelos de virus trazadores (Bartness, Shrestha, Vaughan, Schwartz, & Song, 2010) se ha demostrado que existe una comunicación nerviosa bidireccional entre el tejido adiposo y el CNS. La comunicación entre el CNS y el tejido adiposo blanco es mediada por el SNS (Bamshad, Aoki, Adkison, Warren, & Bartness, 1998).

El origen de la señal que transmite la información al tejido adiposo, proviene de múltiples regiones centrales, como desde el PVN, ARC en el hipotálamo y desde el NTS y el raphe del tronco encéfalo (Song, Jackson, Harris, Richard, & Bartness, 2005). El tejido adiposo blanco expresa los tres tipos de receptores β -adrenérgicos tipo 1, 2 y 3 y el receptor inhibitorio α 2-adrenérgico. La activación de los receptores β -adrenérgicos en el tejido adiposo estimula la lipólisis, iniciando el proceso de hidrólisis de los triglicéridos almacenados en un proceso catalizado por la forma fosforilada de la hormona sensible a lipasa (HSL) para generar monoacilglicéridos que serán liberados al torrente sanguíneo para ser consumido por los tejidos periféricos (Carpéné, Bousquet-Mélou, Galitzky, Berlan, & Lafontan, 1998).

2.1.3.2 Inervación autónoma del tejido adiposo pardo

Como se ha mencionado anteriormente, el tejido adiposo marrón es el encargado de modular la temperatura corporal y el gasto energético, regulado principalmente desde el VMH ante señales periféricas. Las señales aferentes provocan una respuesta eferente por parte del CNS que se transmiten mediante el SNS al tejido adiposo marrón (Seoane-Collazo, et al., 2015). Gracias al uso de virus de transmisión trans-neural, se ha descrito que el tejido adiposo marrón está conectado al diferentes núcleos hipotalámicos (PVH, VMH y LHA) (Enquist, 2002).

2.1.3.3 Inervación autónoma del hígado

El hígado es un órgano clave en el control del metabolismo de lípidos y glucosa durante la alimentación y el ayuno. Además de hormonas y nutrientes, las aportaciones del sistema nervioso autónomo también participan en afinar la regulación del metabolismo hepático. La inervación eferente hepática está constituida por nervios simpáticos y parasimpáticos. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, el uso de virus trazadores ha permitido determinar la anatomía de esta inervación; los nervios simpáticos del hígado se originan en los ganglios mesentéricos y celiacos, que provienen de la zona intermediolateral de la médula; mientras que los nervios parasimpáticos proviene del núcleo motor dorsal del nervio vago (DMV) localizado en el tronco encéfalo (Berthoud, 2002).

Desde el VMH, descienden proyecciones simpáticas por la médula espinal hasta el ganglio celiaco, y de ahí neuronas post-sinápticas inervan el hígado con la vasculatura aferente (Shimazu, 1996). La estimulación de esta ruta, genera hiperglucemia, por la activación de enzimas clave en la glucogenólisis y en la gluconeogénesis, como en la glucógeno fosforilasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) respectivamente; por otro lado se suprime la glucólisis por la inhibición de la piruvato kinasa (PK) (Uyama, Geerts, & Reynaert, 2004). Las conexiones eferentes del LH están dirigidas a los grupos celulares parasimpáticos del DMV. Desde el DMV nervios post-sinápticos proyectan hacia el hígado, en lo que se denomina la rama hepática del nervio vago (Shimazu, 1996). La estimulación del LH activa rutas de almacenamiento energético en el hígado como la glucogenogénesis, activando la glucógeno sintasa; también se disminuye la gluconeogénesis por la inhibición de la PEPCK y la PK y potencia la sensibilidad a la insulina. Las rutas descendientes desde el PVH hacia el hígado se han descrito vía la médula espinal y por el DMV desde el tronco encefálico (Buijs, et al., 2003). Por lo tanto la ruta desde el PVN involucra ambos sistemas simpáticos y parasimpáticos en la modulación del metabolismo de la glucosa hepática. Usando trazadores para determinar la inervación autónomo-hepática desde el PVN se ha descrito que existen conexiones entre el VMH y el PVN, y desde el ARC hasta el PVN (Buijs, et al., 2003). Por tanto, el PVH integra la información de otros núcleos hipotalámicos y el control autónomo del hígado (Uyama, Geerts, & Reynaert, 2004).

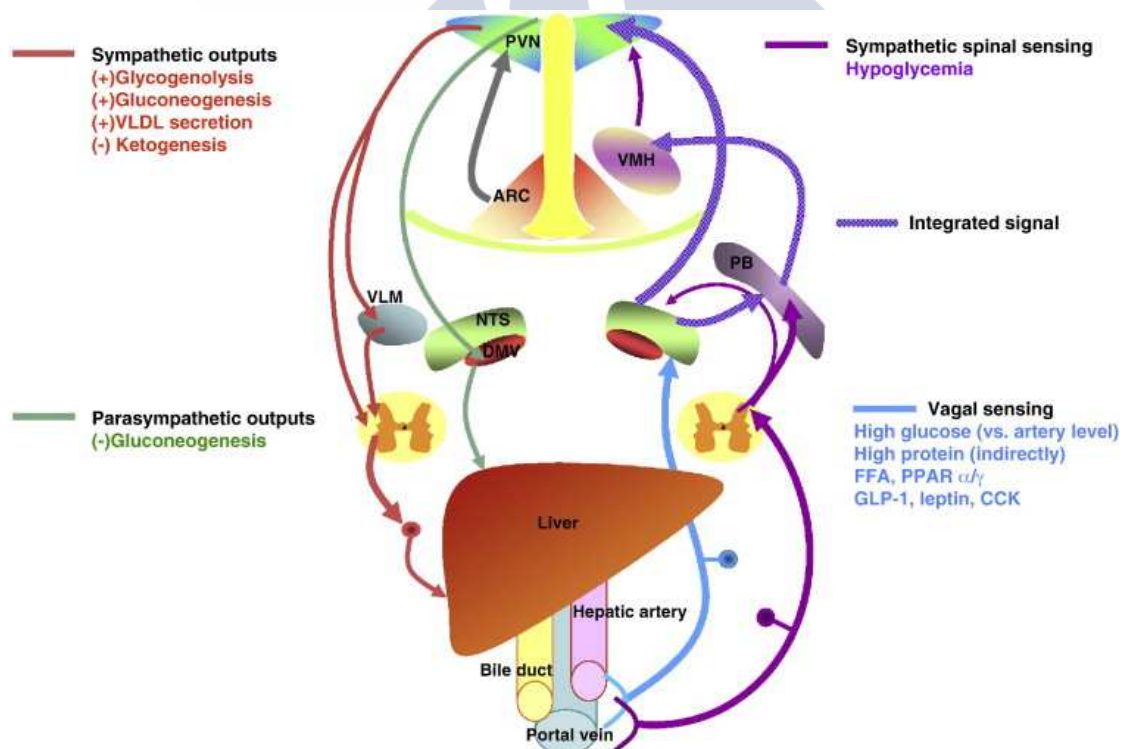


Fig. 5. Inervación en hígado. Imagen adaptada (Yi, E. la Fleur, Fliers, & Kalsbeek, 2010). *Con permiso de Biochim Biophys Acta.*

3. Tejido adiposo

3.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios de las últimas dos décadas han establecido al tejido adiposo como un órgano dinámico que lleva a cabo varios procesos fisiológicos importantes. El tejido adiposo es reconocido como un órgano multifuncional, ya que además de cumplir su función de almacén de los depósitos de grasa, el adipocito maduro es considerado un órgano endocrino y paracrino, que secreta sustancias bioactivas que controlan las funciones de otros órganos, las adipocinas (Welsch, 2009). Estas sustancias bioactivas incluyen ácidos grasos libres, prostaglandinas, hormonas, proteínas involucradas en la regulación del balance energético, el control del hambre y la saciedad, el metabolismo de los lípidos, la sensibilidad a las acciones de la insulina, el sistema alternativo del complemento, la homeostasis vascular, la regulación de la presión arterial y la angiogénesis (Trayhurn & Wood, 2004).

El tejido adiposo se encuentra distribuido en distintas localizaciones en el organismo formando depósitos. El tejido adiposo está formado principalmente por células adiposas o adipocitos que además de almacenar los lípidos, también pueden sintetizarlos a partir de los hidratos de carbono. Pero existen dos tipos fundamentales de adipocitos que van a dar origen a dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo o marrón. Ambos presentan diferencias, no solo en coloración, sino también en morfología, distribución, genes y función. El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos uniloculares, que contienen mitocondrias muy diferentes de las encontradas en el pardo. Estas células producen sustancias como la leptina u otras adipocinas (figura 6), que informan al cerebro del estado nutricional del individuo para regular la ingesta y el gasto energético.

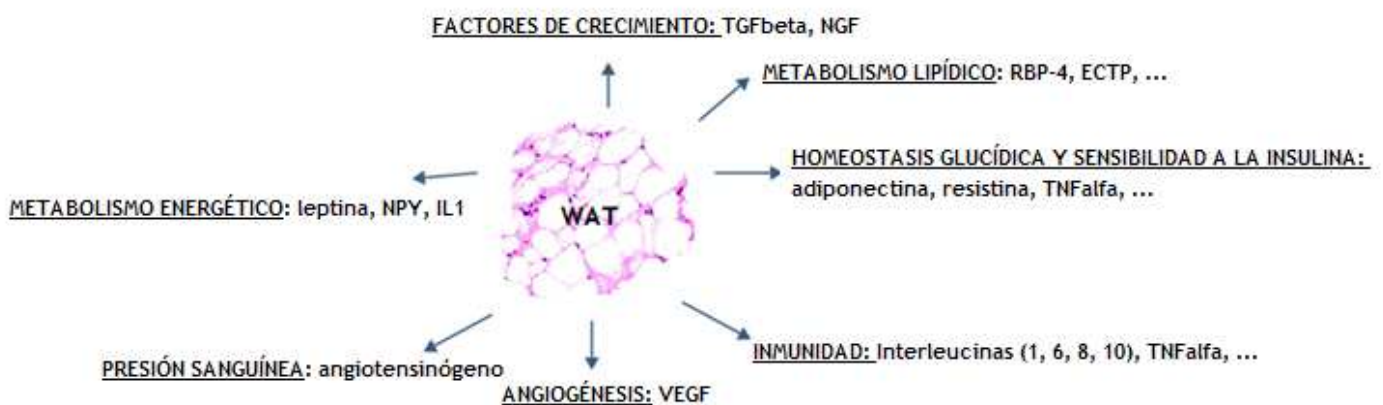


Fig. 6. Adipocinas secretadas por tejido adiposo blanco (WAT). Elaboración propia.

El tejido adiposo pardo posee adipocitos multiloculares con abundantes mitocondrias que expresan altas cantidades de proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual es responsable de

la actividad termogénica de este tejido (Fromme & Klingenspor, 2011) (Boss & Farmer, 2012) (Sarjeant & Stephens, 2012) (Welsch, Sobotta Histología, 2009). Mientras que el tejido adiposo marrón está especializado en la producción de energía, el tejido adiposo blanco está especializado en la captación de ácidos grasos a partir de los quilomicrones y VLDL plasmáticos, en la glicerólísis y lipogénesis a partir de glucosa, en situación postprandial inmediata, y en la lipólisis en situación de ayuno.

La obesidad es caracterizada por una inflamación moderada y el adipocito parece ser el sitio principal de este estado inflamatorio, que lo estimula a producir citoquinas, quimioquinas, proteínas de fase aguda, y factores angiogénicos. Las adipoquinas ejercen una profunda influencia en los fenómenos proinflamatorios y protrombóticos que desencadenan el proceso ateromatoso y la diabetes tipo 2 (Walley, Blakemore, & Froguel, 2006). Mientras que el número de adipocitos se ha visto incrementado (hiperplasia) en obesidad mórbida, la obesidad se atribuye en primer lugar a la hipertrofia de adipocitos que ocurre cuando la síntesis de TAG (esterificación) excede a la rotura de TAG (lipólisis), resultando en un almacenamiento elevado de TAG (Gregoire, Smas, & Sul, 1998). Aunque se ha postulado que el gran tamaño del adipocito puede contribuir a la resistencia a insulina, el mecanismo molecular no está claro (Ahmadian, Duncan, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007).

3.2 FISIOLÓGÍA

3.2.1 Fisiología del Tejido adiposo blanco: WAT (White adipose tissue)

El tejido adiposo blanco, comúnmente llamado "grasa", es un tipo de tejido conectivo laxo compuesto por células llenas de lípidos (adipocitos) rodeadas por una matriz de fibras de colágeno, vasos sanguíneos, fibroblastos y células inmunes. Es un tejido muy bien irrigado por vasos sanguíneos, ya que cada adipocito entra en contacto al menos con un capilar sanguíneo. En ciertas áreas, por ejemplo, las regiones, subcutáneas y mesenterio, el tejido adiposo está organizada en grandes estructuras lobulares. Se encuentra muy difundido por todo el organismo, pero existen variaciones en la cantidad, en función de la edad y el género; por ejemplo en hombres puede almacenarse una gran cantidad en el tejido subcutáneo abdominal mientras que en las mujeres se acumula más en el depósito subcutáneo de glúteos caderas y mamas. Además, el WAT también cumple funciones constructivas mecánicas en localizaciones como la órbita, articulaciones grandes, palmas de manos y pies, donde no se ve afectado, ni se degrada, en periodos de inanición.

Está caracterizado por adipocitos con una única inclusión lipídica y un núcleo colocado excéntricamente. El tejido adiposo proporciona un lugar de almacenaje ilimitado para triglicéridos (Ahima & Flier, 2000) (Welsch, Sobotta Histología, 2009).

Los adipocitos cuentan con un diámetro de en ocasiones más de 100µm y al encontrarse muy juntos con frecuencia adoptan una forma hexagonal. Los orgánulos de adipocitos blancos se someten típicamente a una disposición confinada debido a la presencia de una gota lipídica unilocular que ocupa la mayor parte del citosol. El núcleo

está usualmente comprendido entre la grasa y la membrana plasmática. Hay una escasa distribución de mitocondrias en adipocitos blancos y de otros orgánulos celulares, como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. El color de esta gran gota va del blanco al amarillento dependiente de la cantidad de carotenos presentes en la dieta. Aunque también existen periodos en que pueden presentar más de una inclusión, como durante el desarrollo como tras periodos de inanición, cuando las células restablecen sus depósitos lipídicos (Welsch, 2009).

La formación del tejido adiposo blanco comienza antes del nacimiento. La mayor expansión del mismo tiene lugar rápidamente tras el nacimiento. Pero, el desarrollo es un proceso continuo a lo largo de la vida. Una vez que el tejido adiposo está completamente formado, los adipocitos representan entre uno y dos tercios del mismo. El resto del tejido está constituido por células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos, aunque también aparecen preadipocitos (células intersticiales o vacías de lípidos) células mesenquimales pobremente diferenciadas (poseen pequeñas gotas de lípidos) y células grasas muy pequeñas (Sarjeant & Stephens, 2012).

3.2.2 Fisiología del Tejido adiposo pardo: BAT (Brown adipose tissue)

El tejido adiposo marrón está innervado por el sistema nervioso simpático y bien vascularizado. Los adipocitos marrones son típicamente elipsoides y su tamaño entre 15-50mm. Contiene multiloculares gotas lipídicas. El núcleo de estas células está relativamente centralizado dentro del citoplasma y están presentes todos los orgánulos clásicos (Sarjeant & Stephens, 2012).

Morfológicamente los adipocitos pardos son multiloculares, contienen menos lípidos que los blancos, siendo particularmente ricos en mitocondrias. En humanos, el tejido adiposo pardo rodea el corazón y los grandes vasos durante la infancia, tendiendo a desaparecer con el tiempo, de forma tal que sólo escasas células se pueden encontrar en los reservorios grasos.

En este tejido las células contienen multitud de inclusiones lipídicas y mitocondrias. Su color parduzco, que le da nombre, se debe a la alta presencia de citocromos mitocondriales, así como a una irrigación vascular abundante. Tiene una estructura lobulillar y en los seres humanos es muy abundante en neonatos (cintura escapular, axila etc.) así como en animales hibernantes, en los cuales aumenta antes del sueño invernal. Evidencias recientes parecen indicar que también se encuentra presente en cantidades destacables en humanos adultos (Welsch, 2009).

La principal función del BAT es la de producir calor mediante la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias, orgánulos que se encuentran en alta concentración en estos adipocitos. Se encuentra muy bien innervado por el sistema nervioso simpático, que liberan noradrenalina. La unión de la adrenalina a los receptores adrenérgicos α -2 (Adra2) y, fundamentalmente β -3 (Adrb3), activa la degradación enzimática de los triglicéridos (TGs) y como consecuencia se obtiene calor, al desacoplarse la fosforilación oxidativa de

la cadena de transporte electrónico; proceso mediado por la proteína desacopladora-1 (*uncoupling protein-1*, UCP-1) (Welsch, 2009).

Los adipocitos marrones no absorben cantidades significativas de glucosa con la estimulación de la insulina. Sin embargo, son sensibles al sistema nervioso simpático, y norepinefrina pudiendo estimular la captación de glucosa independiente de la insulina (Shimizu, Kielar, Minokoshi, & Shimazu, 1996). Los adipocitos blancos y marrones almacenan y metabolizan los lípidos en diferentes maneras. Los adipocitos blancos acumulan triglicéridos derivados de nutrientes y los liberan por lipólisis durante los períodos de ayuno, mientras que los adipocitos marrones oxidan sus reservas de lípidos por una vía que produce calor en el que el principal implicado es UCP1. UCP1 se expresa en grandes cantidades en adipocitos marrones y es el mediador central en la capacidad de BAT para producir calor adaptativo. La importancia de UCP1 se demostró en los ratones knockout, en los que los ratones deficientes de UCP1 eran incapaces de sobrevivir a la exposición a largo plazo al frío (Golozoubova, et al., 2001). UCP1 se localiza en la membrana interna mitocondrial, donde reduce el gradiente de protones a través de la membrana, facilitando el flujo de protones desde el espacio intermembrana de la mitocondria de nuevo a la matriz, liberando de este modo calor en lugar de la producción de ATP. Las temperaturas subtermoneutrales desencadenan esta vía y estimulan el sistema nervioso simpático para liberar noradrenalina. La norepinefrina actúa a través de receptores β -adrenérgicos para jugar un papel en la activación de la termogénesis. La importancia fisiológica de los receptores β -adrenérgicos se demostró en ratones deficientes de los tres receptores β -adrenérgicos. En estos ratones se habían reducido las tasas metabólicas y la susceptibilidad a la obesidad severa en animales alimentados con dieta alta en grasas (Bachman, et al., 2002) (Sarjeant & Stephens, 2012).

Recientemente se ha revelado, principalmente en roedores, que frente a determinados estímulos puede producirse una remodelación del tejido adiposo blanco en marrón, proceso conocido como marronización o *browning* (Loncar, 1991). Este proceso consiste en la aparición de adipocitos similares a los adipocitos marrones en depósitos de TAB en respuesta a estímulos como exposición al frío, tratamiento con fármacos o tratamientos dietarios (Giralt & Villarroya, 2013). Los adipocitos marrones presentes en el TAB reciben el nombre de *brite* (de *brown in white*) o *beige*. Estas células tienen características similares a los adipocitos marrones, como su capacidad termogénica, por lo que podrían contribuir al gasto energético y al mantenimiento del peso corporal. También en humanos se han encontrado islas de tejido adiposo marrón dentro de depósitos de grasa blanca, y adipocitos con características de adipocitos marrones que expresan ARNm de UCP1 (Oberkofler, et al., 1997). La posibilidad de aumentar la cantidad de adipocitos marrones funcionales, especialmente aquellos presentes en los abundantes depósitos de grasa blanca aparece como una interesante herramienta o posibilidad terapéutica para combatir (prevenir o tratar) la obesidad y problemas relacionados. De hecho, se cree que la remodelación del tejido adiposo blanco a marrón puede conferir protección frente a la obesidad en numerosos modelos experimentales (Bonet, Oliver, & Palou, 2013).

3.3 LA FUNCIÓN ENERGÉTICA DEL TEJIDO ADIPOSO

3.3.1 Almacenamiento

El tejido adiposo blanco es el mayor reservorio de energía en eucariotas superiores. El principal objetivo del WAT es la síntesis y el almacenaje de triglicéridos en periodos de exceso de energía y la hidrólisis de TAG para generar ácidos grasos para ser usados por otros órganos en periodos de escasez de energía (Gregoire, Smas, & Sul, 1998). El tejido adiposo también secreta adipoquinas que regulan la ingesta de energía y el metabolismo. La energía se almacena en forma de triglicéridos en los adipocitos. La principal fuente de triglicéridos para los adipocitos procede de los quilomicrones y las VLDL circulantes. Los triglicéridos de estas lipoproteínas son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y monoglicerol por la lipoproteína lipasa (LPL) que se encuentra en la pared de los capilares del tejido adiposo. Estos ácidos grasos libres son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son reesterificados para formar triglicéridos (Queiroz, Alonso-Vale, Curi, & Lima, 2009). Los lípidos pueden ser hidrolizados y pueden ser usados por la β -oxidación, síntesis de membranas, modificación de proteínas o generación de moléculas señalizadoras en función de las necesidades del organismo. Así los TG/DGs almacenados son fuente energética para todo el organismo, pero también los esteres de colesterol que son utilizados en los tejidos estereidogénicos para la síntesis de esteroides.

Los adipocitos son células especializadas en el depósito de TGs, a los que almacenan en grandes cantidades, en forma de gota de grasa que ocupan casi totalmente la célula. Esta gran gota lipídica (lipids droplets o LP) resulta ser el orgánulo de almacenaje por excelencia. Aquí se encuentran almacenados los triglicéridos (TGs), diacilglicéridos (DGs) y otros lípidos. El almacenamiento de triacilglicerol en el tejido adiposo es la principal reserva energética del organismo de mamíferos. El exceso en la acumulación de TAG da como resultado la obesidad, también relacionados con desordenes metabólicos como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares e hipertensión (Ahmadian, Duncan, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007). Los TAG son sintetizados y almacenados en gotas lipídicas citosólicas en momentos de excesos de energía, y son movilizados por gotas lipídicas, por lipólisis, cuando se necesita energía para generar ácidos grasos. Mientras que la síntesis de TAG también tiene lugar en otros órganos, como el hígado para la producción de VLDL, la lipólisis para el abastecimiento de ácidos grasos como fuente de energía para otros órganos es una función exclusiva de los adipocitos (Ahmadian, Duncan, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007). El incremento de la lipólisis en adipocitos quizás fuese una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, niveles crónicamente altos de ácidos grasos en sangre, típicamente observados en obesidad, se correlacionan con muchas consecuencias metabólicas desfavorables como la resistencia a la insulina (Welsch, Sobotta Histología, 2009) (Ahmadian, Wang, & Sul, 2010).

La gota lipídica no es un acúmulo sin más de lípidos, sino que tiene una estructura concreta con una serie de proteínas específicas asociadas (Ahmadian, Wang, & Sul, 2010).

Las gotas lipídicas (lipid droplets LDs) son orgánulos dinámicos ubiquitinizados que almacenan y suministran lípidos en todas las células eucariotas y alguna procariota para el metabolismo energético, la síntesis de la membrana y la producción de moléculas derivadas de lípidos esenciales. En la última década se ha puesto especial interés en la biología del orgánulo celular debido a la relación entre las gotas lipídicas y la prevalencia de enfermedades humanas y el descubrimiento de nuevas e insospechadas funciones de las gotas lipídicas. El almacenaje de lípidos en las células varía y refleja un balance entre los lípidos entrantes y el consumo de lípidos. En enfermedades relacionadas con grasa como la obesidad y la arteriosclerosis tiene lugar una acumulación excesiva de gotas lipídicas (Krahmer, Farese, & Walther, 2013) (Pol, Gross, & Parton, 2014).

En tiempo donde la energía escasea, los TAG almacenados en gotas lipídicas se hidrolizan a ácidos grasos y glicerol por la vía lipolítica. Los ácidos grasos liberados desde el tejido adiposo pueden entrar en la circulación y ser captado por otros órganos para β -oxidación y subsecuentemente la generación de ATP. Adicionalmente, los ácidos grasos y el glicerol liberado también pueden servir como sustrato en el hígado para la ketogénesis y gluconeogénesis respectivamente. Previamente, la lipasa sensible a hormonas (HSL) se consideró que era la enzima limitante de la velocidad de hidrólisis de TAG (Duncan, Ahmadian, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007). Sin embargo, los ratones knockout para HSL no eran obesos y acumulaban diacilglicerol (DAG) en el tejido adiposo en lugar de TAG, implicando a HSL como una lipasa DAG y sugiriendo la presencia de nuevas lipasas adicionales en adipocitos (Haemmerle, et al., 2002) (Ahmadian, Wang, & Sul, Lypolysis in adipocytes, 2010).

3.3.2 LIPOGÉNESIS

La lipogénesis es el proceso por el cual los azúcares simples como la glucosa se convierte en ácidos grasos, que posteriormente se esterifican con glicerol para formar los triglicéridos que están empaquetados en VLDL y secretada por el hígado. Para sintetizar los triglicéridos que el tejido adiposo utiliza como almacenaje de energía, necesita primero ácidos grasos que pueden proceder de la dieta, de los ya almacenados en las células o de síntesis *de novo*. De la dieta, una vez ingeridas, las grasas son absorbidas en el intestino delgado después de haber sido emulsionadas por las sales biliares. A continuación las distintas lipasas intestinales las degradan en distintos componentes que van desde los TGs hasta FAs y glicerol. Estos componentes difunden hasta el interior de las células epiteliales del intestino donde otra vez como TG se empaquetan junto con el colesterol de la dieta y proteínas específicas y forman los quilomicrones y las *very low density lipoproteins* (VLDL). De esta forma viajan por el torrente sanguíneo hasta los capilares de los tejidos. En la superficie de las células que van a utilizar estos TG se encuentra un enzima denominado *lipoprotein lipase* (LPL) que es el encargado de hidrolizarlos de estas estructuras en las que se transportan y convertirlos en ácidos grasos y glicerol que penetran

en la célula (Cox & Nelson, 2006). Pero además de los almacenados y de los obtenidos a partir de la dieta, el organismo también puede sintetizarlos *de novo*.

La lipogénesis abarca los procesos de síntesis de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos posteriores. Se inicia con la acetil-CoA y se acumula por la adición de dos unidades de carbón. La síntesis se produce en el citoplasma, en contraste con la degradación (oxidación) que se produce en la mitocondria. El término lipogénesis *de novo* designa específicamente la formación de ácidos grasos a partir de algún precursor derivado del adipocito, por ejemplo glucosa.

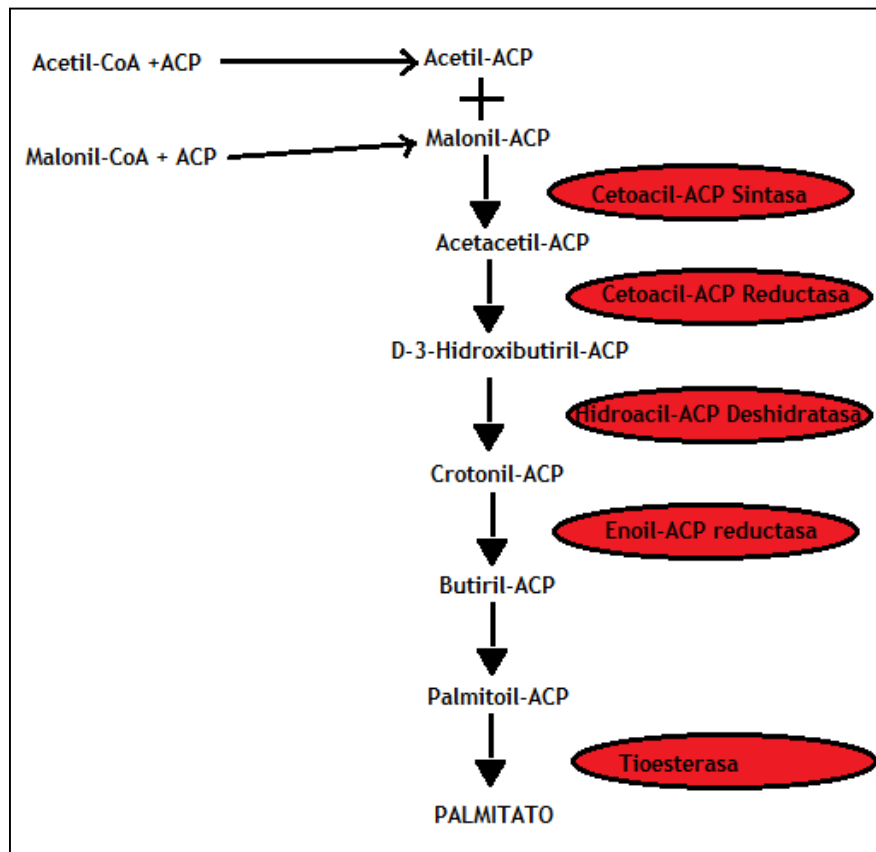


Fig. 7. Lipogénesis. Elaboración propia.

La síntesis de ácidos grasos necesita de dos precursores, el acetil-CoA y el malonil-CoA. El acetil-CoA utilizado en este proceso se forma fundamentalmente en las mitocondrias a partir de la oxidación de piruvato y el catabolismo de los aminoácidos. El que se produce en la β -oxidación no representa una fuente significativa ya que ambas rutas se regulan recíprocamente. La membrana mitocondrial interna es impermeable al acetil-CoA, por lo que una lanzadera indirecta transfiere equivalentes del grupo acetilo a través de la membrana mitocondrial. El acetil-CoA se combina con el oxalacetato por acción de la citrato sintasa dando citrato que por el transportador de citrato lo lleva al citosol y por medio de la ATP citrato liasa (ACL) vuelve a transformar al citrato en acetil-CoA. La síntesis de los ácidos grasos necesita de un intermediario conocido como malonil-CoA. La

formación de malonil- CoA es un proceso irreversible catalizado por la *acetil-CoA carboxilasa* (ACC) a partir del acetil-CoA. Se trata de una reacción de carboxilación dependiente de biotina. Se produce con consumo de ATP y el grupo carboxilo procede del bicarbonato. La formación del ácido graso está mediada por la *fatty acid synthase* (FAS) a partir del malonil-CoA y de acetil-CoA. En cada paso se añaden dos carbonos y consta de cuatro etapas que cataliza FAS. Estos pasos son 1) condensación de un grupo acilo activado (un grupo acetilo procedente del acetil-CoA) y dos carbonos procedentes del malonil-CoA, con liberación de CO₂ procedente del grupo malonil; 2) el producto β-aceto se reduce a alcohol; 3) la eliminación de H₂O crea un doble enlace; 4) el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilo graso saturado. Y así se suceden de forma continua estos 4 pasos y la síntesis del ácido graso se detiene al llegar a los 16 carbonos, dando como resultado un ácido graso conocido como palmitato. La energía química requerida procede del ATP y del poder reductor del NADPH. Todo este proceso ocurre en el citoplasma (Cox & Nelson, 2006).

Para la regulación de la síntesis de ácidos grasos, la clave reguladora es ACC, ya que si existe un exceso de palmitato, ACC se fosforila y pasa a ser inactiva. Por la contra si existe mucho acetil-CoA en el interior de la mitocondria se estimula la actividad de ACC. Esta regulación también es llevada a cabo por distintos sensores hormonales (glucagón e insulina) y mediada por AMPK. AMPK activada fosforila e inhibe la actividad de ACC y reduce la expresión de FAS a través de un mecanismo dependiente de SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*).

Una vez que los ácidos grasos están sintetizados el otro componente necesario para la síntesis de TGs es el glicerol-3-P. Casi todo el glicerol-3-P procede de la dihidroxiacetona fosfato generada en la glucolisis por acción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Cox & Nelson, 2006).

3.3.3 LIPOLISIS

Entendemos como lipolisis la capacidad de las células para liberar ácidos grasos (*fatty acids*, FA) y glicerol de los TGs, con el fin de que estén disponibles para la maquinaria celular, y puedan ser combustible para la β-oxidación de los ácidos grasos. Este proceso genera gran cantidad de energía para la célula y, por extensión, para el organismo. El proceso de lipolisis ocurre dentro de la célula, más concretamente en la superficie de la gota lipídica. Únicamente los adipocitos maduros poseen un la maquinaria completa para la metabolización de los TGs (lipolisis y síntesis de TG) y para la producción de adipocinas (Cox & Nelson, 2006). Una de las principales finalidades de todos los TG almacenados en la gota lipídica es servir de combustible a la célula o al organismo. Pero este proceso catabólico se encuentra fuertemente regulado por hormonas y otras señales. Los triglicéridos presentes en la gota lipídica necesitan ser degradados o hidrolizados hasta ácidos grasos para que estos entren en la β-oxidación y proporcionar así la energía que necesita el organismo.

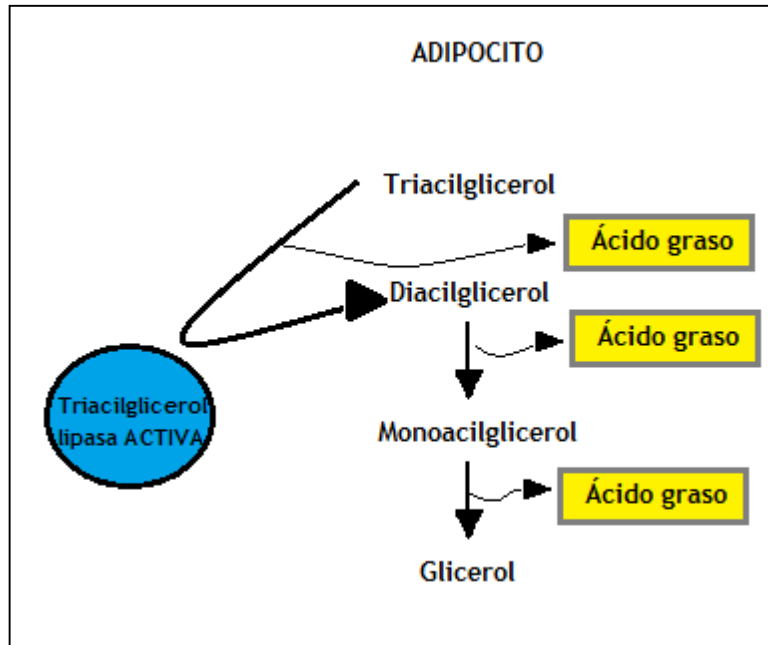


Fig. 8. Lipólisis. Elaboración propia.

El proceso de hidrólisis de triglicéridos consta de varios pasos donde podemos encontrar varias enzimas implicadas. El primer paso será hidrolizar los TGs presentes en la gota lipídica a DGs. En la actualidad se sabe que este proceso es llevado a cabo por la ATGL. El siguiente paso es el de hidrolizar el DG a monoacilglicéridos (MGs). Este paso es catalizado por la *hormone sensitive lipase* o HSL.

La β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga a acetil-CoA es una ruta central de producción de energía en muchos organismos y tejidos. La β -oxidación es un proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren remoción, mediante la oxidación, de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas acetil-CoA, que serán posteriormente oxidados en la mitocondria para generar energía química en forma de (ATP).

La lipólisis, se encuentra fuertemente regulada por hormonas. Durante la lipólisis, los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta enzima cataliza la hidrólisis de triglicéridos hasta monoglicéridos. Finalmente, éstos son degradados por la monoacilglicerol lipasa. La HSL está sujeta a una intensa regulación. Así, la HSL se activa por fosforilación controlada por la proteína quinasa A, la cual está asimismo activada por la vía del AMP cíclico (AMPc). La lipólisis se verá estimulada por todas aquellas hormonas que al unirse a su receptor provoquen la activación de proteínas G estimulantes y, por tanto, la estimulación de la adenilato ciclasa y la formación de AMPc, como ocurre por la unión de catecolaminas a los receptores β -adrenérgicos. Por el contrario, la lipólisis va a ser inhibida por aquellas hormonas cuyo receptor se encuentra asociado a la adenilato ciclasa a través de proteínas G inhibitorias.

Esto provoca una menor producción de AMPc y una menor activación de la proteína quinasa A y por tanto de la HSL.

El incremento en ácidos grasos libres derivado del aumento en el tamaño y la actividad lipolítica de la grasa visceral parece ser el responsable de las alteraciones metabólicas hepáticas, que conducen finalmente a hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, etc.

El adipocito tiene la capacidad de acumular grasa cuando el aporte energético es excesivo; y de movilizarla cuando el organismo requiere energía. Para esto, la célula adiposa contiene todas las enzimas de la lipólisis y de la lipogénesis y es capaz de modificar su tamaño hasta 20 veces su diámetro y varios cientos de veces su volumen. El metabolismo lipídico en el tejido adiposo es dependiente del requerimiento energético del organismo y está finamente regulado por nutrientes, señales hormonales y neuronales. El tejido adiposo blanco no sólo responde a hormonas, sino que también las produce y secreta. Mediante estas señales moleculares el adipocito participa en la regulación de múltiples funciones celulares y se comunica con células de otros tejidos localizadas en órganos distantes, como hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñón, endotelio y sistema inmune.

3.3.4 Alteraciones del tejido adiposo: LIPODISTROFIA

Paradójicamente, las anormalidades metabólicas típicamente encontradas en la obesidad también están asociadas con una lipodistrofia que es caracterizada por la pérdida selectiva de tejido adiposo de regiones particulares del cuerpo (Bhayana & Hegele, 2002).

Hace tiempo que se ha observado que el exceso de tejido adiposo predispone hacia el desarrollo de la resistencia a insulina. Es menos conocido, pero igual de importante, que la pérdida de relleno selectivo de grasa, o ausencia completa de tejido adiposo, también está asociada con formas severas de resistencia a insulina (Moitra, et al., 1998). Esto es en parte debido a la ausencia de compartimentos especializados en el almacenamiento de lípidos bajo condiciones normales. Esto lleva a que no se regule la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos libres, así como a la no regulación de las proteínas específicas secretadas por el adipocito, un grupo de proteínas llamadas adipoquinas o adipocinas. El tejido adiposo es un regulador del sistema de almacenaje de lípidos y a través de la secreción de un número de adipoquinas tiene influencia en muchos procesos, incluyendo el metabolismo energético, inflamación y cambios patofisiológicos como cáncer o enfermedades infecciosas (Nawrocki & Scherer, 2005) (Scherer, 2006).

Aunque los mecanismos moleculares fundamentales no están claros, las complicaciones metabólicas pueden resultar de un almacenamiento ectópico de TAG en tejidos como el hígado y el músculo. Una propiedad adecuada para el almacenamiento de TAG en adipocitos es claramente importante para la regulación metabólica normal. En vista de la amplia gama de problemas de salud asociados con inadecuada el almacenamiento de grasa y la liberación, es fundamental para entender la regulación del adipocito específica de TAG la síntesis y la hidrólisis (Ahmadian, Duncan, Jaworski, Sarkadi-Nagy, & Sul, 2007).

SEÑALES REGULADORAS DE LA HOMEOSTASIS
DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON LOS OBJETIVOS
DE ESTA TESIS

4. NR4A

NR4A es una subfamilia de receptores nucleares huérfanos (NR) que en mamíferos consta de tres isotipos: *Nur77* (NR4A1), *Nurr1* (NR4A2) y *Nor-1* (NR4A3). Los receptores NR4A son factores de transcripción (contrarios a los receptores nucleares clásicos) cuya actividad es controlada primariamente a nivel de expresión proteica y/o modificación post-translacional. Son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores esteroideos hormonales nucleares (Forman, Umesono, Chen, & Evans, 1995) (Mangelsdorf, et al., 1995) (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

4.1 DESCUBRIMIENTO

Se han usado diferentes nomenclaturas para describir estos genes. Por conveniencia usamos la terminología para genes homólogos en ratón para *Nur77* y *Nurr1* y su homólogo en humano para *Nor-1*. El homólogo de rata de *Nur77*, NGFI-B (factor de crecimiento nervioso inducible B) fue la primera de estas proteínas descubierta, cuando fue identificada en feocromocitoma de rata (células PC12) siguiendo la diferenciación con el factor de crecimiento nervioso (Milbrandt, 1988). Subsecuentemente, el homólogo en ratón *Nur77* (receptor nuclear 77) fue identificado en fibroblastos (Hazel, Nathans, & Lau, 1988). *Nurr1* (factor relacionado con Nur 1), el segundo gen en esta subfamilia fue aislado por Law y su grupo por screening de la librería de cDNA del cerebro de ratón con la sonda COUP-TF, otro receptor nuclear (Law, Conneely, DeMayo, & O'Malley, 1992). Tras esto, otros homólogos *Nurr1* fueron identificados en rata (RNR-1 y Hzf-3) (Scarce, Laz, & Hazel, 1993) (Peña de Ortiz & Jamieson, 1996) y en humanos (NOT) (Mages, Rilke, Bravo, & Senger, 1994). El último miembro de esta subclase, *Nor-1* (receptor nuclear huérfano derivado 1), fue aislado del cultivo de neuronas de prosencéfalo de ratas sometidas a apoptosis (Ohkura, Hijikuro, Yamamoto, & Miki, 1994) (Eells, Witta, Otridge, Zuffova, & Nikodem, 2000) (tabla 2).

	<i>Nur77</i>	<i>Nurr1</i>	<i>Nor-1</i>
<i>Ratón</i>	<i>Nur77</i> ; N19; TIS1	<i>Nurr1</i>	No clonado
<i>Rata</i>	NGFI-B	RNR-1	Nor-1
<i>Humano</i>	TR3, NAK1, ST59	NOT, <i>Nurr1</i>	Minor, Tec, NOR-1, CHN

Tabla 2. Nomenclatura alternativa para los miembros de la subfamilia NR4A. *Nur77* (NGF1B/N10/NAK-1 (Soriano, Montgomery, Geske, & Bradley, 1991) (Guichet, et al., 1997) (Zhou & Palmiter, 1995); *Nurr1* (RNR-1y NOT (Fonnum, 1975) (Yamada, Placzek, Tanaka, Dodd, & Jessell, 1991) (Yu, et al., 1997); *Nor-1* (minor/tec) (Hynes, et al., 1994) (Hyman, et al., 1991) (Knüsel, et al., 1991).

4.2 ESTRUCTURA

4.2.1 Estructura génica

Los tres genes contienen 6 exones traducibles con sitios similares de corte exón/intrón conforme la regla de corte de intrón GT-AG donador/aceptor (Milbrandt, 1988) (Hazel, Nathans, & Lau, 1988) (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996) (figura 9). Los genes *Nurr1* y *Nor-1* contienen dos exones no traducibles 5' mientras que el gen *Nur77* tiene solo un exón no traducible 5'. El primer exón traducible (exón 3 de *Nurr1* y *Nor-1* y exón 2 de *Nur77*) codifica el dominio N-terminal y el primer dedo de zinc de la región DBD. El siguiente exón traducible codifica el segundo dedo de zinc de DBD. EL tercer exón codifica una región bisagra mientras que los últimos tres exones traducibles codifican una región putativa de unión/transactivación de ligando, el codón de parada de la traducción, y una región no traducible 3' (Milbrandt, 1988) (Hazel, Nathans, & Lau, 1988) (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996). Además la región no traducible de estos genes, como de otros genes inmediatos tempranos, contienen secuencias ATTTA las cuales son características de mRNAs de vida corta (Eells, Witta, Otridge, Zuffova, & Nikodem, 2000).

Una similitud entre los genes de la superfamilia de receptores nucleares es la presencia de una unión exón/intrón entre dos motivos de dedos de zinc. El lugar de corte en muchos de otros receptores nucleares está bien conservado, localizado en los nueve nucleótidos downstream de una región que codifica Phe-Phe-Lys-Arg (Ryseck, Macdonald-Bravo, Mattei, Ruppert, & Bravo, 1989). Sin embargo, el lugar de corte en los genes *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* tiene lugar entre los codones de lisina y arginina (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996) (Ryseck, Macdonald-Bravo, Mattei, Ruppert, & Bravo, 1989). Estos patrones de corte distintos promueven la diferencia de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* como una subfamilia de receptores hormonales nucleares (Eells, Witta, Otridge, Zuffova, & Nikodem, 2000).

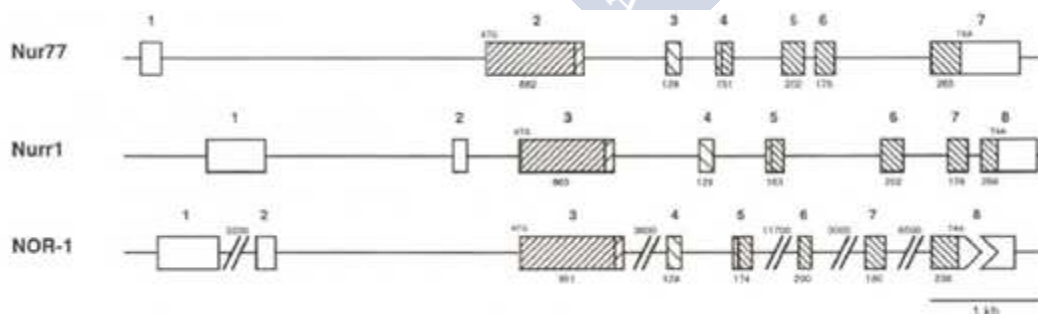


Fig. 9. Estructura génica de la subfamilia NR4A y un diagrama de sus dominios proteicos estructurales. Los exones están numerados e ilustrados con cajas y los intrones por líneas. DBD (dominio de unión a DNA) LBD (dominio de unión al ligando). Imagen adaptada (Eells, Witta, Otridge, Zuffova, & Nikodem, 2000). Con permiso de Current Genomics.

4.2.2 Estructura proteica

Muchos investigadores han descrito la estructura de la familia NR4A (Meinke & Sigler, 1999). Las estructuras de estas proteínas receptoras se han revisado con detalle por Hsu y su grupo (Hsu, Zhou, & Mountz, 2004).

La estructura proteica de los receptores consiste en tres componentes estructural y funcionalmente distintos que incluyen un dominio de activación en su extremo N-terminal (A/B o AF-1), un dominio de unión a DNA (C o DBD) (Wilson, Fahrner, Johnston, & Milbrandt, 1991) y un dominio de unión a ligando (E, LBD o AF-2) en su extremo C-terminal (Enmark & Gustafsson, 1996).

NR4A1, 2 y 3 son altamente homólogos en el dominio DBD (91-95%), modestamente homólogos en el dominio LBD (60%) y muy divergentes en su dominio de activación. Los tres miembros se encuentran en el núcleo ya que su dominio DBD contiene señales de localización nucleares (NLS) (Katagiri, et al., 2000) (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

Las funciones del dominio C-terminal como un dominio de unión al ligando también tiene función en dimerización, localización nuclear y en transactivación o expresión-represión de genes. Mientras *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* comparten esta estructura tripartita, también comparten otras homologías estructurales mucho mayores que con otros receptores hormonales nucleares. La estructura de la región DBD altamente conservada incluye dos dedos de zinc, cada uno con cuatro residuos de cisteína responsables de la unión. Dentro de la región DBD hay varios motivos altamente conservados llamados cajas P-, D-, T- y A- que son necesarios para la unión a la secuencia de DNA específica. Las cajas P, T y A son idénticas en *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* (Milbrandt, 1988) (Hazel, Nathans, & Lau, 1988) (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996). Estas regiones se requieren para la unión a las secuencias específicas de DNA en genes diana. La caja D se piensa que es necesaria para la orientación de la proteína ya que las mutaciones alteran la formación de dímeros entre el receptor de estrógeno y el receptor de glucocorticoide. La caja D en *Nurr1* y *Nor-1* son idénticas, mientras que en *Nur77* es diferente en una posición aminoacídica (Milbrandt, 1988) (Hazel, Nathans, & Lau, 1988) (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996).

El dominio LBD de NR4A1 contiene tres señales de exportación nuclear (3xNES) así como un dominio de unión a Bcl-2 (Katagiri, et al., 2000). La unión de DBD a la secuencia consenso de DNA "AAAGGTCA" (NBRE, elemento de respuesta NGFI-B) se realiza en forma de monómero, y a "AAAT" (G/A)(C/T)CA (NurRE, elemento de respuesta a Nur) por interacción de homodímeros o heterodímeros para activar diferentes expresiones del gen diana (Perlmann & Jansson, 1995) (Zetterstrom, Solomin, Mitsiadis, Olson, & Perlmann, 1996) (Maira, Martens, Philips, & Drouin, 1999).

Los dímeros tienen una actividad más fuerte que los monómeros, y los diferentes dímeros muestran preferencia por distintas secuencias de DNA diana. Las proteínas de la familia NR4A están implicados en una amplia variedad de procesos biológicos,

especialmente están implicados en supervivencia y apoptosis. Son genes tempranos inducidos por suero, factores de crecimiento y el acoplamiento del receptor.

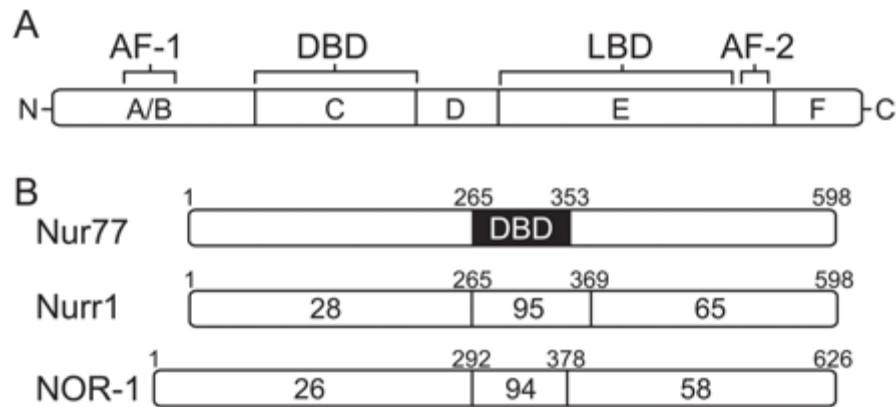


Fig 10. Estructura proteica de subfamilia NR4A. A. Representación esquemática de la secuencia correspondiente a los genes NR4A. B. Alineación de la secuencia aminoacídica de los genes NR4A y el porcentaje de similitud con las regiones de *Nur77*. Imagen adaptada (Martínez-González & Badimon, 2005). Con permiso de Cardiovascular Research.

4.3 ISOTIPOS

4.3.1 NR4A1- *Nur77*

Nur77 está implicado en la mediación del ciclo celular, la inflamación y la apoptosis. La proteína *Nur77* juega un papel clave en la mediación de las respuestas inflamatorias en los macrófagos. Además, la localización subcelular de la proteína NGFIB parece desempeñar un papel clave en la supervivencia y muerte de las células. La expresión es inducida por fitohemaglutinina en linfocitos humanos y por la estimulación de los fibroblastos retenidos en suero. La translocación de la proteína desde el núcleo hasta las mitocondrias induce la apoptosis. Se han identificado múltiples variantes de corte y empalme alternativo, que codifican la misma proteína (Eells, Witta, Otridge, Zuffova, & Nikodem, 2000).

4.3.2 NR4A2-*Nurr1*

Nurr1 juega un papel clave en el mantenimiento del sistema dopaminérgico del cerebro. Las mutaciones en este gen se han asociado con trastornos relacionados con la disfunción dopaminérgica, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia y la depresión maníaca. La regulación deficiente de este gen puede estar asociado con la artritis reumatoide. En este gen se han identificado cuatro variantes de la transcripción que codifican cuatro isoformas. Pueden existir variantes de empalme alternativas adicionales, pero su naturaleza de longitud completa no se ha determinado. *Nurr1* induce la expresión

de la tirosina hidroxilasa, que eventualmente conduce a la diferenciación en neuronas dopaminérgicas. *Nurr1*, se ha demostrado para inducir la diferenciación en células precursoras del SNC *in vitro* pero requieren factores adicionales para llegar a la plena madurez y la diferenciación dopaminérgica (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997).

4.3.3 NR4A3-*Nor-1*

Nor-1 fue originalmente identificado en cultivo primario de células del tronco cerebral de ratas bajo apoptosis. Su mRNA se expresa en células neuronales apoptóticas y en el cerebro fetal, en este último con picos en el día embrionario 17 y desciende hasta niveles bajos en el cerebro de adultos. En otros tejidos adultos normales los niveles de expresión no son significativos (Ohkura, et al., 1996).

4.4 DISTRIBUCIÓN/LOCALIZACIÓN

En contraste a algunos genes tempranos inmediatos, que muestran una expresión basal baja, *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* se expresan en diferentes tejidos bajo condiciones basales. *Nur77* presenta mayor distribución en tejidos con altos niveles de expresión en la hipófisis, cerebro, músculo, próstata, timo y adrenales y bajos pero detectables niveles en muchos otros tejidos (Milbrandt, 1988) (Law, Conneely, DeMayo, & O'Malley, 1992) (Ryseck, Macdonald-Bravo, Mattei, Ruppert, & Bravo, 1989) (Bandoh, Tsukada, Maruyama, Ohkura, & Yamaguchi, 1997).

Nurr1 y *Nor-1* se expresan en altos niveles en el cerebro y en la hipófisis. *Nor-1* también se expresa en timo, adrenales, bazo, epidídimo y conducto deferente (Law, Conneely, DeMayo, & O'Malley, 1992) (Bandoh, Tsukada, Maruyama, Ohkura, & Yamaguchi, 1997) (Maruyama, Tsukada, Bandoh, Sasaki, & Ohkura, 1997). En el cerebro, las tres proteínas se expresan en neuronas en una compleja distribución con patrones de expresión, espaciales y temporales, tanto únicos como solapados (Zetterstrom, Solomin, Mitsiadis, Olson, & Perlmann, 1996). Habría que destacar que la expresión de *Nur77* en el cerebro es baja durante el desarrollo embrionario pero se incrementa con la madurez (Zetterstrom, Solomin, Mitsiadis, Olson, & Perlmann, 1996) (Bandoh, Tsukada, Maruyama, Ohkura, & Yamaguchi, 1997) (Maruyama, et al., 1998). Sin embargo, tanto *Nurr1* como *Nor-1* tienen sus picos durante el desarrollo embrionario y alcanzan niveles de expresión más estables en adultos (Maruyama, Tsukada, Bandoh, Sasaki, & Ohkura, 1997). Las tres proteínas se expresan en neuronas en varias áreas del cerebro, en conjunto o por alguna combinación de los tres miembros NR4A. Así, *Nur77* y *Nor-1* se expresan en el estriado, *Nur77* y *Nurr1* en el bulbo olfatorio y las tres proteínas en el cerebelo, *habenula medial* y células difusas del hipocampo. Una región cerebral con la única expresión de *Nurr1* son las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

Mientras que la expresión de *Nurr1* parece estar restringida a tejido del cerebro de ratón en el estado adulto y durante su desarrollo embrionario, la expresión constitutiva de

Nur77 y *Nor-1* está distribuida además del cerebro en algunos tejidos periféricos (Fonnum, 1975). De este modo, mientras la expresión constitutiva de *Nurr1* está restringida al tejido cerebral en el adulto, la expresión de los tres miembros puede ser inducida en otros tejidos en respuesta a estímulos extracelulares. Por ejemplo, se ha encontrado expresión de *Nur77* en células de linfocitos T sufriendo apoptosis, expresión de *Nurr1* en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por adrenocorticotropina y en células hepáticas en regeneración (Yamada, Placzek, Tanaka, Dodd, & Jessell, 1991). En algunos casos, se ha demostrado que la inducción de estos receptores nucleares está relacionada con cambios en el fenotipo celular mediados por señales extracelulares acopladas a la transcripción de genes regulados por receptores nucleares.

Otro mecanismo para la regulación de la función de los miembros de la subfamilia NR4A es alterando la fosforilación. Estos tres receptores tienen una serina en la caja A de la región DBD que tiene el potencial para ser fosforilado (Castillo, Xiao, Lyu, Kozak, & Nikodem, 1997) (Ohkura, et al., 1996) (Wilson, Fahrner, Johnston, & Milbrandt, 1991) (Davis, Hazel, Chen, & Blenis, 1993). La fosforilación de la serina de la caja A resulta en una fuerte reducción en la afinidad en la unión al DNA y en la actividad de la activación transcripcional.

La expresión *in vitro* de los miembros de la subfamilia NR4A está bien documentado, sin embargo, la expresión inducida *in vivo* se ha estudiado en un número limitado de tipos de tejidos. NR4A se expresa ampliamente en diferentes tejidos clave de demanda metabólica, incluyendo músculo esquelético, hígado, WAT y corazón (Pearen, et al., 2006). La expresión de estos tres receptores en tejidos y órganos varía, lo que puede implicar diversas funciones fisiológicas. NR4A1 se expresa ampliamente, pero los lugares principales de expresión son timo, osteoblasto, hígado e hipófisis (Zetterstrom, Solomin, Mitsiadis, Olson, & Perlmann, 1996) (Hsu, Zhou, & Mountz, 2004). NR4A2 se expresa durante el desarrollo y en el sistema nervioso central del adulto (Law, Conneely, DeMayo, & O'Malley, 1992) (Paulsen, Granas, Johnsen, Rolseth, & Sterri, 1995).

El mRNA de NR4A3 fue detectado en bajos niveles en el corazón adulto y en el músculo esquelético, así como en el cerebro del feto. Se expresa en altos niveles en la glándula hipófisis. La cinética de expresión de NR4A3 es similar a la de NR4A1 en células T, y ellos parecen jugar papeles parcialmente redundantes en células T y en glándulas adrenales (Fernandez, et al., 2000) (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

4.5 SUPERFAMILIA DE RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares que son activados por hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos), tiroideas y ciertas vitaminas solubles en grasa son un prototipo de la superfamilia de receptores nucleares. Esta familia son factores de transcripción que una vez se unen a su ligando, alteran el fenotipo celular al unirse a secuencias reguladoras específicas de DNA y activan la expresión de una serie de genes blanco. En los últimos años se ha obtenido información importante acerca de las características estructurales que requiere tener un receptor para

unirse al ligando, dimerizar, unirse a secuencias de DNA específicas y activar la transcripción del gen blanco. La secuencia de unión al DNA está determinada por una región de aminoácidos fuertemente conservada que contiene dos dedos de zinc en su estructura, que es la principal característica de esta familia de factores de transcripción. La propiedad de los receptores nucleares de poseer una región de unión al DNA y ser factores de transcripción, indica que todos los miembros de la superfamilia regulan la expresión de genes, interactuando ya sea como monómeros o dímeros con secuencias específicas de DNA activantes en cis (sobre las regiones contiguas), de las cuales se conocen dos tipos “AGGTCA” y “AGAACA” (Law, Conneely, DeMayo, & O’Malley, 1992) (Mangelsdorf, et al., 1995). Aunque los factores de transcripción activados por ligando, como por ejemplo los receptores para esteroides y retinoides, son los miembros más caracterizados de la superfamilia, algunos receptores nucleares pueden unirse a dicho DNA cis-activante y regular la transcripción a través de estos elementos de una manera independiente del ligando, ya sean como factores de transcripción activos en forma constitutiva (Zetterstrom, et al., 1997) o cuando son activados por fosforilación (Saucedo-Cardenas & Conneely, 1996) (Zetterstrom, Williams, Perlmann, & Olson, 1996). A muchos de estos receptores se les ha determinado cuál es su ligando, sin embargo, existe un grupo de receptores cuya función y ligando se desconocen todavía y a los cuales se les denomina "receptores huérfanos". Algunos de los receptores huérfanos es la subfamilia NR4A. Los tres miembros de esta subfamilia constituyen una subclase de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción y al parecer no requieren de un ligando para ser transcripcionalmente activos (Yamada, Placzek, Tanaka, Dodd, & Jessell, 1991) (Hyman, et al., 1991).

4.6 SEÑALIZACIÓN

Los sitios de unión en los elementos de respuesta para *Nur77*, que son comunes a los otros dos miembros de la familia Nur, son: NBRE - 5-A/TAAAGGTCA; NurRE - una repetición AAATCA y RXR - DX, un motivo. La familia NR4A une como un monómero u homodímero de elemento de respuesta NBRE y como un homodímero de NurRE. También es capaz de heterodimerizar con COUP-TF y el receptor retinoide X en la mediación de la transcripción en respuesta a los retinoides. Las tres proteínas se unen a un sitio llamado elemento de respuesta NGFI-B (NRBE: AAAGGTCA) como monómeros (Philips, et al., 1997) (Wilson, Fahrner, Johnston, & Milbrandt, 1991).

Estos receptores nucleares tienen residuos aminoacídicos con homología del 97% en los dominios de unión al DNA, 20% en los dominios de transactivación N-terminal y 60-65% en los dominios de unión al ligando C-terminal (Maruyama, et al., 1998)

Los receptores NR4A se expresan en genes de respuesta temprana en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos incluyendo ácidos grasos, estrés, prostaglandinas, factores de crecimiento, calcio y citoquinas inflamatorias, hormonas peptídicas y neurotransmisores (McMorrow & Murphy, 2011) (Pearen & Muscat, 2010).

Aunque estos receptores factores de transcripción son considerados como huérfanos, pueden ser regulados por muchas hormonas por la formación de heterodímeros con otros receptores hormonales que se unen a ligandos hormonales. Estos receptores también pueden influir en genes diana de otros receptores nucleares por la formación de heterodímeros similares (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

Una característica de los miembros de la subfamilia NR4A es su potencial para actuar como genes inmediatos tempranos. Aunque la expresión basal considerable y la actividad funcional de estas proteínas tienen lugar en algunos tejidos, por varios estímulos, la expresión de los tres miembros puede ser rápida y transitoriamente inducida en muchos tipos celulares diferentes independiente de la síntesis de proteína, criterio necesario para la distinción como genes tempranos. Los genes inmediatos han sido propuestos para funcionar como enlace crítico entre señales extracelulares y expresión de genes de respuesta tardía.

4.7 ACCIONES BIOLÓGICAS

Estos receptores están implicados en importantes procesos biológicos incluyendo carcinogénesis, control apoptótico, inflamación, enfermedad vascular, desarrollo de neuronas dopaminérgicas y metabolismo (Pearen & Muscat, 2010).

4.7.1 Apoptosis células-T

NR4A1, 2 y 3 han sido previamente implicados en crecimiento celular, supervivencia y apoptosis. Los tres miembros de la familia NR4A parecen tener funciones pro-supervivencia en ciertos contextos, mientras que NR4A1 y NR4A3 también tienen funciones pro-apoptóticas en otros contextos (Suzuki, et al., 2003) (Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling., 2003).

Muchos estudios describen la posible implicación de NR4A1, 2 y 3 en varias enfermedades humanas (Hsu, Zhou, & Mountz, 2004), incluyendo a NR4A1 en enfermedades inflamatorias, alergia y aterosclerosis, y a NR4A2 en la enfermedad de Parkinson y en artritis reumatoide (Le, et al., 2003) (McEvoy, et al., 2002). Sin embargo, datos acumulados también implican a esta familia de receptores en la transformación celular y en carcinogénesis humana (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

NR4A1 es el miembro mejor estudiado entre esta familia de receptores. Su expresión puede estar inducida por numerosos y diferentes estímulos, por ejemplo, estímulos de estrés como TNF (Suzuki, et al., 2003), suero y factores de crecimiento incluyendo NGF y la señalización del receptor mediadas por células T (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

En contraste a NR4A1, solo se han visto efectos pro-supervivencia en NR4A2, pero no se observan efectos pro-apoptóticos.

NR4A2 se expresa altamente en tejido cerebral, con baja expresión en otros tejidos. Los ratones KO para NR4A2 tenían impedido el desarrollo y el mantenimiento de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas, muriendo poco tiempo después del nacimiento (Law,

Conneely, DeMayo, & O'Malley, 1992) (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006). Los ratones heterocigotos parecen saludables, pero eran más susceptibles a la acción de neurotoxinas.

Se ha visto que NR4A3 es funcionalmente similar a NR4A1 en células T apoptóticas. El patrón de tejidos de expresión de NR4A3 es también similar a NR4A1.

Por otro lado, en varios experimentos se ha observado que los ratones KO NR4A3 eran embriones letales, similar a los ratones KO NR4A2, pero contrario a los ratones KO NR4A1. Resultados de estos estudios también sugieren que NR4A1 y NR4A3 no tienen funciones solapadas (Li, Ke, Sundaram, & Wong-Staal, 2006).

4.7.2 Regulación en el eje HPA

Tanto la expresión constitutiva como la expresión inducible se ha documentado a través del eje HPA (hipotálamo-hipófisis-adrenal). Las neuronas CRH (hormona liberadora de corticotropina) localizadas en PVN del hipotálamo, actúan liberando CRH en el sistema portal hipofisario el cual actúa en la hipófisis anterior lo que causa la liberación de ACTH y la síntesis de POMC, la proteína precursora contiene el péptido ACTH. ACTH actúa en el córtex adrenal para estimular la liberación la síntesis de glucocorticoides. Los glucocorticoides a su vez tienen acción inhibitoria en el hipotálamo y la hipófisis en la liberación y síntesis de CRH y ACTH, respectivamente. *Nur11* se expresa en PVN bajo condiciones basales mientras que *Nur77* se induce en esta área en respuesta al estrés. *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* se expresan en altos niveles en la hipófisis anterior (Bandoh, Tsukada, Maruyama, Ohkura, & Yamaguchi, 1997) (Maruyama, Tsukada, Bandoh, Sasaki, & Ohkura, 1997) (Saucedo-Cardenas & Conneely, 1996).

4.7.3 Acciones biológicas en periferia

Muchos estudios se han centrado principalmente en la acción de estos receptores en el metabolismo de la glucosa en hígado y músculo. La actividad de los receptores NR4A tiene lugar como reguladores transcripcionales del metabolismo de la glucosa en hígado activando genes gluconeogénicos (Pei, et al., 2006), mejorando la producción de glucosa hepática y elevando la glucosa en sangre. Por otra parte, en el laboratorio de Tontonoz encontraron que la expresión de NR4A está inducida por AMPc (Pei, et al., 2006) en respuesta al glucagón y al ayuno. En el músculo esquelético NR4A es un regulador transcripcional de la glucólisis, regulando la expresión de genes relacionados con la utilización de la glucosa (Chao, et al., 2009) y están implicados en el metabolismo oxidativo y la actividad mitocondrial (Chao, et al., 2012) (Chao, et al., 2007).

Observando los resultados obtenidos en roedores, varios estudios en humanos han ligado la obesidad y diabetes con los receptores NR4A (Fu, Luo, Luo, Zhu, & Garvey, 2007) (Veum V. , et al., 2012) incrementando el interés para estos receptores nucleares como una potencial diana terapéutica.

Aunque algunos estudios muestran que NR4A se expresa en WAT y regula el metabolismo de la glucosa, todos estos estudios se han realizado *in vitro*. En células 3T3-L1, NR4A se induce por insulina (Fu, Luo, Luo, Zhu, & Garvey, 2007) y su relación con la adipogénesis es polémico, ya que algunos grupos no encontraron ninguna implicación de NR4A en adipogénesis (Au, Payne, O'Rahilly, & Rochford, 2008), mientras que otros demostraron una inhibición de adipogénesis por NR4A (Chao, Bensinger, Villanueva, Wroblewski, & Tontonoz, 2008).

Los datos *in vivo* de NR4A en WAT están limitados a un solo artículo indicando que *Nur77* modula alguna de las acciones del análogo α -MSH (Wang, Myers, Eriksson, Fitzsimmons, & Muscat, 2011), sugiriendo un importante papel endógeno de NR4A en el metabolismo del tejido adiposo blanco.

Nur77 se expresa en niveles más altos en músculo glucolítico que en músculo oxidativo, y su sobreexpresión en músculo de rata o células musculares induce la expresión de múltiples genes que utilizan glucosa (Chao, et al., 2007) (Kanzleiter, et al., 2010).

Además, la estimulación de los receptores β -adrenérgicos induce la expresión de mRNA de *Nur77* en células musculares esqueléticas C2C12 y provoca hipertrofia en músculo esquelético (Pearen, et al., 2006).

Aunque las acciones metabólicas de *Nur77* en hígado y en músculo parecen claras, su papel potencial en el tejido adiposo permanece conflictivo. Algunos estudios *in vitro* relatan que la expresión de los receptores NR4A se inducían de forma aguda con un cóctel adipogénico en preadipocitos 3T3-L1 y estimulados a largo plazo después del tratamiento con ligandos PPAR γ (Fu, et al., 2005). Por otro lado, en líneas celulares estables de preadipocitos 3T3-L1 y 3T3-F442A que sobreexpresaban los tres receptores nucleares la diferenciación fue inhibida y este efecto no se pudo restaurar por PPAR γ (Chao, Bensinger, Villanueva, Wroblewski, & Tontonoz, 2008). Finalmente, otros estudios indican que la familia NR4A no se requería para la adipogénesis (Au, Payne, O'Rahilly, & Rochford, 2008).

La sobreexpresión de *Nur77* lleva a una activación transcripcional de genes implicados en inflamación, apoptosis y control del ciclo celular (Pei, Castrillo, & Tontonoz, 2006). En células cancerígenas, las funciones de *Nur77* en el núcleo son de un factor oncogénico de supervivencia, pero se convierte en un asesino potente cuando ciertos estímulos de muerte inducen su migración a las mitocondrias (Moll, Marchenko, & Zhang, 2006).

Los ratones deficientes en *Nur77* con una dieta alta en grasa (VHFD) (60% calorías) desarrolla esteatosis hepática y una alteración a la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético e hígado (Chao, et al., 2009). En músculo, *Nur77* regula la lipólisis, gasto energético (Maxwell, et al., 2005), y metabolismo de la glucosa (Chao, et al., 2007).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A lo largo de los últimos años distintos grupos han tratado de desenmascarar distintas dianas biológicas que permitan un abordaje racional de la obesidad y/o de sus comorbilidades especialmente de las metabólicas. Esto ha abarcado a señales muy diversas incluyendo hormonas esteroideas y polipeptídicas, así como sus receptores y su señalización intracelular. En esta tesis nosotros nos planteamos esclarecer el papel de un miembro de la familia de receptores nucleares, *Nur77*, dada la relevancia de los receptores esteroideos en la homeostasis metabólica.

La familia de NR4A está implicada en una gran variedad de acciones biológicas incluyendo la regulación del ciclo celular, apoptosis, inflamación, carcinogénesis y metabolismo. *Nur77* es un miembro de la subfamilia NR4A de receptores nucleares y que juega un papel metabólico importante, modulando el metabolismo hepático de la glucosa y la lipólisis en músculo. Por todo ello, nos propusimos investigar:

Objetivo 1. El papel endógeno de *Nur77* en la homeostasis metabólica y energética.

Objetivo 2. Investigar la regulación de la familia NR4A bajo distintas condiciones fisiológicas asociadas con cambios en el metabolismo como desarrollo postnatal, estado gonadal, gestación, cambios hormonales.





MATERIAL Y MÉTODOS





MATERIAL Y METODOS

1. Animales de experimentación

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

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

La metodología empleada permitió la recolección de múltiples muestras de tejidos y la realización de distintos análisis sobre los mismos animales siempre que fuera posible. La experiencia adquirida permitió refinar los procedimientos experimentales a fin de eliminar o reducir al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero como se ha mencionado previamente. Los grupos de cada experimento constaban de un número de entre 6-10 individuos cada uno.

1.1 MODELOS ANIMALES UTILIZADOS

1.1.1 Ratón C57BL/6J

La mayoría de experimentos fueron realizados con ratón (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6J procedentes de la compañía *Charles Rivers Laboratories International, Inc.* (Delegación en Barcelona). Según la dieta, algunos llegaron a nuestro animalario con 15 semanas (normal diet- ND o chow diet) y permanecieron 1 semana en el animalario para su aclimatación y otros con 4 semanas a los que se les puso una dieta determinada (HFD-high fat diet para engordar o LFD para algún experimento concreto) hasta las 16 semanas (Research diets Inc, New Brunswick, USA).



A. Low Fat Diet

B. High Fat Diet

C. Very High Fat Diet

Product Data - D12450B			
Formula			
Product #D12450B	gm%	kcal%	
Protein	19.2	20	
Carbohydrate	67.3	70	
Fat	4.3	10	
Total	kcal/gm	3.85	
Total	1000.05	4057	
Ingredient			
Ingredient	gm	kcal	
Casein, 30 Mesh	200	800	
L-Cystine	3	12	
Corn Starch	315	1260	
Maltodextrin 10	35	140	
Sucrose	350	1400	
Cellulose, BW200	50	0	
Soybean Oil	25	225	
Lard*	20	180	
Mineral Mix S10026	10	0	
DiCalcium Phosphate	13	0	
Calcium Carbonate	5.5	0	
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	
Vitamin Mix V10001	10	40	
Choline Bitartrate	2	0	
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0	

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

Product Data - D12451			
Formula			
Product #D12451	gm%	kcal%	
Protein	24	20	
Carbohydrate	41	35	
Fat	24	45	
Total	kcal/gm	4.73	
Total	858.15	4057	
Ingredient			
Ingredient	gm	kcal	
Casein, 30 Mesh	200	800	
L-Cystine	3	12	
Corn Starch	72.8	291	
Maltodextrin 10	100	400	
Sucrose	172.8	691	
Cellulose, BW200	50	0	
Soybean Oil	25	225	
Lard*	177.5	1598	
Mineral Mix S10026	10	0	
DiCalcium Phosphate	13	0	
Calcium Carbonate	5.5	0	
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	
Vitamin Mix V10001	10	40	
Choline Bitartrate	2	0	
FD&C Red Dye #40	0.05	0	

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

Product Data - D12492			
Formula			
Product #D12492	gm%	kcal%	
Protein	36.2	20	
Carbohydrate	36.3	20	
Fat	34.9	60	
Total	kcal/gm	5.24	
Total	773.80	4057	
Ingredient			
Ingredient	gm	kcal	
Casein, 30 Mesh	200	800	
L-Cystine	3	12	
Corn Starch	0	0	
Maltodextrin 10	125	500	
Sucrose	68.8	275.2	
Cellulose, BW200	50	0	
Soybean Oil	25	225	
Lard*	245	2205	
Mineral Mix S10026	10	0	
DiCalcium Phosphate	13	0	
Calcium Carbonate	5.5	0	
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	
Vitamin Mix V10001	10	40	
Choline Bitartrate	2	0	
FD&C Blue Dye #1	0.05	0	

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.



Fig 11. Composición dietas ratones. A. Low Fat Diet (LFD). La dieta baja en grasa como control frente a la obesidad está compuesta del 10 Kcal % de grasa. B. High Fat Diet. La dieta alta en grasa (HFD) para la obesidad inducida por dieta (DIO) está compuesta del 45 kcal% de grasa).C. Very High Fat Diet (VHFD). En cuanto a la dieta con mayor cantidad de grasa para la obesidad inducida por dieta (DIO) está compuesta del 60 kcal% de grasa (Research diets Inc, New Brunswick, USA).

1.1.2 Ratas Sprague-Dawley

Los experimentos con ratas fueron realizados con ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley, procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. Las ratas se pedían con un peso aproximado entre 200-250 g. salvo que el experimento requiriera otras condiciones o ratas con edades concretas.

1.1.3 Rata Dwarf

Las ratas Dwarf carecen de GH (Charlton, et al., 1988) (Carmignac & Robinson, 1990). Como controles de este experimento se utilizaron ratas Lewis. Procedentes de los laboratorios *Harlam Ibérica* y después de una semana en el animalario para su adecuación fueron sacrificadas y se les extrajo el tejido adiposo blanco.

1.1.4 Ratón knock-out de leptina *ob/ob*

Se trata de ratones (*Mus musculus*) con fondo genético de la cepa C57BL/6J y *Knockout* para el gen *ob* (leptina). Llegaron a nuestro animalario con una edad de 6 semanas y se estabularon durante una semana para su aclimatación.

1.2. ESTABULACIÓN

Una vez llegaban al animalario, los animales se estabulaban a una temperatura adecuada (22-24°C) en un período de luz-oscuridad de 12h, con libre acceso a comida y bebida hasta el experimento.

1.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la obtención de las muestras de tejidos y sangre, los animales se sacrificaban por decapitación y a continuación eran diseccionados rápidamente utilizando material quirúrgico estéril, con el fin de evitar posibles contaminaciones durante la extracción. Los tejidos extraídos se colocaban en tubos estériles con tapa de 2ml de capacidad y se congelaban rápidamente en CO₂ sólido (hielo seco) contenido en un recipiente aislante. Las muestras eran almacenadas en un congelador a -80°C hasta su procesado.

1.4. SEDACIÓN

Para la sedación de animales se utilizaban dos métodos: una anestesia inhalada compuesta por isofluorano y administrada con la ayuda de una máquina de anestesia en las proporciones indicadas para cada animal y un anestésico líquido inyectable formado por un combinado de ketamina y xilacina en distintas proporciones según el animal.

Anestesia inhalada: Inducción: Colocar el animal en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador al 4-5% de isofluorano y flujo de oxígeno a (0.5-1.0 l/min). Cuando el animal pierda la consciencia, cerrar la llave de entrada a la misma, sacarlo de la cámara y colocarle la mascarilla. Mantenimiento: regular el vaporizador de anestésico al 1-2% y oxígeno al 100% y un flujo de oxígeno de (0.5-1 l/min).

Anestesia líquida:

- Para Ratas: Ketamina (hidrocloruro), 42'5 % Imalgene®, (Merial Laboratorios, S.A, Sanofi Company, Barcelona). 100mg/ml; Xilazina 20% Rompun®, (Bayer HealthCare, Germany) 0,8 mg/ml; Solución Salina Fisiológica (0,9% saline) 37,5%.

- Para Ratón: Ketamina (hidrocloruro), 5 % Imalgene®, (Merial Laboratorios, S.A, Sanofi Company, Barcelona). 100mg/ml; Xilazina 1,25% Rompun®, (Bayer HealthCare, Germany) 0,8 mg/ml; Solución Salina Fisiológica (0,9% saline) 30%.

La dosis ketamina-xilacina utilizada para ratas fue de 200µl por cada 100 gramos de peso corporal y para ratón de 10µl por cada gramo de peso corporal, considerándose una anestesia de grado II-III durante periodos de una a dos horas, siendo la mortalidad despreciable. La anestesia fue administrada intraperitonealmente.

1.5 MODELOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

1.5.5 Análisis por sistema de calorimetría indirecto, TSE

Para el estudio de los factores que regulan la partición nutricional, se utilizan sistemas de fenotipado indirecto o sistemas de calorimetría indirecta. Este tipo de sistema nos permite reflejar el estado nutricional del organismo en estudio bajo diferentes condiciones. La medición del gasto energético, ingesta, y tasa de respiración metabólica (RQ) se realiza utilizando un sistema de 12 cajas con medición simultánea de calorimetría indirecta (PhenoMaster, Sophisticated Life Science Research Instrumentation, TSE system, Germany). El sistema permite que se puedan medir los parámetros de forma continua y simultáneamente en un máximo de 12 animales. Se calcula de forma simultánea el gasto energético, la ingesta y la tasa de respiración metabólica. El PhenoMaster toma medidas de ingesta, consumo de O₂ (vO₂) y producción de CO₂ (vCO₂) entre otros. Este aparato registra estos parámetros a cada intervalo de tiempo marcado (20 min), durante 48 horas. Los animales se adaptaron al nuevo tipo de ambiente instalándolos en cajas de adaptación durante 48 horas antes de las mediciones. Con los valores obtenidos, se calculó la RQ de cada individuo durante cada medición dividiendo el vCO₂ entre el vO₂ (vCO₂/vO₂) y el valor de gasto energético (EE) resultante (kcal/48h).

El cociente respiratorio es el ratio entre el volumen de dióxido de carbono que un organismo produce y el volumen de oxígeno que consume. Tiene una relación directa con el nutriente metabolizado como fuente de energía por el organismo. Los valores de la ratio nos van a determinar cuál es el macronutriente preferente para realizar la oxidación. Así, un RQ igual a 1 indica que el organismo está quemando carbohidratos. Sí es mayor a 1 indica que se están utilizando glúcidos para la síntesis de lípidos. RQ inferior a 1 indica la utilización de otras biomoléculas como fuentes de lípidos.

1.5.6 Expresión de *Nur77*, *Nor-1* y *Nurr1* en tejido adiposo blanco

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas o jóvenes, ratas Dwarf y ratones *ob/ob*, en diferentes condiciones fisiológicas y se les extrajo WATg (tejido adiposo blanco gonadal).

1.5.6.1 Ayuno y realimentación

Se utilizaron ratas adultas macho de 250 g, las cuales se mantuvieron en el animalario durante 1 semana para su adaptación a las condiciones estándar. Después de este período, las ratas fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos: control alimentadas *ad libitum* y ratas privadas completamente de alimento durante 48h, y un cuarto grupo con 48h de ayuno, pero al cabo de las cuales se les repuso alimento *ad libitum* durante otras 48h. El agua fue *ad libitum* en todos los grupos. Finalizados los tiempos de cada grupo, los animales se sacrificaron y se les extrajo el WATg para el análisis de la expresión de ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.2 Restricción alimenticia crónica en machos adultos

Las ratas macho adultas se mantuvieron 1 semana en el animalario y pasado este período se dividieron aleatoriamente en grupos: alimentadas *ad libitum* y sometidas a una restricción alimenticia del 70% a distintos días según el grupo. Cada día, el alimento se reducía en un 30% teniendo en cuenta la cantidad ingerida el día anterior. Las ratas que fueron privadas parcialmente de ingesta se mantuvieron en cajas individuales con el fin de evitar la competencia entre varios animales. A medida que las ratas alcanzaban la edad requerida se sacrificaban y se les extrajo el WATg para el análisis de expresión ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.3 Ayuno y tratamiento con Leptina: Ratones *ob/ob*

Se utilizaron ratones machos adultos de 30 g. aproximadamente deficientes en leptina. Los animales se dividieron en 3 grupos; uno con libre acceso a alimento y dos a los que se sometió a un ayuno de 48h. Para el tratamiento con leptina se les administró a uno de los grupos de ayuno una inyección intracerebroventricular cada 12 horas de leptina humana recombinante de *Sigma* (disolución según instrucciones del fabricante, L4146 Sigma) en una dosis de 0,8 µg/g de ratón (peso corporal) por inyección. A los grupos control se les administró el mismo número de inyecciones. Al terminar el tratamiento se sacrificaron y se les extrajo el WATg para la posterior medición de los niveles de la expresión ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.4 Dieta alta/baja en grasas

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 250 g. aproximadamente. Se les suministraron dos tipos de dieta: baja en grasa (LFD) y alta en grasa (HF) creando dos subgrupos. Esta dieta se mantuvo durante 12 semanas. Se les extrajo el tejido adiposo blanco gonadal a fin de extraer ARN para analizar la expresión de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.5 Desarrollo Postnatal y Dimorfismo sexual

Se utilizaron ratas macho y hembra de la cepa Sprague-Dawley de distintas edades: 25, 45, 60 y 90 días postnatales. Tras mantenerlas estabuladas 1 semana se procedió a sacrificarlas el día que alcanzaban dicha edad. Se extrajo el WATg para el análisis de la expresión de ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.6 Efecto hormonas gonadales

Se utilizaron ratas macho y hembra de 21 días (prepúberes). Se operaron para extraerles las gónadas (orquidectomizadas; gonadectomizadas y ovariectomizadas). Como control usamos un grupo al que se simuló la operación (Sham). Tras 15 días de estabulación se sacrificaron contando 45 días de edad (postpuberal). Se extrajeron el tejido adiposo blanco gonadal para el análisis de la expresión de ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3.

1.5.6.7 Estado Tiroideo

Se utilizaron ratas adultas macho, las cuales se mantuvieron en el animalario durante 1 semana para su adaptación a las condiciones estándar. Después de este período, las ratas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos: eutiroides (grupo control), hipotiroideos e hipertiroideos. El hipotiroidismo fue inducido por la adición de un antitiroideo, 0.1% aminotriazol (3-amino-1, 2, 4- triazole; *Sigma*) que disuelto en el agua de bebida junto con albúmina de suero bovina al 3% y CIH al 0,22% fue dada a los animales durante un período de 3 semanas. Para evitar el deterioro, el compuesto fue guardado a 4°C y cambiado periódicamente a las ratas cada 2 o 3 días. El hipertiroidismo fue inducido por la administración subcutánea durante 21 días de L-tiroxina (L-thyroxine sodium salt pentahydrate; *Sigma*) a una dosis de 1mg/día, disuelto en 200 µl de salino (pH= 10.5). Pasado el período correspondiente de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el WATg.

1.5.6.8 Gestación

Las ratas hembras utilizadas fueron estabuladas durante 1 semana en el animalario para que su ciclo fuese regular. Una vez transcurrido este tiempo las ratas eran sometidas a un frotis vaginal diario para comprobar su estado estral. Este frotis se realizaba con salino y el estadio de las células se observaba con un microscopio óptico. El día en que las ratas se encontraban en proestro, se cruzaban con 1 rata macho durante 1 noche. A la mañana siguiente las ratas se separaban y comenzaba a contarse este día como el día 1 de gestación.

Cuando las ratas llegaban al tiempo requerido de gestación (12, 16, 19 y 21 días) eran sacrificadas para la posterior extracción de WATg para el análisis de expresión ARNm de los genes NR4A1, NR4A2 y NR4A3. Como controles se utilizaron ratas pseudopreñadas, es decir, hembras que fueron cruzadas con un macho pero que no quedaron preñadas (Gualillo O. , et al., 2002).

2. Técnicas experimentales

2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

2.1.1. Extracción de ARN de tejidos

2.1.1.1 Homogenización de tejido

En este procedimiento se siguió la siguiente metodología: Se extrae un fragmento de la muestra congelada (según el tejido varía la cantidad que se extrae. Por ej.: 50 mg para grasa blanca) y se coloca en un tubo de 2ml con una bola de acero (*Quiagen*) y 1 ml de reactivo *TRIZOL® Reagent (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se homogenizan mecánicamente en un homogeneizador (*Tissue lyser, Quiagen*). El homogeneizador se usa a una frecuencia de 25.0 oscilaciones por minuto, durante 3 minutos. Todo este proceso se realiza en frío (sobre hielo) y el material usado (pinzas para extraer el fragmento y bolas de acero) se lava previamente con agua DEPC (preparación: dietilpirocarbonato al 0,1% en agua MiliQ incubada toda la noche a temperatura ambiente o a 37°C durante 2 horas y autoclavada).

2.1.1.2 Aislamiento del ARN

Una vez homogeneizadas las muestras se microcentrifugan 10 min a 13000 rpm a 4°C en una microcentrífuga (*centrifuge 5415 R-ependorf®*) y se extrae el sobrenadante, bajo campana de extracción de gases, a un nuevo tubo de 1,5ml autoclavado evitando la capa superior y el pellet formado. De esta forma conseguimos separar la capa de lípidos que pueda existir (según el tejido) y extraer la fase intermedia para optimizar la pureza

del ARN extraído. A continuación se añaden 250 µl de cloroformo en campana y se agitan fuertemente en vórtex durante varios segundos. Tras la agitación, las muestras se mantienen a temperatura ambiente durante 5 minutos. En este momento se empiezan a distinguir dos fases, una transparente y una rosada. Se vuelven a centrifugar las muestras (10 min, 13000 rpm, 4°C). Ahora claramente se observan las dos fases: una fase acuosa donde se halla el ARN y una fase fenólica en la parte inferior que contiene las proteínas y los lípidos. En la interfase es donde se encuentra el ADN.

Con mucho cuidado se retira la fase acuosa (extrayendo una cantidad conocida en todos los tubos) y se pasa a otro tubo de 1,5ml autoclavado, despreciando la parte fenólica. De esta forma separamos el ARN del resto de los componentes celulares.

2.1.1.3 Precipitación del ARN

Posteriormente, se añade la misma cantidad de isopropanol que de fase acuosa retirada más 200 µl y se agitan vigorosamente con un vórtex. Los tubos se colocan en un congelador a -20°C durante 10 min permitiendo así la precipitación del ARN. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga (10 min, 13000 rpm, 4°C). El ARN queda concentrado en el fondo.

2.1.1.4 Lavado del ARN

Se decanta el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet y se añade 1 ml de etanol al 70% en agua DEPC y se agita durante unos segundos. Las muestras vuelven a centrifugarse (10 min, 13000 rpm, 4°C). Decantamos el sobrenadante y volvemos a centrifugar (1 min, 13000 rpm, 4°C). Se retira el sobrenadante remanente con una micropipeta con mucho cuidado de no llevarnos el pellet. Finalmente se resuspende el pellet en agua DEPC (distinta cantidad según el tejido del que extraemos el ARN) y se disuelve el precipitado calentándolo a 60°C y agitando cada 3 minutos hasta completar los 9 min.

2.2. CUANTIFICACIÓN

Para determinar la concentración de ARN se utiliza un Nanodrop (*Nanodrop 2000 spectrophotometer, Thermo scientific*).

La absorción a 260 nm proporciona la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinaba estudiando el cociente 260/280, considerándose aceptable una oscilación entre 1,5 y 1,8. Las muestras fuera de ese rango fueron descartadas.

2.3 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La reacción de retrotranscripción se llevaba a cabo en un volumen total de 30µl, con las siguientes proporciones para cada muestra:

- 10 µl de muestra concentrada 0,05 µg/µl si es WAT, BAT o músculo, y 0,01µg/µl si es hipotálamo o hígado.
- 20 µl de mix: 6 µl de Buffer de reversotranscripción 5x (“5X first strand buffer”; *Invitrogen*) (250mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂); 6 µl de mix de dNTPs (20mM) (dTTP, dCTP, dGTP, dATP); 1,5 µl de MgCl₂ (50mM)(*Invitrogen*); 0,17 µl de cebadores (Random primers) 3 µg/µl (*Invitrogen*); 0,25 µl RNaseOUT Inhibidor recombinante ribonucleasa (40U/µl)(*Invitrogen*); 1 µl M-MLV Reverso transcriptasa 200U/µl (*Invitrogen*); agua DEPC autoclavada hasta completar los 20 µl.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se da un spin a las muestras y a continuación se incuban en un termociclador (Bio-Rad T100 thermal cycler) donde se han programado con anterioridad las siguientes condiciones: (30 ciclos) 1 hora a 37°C. 15 minutos 42°C. La enzima era inactivada calentando a 96°C durante 5 minutos.

2.4. PCR TIEMPO REAL

Estos análisis se realizaron en un aparato TaqMan 7500, (*TaqMan; Applied Biosystems*). Se usa como sistema de detección las sondas Taqman (Sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptador). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560 nm y un máximo de emisión de 580nm.

2.4.1 Condiciones para PCR

Los primers usados fueron diseñados según la base de datos BLAST del NCBI. La mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final era de 12 µl estaba constituida por:

- 2.92 µl H₂O-MQ; 0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM) (Tabla 3).
- 0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM) (Tabla 3).
- 0.36 µl Sonda (5 µM) (Tabla 3).
- 6 µl Taqman Universal PCR máster mix; (*Applied Biosystems*)
- 2 µl Muestra (RT).

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

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

Las condiciones de amplificación fueron de: Desnaturalización inicial 50°C 2 min, seguido de otro periodo de 10 min a 95°C y a continuación 40 ciclos para el gen problema y 35 para el *housekeeping* HPRT/18S de desnaturalización a 95°C 15 segundos e hibridación-extensión a 60°C 1 minuto.

El aparato de taqman detecta la fluorescencia al final de la fase de hibridación/elongación, lo que nos permite cuantificar la cantidad de producto de PCR formado durante ese ciclo. Los fluoróforos FAM (Fluorescein-6) en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3' de la sonda son los que emiten esa fluorescencia. Mientras la sonda se encuentra libre o hibridada con la zona del gen que es homóloga, la señal que emite FAM (Donante o Reporter) al ser excitada por la luz es absorbida por TAMRA (Aceptor o Quencher). Cuando la ADN polimerasa realiza la elongación en esta zona, la sonda es hidrolizada por el extremo 5', degradando el quencher, que impedía la emisión de la fluorescencia de la molécula del extremo 3'. La señal emitida es captada por los filtros y transformada en datos por el Software de *Applied Biosystems: Sequence Detection Software*. La fluorescencia detectada en el termociclador de la PCR cuantitativa es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado.

Para determinar la concentración de DNAc en cada muestra se analiza el valor CT. El CT es el ciclo a partir del cual es amplificado la mitad del contenido del DNAc. El valor del CT es inversamente proporcional a la cantidad de DNAc. Los niveles relativos de ARN mensajero se normalizaron con un gen "*housekeeping*" o gen control: HPRT o 18s. Para el análisis de los datos, el valor obtenido del gen de interés fue estandarizado por el valor de HPRT o del 18S para cada muestra y fue expresado comparado en el valor promedio del grupo control.

Nombre	5' - 3'	Primers
HPRT	FW	AGCCGACCGTTCTGTCAT
	RV	GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC
	PB	CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGA
18S	FW	CGGCTACCACATCCAAGGAA
	RV	GCTGGAATTACCGCGGCT
	PB	GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA
NRA41 rat	FW	CTGTTGCTAGAGTCCGCCTTTC
	RV	CAGGCCTGAGCAGAAGATGAG
	PB	CCTCCGCCTGGCCTACCGATCTAA
NR4A2 rat	FW	GCTGAAGCCATGCCTTG TG
	RV	GCTGTATTCTCCCGAAGAGTGGTA
	PB	TCGCCTCAAGGAGCCAGCCCC

Nombre	5' - 3'	Primers
NR4A3 rat, mouse	FW	GAAGGAAGTTGTGCGTACAGATAGTC
	RV	CTCGGACAAGGGCGTTCAT
	PB	CCACTACAACAGGAGCCCTCGCAGC
NRA41 mouse	FW	TCTGCCTTCCTGGAACCTTCA
	RV	CAGGCCTGAGCAGAAGATGAG
	PB	CCTCCGCCTGGCCTACCGATCTAA
NR4A2 mouse	FW	GCTGAAGCCATGCCTTGTG
	RV	GCTGTATTCTCCCGAAGAGTGGTA
	PB	TCGCCTCAAGGAGCCAGCCCC
ACCa1	FW	TGGGCGGGATGGTCTCTTT
	RV	AGTCGCAGAAGCAGCCCATT
	PB	ACCTTTGAAGATTCGTCAGGATCTTTGATGA
B1-adr	FW	CCCCAAGTGCTGCGATTTC
	RV	AGGTACACGAAGGCCATGATG
	PB	TCGTCCGTCGTCTCCTTCTACGTGC
B2-adr	FW	GTGGATCGCTATGTTGCTATCACA
	RV	CACTCGGGCCTTATTCTTGGT
	PB	CGCCCTTCAAGTACCAGAGCCTGCT
B3-adr	FW	CACCGCTCAACAGGTTTGATG
	RV	CCCAGAAGTCCTGCAAAAACG
	PB	ACGTGAAGGGCCGTGAAGATCCAGC
BMP7	FW	TCCTCACTGACGCCGACAT
	RV	GGTATCGAGGGTGAAGAATTCT
	PB	TCATGAGCTTCGTCAACCTAGTGAACATG
CIDEA	FW	CCTACGACATCCGATGCACAA
	RV	TCTGTGCAGCATAGGACATAAACC
	PB	CTTCAAGGCCGTGTTAAGGAATCTGCTG

Nombre	5' - 3'	Primers
CPT1-B	FW	TCCAAACGTCCTGCCTAAGCT
	RV	GGCCGCACAGAATCCAAGT
	PB	CGTGCCAGCCACAATTCACCGG
CPT1-C	FW	CGCTCCTGGAAAAGGAATCTC
	RV	CGGGACCACACCAGCAA
	PB	CGTGTCTGGAATGACTTT
CPT1-L	FW	CCCTGGGCATGATTGCAA
	RV	GACGCCACTCACGATGTTCTT
	PB	CCTAGACACCACTGGCCGCATGTCA
PGC1 α (PPAR γ C1 α)	FW	CGATCACCATATTCCAGGTCAAG
	RV	CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT
	PB	AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA
PPAR γ	FW	CGGTTTCAGAAGTGCCTTGCT
	RV	CGCCAACAGCTTCTCCTTCTC
	PB	ATGTCTCACAATGCCATCAGGTTTGGGC
SREBP1	FW	GCGGCTGTTGTCTACCATAAGC
	RV	TGTTGCCATGGAGATAGCATCTC
	PB	ACCAGCTGCATGCCATGGGCAAGTA
UCP-1	FW	CGATGTCCATGTACACCAAGGA
	RV	CCCGAGTCGCAGAAAAGAAG
	PB	ACCGACGGCCTTTTTCAAAGGGTTTG
FASN		Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref.Mm01253292_m1)
PDRM16		Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref. Mm01266512_m1)

Nombre	5' - 3'	Primers
UCP-3		Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref Rn00565874_ml)
Arginase	FW RV PB	TCCACCCTGACCTATGTGTCATT CCTGGTACATCTGGGAACTTTCC ACATCAACACTCCCCTGACAACCAGCTCT
NOS	FW RV PB	TGACGCTCGGAACTGTAGCA TGAAGTCATGTTTGCCGTCCT CAATGGCAACATCAGGTCGGCCA
MAC2	FW RV PB	CCAACGCAAACAGGATTGTTCT CCTGCTTCGTGTTACACACAATG ATGTTGCCTTCCACTTTAACCCCCGC
PPAR α	FW RV PB	Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref. Mm004409939_m1)
IL6	FW RV PB	Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref. Mm00446190_m1)
TNF α	FW RV PB	Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref. Mm99999068_m1)
EMR1	FW RV PB	Cebadores comerciales proporcionados por <i>Applied Biosystems</i> (Ref. Mm00802529_m1)

Tabla 3: Oligonucleótidos y sondas de hidrólisis para la PCR en Tiempo Real.

2.5. DISEÑO DE CEBADORES

Para el diseño de los cebadores o primers fue utilizado el programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems*). Los diseños están basados en las secuencias disponibles en la página del pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Los primers que el programa no diseñaba se compraron ya diseñados a *Applied Biosystems*.

2.6 WESTERN BLOT

El análisis mediante western blot de las distintas proteínas estudiadas se realiza con base en protocolos estandarizados por nuestro grupo de investigación.

2.6.1. Extracción de proteína (Extracción de las proteínas totales)

El proceso de extracción de proteínas se lleva a cabo en frío, sobre hielo.

Se corta el tejido que se hallaba conservado a -80°C (sin dejar que se descongele) y se pesa una cantidad aproximada (que varía en función del tipo de tejido del que queremos extraer las proteínas) y se colocan las muestras en tubos de 2ml con una bola de acero y 1 ml de buffer o tampón de lisis (1ml por cada 0,5 gramos de tejido aproximadamente).

Tampón de lisis: 50mM HEPES a pH 7,4; 1% Tritón X-100; 50mM NaCl; 0,1M NaF; 10mM Ortovanadato sódico (Na_3VO_4); 0,1% SDS; 10 μl de Aprotinina 10mg/ml; 2mM Benzamidina; 2mM PMSF; rellenar con agua destilada hasta 100ml.

Se lisa el tejido por homogenización mecánica en un homogenizador (Tissue Lysser) hasta su disgregación completa.

Se microcentrífuga 20 min a 13000rpm a 4°C . Se recoge el sobrenadante pasándolo a otro tubo de 1,5 ml autoclavado, evitando la capa superior (lípidos en el caso de algunos tejidos) y el pellet. En el caso del tejido adiposo es necesario hacer otra centrifuga con el fin de eliminar los lípidos que puedan quedar.

El contenido de proteínas se cuantifica mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Cat. 500-006 Bio-Rad Laboratories, Inc.) con ayuda de un espectofotómetro Multiskan Go (Thermo scientific).

Después se realizan alícuotas con una concentración de $20\mu\text{g}/16\mu\text{l}$ de proteínas. Se le añade el tampón de carga 1x (tampón carga 5x: 20% β -mercaptoetanol; 50% glicerol; 10% SDS; 0,5% azul de bromofenol, 0,25 M tris pH 6,8, completar con agua destilada) que neutralizará la carga de las proteínas. Estas alícuotas serán utilizadas para cargar los geles. El tampón de carga tiene un color azul característico lo que nos va a permitir observar un frente de carga.

2.6.2. Electroforesis

La separación de las proteínas se realiza por electroforesis en geles SDS-PAGE, separándose las proteínas por peso molecular. Cuando una mezcla de proteínas ionizadas y con carga neta es colocada en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta. Los geles están compuestos por dos fases: una fase inferior o separadora (permite la separación de las proteínas exclusivamente en función del peso) y una fase superior o stacking (que se utiliza para homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador). El porcentaje de acrilamida del gel separador varía en función del tamaño de las proteínas que queremos estudiar. Los geles más frecuentemente utilizados tienen un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del 6,5%, 8% o 10%.

Geles separadores:

Gel 6,5%: 2,456 ml H₂O; 5,06 ml Tampón A (90,1 g Tris-HCl, 2 g SDS, 1 l H₂O; pH=8.8); 2,187 ml Acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 20:1; Acrylamide: N-N'-methylene-bis-acrylamide; Cat # 161-0156; Bio-Rad); 10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; T9281-100ml; Sigma-Aldrich) y 56,25 µl APS (amoniun persulfate, Sigma).

Gel 8%: 4,6 ml H₂O; 2,5 ml (Tris-HCl 1,5M pH 8,8); 100 µl SDS 10% (sodium dodecyl sulfate); 100 µl APS 10% (amoniun persulfate, Sigma); 6 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; T9281-100ml; Sigma-Aldrich); 2,7 ml Acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 20:1; Acrylamide: N-N'-methylene-bis-acrylamide; Cat # 161-0156; Bio-Rad).

Gel 10%: 4 ml H₂O; 2,5 ml (Tris-HCl 1,5M pH 8,8); 100 µl SDS 10% (sodium dodecyl sulfate); 100 µl APS 10% (amoniun persulfate, Sigma); 4 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; T9281-100ml; Sigma-Aldrich); 3,3 ml Acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 20:1; Acrylamide: N-N'-methylene-bis-acrylamide; Cat # 161-0156; Bio-Rad).

Gel concentrador (común a todos):

Gel concentrador: 1,4 ml H₂O; 0,25 ml (Tris-HCl 1M pH 6,8); 20 µl SDS 10% (sodium dodecyl sulfate); 20 µl APS 10% (amoniun persulfate, Sigma); 2 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; T9281-100ml; Sigma-Aldrich); 0,33 ml Acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 20:1; Acrylamide: N-N'-methylene-bis-acrylamide; Cat # 161-0156; Bio-Rad).

Según el tejido a estudiar, la cantidad total de proteína que se carga puede variar. En general, se cargan 20 µg de proteína total diluidos en 16 µl totales (ya incluido el tampón de carga 1x).

Para determinar el peso de las proteínas se utilizan marcadores de pesos molecular comercial, *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo scientific. Cat# 26616).

Antes de cargar el gel, las alícuotas se colocan en un termoblock a 95°C durante 10 minutos con el fin de desnaturalizar la proteína.

El gel se coloca en una cubeta con tampón de electroforesis (running buffer) y se corre durante 2 horas aproximadamente, primero a 80v y después a 95v, hasta que el frente de carga llegue a la parte inferior.

Tampón de electroforesis 1X (2 L): 6g Tris base; 28,8 g Glicina; 2g SDS; completar con H₂O destilada.

2.6.3. Transferencia

Una vez haya corrido el gel, se coloca con mucho cuidado para evitar que se rompa sobre unas membranas de Polivinildeno fluorado (PVDF) de 0,45 µm (*Immobilon[®]-P. Millipore, Merck, USA*), previamente colocadas sobre el aparato de transferencia y humedecidos con tampón de transferencia 1x. Las proteínas del gel se transferirán a las membranas gracias a una corriente de 0,2-0,3 A (100V) durante 1h 40min. La transferencia se realiza mediante un sistema semiseco utilizando un aparato Trans-blot[®] SD Semi-Dry transfer cell (*Bio-Rad*).

Tampón de transferencia 1x (1L): 8,41 g Tris base; 2,92 g Glicina; 0,36 g SDS, 200 ml metanol (20% (w/v), completar con H₂O destilada

2.6.4. Inmunodetección

Se bloquea la membrana 1h a temperatura ambiente con BSA (seroalbúmina bovina) al 3% (con TBS-Tween al 1%), con BSA al 5% o con Leche al 5% para anticuerpos más inespecíficos.

Se incuba con el primer anticuerpo toda la noche a 4°C en solución de bloqueo o durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con la solución de lavado. Se incuba 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo.

2.6.5 Soluciones usadas

Anticuerpos secundarios más frecuentes: Referencia y Dilución

- *Polyclonal Goat Anti-Rabbit Inmunoglobulins/HRP (ref. P0448, Dako Denmark). 1:5000*
- *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Inmunoglobulins/HRP (ref. P0260, Dako Denmark). 1:5000*
- *Polyclonal Rabbit Anti-Goat Inmunoglobulins/HRP (ref. P0449, Dako Denmark). 1:5000*

Se realizan 3 lavados de 5 minutos con solución de lavado tras el anticuerpo secundario.

Se deja la membrana en reposo y en oscuridad 3 minutos en el sustrato quimioluminiscente (Kit de quimioluminiscencia *Pierce® ECL-Western blotting substrate, Thermo scientific*).

Se coloca en un casete de autorradiografía con películas fotográficas en un cuarto con luz roja (*Fuji Medical X-Ray Film, Super HR-U*) y se revelaban las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

Cuando se incubaba la misma membrana con varios anticuerpos sucesivos era necesario dejarla 30 minutos en una solución de “stripping” a 55°C para liberar el anticuerpo de la membrana antes de incubar con el siguiente. A continuación se lavaba bien con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos) y se procedía a bloquear de nuevo la membrana.

Solución de lavado (1L)- TBS-Tween:

100ml TBS 1X; 1ml de Tween 20; completar con H₂O destilada.

TBS 10X (1L): *24,2g Tris base; 80 g NaCl; completar con H₂O destilada. pH 7,6.*

Solución de bloqueo (100 ml):

BSA 3%: *3 g de BSA (seroalbúmina bovina, Sigma Aldrich); completar con TBS-Tween® 1X (Sigma, p-9416).*

BSA 5%: *5 g de BSA (seroalbúmina bovina, Sigma Aldrich); completar con TBS-Tween® 1X (Sigma, p-9416).*

Leche 5%: *5 g de leche en polvo; completar con TBS-Tween® 1X (Sigma, p-9416).*

Sustrato de quimioluminiscencia (ECL-Western blotting substrate) (Termo Fisher): solución 1 (1/1)

Solución de estripado (100 ml): *700 µl β-mercaptoetanol; 20 ml SDS 10%; 6,25 ml Tris-HCl 1M pH 6,8; completar con H₂O destilada.*

Anticuerpos primarios utilizados.

- ACC α (H-76) (sc-30212), Santa Cruz Biotechnology.
- AMPK α 1 (#07-350), Millipore, Merck.
- AMPK α 2 (#07-363), Millipore, Merck.
- CPT1-L (H-95) (sc-20669), Santa Cruz Biotechnology.
- FAS (H-300) (sc-20140), Santa Cruz Biotechnology.
- GCK (Glucokinasa) (H-88) (sc-7908) Santa Cruz Biotechnology
- GLUT2 Abcam
- GLUT-4 (sc-7938), Santa Cruz Biotechnology.
- GP (PYGB/L/M) (sc-46347) Santa Cruz Biotechnology
- GS2 (H-49)(sc-99029) Santa Cruz Biotechnology
- IDE (sc-27265) Santa Cruz Biotechnology
- IRS 2 (sc 8299) Santa Cruz Biotechnology
- IRS-1 (H-165) (sc-7200), Santa Cruz Biotechnology.
- JNK 1/3 (c-17) (sc-474), Santa Cruz Biotechnology.
- LPL (sc-32885), Santa Cruz Biotechnology.
- PCK1(PEPCK1) (ab70358) Abcam
- Phospho-ACC (Ser79) (#07-303) Millipore, Merck.
- Phospho-AKT (Ser473) (#9271), Cell signaling.
- Phospho-AMPK α (Thr172) (#2535), Cell signaling.
- Phospho-IRS (Tyr612) (44-816G), Invitrogen
- Phospho-SAPK/JNK (Thr183/tyr185) (#4671), Cell signaling.
- PTEN (A2B1) (sc-7974), Santa Cruz Biotechnology.
- UCP-1 (Ab10983) → Abcam

Housekeeping: β -actin (A5316- Sigma-Aldrich, USA). GAPDH (CB1001-Calbiochem/Millipore, Merck), α -Tubulina (T-5168- Sigma-Aldrich, USA).

Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:1000 excepto UCP1 (1:10000).

2.6.6 Cuantificación western blot

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

2.7 MEDICIÓN DE OTROS PARÁMETROS

2.7.1 Extracción de triglicéridos (TG)

En primer lugar se extraen 50 mg de tejido del animal (hígado generalmente) del total de tejido guardado a -80°C , y se coloca en un tubo de 2ml con una bola de acero. A este tubo se le añaden 0,5ml de una solución triclorometano-cloroformo/metanol (2:1). Esta solución se realiza en recipiente de cristal. Se homogeniza mecánicamente en un homogenizador (*Tissue lyser*, *Quiagen*) y se deja rotar de 1 a 3 horas a temperatura ambiente.

Tras este tiempo, se le añade a cada tubo 0,3ml de agua MiliQ y se microcentrifuga durante 20 min a 13000rpm y a temperatura ambiente (25°C). Se elimina la capa superior que corresponde a la inorgánica, evitamos la capa del medio que se corresponde con restos celulares y transferimos la capa inferior, que estaría compuesta por lípidos disueltos en cloroformo, a un nuevo tubo de 1,5ml.

Esto se deja evaporar toda la noche o se evapora con el SpeedVac Plus. Cuando este todo evaporado, se añade una cantidad conocida de cloroformo (0,5ml o 0,8ml en el caso de animales con dieta alta en grasa) y se agita fuertemente.

2.7.2 Análisis Triglicéridos

De esta cantidad conocida se extraen $15\mu\text{l}$ para cada tubo (por duplicado) y se deja evaporar. Cuando están evaporados se le añade $150\mu\text{l}$ de reactivo de cuantificación de triglicéridos colorimétrico (ref. 1001314, Spinreact, Barcelona). Con cada muestra se carga la placa, incluyendo la recta de concentración conocida, se incuba 5 min a 37°C y se mide la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro (Multiskan Go). Con los datos de la recta de regresión se crea una ecuación y se calcula la concentración de los triglicéridos. Estos datos se ajustan con la cantidad con la que diluimos el pellet y con la cantidad de tejido pesado dándonos una cantidad de miligramos de triglicéridos por gramos de tejido.

Para las muestras de suero/plasma el protocolo de cuantificación es de manera similar. Las muestras se diluyen 1:10 (o 1:20 si son HFD) y se añade $15\mu\text{l}$ de esta dilución de cada muestra en cada pocillo por duplicado.

2.7.3 Análisis de ácidos grasos libres no esterificados (NEFAS)

El análisis de los nefas es igual que el de los triglicéridos salvo por el reactivo colorimétrico utilizado (Wako chemicals, USA) y se usan dos reactivos que se añaden consecutivamente tras una incubación de 5min a 37°C del reactivo 1. La absorbancia se mide a 620nm.

Para muestras de suero/plasma las muestras se diluyen 1:10. Se cargan $3,5\mu\text{l}$ de muestra por pocillo y por duplicado. El resto es similar a lo anteriormente explicado.

2.7.4 Análisis de colesterol

El análisis del colesterol es igual que el de los triglicéridos cambiando el reactivo a utilizar (ref. 1001093, Spinreact, Barcelona).

2.7.5 Test de tolerancia a la glucosa y Test de tolerancia a la insulina

Antes del sacrificio se realizan test de tolerancia a la glucosa (GTT) e insulina (ITT). Los niveles basales de glucosa en sangre se miden después de un ayuno de toda la noche (12h) con un glucómetro Accucheck (Roche). Para la realización del GTT e ITT se realizó una inyección intraperitoneal de concentración de 2mg/g D-glucose (Sigma) o 0.75U/kg insulina (Sigma-Aldrich) diluidos en suero fisiológico salino. Se hicieron medidas de sangre a tiempos determinados tomando como punto 0 el momento de inyección. Se determinaron valores bajo la curva (AUC).

2.7.6 Tinción Hematoxilina/eosina y Red-oil

Las muestras de tejido adiposo pardo y de hígado se fijan 24 horas en un tampón 10% formalina y se deshidratan y embeben en parafina por un procedimiento estandarizado.

Protocolo de inclusión: Una vez fijado el tejido, se deshidrató para embeberlo en parafina para el posterior corte de secciones de 4 micrómetros de grosor, que se recogieron en portaobjetos xilanizados (*Histobond Adhesión Micro Slides; Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania*). Los cortes se dejaron secar una noche a 60°C. Para la inclusión se siguió un protocolo estándar, utilizando un procesador de tejidos automático *Citadel-Shandon*. **Deshidratación:** Alcohol de 70% (1 hora), 2 x Alcohol de 96% (1 hora), 3 X Alcohol de 100% (1X1hora, 2X2horas), 3 X Xilol (1X1hora, 2X2horas). **Inclusión en parafina:** Parafina 2 (2 horas).

Con un micrótopo se hacen secciones de 3 µm. Estas son teñidas en un proceso estandarizado con Hematoxilin/Eosin Alcoholic (BioOptica) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La diferenciación adipogénica se identifica mediante la tinción estandarizada de red-oil (0,7 mg en 100mL de propilen-glicol).

2.7.7 Determinaciones séricas: Insulina y leptina

RIA de insulina en suero.

Los niveles circulantes de insulina se determinaron mediante la utilización de un radioinmunoensayo (RIA). Los reactivos utilizados forman parte de un kit comercial y se siguieron las instrucciones del fabricante (HI-14K: *Millipore Corporation, Billerica Merck, MA*).

Kit Elisa insulina/leptina

Para la realización del kit de Elisa, tanto de leptina como de insulina necesitamos un kit comercial. Las medidas de leptina e insulina se llevaron a cabo mediante ELISA (EZRMI-13K Rat/Mouse Insulin ELISA y EZML-82K Mouse Leptin ELISA: *Millipore Corporation, Billerica, Merck, MA*). El protocolo a seguir es el indicado en las instrucciones del fabricante.

3. Análisis estadístico y representaciones gráficas

Los test estadísticos utilizados varían en función del experimento. Los datos (media \pm SEM) fueron representados con relación a las unidades de expresión de los animales tratados respecto al control (porcentaje). Los valores de probabilidad (p) de que la hipótesis nula sea correcta considerados fueron representados por un asterisco en la gráfica de acuerdo al siguiente código: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Para el análisis, se excluyeron las muestras y/o animales cuyo valor se desviaba ± 2 veces la desviación estándar, o cuando se observara un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental.

Previo al análisis estadístico se realiza un test de normalidad que contrasta la normalidad de un conjunto de datos. En este caso, se plantea como hipótesis nula que una muestra del conjunto de datos proviene de una población normalmente distribuida.

Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal se realizan test estadísticos paramétricos. Si se compara dos poblaciones empleamos el T-test (una o dos colas, dependiendo si conocemos o desconocemos el efecto de la variable estudiada), en caso de terminar la diferencia entre las medias de tres o más poblaciones que siguen una distribución normal y son independientes entre sí empleamos un ANOVA de una vía. En este supuesto, en caso de que sí existiese diferencia significativa realizaríamos, *a posteriori*, un test de Tukey para comparar los grupos de dos en dos y comprobar cuáles son los grupos que causan significación.

Cuando la población no pasa el test de normalidad, se considera que dicha población no siguen una distribución normal y se realizaría test estadísticos no paramétricos, evento no ocurrido durante el análisis de los datos de la presente tesis.

Las representaciones gráficas y el análisis estadístico fueron realizados con el software Graphpad InStat 3 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA).



RESULTADOS





RESULTADOS

OBJETIVO 1.

El papel endógeno de *Nur77* en la homeostasis metabólica y energética

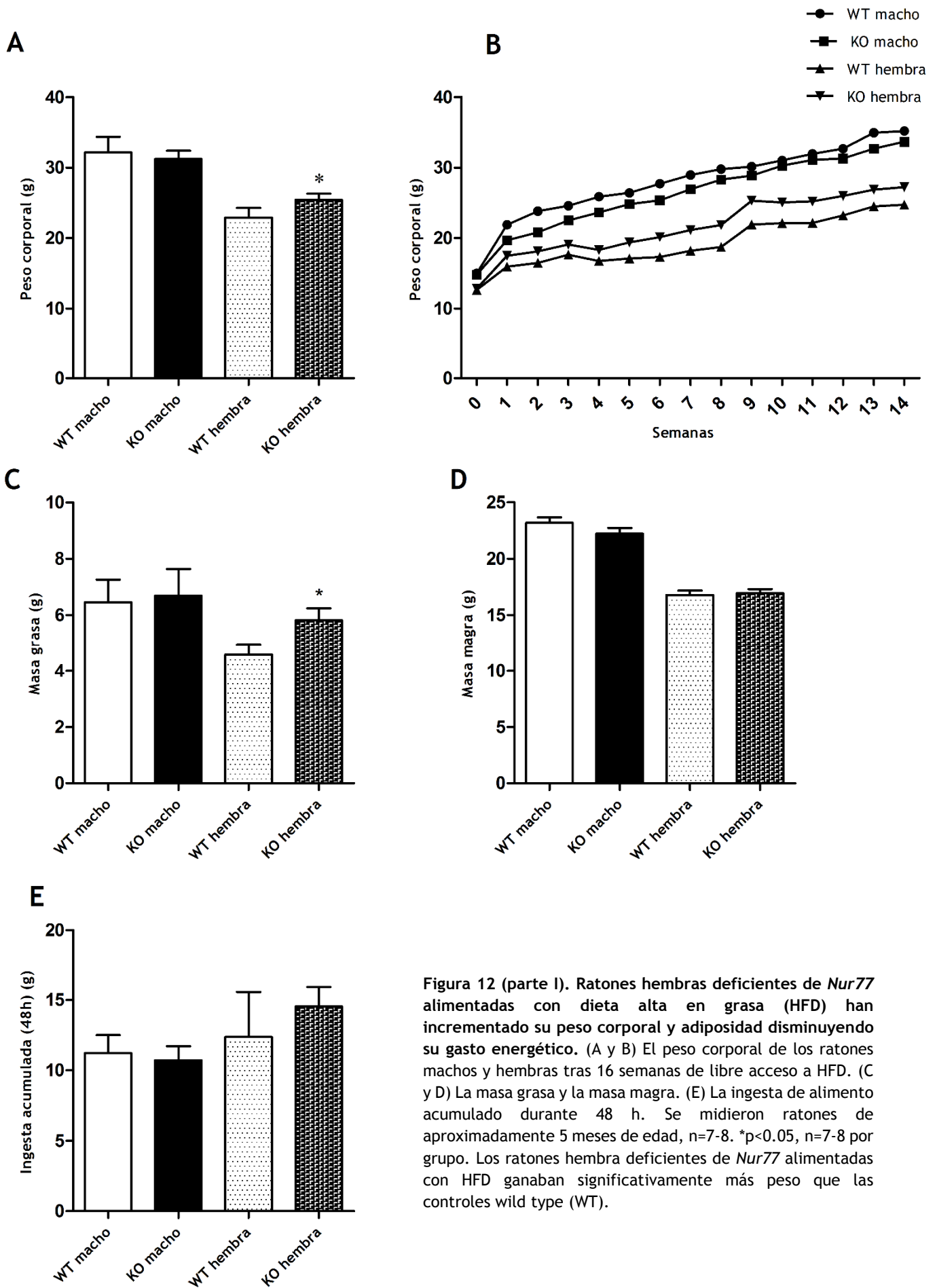
1. 1. LOS RATONES HEMBRA KO PARA *NUR77* ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA HAN INCREMENTADO SU PESO CORPORAL Y SU ADIPOSIDAD

Lo primero que nos preguntamos y dado los antecedentes que explicamos en la introducción, era si los ratones *Nur77* KO podrían tener resistencia a las dietas altas en grasa o al contrario ser más sensibles a la misma. Por ello comparamos ratones de la misma edad machos y hembras WT y *Nur77* KO que se mantuvieron con dieta alta en grasa desde las 4 semanas de edad (45% kcal grasa, 4,73 kcal/g) y durante 16 semanas para evaluar sus fenotipos metabólicos. Aunque no se encontraron diferencias en el peso corporal entre los machos WT y *Nur77* KO cuando fueron alimentados con dieta alta en grasa (figura 12 A y B), las hembras *Nur77* KO ganaban significativamente más peso que las hembras WT alimentadas con dieta alta en grasa (figura 12 A y B).

Cuando realizamos el análisis de la composición corporal mediante el NMR cuantitativo nos encontramos que las hembras *Nur77* KO alimentadas con HFD durante 16 semanas acumulaban más grasa que las WT (figura 12 C) y sin existir cambios en la masa magra (figura 12 D). Sin embargo, al realizar el mismo análisis con los machos, no se observaron diferencias en la composición corporal de los machos (figura 12 C y D). No se encontraron diferencias en la ingesta diaria de HFD medida al final del tratamiento entre los ratones deficientes de *Nur77* y los WT (figura 12 E).

1.2 LA SUPRESIÓN DE *NUR77* DISMINUYE EL GASTO ENERGÉTICO EN HEMBRAS ALIMENTADAS CON HFD

Lo siguiente fue ver cómo podía verse afectado el gasto energético, y se encontró que cuando los ratones se alimentaban con dieta alta en grasa, el gasto energético era menor en las hembras deficientes en *Nur77* comparada con las hembras WT, mientras que en los machos no se detectaron diferencias (figura 12 F). Los resultados son similares cuando se corrige el gasto energético con la masa magra (figura 12 G). A pesar de esta disminución en el gasto energético, los niveles de actividad locomotora espontánea permanecieron sin cambios entre *Nur77*KO y WT tanto en machos como en hembras (figura 12H), lo que sugiere que podrían existir otros mecanismos, independientes de la actividad locomotora que afectarían al gasto energético en los ratones hembra *Nur77* KO. El cociente respiratorio (RQ) tampoco muestra diferencias durante el ciclo circadiano (figura 12 K), sin cambios ni durante la fase de luz (figura 12 I) ni durante la fase de oscuridad (figura 12 J) indicando que la ausencia de *Nur77* no modula el reparto de nutrientes.



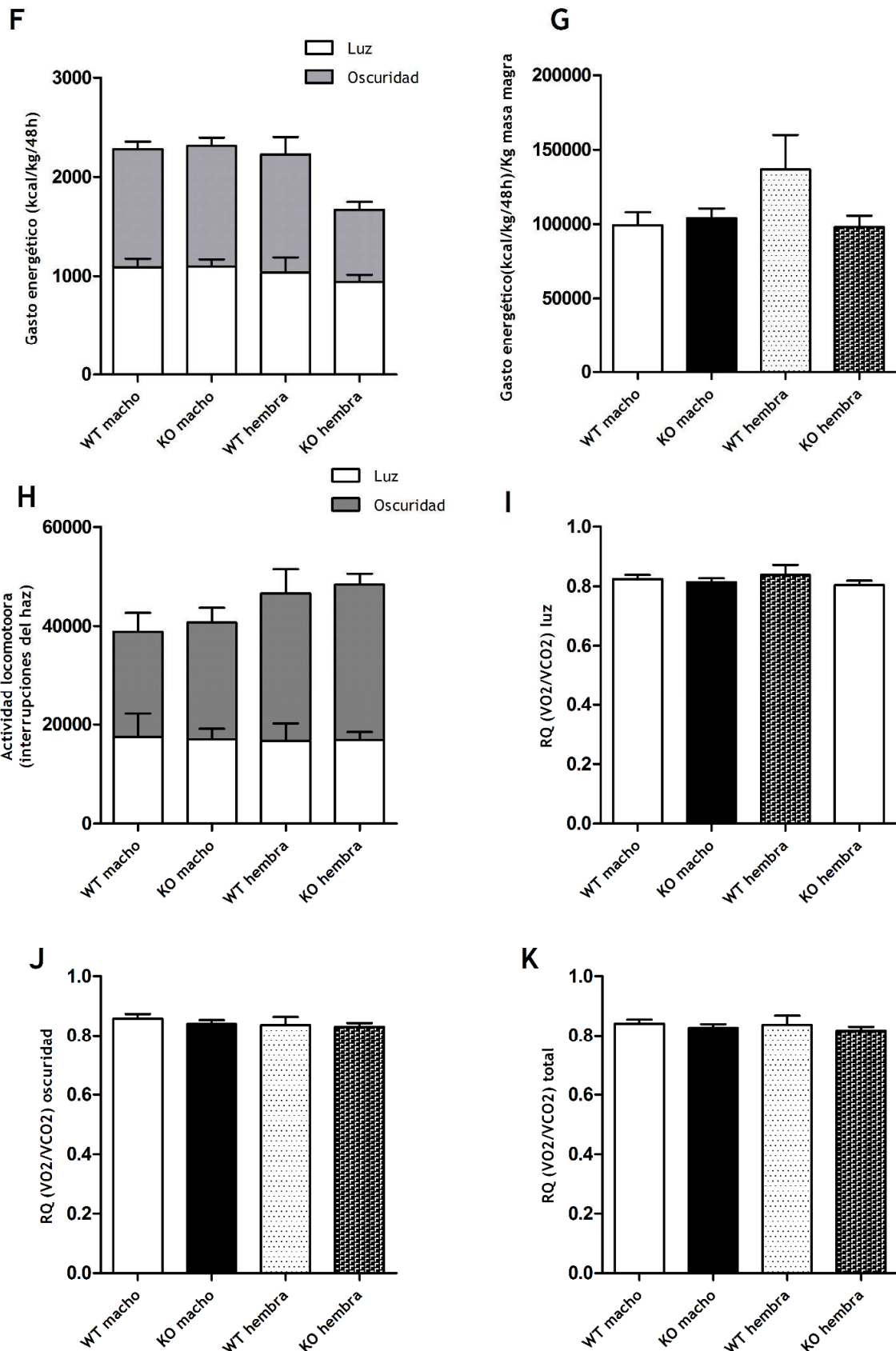


Figura 12 (parte II). Ratones hembras deficientes de *Nur77* alimentadas con dieta alta en grasa (HFD) han incrementado su peso corporal y adiposidad disminuyendo su gasto energético. (F) 48 h del gasto total de energía determinado por calorimetría indirecta. (G). El gasto de energía corregida por kg de masa libre de grasa. (H) La actividad locomotora durante un periodo de 48 h corregida por kg de masa libre de grasa. (I, J y K) El cociente respiratorio. Se midieron ratones de aproximadamente 5 meses de edad, n=7-8 por grupo. La disminución del gasto energético fue consistente con el aumento del peso y la grasa en ratones *Nur77* KO después de HFD.

1.3 LAS HEMBRAS KO *NUR77* ALIMENTADAS CON HFD HAN AUMENTADO EL ALMACENAMIENTO DE GRASA HEPÁTICA

Debido a los datos obtenidos en los que encontrábamos un aumento de peso corporal y ganancia de masa grasa, quisimos averiguar si esto se relacionaba con un incremento de almacenamiento de grasa en el hígado, para ello medimos el contenido de triglicéridos y encontramos un incremento del contenido de triglicéridos hepáticos totales en hembras deficientes de *Nur77* alimentadas con HFD en comparación con los ratones WT (figura 13A). No encontramos diferencias significativas en el análisis de NEFAS (figura 13B). Al realizar análisis e expresión mediante qPCR comprobamos que los niveles más altos de triglicéridos son consistentes con la sobrerregulación de la expresión de RNA mensajero de SREBP1 y ACCalfa (figura 13C) y a nivel proteico con la elevación de FAS, un marcador lipogénico (figura 13D) y con un descenso de los niveles de pJNK1 (figura 13E), una kinasa fuertemente implicada en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en hembras deficientes *Nur77* alimentadas con HFD comparadas con las hembras WT. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de proteína JNK1 total en hembras (figura 13F). Vistos en conjunto, estos datos sugieren que la falta de *Nur77* favorece el almacenamiento de lípidos en el hígado de los ratones hembra deficientes en *Nur77* alimentadas con HFD.

1.4 LAS HEMBRAS *NUR77* KO ALIMENTADAS CON HFD EXHIBEN DESCENSO EN LA LIPOLISIS EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Observando una mayor cantidad de masa grasa en hembras deficientes en *Nur77* alimentadas con HFD en comparación con sus controles WT, medimos el contenido de triglicéridos por gramos de grasa y no encontramos diferencias entre los dos grupos (figura 14A). Sin embargo, cuando calculamos el contenido de TG del total de masa grasa, encontramos un aumento significativo en hembras *Nur77* KO comparadas con las WT (figura 14B). Para investigar en más detalle los mecanismos moleculares implicadas en el metabolismo lipídico del adipocito usamos grasa epididimal en machos y grasa parametrial en hembras y medimos expresión de proteínas y RNAm.

Encontramos un descenso significativo en la expresión de RNAm de ACCalfa y FAS (figura 14C) y sin cambios en los niveles de los genes SREBP1 o LPL en el tejido adiposo blanco parametrial de hembras *Nur77* KO alimentadas con HFD (figura 14C).

Para profundizar en los mecanismos adyacentes implicados en el catabolismo de lípidos, examinamos los niveles de proteínas de la lipasa sensible a hormonas (HSL), una enzima clave en la movilización de ácidos grasos y lipólisis en WAT. Aunque la deficiencia en *Nur77* no cambia los niveles de HSL fosforilado totales, el ratio pHSL/HSL disminuye en el WAT parametrial de ratones hembra deficientes en *Nur77* (figura 14D).

En conjunto, estos resultados indican que la lipólisis está inhibida en WT de hembras *Nur77* deficientes alimentadas con HFD.

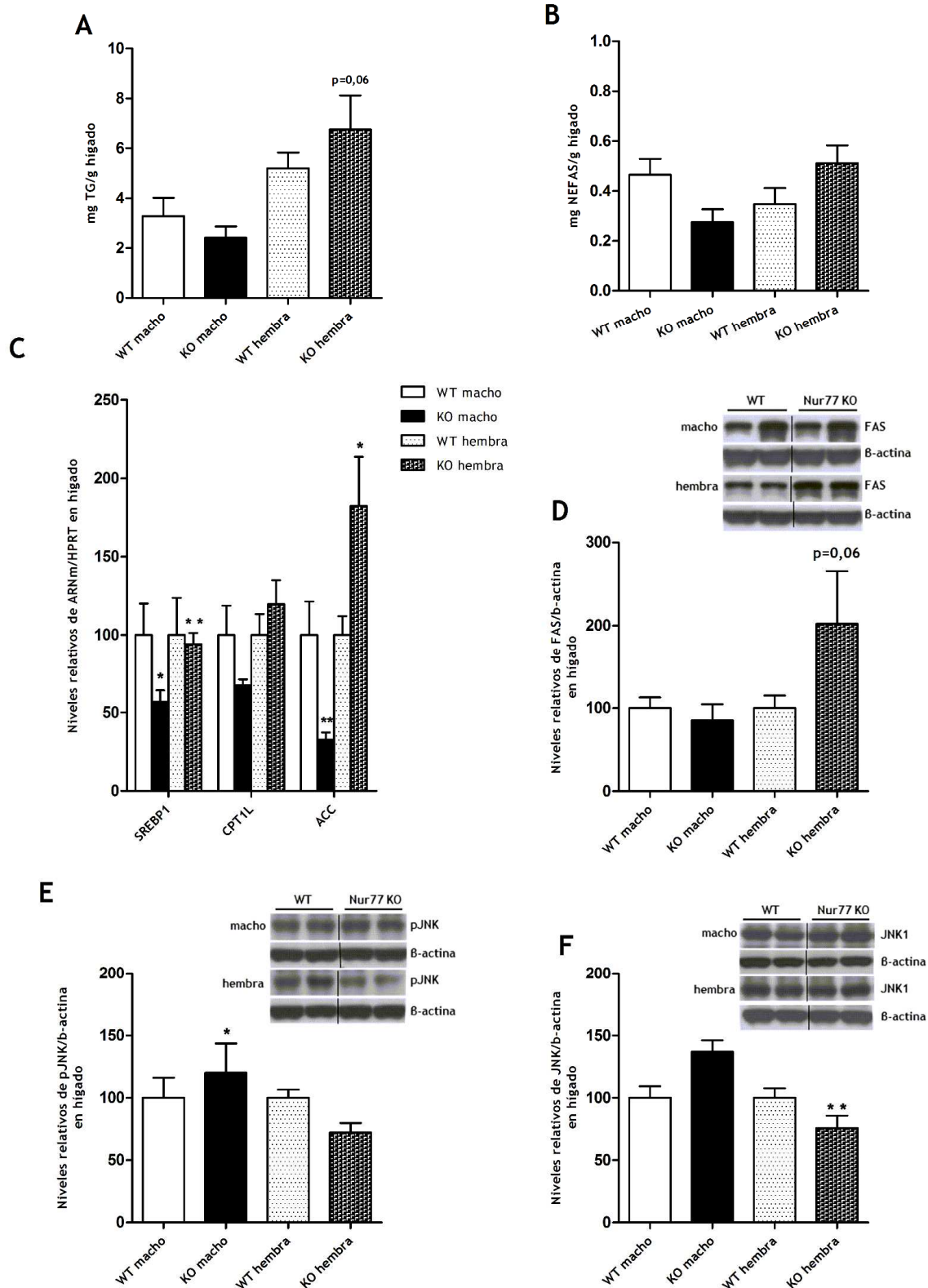


Figura 13. Ratones hembra Nur77 KO alimentados con HFD han aumentado el almacenamiento hepático de grasa. (A) Contenido de triglicéridos (TG) totales en hígado después de la exposición HFD y (B) contenido de ácidos grasos libres NEFAS. (C) Niveles de expresión de ARNm de enzimas hepáticas: SREBP, CPT1 y ACC. Niveles de proteína: (D) FAS (ácido graso sintasa), (E) pJNK1 (Quinasa fosforilada c-Jun N-terminal) y (F) JNK1 en el hígado de ratones WT y Nur77 KO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7-8$ por grupo. De acuerdo con aumento del peso corporal y el aumento de la masa grasa, se encontró un mayor contenido hepático total de TG en ratones hembra deficientes en Nur77 alimentados con HFD en comparación con los ratones WT. Los niveles más altos de TG hepáticos fueron consistentes con una sobre regulación de los niveles de proteína de FAS y con niveles disminuidos de pJNK1 en ratones hembra Nur77 KO alimentados con HFD en comparación con los ratones WT. Sin embargo, no se detectaron cambios en el total de los niveles de proteína JNK1 en las hembras. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la falta de Nur77 favorece el almacenamiento de lípidos en el hígado de hembras Nur77 deficientes alimentados con HFD.

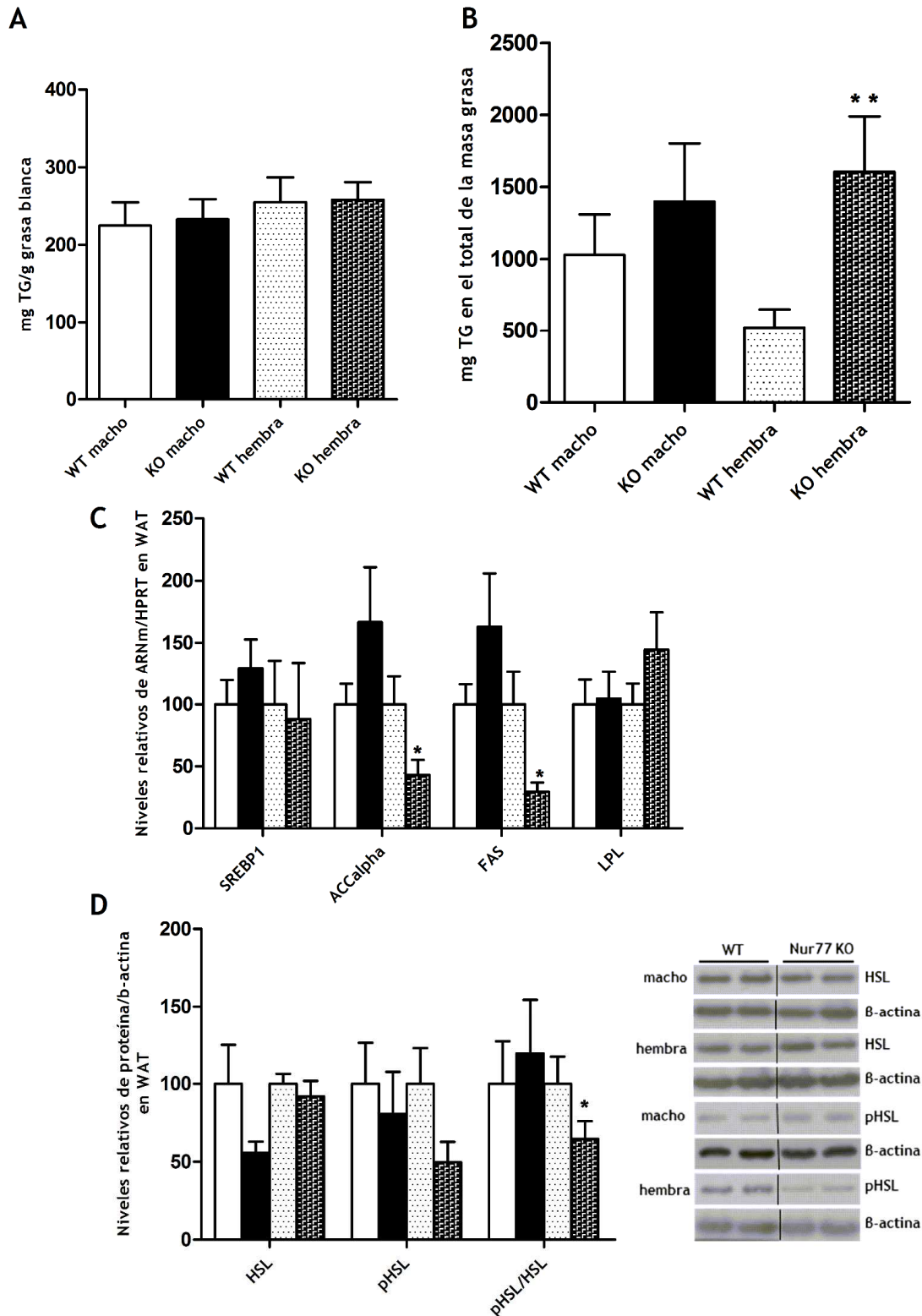


Figura 14. Ratones hembra Nur77 KO alimentados con HFD mostraban una disminución de la lipólisis en el tejido adiposo blanco (WAT). (A) Contenido de triglicéridos por gramos de grasa. (B) contenido de TG del total de masa grasa. (C) La expresión del mRNA de enzimas implicadas en el almacenamiento de lípidos: SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), ACC α (acetil-CoA carboxilasa), FAS, y LPL (lipoproteína lipasa) en WAT después de 16 semanas de HFD. * $p < 0,05$, $n = 7-8$ por grupo. Se encontró una disminución significativa en la expresión de ARNm de ACC α y FAS en el WAT de hembras Nur77 KO. (D) Los niveles de proteína HSL (lipasa sensible a hormonas), pHSL, y la relación de la pHSL / HSL. * $p < 0,05$, $n = 7-8$ por grupo. En cuanto a otras enzimas, aunque la deficiencia de Nur77 no cambió totalmente los niveles fosforilados de HSL, la relación pHSL / HSL se redujo en el WAT de hembras Nur77 deficientes. En general, estos resultados indican que la oxidación de lípidos se inhibe en el WAT de ratones hembras Nur77 deficientes alimentados con HFD.

1.5 LA SUPRESIÓN DE *NUR77* EN HEMBRAS INCREMENTA LOS NIVELES DE CIDEA EN BAT

Para investigar el mecanismo potencial responsable del descenso del gasto energético en ratones hembra *Nur77* KO, se analizó el BAT. Los adipocitos marrones de hembras *Nur77* KO eran más grandes que los de las hembras WT alimentadas con HFD (figura 15A y B). Contrariamente, los adipocitos de machos *Nur77* KO eran más pequeños que sus controles WT alimentados con HFD (figura 15A y B). El siguiente paso fue medir la expresión de varios marcadores termogénicos en BAT. No había diferencias en los niveles de proteína de UCP1 entre hembras *Nur77* KO y WT (figura 15C) o en la expresión de HSL o pHSL (figura 15D).

Consistentemente, la expresión de RNAm de otros factores implicados en el programa termogénico como UCP3, FGF21, PGC1 α o BMP7 tampoco presentaba diferencias entre los grupos de ratones hembra (figura 15E). También observamos los niveles de CIDEA, ya que se conoce que los ratones que carecen de CIDEA tienen una tasa metabólica más alta, mayor lipólisis en BAT y la temperatura corporal cuando se someten a tratamiento de frío (Zhou, et al., 2003). Encontramos que los niveles de RNAm de CIDEA se incrementaba en BAT de hembras *Nur77* KO (figura 15E). En machos *Nur77* KO solo detectamos un descenso significativo en la expresión del gen UCP3 cuando los comparamos con sus controles WT (figura 15E).



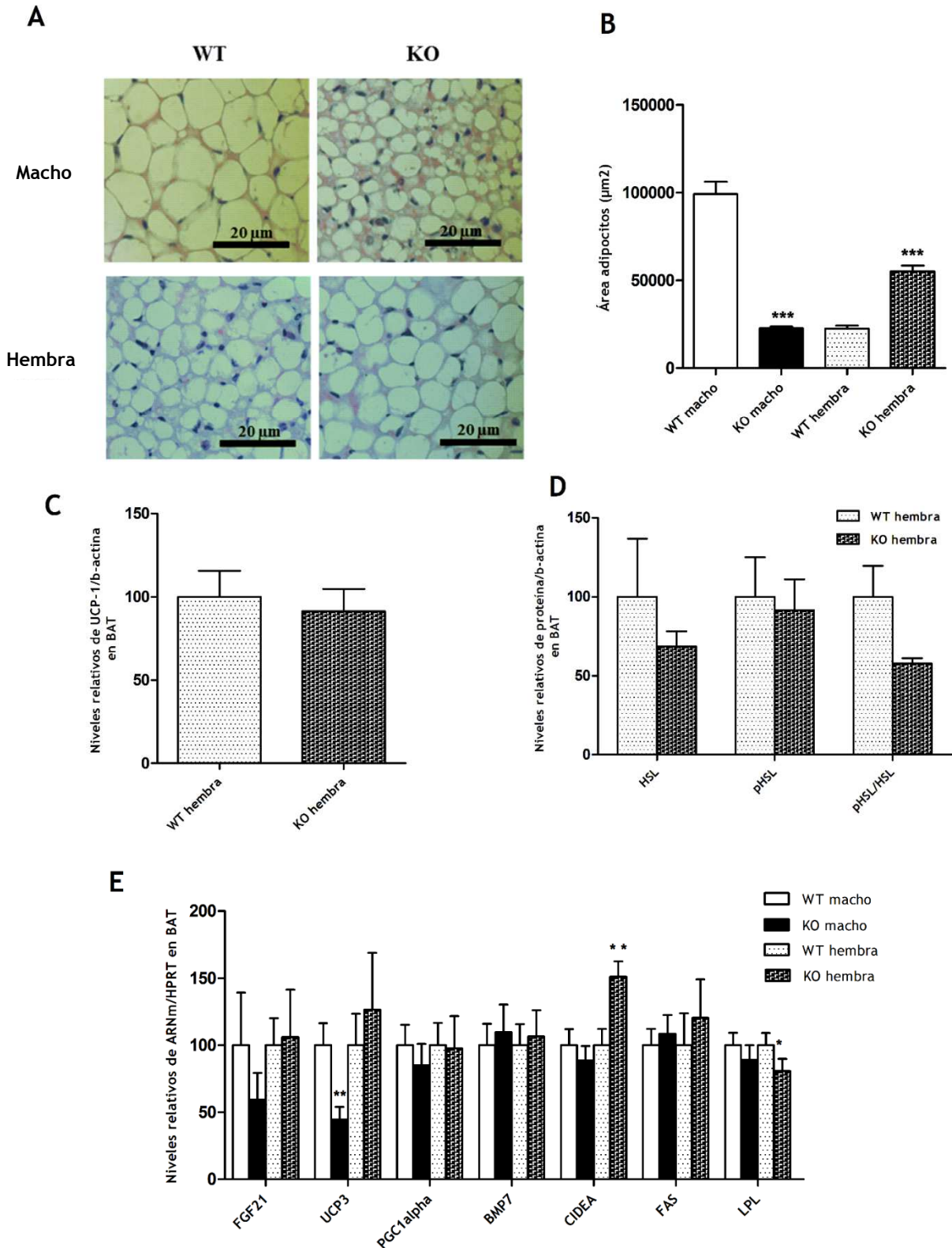


Figura 15. Supresión de Nur77 en las hembras aumenta los niveles de CIDEA en BAT (Brown adipose tissue). (A) Histología de tejido adiposo pardo. Adipocitos. (B). Análisis representativo del tamaño de adipocitos de BAT (C) Niveles de proteína UCP1 en BAT de ratones WT y Nur77 KO después de 16 semanas de HFD. (D) Expresión de mRNA de los factores que intervienen en el metabolismo de los lípidos y la termogénesis: FGF21, UCP3, PGC1α, BMP7, CIDEA y FAS. ** $p < 0,01$, $n = 7-8$ por grupo. No hubo diferencias en los niveles de proteína de UCP1 entre hembras Nur77 KO y WT. En consonancia, la expresión de mRNA de otros factores que intervienen en la termogénesis como UCP3, FGF21, PGC1α o BMP7 también fue alterada en ratones Nur77 deficientes. Sin embargo, los niveles de CIDEA se incrementaron en el BAT de ratones hembra Nur77 KO. En general, esto indica que los niveles más altos de CIDEA en hembras Nur77 deficientes alimentados con HFD podría inducir una disminución de la termogénesis y la disminución de la lipólisis

1.6. LOS RATONES HEMBRA *NUR77* KO TIENEN NIVELES SÉRICOS NORMALES DE NEFAs, TG, COLESTEROL E INSULINA PERO INCREMENTAN LOS NIVELES DE LEPTINA Y GLUCOSA BASAL

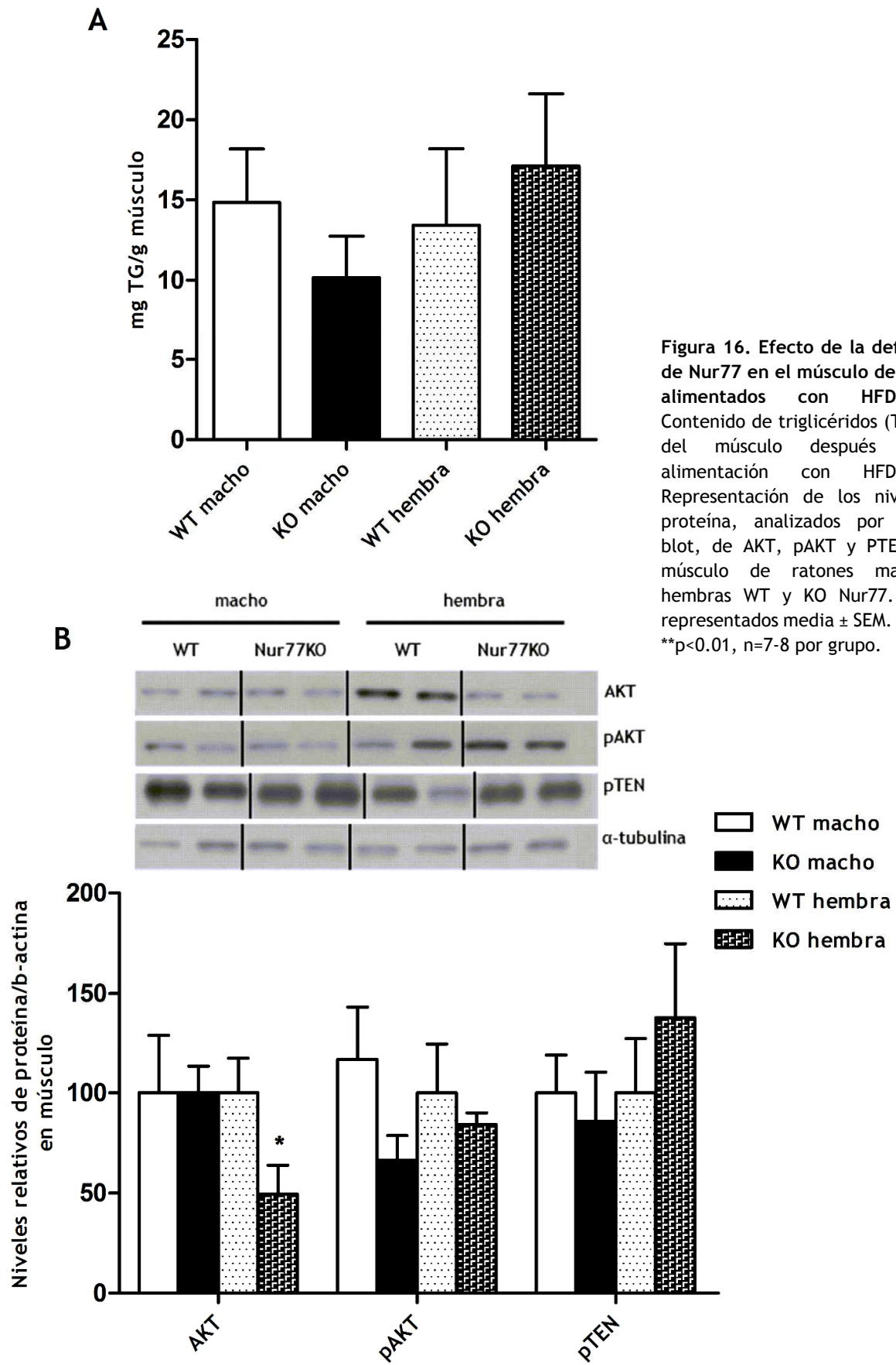
No detectamos ningún cambio significativo en los niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados (NEFAs), TG, colesterol e insulina entre los ratones WT y *Nur77* KO alimentados con HFD (tabla 4). Sin embargo, encontramos un aumento significativo en los niveles de leptina y glucosa basal (ayuno de toda la noche) en hembras deficientes en *Nur77* comparados con las hembras WT (tabla 4).

	WT machos	KO machos	WT hembras	KO hembras
Peso inicial (g)	15,00 ± 0,42	14,80 ± 0,98	12,93 ± 0,23	13,56 ± 0,33
NEFAs (mg/dl)	77,34 ± 9,98	76,49 ± 20,74	36,88 ± 4,27	41,99 ± 2,23
TG (mg/dl)	138,17 ± 21,35	117,66 ± 23,04	80,66 ± 11,31	74,40 ± 3,60
Colesterol (mg/dl)	363,43 ± 14,15	342,77 ± 13,08	246,52 ± 18,21	253,33 ± 18,96
Insulina (ng/ml)	1,71 ± 0,41	2,44 ± 0,92	0,55 ± 0,06	0,79 ± 0,12
Leptina (ng/ml)	9,87 ± 2,05	15,59 ± 4,24	3,99 ± 1,41	9,95 ± 1,96*
Glucosa basal (mg/dl)	93,60 ± 11,47	97,83 ± 12,94	53,00 ± 10,79	80,60 ± 5,30 *

Tabla 4. Parámetros circulantes de NEFAs (non-esterified fatty acids), triglicéridos (TG), colesterol, insulina, leptina y glucosa basal en ratones WT y *Nur77* KO después de 16 semanas de HFD. n=7-8 por grupo. *p<0,05.

1.7 CONTENIDO DE TG Y SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN MÚSCULO

El contenido de TG en músculo no muestra diferencias entre los ratones macho WT y *Nur77* KO, mientras que hay un ligero incremento aunque no significativo en hembras *Nur77* KO cuando las comparamos con sus controles WT (figura 16A). Observamos algunos factores clave que median la señalización de la insulina y encontramos que los niveles proteicos de AKT se reducen en músculo de hembras carentes de *Nur77*, mientras que no hay cambios detectables en pAKT o PTEN (figura 16B).



1.8 HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES *NUR77* DEFICIENTES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA

Nos parecía indispensable realizar un estudio sobre el metabolismo de la glucosa en estos ratones, con lo que medimos parámetros clave de la homeostasis de la glucosa en ratones WT y *Nur77* KO. Este análisis no muestra cambios en las concentraciones de glucosa sérica en ayuno en machos carentes de *Nur77* comparados con sus controles alimentados con HFD (tabla 4). Sin embargo, las hembras *Nur77* KO muestran un aumento de los niveles de glucosa sérica en ayuno comparado con las hembras WT (tabla 4). Por ello decidimos realizar el test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT) a los ratones *Nur77* KO alimentados con HFD y no encontramos diferencias en la tolerancia a la glucosa en machos (figura 17 A, B, C y D) o en hembras (figura 17 E, F, G y H).

Para analizar su sensibilidad a la insulina lo siguiente fue realizar un test de tolerancia a la insulina (ITT) y de nuevo no encontramos diferencias en el descenso de los niveles de glucosa en sangre entre los dos grupos en machos (figura 17 I, J,). Sin embargo, observamos una resistencia marcada a la insulina en hembras *Nur77* KO comparadas con las hembras WT alimentadas con HFD (figura 17 M, N, O y P). Curiosamente, cuando calculamos la glucosa como porcentaje de variación de glucemia, encontramos que tanto machos (figura 17 K y L) como hembras (figura 17 O y P) carentes de *Nur77* muestran mayor resistencia a insulina que sus controles WT.



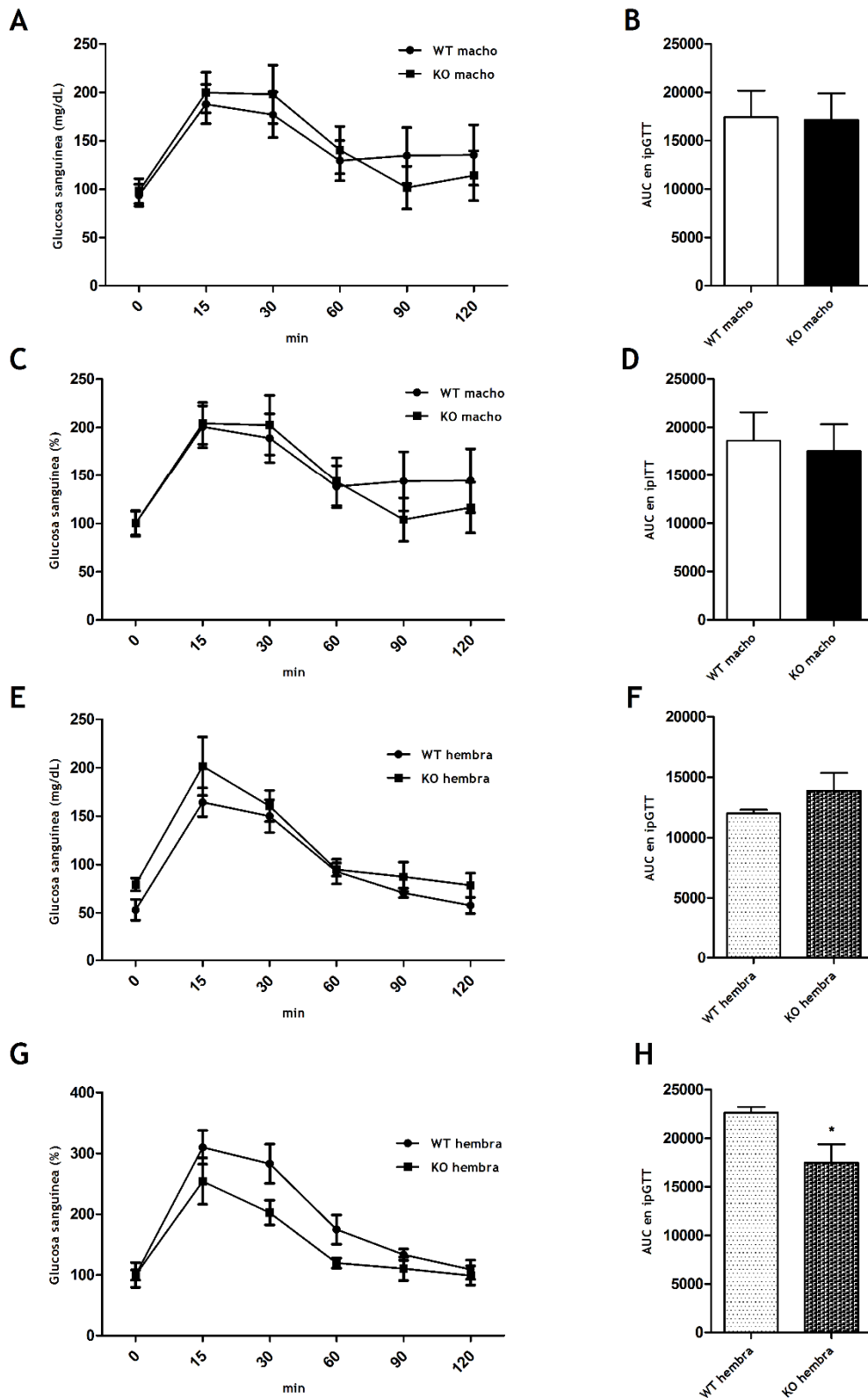


Figura 17 (parte I). Tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones KO *Nur77*. (A) Representación gráfica de los valores (mg/dL) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (B) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (C) Representación gráfica de los valores (porcentaje) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (D) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (E) Representación gráfica de los valores (mg/dL) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (F) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (G) Representación gráfica de los valores (porcentaje) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (H) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). Valores representados Media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7-8$ por grupo.

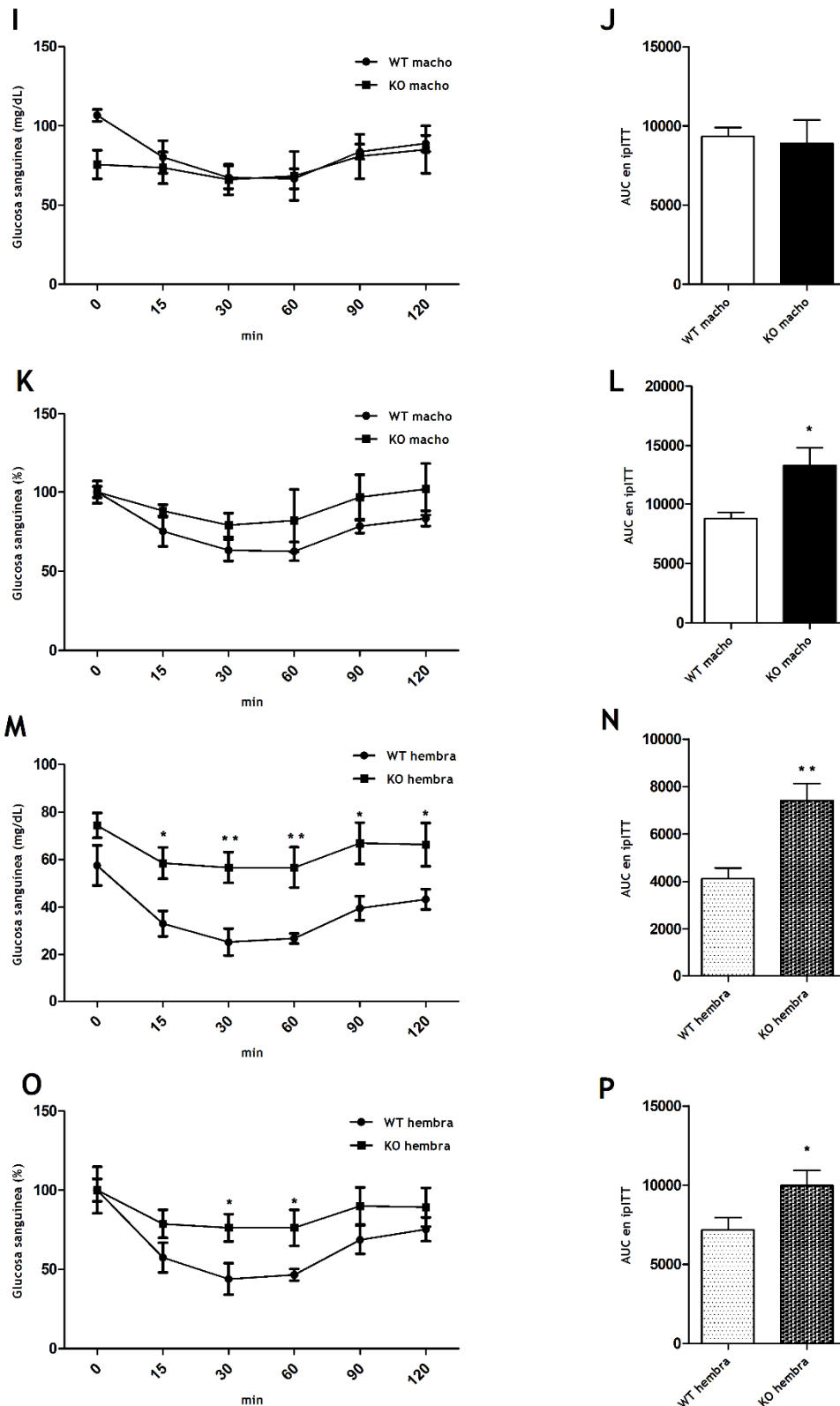


Figura 17 (parte II). Tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones KO *Nur77*. (I) Representación gráfica de los valores (mg/dL) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPITT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (J) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (K) Representación gráfica de los valores (porcentaje) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPITT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (L) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (M) Representación gráfica de los valores (mg/dL) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPITT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (N) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). (O) Representación gráfica de los valores (porcentaje) tras un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPITT) en los machos después de 16 semanas de HFD y (P) la representación de estos valores como área bajo la curva (AUC). Valores representados Media \pm SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, n = 7-8 por grupo.

OBJETIVO 2.

Investigar la regulación de la familia NR4A bajo distintas condiciones fisiológicas asociadas con cambios en el metabolismo como desarrollo postnatal, estado gonadal, gestación, cambios hormonales

Dado que claramente *Nurr77* está implicada en el metabolismo energético y la homeostasis de la glucosa, nos preguntamos cómo variaría la expresión de los distintos componentes de la familia en diferentes condiciones fisiológicas. Para una mejor comprensión de esta proteína, hemos estudiado los niveles de expresión de la familia NR4A a la que pertenece *Nur77* bajo diferentes condiciones fisiológicas.

2.1 INFLUENCIA DE LA PRIVACIÓN DE ALIMENTOS, LA LEPTINA Y LA COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS EN LA EXPRESIÓN DE NR4A

Primero nos planteamos investigar los efectos del estado alimenticio en la expresión de ARN m de NR4As: NR4A1 (*Nur77*), NR4A2 (*Nurr1*) y NR4A3 (*Nor-1*) en el tejido adiposo blanco de ratas.

Empezamos analizando los efectos del ayuno y encontramos que después de 24 horas de ayuno había un incremento en la expresión de RNA de los tres isotipos de NR4A estudiados (figura 18 A). Este efecto se revertía cuando las ratas eran realimentadas, produciendo un descenso de los niveles de RNA mensajero hasta niveles basales similares a los observados en ratas alimentadas *ad libitum*.

El siguiente paso fue investigar los efectos de la restricción alimenticia crónica (70% de la ingesta normal) durante 8, 12, 16 y 21 días. Sin embargo, en este caso, no pudimos encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa en la expresión de ARN m de NR4As (figura 18 B), si bien los datos indicaban una tendencia a la disminución de los valores.

La leptina es una hormona principalmente liberada por el tejido adiposo blanco que actúa en el cerebro para regular la ingesta alimentaria y el peso corporal. Además uno de los cambios más importantes que suceden en un estado de ayuno es que los niveles de leptina disminuyen. Por esto, nos preguntamos si el efecto observado durante el ayuno podría estar mediado por la leptina. Para ello, usamos un modelo de ratón deficiente en leptina (*ob*). Comparamos los ratones control, los ratones *ob/ob* (deficientes en leptina) y los ratones *ob/ob* tratados con leptina y no pudimos observar ninguna diferencia en la expresión de ARNm en ninguna de las isoformas (figura 18 C) pudiendo indicar que el incremento en la expresión durante el ayuno era independiente de los niveles de leptina.

Finalmente, analizamos si la composición de la dieta podría afectar a la expresión de NR4As. Alimentamos ratas con dieta estándar (ND) y con dieta alta en grasa durante 12 semanas. La HFD produce un aumento en la expresión de ARNm de *Nur77* y *Nor-1* en WAT, mientras que no encontramos diferencias en el efecto de *Nurr1* (figura 18 D).

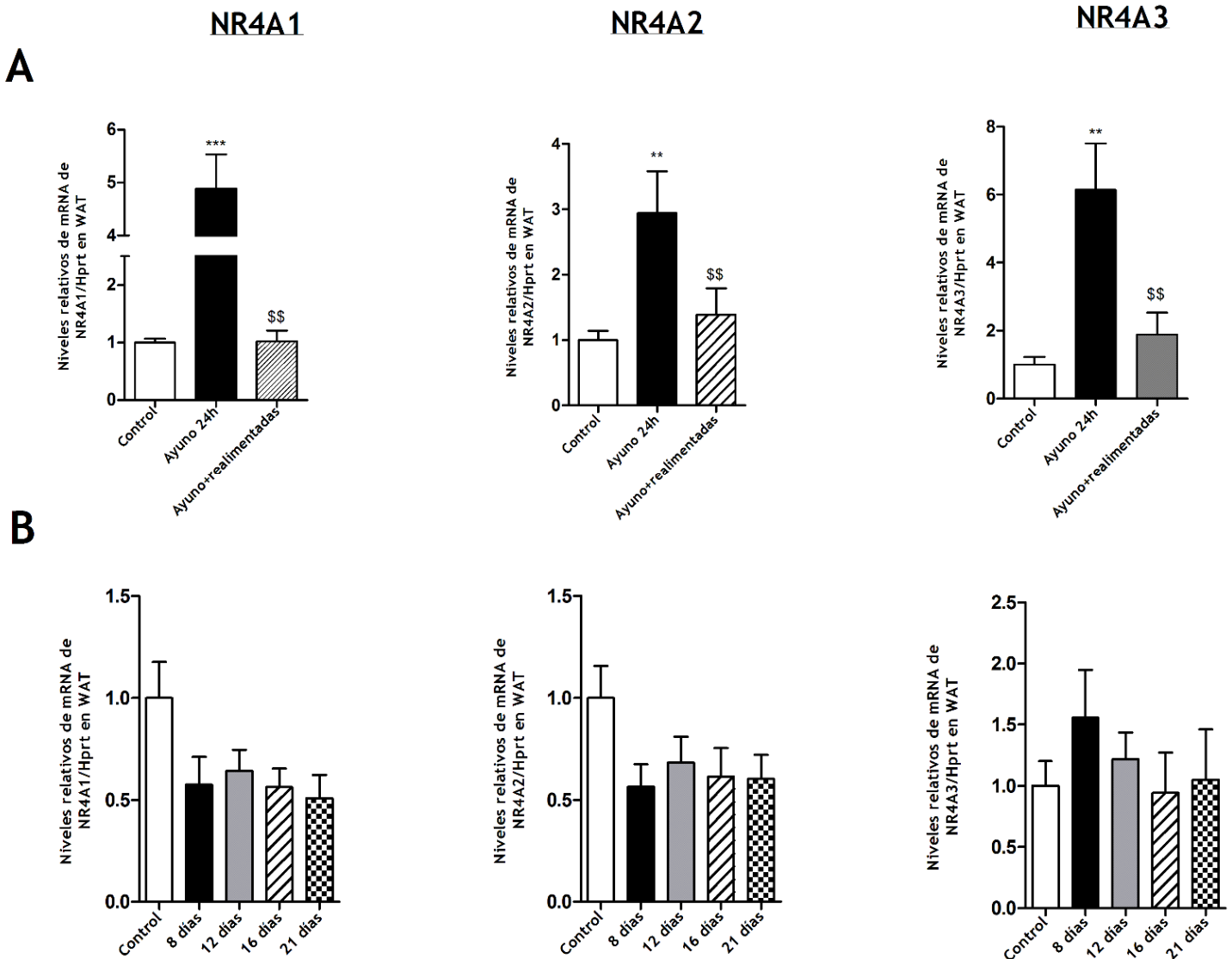


Figura 18 (parte I). Efectos del estado nutricional y la leptina sobre la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal. (A). Efectos de la alimentación ad libitum, el ayuno de 24 horas y la realimentación de 24h en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (alimentados) (B). Efectos de la restricción crónica (70%) en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (alimentados). La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controles. \$\$ $p < 0,01$ vs grupo en ayuno de 24h.

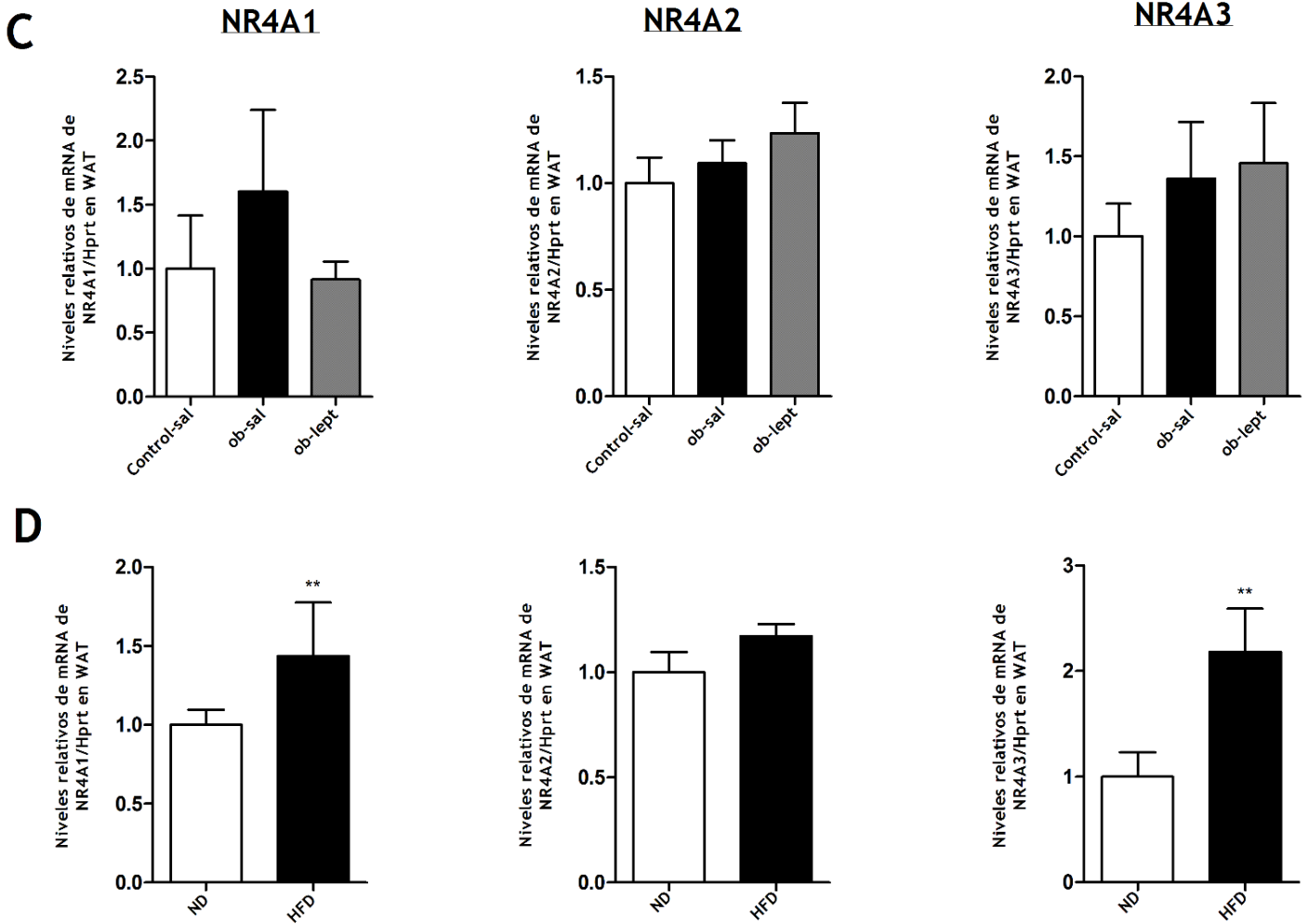


Figura 18 (parte II). Efectos del estado nutricional y la leptina sobre la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal. (C). Efectos de la leptina en ratones ob/ob en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (salinos) (D). Efectos de la dieta alta en grasa (HFD) en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (dieta normal o estándar). La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controles. §§ $p < 0,01$ vs grupo en ayuno de 24h.

2.2 INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL GÉNERO EN LA EXPRESIÓN DE ARNm DE NR4A

Tal como se describió en el objetivo 1 encontramos un dimorfismo sexual en relación a los efectos de Nu77 sobre la homeostasis energética. Además es bien conocido que el tejido adiposo blanco tiene implicaciones muy importantes en el desarrollo postnatal y la pubertad, por eso, analizamos la expresión de NR4A en WAT en diferentes estados de desarrollo en machos y hembras. Primero, medimos la expresión de ARNm en el desarrollo postnatal de ratas hembras de 25, 45, 60 y 90 días. La expresión de ARNm de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* aumenta a lo largo del desarrollo. Las tres isoformas alcanzan niveles más altos a los 90 días del desarrollo postnatal (figura 19 A). Puesto que a los 90 días de edad, las ratas son adultas y el eje gonadal está completamente desarrollado, quisimos comprobar si las hormonas sexuales podrían estar implicadas en el incremento de los niveles de ARNm de NR4As. Para ello, utilizamos un modelo de rata ovariectomizada (figura 19 B) y encontramos un descenso en la expresión de ARNm en WAT de los genes NR4As comparados con las hembras control (SHAM- controles operados). Estos datos parecían sugerir que los estrógenos estarían implicados en la sobreexpresión de los genes NR4As en WAT durante el desarrollo postnatal en ratas hembra.

Después, analizamos la expresión de ARNm de los genes NR4As de ratas macho de 25, 45, 60 y 90 días de edad y encontramos que la expresión es similar para los tres receptores en WAT incrementando a lo largo del desarrollo en machos con niveles más alto a los 90 días (figura 20 A). Para estudiar la influencia de las hormonas sexuales, en este caso la testosterona, en la expresión de los genes NR4As, usamos ratas macho gonadectomizadas (figura 20 B) y encontramos que la ausencia de gónadas disminuía la expresión de ARNm de los isotipos de NR4As comparado con los controles (Sham- controles operados). Estos parecían sugerir que la testosterona modula de manera directa o indirecta los niveles de expresión de los genes NR4As en WAT.

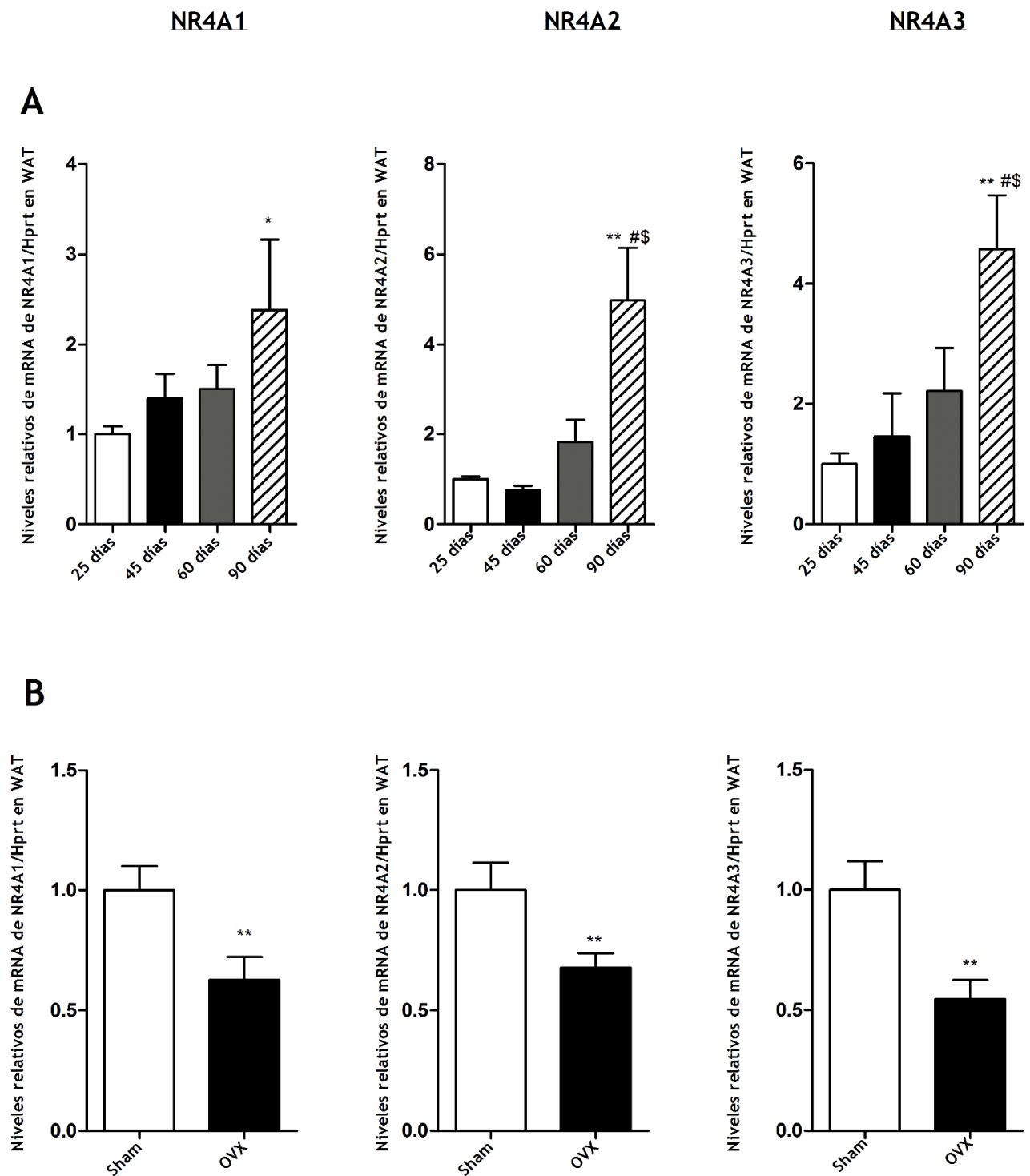


Figura 19. Efectos del desarrollo postnatal, edad y esteroides sexuales sobre la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal de ratas hembra. (A). Expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (ratas de 25 días de edad) durante el desarrollo postnatal en ratas hembra. (B) expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (Sham) dos semanas después de la ovariectomía (OVX). La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 vs controles. # p< 0,05 vs ratas de 45 días de edad. \$ p< 0,05 vs ratas de 60 días de edad.

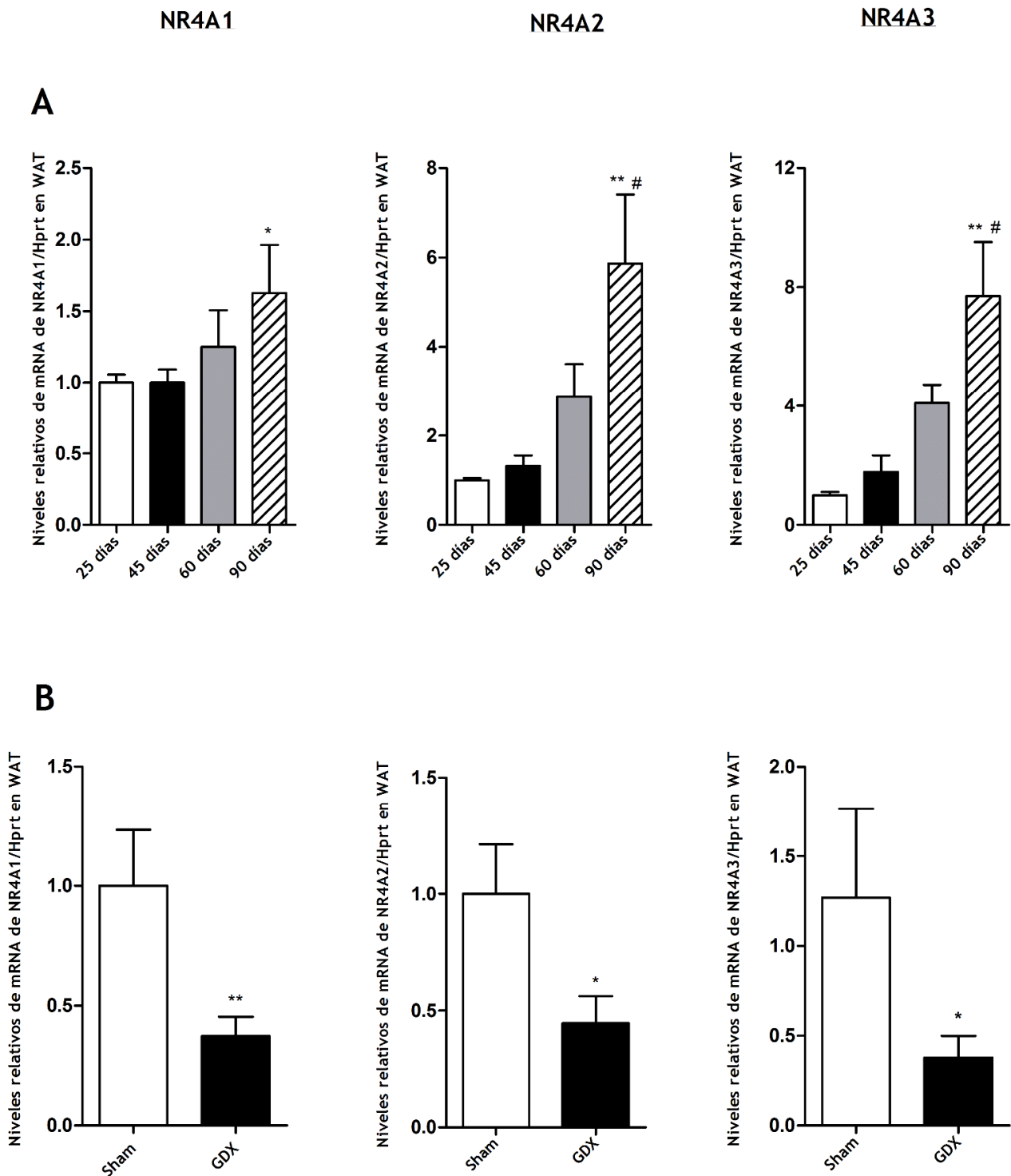


Figura 20. Efectos del desarrollo postnatal, edad y esteroides sexuales sobre la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal de ratas macho. (A). Expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (ratas de 25 días de edad) durante el desarrollo posnatal, en ratas hembra. (B) expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en la WATg en relación a sus controles (Sham) dos semanas después de la gonadectomía (GVX). La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). *p< 0,05; **p< 0,01 vs controles. # p< 0,05 vs ratas de 45 días de edad.

2.3 INFLUENCIA DE LAS HORMONAS HIPOFISARIAS

Es muy conocido que alteraciones en los diversos ejes neuroendocrinos hipotálamo-hipofisarios están implicados en la regulación del balance energético. Por ello, y una vez descrito el papel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal decidimos estudiar la expresión de ARNm de los genes NR4As en 2 modelos de rata: uno con alteraciones en el eje tiroideo y otra con alteraciones en el eje somatotropo.

Como las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en la regulación del metabolismo, y el hipotiroidismo produce una ganancia de peso y adiposidad descontrolada, analizamos si la deficiencia en la hormona tiroidea podría afectar a los niveles de expresión de NR4As. El hipotiroidismo disminuyó la expresión de ARNm de *Nur77*, *Nor-1* y *Nurr1* en WAT comparado con las ratas eutiroides (figura 21 A).

La hormona del crecimiento (GH-growth hormone) juega un papel importante tanto en el control de la homeostasis metabólica como en la composición corporal y el metabolismo de la glucosa y lipídico (Rizza, Mandarino, & Gerich, 1982). Por ello estudiamos los efectos de la deficiencia de GH (ratas Dwarf) en los niveles de NR4As en WAT y encontramos una subregulación de la expresión de ARNm de *Nur77* en ratas deficientes en GH comparadas con los controles. Los otros isotipos, *Nurr1* y *Nor-1*, no presentan ninguna diferencia en la expresión comparados con sus controles (figura 21 B).



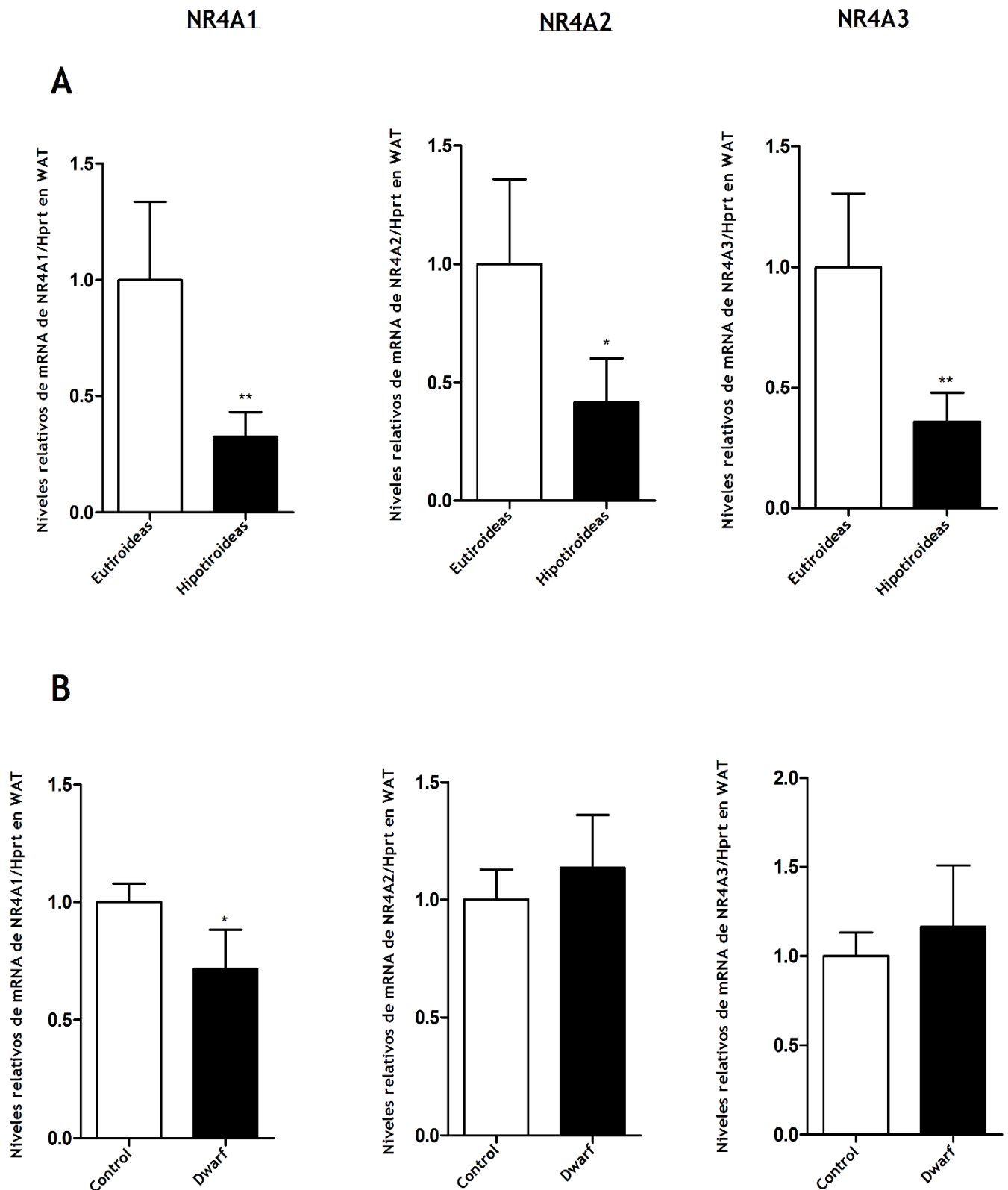


Figura 21. Análisis de los factores hipofisarios en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal. (A) Efectos del estado tiroideo en los niveles de ARNm WATg de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 relativo a sus controles (Eutiroideas). (B) Efectos de la deficiencia de GH en los niveles de ARNm WATg de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 relativo a sus controles (Lewis). La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). *p< 0,05; **p< 0,01 vs controles.

2.4 EFECTOS DE LA GESTACIÓN

Finalmente, decidimos analizar los niveles de expresión de ARNm de los genes NR4A en un modelo fisiológico especial asociado a cambios metabólicos y hormonales importantes, como incremento en la acumulación de tejido adiposo, como es la gestación. Analizamos la expresión de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* durante diferentes días de la gestación (8, 12, 16 y 21 días) y encontramos un incremento en la expresión de ARNm de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* en el día 8 de gestación. Esos niveles descendían a partir del día 12 hasta el 21 llegando a los niveles del grupo control no preñada o siendo menores como se observa para NR4A2 y NR4A3 (figura 22).

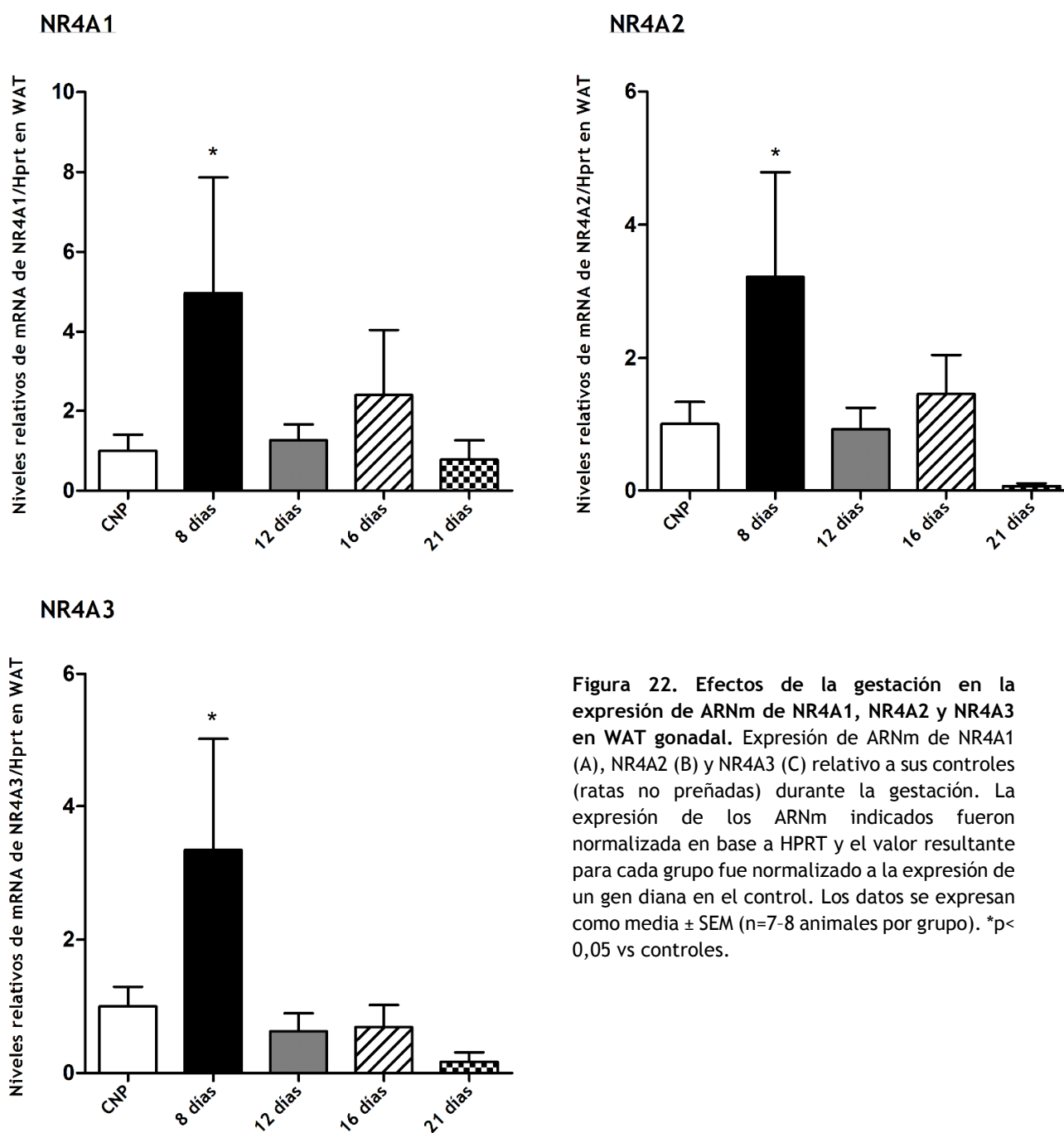


Figura 22. Efectos de la gestación en la expresión de ARNm de NR4A1, NR4A2 y NR4A3 en WAT gonadal. Expresión de ARNm de NR4A1 (A), NR4A2 (B) y NR4A3 (C) relativo a sus controles (ratas no preñadas) durante la gestación. La expresión de los ARNm indicados fueron normalizada en base a HPRT y el valor resultante para cada grupo fue normalizado a la expresión de un gen diana en el control. Los datos se expresan como media \pm SEM (n=7-8 animales por grupo). *p< 0,05 vs controles.

DISCUSIÓN





DISCUSIÓN

Nur77 participa en la regulación de numerosas acciones biológicas, incluyendo el metabolismo. En particular, *Nur77* es un regulador transcripcional del metabolismo de la glucosa en el hígado y en el músculo esquelético (Pei, et al., 2006) (Chao, et al., 2009) (Chao, et al., 2007) (Pearen, et al., 2006). Varios estudios *in vitro* también han indicado que *Nur77* está involucrado en la adipogénesis (Chao, Bensinger, Villanueva, Wroblewski, & Tontonoz, 2008) (Wang, Myers, Eriksson, Fitzsimmons, & Muscat, 2011). Sin embargo, no ha habido estudios *in vivo* que clarifiquen el posible papel de *Nur77* en el tejido adiposo. En este trabajo utilizando dieta alta en grasa con un 45% de grasa, demostramos que los ratones hembras que carecen de *Nur77* alimentados con un HFD ganaron significativamente más peso corporal que los controles (tipo salvaje-WT). La disminución del gasto energético fue consistente con el aumento del peso corporal y la masa grasa en ratones *Nur77* KO después de la alimentación con HFD. A nivel molecular, encontramos alteraciones en el metabolismo lipídico en ratones hembra, pero no en machos. Más específicamente, nuestros hallazgos sugieren que la deficiencia de *Nur77* disminuyó la lipólisis del tejido adiposo en las hembras en comparación con sus compañeros de camada alimentados con HFD. Además de la función de almacenamiento de los lípidos, el tejido adiposo blanco (WAT) desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis energética. Por otra parte, el tejido adiposo pardo (BAT) ha surgido como un órgano activo regulador de la termogénesis no sólo en el recién nacido, sino también en los adultos (van Marken Lichtenbelt, et al., 2009) (Virtanen, et al., 2009). Y dado que está bien establecido que WAT y BAT ejercen efectos relevantes sobre la sensibilidad a la insulina decidimos seguir investigando el papel de *Nur77* en esos tejidos.

Lo primero que encontramos fue una disminución de la ratio pHSL / HSL en WAT, lo que estaría sugiriendo una disminución de la lipólisis. Esto es coherente con el efecto de *Nur77* en las células del músculo esquelético, donde la atenuación de la expresión *Nur77* dio lugar a una disminución de la lipólisis (Maxwell, et al., 2005). Sin embargo estos resultados no están en concordancia con los observados en los seres humanos, ya que en este caso *Nur77* está sobrerregulado en el WAT de los pacientes obesos extremos, mientras que la expresión de *Nur77* se normaliza después de la pérdida de grasa (Veum V. , et al., 2012) . En conjunto, estos datos sugieren que el aumento de la expresión de *Nur77* en el WAT de los pacientes obesos podría ser un mecanismo compensatorio con el fin de limitar la expansión del tejido adiposo.

En BAT, la expresión de *Nur77* se indujo en aquellos ratones expuestos al frío por lo que *Nur77* es un regulador negativo de UCP1 inducido por frío (Kanzleiter, et al., 2005). Sin embargo, los ratones que carecen de este receptor no muestran ninguna alteración en la termogénesis, lo que sugiere que existe un mecanismo compensatorio de los otros miembros de la familia (Kanzleiter, et al., 2005).

En nuestros datos actuales no hemos podido detectar ningún cambio significativo en la expresión de genes que controlan la termogénesis en BAT de ratones deficientes en

Nur77. Sin embargo, hemos encontrado mayores niveles de CIDEA en el BAT de los ratones hembra KO para *Nur77* en comparación con sus compañeros de camada alimentados con HFD. Cabe destacar que CIDEA es un importante inhibidor de la lipólisis y los ratones deficientes en CIDEA son delgados y resistentes a la obesidad inducida por la dieta y la diabetes (Zhou, et al., 2003). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el aumento de los niveles de CIDEA podría contribuir a disminuir la lipólisis, mientras que la reducción de la expresión de LPL en el BAT de los ratones hembra KO para *Nur77* sugiere una menor absorción de lípidos en BAT de ratones hembra *Nur77* KO. El mayor tamaño de los adipocitos marrones de los ratones hembra deficientes de *Nur77* en comparación con los ratones hembra WT podría explicarse probablemente por la disminución de la lipólisis en los adipocitos marrones en los animales KO.

Una cuestión intrigante de este estudio es el dimorfismo sexual observado en el fenotipo metabólico de ratones que carecen de *Nur77*. Hay una gran cantidad de datos clínicos y experimentales que demuestran que los esteroides sexuales y la insulina interactúan en sus efectos en varios tejidos y además se sabe que la deficiencia estrogénica se asocia a un marcado incremento en el desarrollo de obesidad inducido por diferentes factores obesogénicos (Livingstone & Collison, 2002) (Novelle, et al., 2017). La deficiencia de los estrógenos o sus receptores se asocia con un aumento de la adiposidad, en particular en la grasa visceral, lo que perjudica la sensibilidad a la insulina (Shi, Seeley, & Clegg, 2009) (Heine, Taylor, Iwamoto, Lubahn, & Cooke, 2000). Los niveles de estrógeno tienen un papel importante en la regulación de la homeostasis energética. Estudios experimentales han demostrado de manera concluyente que este aumento de la adiposidad está asociado a un estado de hiperfagia, reducción del gasto energético y del peso corporal. Por otra parte, la restauración de los niveles de estrógenos en ratones ovariectomizados disminuye este peso corporal y el resto de los parámetros antes citados hasta niveles similares a sus controles. Los estrógenos también afectan el gasto energético y al metabolismo de los lípidos, por ejemplo los ratones deficientes en ER α mostraron un menor gasto de energía (Heine, Taylor, Iwamoto, Lubahn, & Cooke, 2000) y ER α activa directamente la lipólisis (Barros & Gustafsson, 2011).

Un estudio anterior ha descrito que los ratones machos que carecen de *Nur77* ganaron más peso y fueron más resistentes a la insulina que los ratones WT (Chao, et al., 2009). Nuestros hallazgos muestran que las hembras, pero no los ratones macho deficientes en *Nur77* ganaron más peso cuando se alimentaron con HFD. Sin embargo, ambos ratones deficientes en *Nur77*, hembras y machos, mostraron una mayor susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta y una mayor resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina observada en ratones deficientes en *Nur77*, machos y hembras, es consistente con la tendencia a aumentar los niveles de insulina en ayunas en ratones deficientes en *Nur77*. Las discrepancias en el aumento de peso corporal entre los dos estudios podrían explicarse por diferencias en los enfoques metodológicos. Alimentamos a los ratones con un HFD con 45% de calorías de grasa, mientras que el trabajo anterior utilizó 60% de calorías de la grasa (Chao, et al., 2009). De hecho, el uso de dietas con un porcentaje

diferente de grasa provoca diferentes alteraciones en el contenido de triglicéridos, colesterol, etc. (Prior, et al., 2009). Por lo tanto, esta importante variable permite detectar diferentes acciones de un gen utilizando el mismo modelo animal. Enfrentando a los ratones con una dieta con un menor contenido de grasa, fuimos capaces de descubrir las diferencias de género mostradas en este trabajo. Para apoyar esto habría que destacar que aunque no encontramos ninguna diferencia en los machos, el fenotipo metabólico de los ratones hembra *Nur77* deficientes se asemeja a lo estudiado en ratones macho con deficiencia de *Nur77*.

En cualquier caso, nuestros datos sugieren que el aumento del peso corporal y el contenido de grasa en los ratones que carecen de *Nur77* alimentados con HFD pueden ser causados por la disminución del gasto energético. Además, esto se acompaña de un aumento del contenido de triglicéridos en el hígado y de un marcado deterioro de la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, se encontró que los niveles fosforilados de JNK1 están disminuidos en el hígado de ratones hembra deficientes en *Nur77* alimentados con HFD. Dado que se demostró que la ablación de JNK1 en los hepatocitos induce la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática (Sabio, et al., 2009) nuestros datos sugieren que, además de los mecanismos descritos desencadenantes de la acumulación de grasa en el hígado (Chao, et al., 2009), JNK1 también está mediando los efectos de *Nur77* en el metabolismo hepático. Por lo tanto, nuestro estudio actual apoya los resultados anteriores y en general, se puede concluir que el *Nur77* endógeno desempeña un papel importante en el control de la homeostasis de la energía y el metabolismo de la glucosa.

Además de sus acciones hepáticas, cuando los ratones *Nur77* deficientes fueron alimentados con un HFD de 60%, también se ha observado que la ausencia de *Nur77* aumentaba del contenido de lípidos intramuscular, la oxidación de ácidos grasos y la resistencia a la insulina en el músculo (Chao, et al., 2009) (Chao, et al., 2007). De forma similar, en el presente trabajo se encontró que una HFD con 45% de calorías de grasa, indujo un aumento moderado del contenido de TG en el músculo e inhibió los niveles de la proteína AKT en hembras que carecen de *Nur77*, lo que podría explicar parcialmente la sensibilidad a la insulina alterada observada en estos ratones.

En general, es probable que el aumento de la adiposidad en los ratones hembra deficientes en *Nur77* refleja el punto final de los cambios en los efectos metabólicos sistémicos relacionados con la acción de *Nur77* en varios tejidos metabólicos importantes, incluyendo no sólo el músculo esquelético (Chao, et al., 2009) (Chao, et al., 2007) y el hígado (Pei, et al., 2006) sino también la grasa blanca y marrón.

Por lo tanto, es tentador especular que el fenotipo observado en ratones hembra deficientes en *Nur77* podría ser causado por alteraciones en la señalización del receptor de estrógenos a nivel hipotalámico. A este respecto datos recientes han puesto de manifiesto que los estrógenos desempeñan una buena parte de sus efectos sobre el balance energético a nivel central. A este respecto es de destacar datos recientes que demuestran que la acción central del estradiol (E2) inhibe selectivamente la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) a través del receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$) en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), llevando a la activación de la termogénesis en el tejido adiposo

pardo por el sistema nervioso (SNS) de una manera independiente de la alimentación. Según un nuevo modelo, la regulación por E2 del eje VMH AMPK-SNS-BAT es un determinante importante del balance energético y sugieren que la desregulación en este eje puede explicar los cambios comunes en la homeostasis energética y la obesidad ligada a la disfunción del eje ovárico y del dimorfismo sexual (Morentin, et al., 2014).

Sería por tanto muy interesante el evaluar el efecto de los estrógenos a nivel hipotalámico en este grupo neuronal y esclarecer si *Nur77* puede estar regulando la activación de AMPK y por tanto todo el eje antes descrito.

En resumen, este estudio demuestra que: a) además de las funciones metabólicas conocidas en el hígado y el músculo esquelético, *Nur77* es también un importante modulador fisiológico del metabolismo lipídico en el tejido adiposo; Y b) la elección de una HFD con 45% de calorías de grasa, demuestra que hay diferencias de género en la sensibilidad a la delección de la señalización *Nur77*. La disminución del gasto energético y la alteración metabólica en el tejido hepático, muscular y adiposo favorecen la mayor susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta en ratones que carecen de *Nur77*. Estos datos sugieren que la activación de *Nur77* en los tejidos periféricos metabólicos podría ser eficaz en el tratamiento de la obesidad y sus trastornos asociados.

Estudiando a nivel general la subfamilia NR4A, a la que pertenece *Nur77*, hemos demostrado que los miembros de la subfamilia NR4A están regulados, en el tejido adiposo blanco (WAT), por diferentes condiciones asociadas con cambios metabólicos tales como estado nutricional, esteroides sexuales, hormonas hipofisarias y embarazo.

Varios estudios anteriores, mostrados en este trabajo, indicaron que los NR4A se asocian con cambios en la masa grasa en ratones, ratas y seres humanos. Por ejemplo, los ratones que carecen de *Nur77* ganan más grasa cuando se alimentan con un HFD (Chao, et al., 2009) (Perez-Sieira, et al., 2013) y además *Nur77* es un mediador de la regulación de PPAR γ inducida por el ayuno en WAT (Duszka, et al., 2013). La inyección de siRNA de *Nor-1* en el hipotálamo de ratones produjo una supresión de la ingesta de alimentos y el peso corporal (Nonogaki, et al., 2009). En los pacientes con obesidad mórbida, la expresión de NR4As en el WAT estaba incrementada comparado con sujetos delgados mientras que su expresión se normalizó después de la pérdida de grasa (Veum V. , et al., 2012). Por lo tanto, primero analizamos la influencia del estado nutricional (ayuno y restricción crónica de alimentos) en la expresión de NR4As. En relación con un estudio previo (Duszka, et al., 2013) y con datos obtenidos en músculo e hígado (Oita, Mazzatti, Lim, Powell, & B.J., 2009), encontramos que el ayuno produjo una regulación positiva de *Nur77* en WAT, y este efecto se invirtió cuando las ratas volvían a ser realimentadas. Los trabajos actuales demuestran que estos cambios no eran específicos de *Nur77*, ya que *Nurr1* y *Nor-1* mostraron un perfil idéntico en el WAT de ratas en ayunas y en ratas realimentadas. Contrariamente a los hallazgos obtenidos después del ayuno, no hemos detectado ningún cambio en la expresión de NR4As en el WAT de ratas obligadas a una restricción crónica de alimentos. Así, nuestros datos indican que NR4As podría desempeñar un papel importante en las adaptaciones metabólicas del WAT al estado nutricional a corto, pero no a largo plazo. Además, nuestros resultados indican que la

restricción de alimentos modula los receptores NR4A de una manera específica de tejido ya que previamente se había demostrado que la expresión de NR4As se incrementaba en el músculo esquelético de rata y en el hígado durante la restricción alimentaria (Oita, Mazzatti, Lim, Powell, & B.J., 2009).

Como uno de los cambios más importantes en el estado de ayuno es la disminución de los niveles de leptina, evaluamos si la leptina estaba mediando la expresión de NR4As inducida por el ayuno. Para probar esta hipótesis, analizamos la expresión de NR4As en ratones deficientes en leptina (ob / ob) y a los que tratamos con leptina. Aunque la leptina disminuyó la ingesta de alimentos y el peso corporal (datos no mostrados), nosotros no encontramos ninguna diferencia en la expresión de receptores NR4A entre ratones WT y ratones ob/ob con o sin leptina. En general, nuestros resultados indican que el efecto del ayuno en la expresión de NR4As es independiente de la leptina. De hecho, el ayuno está asociado a cambios de múltiples hormonas y otros factores distintos de la leptina, por lo que sería necesario realizar más estudios para precisar los mecanismos que controlan la expresión de NR4S en el WAT después del ayuno.

La obesidad inducida por la dieta (DIO) en roedores representa un modelo experimental de obesidad muy robusto. Dado que estudios previos demostraron que la falta de *Nur77* hacía que los animales fueran más susceptibles a la ganancia de grasa cuando se alimentaban con HFD (Chao, et al., 2009) (Perez-Sieira, et al., 2013), nos propusimos medir la expresión de NR4As en el WAT de ratas DIO. Había sido descrito, que los ratones obesos muestran una reducción en la respuesta β -adrenérgica (Collins, et al., 1994) y se demostró que la señalización β -adrenérgica induce la expresión de mRNAs de NR4As en WAT (Myers, Eriksson, Burow, Wang, & G.E., 2009). Inesperadamente, encontramos que los niveles de *Nur77* y *Nor-1* en WAT se incrementaron en ratas DIO en comparación con ratas delgadas. Aunque la explicación de estos resultados todavía no está clara, podría ser posible que el aumento de los niveles de NR4As en WAT después de tres meses en HFD represente una respuesta compensatoria.

Aunque la regulación de estos receptores en el WAT de roedores obesos parece ser bastante compleja dado que NR4As en WAT estaban sobreexpresadas en las ratas DIO, mientras que la expresión de NR4As se mantuvo sin cambios en el WAT de los ratones obesos ob/ob, vale la pena señalar que los ratones ob/ob muestran alteraciones endocrinas severas, incluyendo hipogonadismo, deficiencia de GH y niveles alterados de hormonas tiroideas (Sone & Osamura, 2001), que podrían modular diferencialmente la expresión de NR4As en WAT.

Durante el desarrollo postnatal hay un incremento significativo de la masa grasa tanto en machos como en hembras, lo que se acompaña de importantes cambios en los niveles de diferentes hormonas que regulan el equilibrio energético y también la resistencia a la insulina (Nogueiras, Gualillo, Caminos, Casanueva, & Dieguez, 2003) (Chanoine, De Waele, & Walia, 2009). Cuando medimos la expresión de NR4As en WAT de machos y hembras a lo largo de su vida, encontramos que los niveles de ARNm de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* se incrementaron a lo largo del desarrollo, con los niveles más altos a los 90 días tras el nacimiento tanto en machos como en hembras. Estos resultados indican que la

expresión de estos receptores en el WAT no se ve afectada por el género, pero que la edad tiene una influencia importante en los niveles de NR4A de WAT. En este sentido, es bien sabido que la deficiencia de estrógenos en hembras está asociada con hiperfagia, aumento de peso corporal y adiposidad (Clegg, Brown, Woods, & Benoit, 2006) y los niveles séricos de testosterona están inversamente asociados con el peso corporal y la masa grasa (Marin, et al., 1993). Para probar la hipótesis de que el incremento de los niveles de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* está relacionado con esteroides sexuales, realizamos experimentos adicionales en ratas ovariectomizadas y orquidectomizadas. En ambos casos la ausencia de producción endógena de esteroides sexuales (estrógenos o testosterona) produjo una disminución de la expresión de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* en WAT, lo que indica que los esteroides sexuales podrían estar regulando la expresión de NR4A.

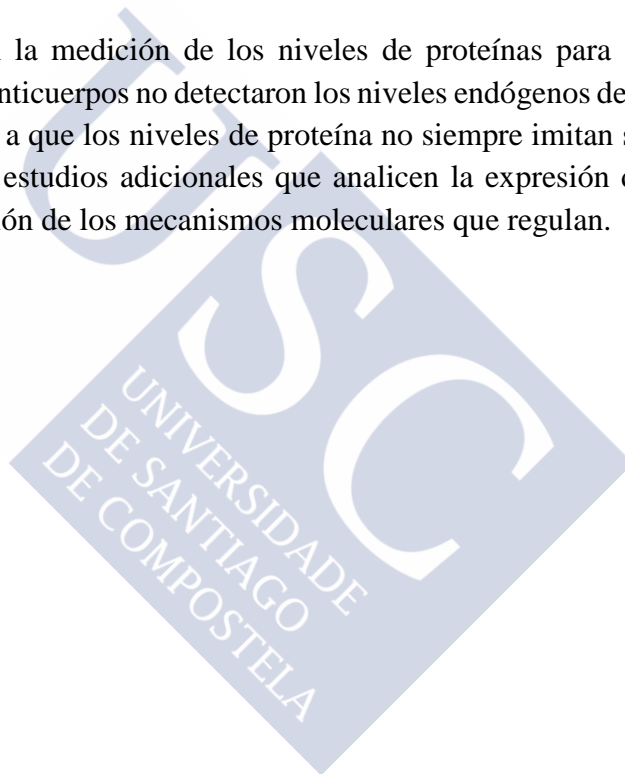
Las hormonas tiroideas y la GH son hormonas hipofisarias que juegan un papel clave en la homeostasis metabólica y metabolismo del tejido adiposo (Schaffler, Scholmerich, & Buechler, 2006). Las hormonas tiroideas (T3 y T4) han sido reconocidas como hormonas críticas para el desarrollo, la diferenciación tisular y el mantenimiento del equilibrio metabólico en los mamíferos (Boelaert & Franklyn, 2005). En nuestro estudio, encontramos una disminución de los niveles de mRNA de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* en el WAT de las ratas hipotiroideas, lo que sugiere que las hormonas tiroideas son importantes moduladores de NR4As. Nuestros resultados también indicarían que esta regulación es específica de los tejidos, porque en un estudio anterior se demostró que *Nr4a1* se incrementaba tanto en ratones machos como en hembras con hipotiroidismo (Dong, et al., 2007). GH también influye en muchos procesos metabólicos, tales como la composición corporal, el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de los lípidos (Rizza, Mandarino, & Gerich, 1982). Nosotros sólo encontramos un descenso en la expresión en WAT de *Nur77* en ratas Dwarf en comparación con las ratas control, mientras que las otras dos isoformas permanecieron sin cambios. Estos hallazgos sugieren que los niveles de GH modulan diferencialmente estos receptores.

El embarazo es un modelo fisiológico caracterizado por una mayor ingesta de alimentos y un aumento de la masa grasa (García, Casanueva, Dieguez, & Senaris, 2000) y durante este período hay claros cambios en varios mecanismos relacionados con la homeostasis de la glucosa (Armitage, Poston, & Taylor, 2008). Utilizando ratas preñadas a distintos tiempos de gestación, encontramos que los niveles de mRNA en WAT de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* se incrementaron en la primera semana de gestación pero disminuían a partir de entonces volviendo a los niveles observados en ratas no preñadas.

En otros estudios se demostró que *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* modulaban la acción de la insulina y el transporte de glucosa en roedores y en humanos (Chao, et al., 2009), (Fu, Luo, Luo, Zhu, & Garvey, 2007). Nosotros observamos que los cambios en su expresión en WAT se producen en la segunda semana de gestación, cuando la sensibilidad de los tejidos maternos para la insulina disminuye (Tamas & Kerenyi, 2001). Por lo tanto, es posible que la alta expresión de NR4A en el inicio del embarazo y su disminución después de la segunda semana sea un reflejo de la sensibilidad a la insulina deteriorada durante el embarazo y podría ser mediada, al menos parcialmente por NR4A.

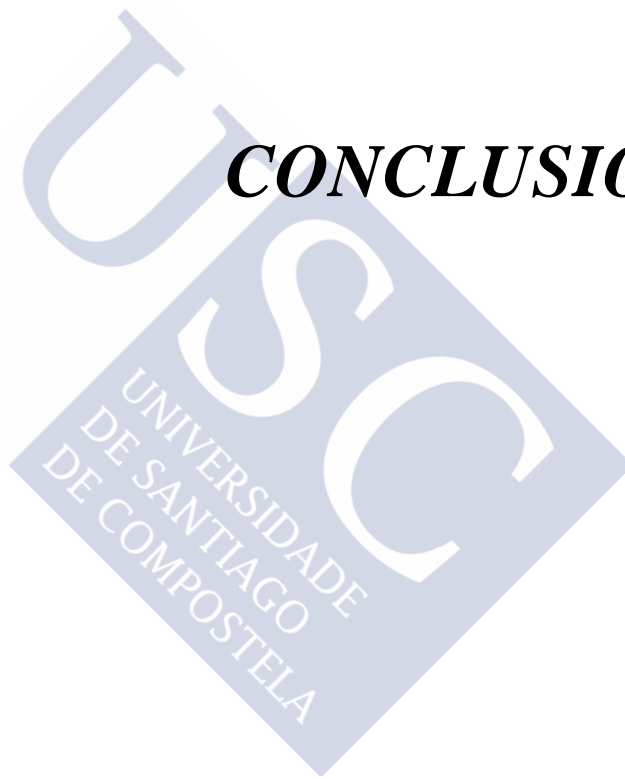
En resumen, nuestros datos demuestran que: a) la subfamilia NR4A (*Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1*) se regulan de forma similar en WAT; B) la expresión en WAT de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* está regulada por el estado nutricional y la composición de los alimentos de una manera independiente de la leptina; C) la expresión en WAT de *Nur77*, *Nurr1* y *Nor-1* se incrementa a lo largo del desarrollo postnatal y esta regulación está mediada por la testosterona y los estrógenos; D) Los niveles de mRNA en WAT de NR4A están regulados por cambios en la función de la hipófisis, específicamente la deficiencia de la hormona tiroidea disminuye la expresión de todos los receptores NR4A y la deficiencia de GH sólo disminuye *Nur77*; E) Los niveles de mRNA en WAT de NR4A se incrementaron en la primera semana de gestación y disminuyeron después de la segunda semana. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la regulación de los niveles de mRNA en el tejido adiposo blanco *in vivo*.

No tuvimos éxito en la medición de los niveles de proteínas para los productos génicos Nr4a, ya que los anticuerpos no detectaron los niveles endógenos de las diferentes isoformas NR4A. Debido a que los niveles de proteína no siempre imitan sus niveles de mRNA, serán necesarios estudios adicionales que analicen la expresión de la proteína para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan.





CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

1. Mediante la utilización de un modelo de silenciamiento génico global, hemos demostrado que *Nur77* desempeña un papel fisiológico en la homeostasis energética y metabólica. A nivel de homeostasis de peso corporal es de destacar el marcado efecto de dimorfismo sexual con una mayor sensibilidad a la obesidad inducida por dieta alta en grasa en hembras KO *Nur77*. A nivel metabólico hemos demostrado que *Nur77* está implicado en la regulación del metabolismo lipídico, especialmente inhibiendo la lipólisis, y en la regulación de la sensibilidad a la insulina.

2. Nuestros datos nos indican que los isotipos de la familia NR4A están regulados de forma tejido-específica y en relación al estadio de desarrollo postnatal. Además hemos documentado que distintos factores hormonales, conocidos por jugar un papel relevante en la homeostasis energética, ejercen un papel regulador sobre sus niveles de expresión.

3. Teniendo en cuenta que los isotipos de la familia NR4A son regulados de forma precisa por distintos factores y el hecho de que el silenciamiento génico de uno de ellos, *Nur77*, conlleve cambios en la homeostasis energética y metabólica, estos datos sugieren que la activación de *Nur77* en los tejidos metabólicos periféricos podría ser efectiva en el tratamiento de la obesidad y de sus trastornos asociados.



AGRADECIMIENTOS





AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es el fruto de varios años de investigación y trabajo continuo. Y como es de bien nacidos ser agradecidos...intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento por todas las personas que han estado presentes durante esta etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

Empezando por el principio, quiero dar las gracias a Rubén Nogueiras y a Carlos Diéguez, por brindarme mi primera oportunidad en el mundo de la investigación y a Sulay Tovar, por enseñarme el valor de la paciencia y animarme a superarme constantemente. En general a mis directores de tesis, por su apoyo y confianza en mi trabajo, y que han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y dedicación por mi parte y de los directores de tesis, no hubiese sido posible su desarrollo y finalización sin la cooperación desinteresada de mis compañeros.

A los “veteranos”, que no los mayores, y personal del laboratorio Amparo, Marisol, Luz, Rucha, Ana, por sus grandes consejos, ánimos, apoyo y ayuda.

A Ana y Bernardo por su gran dedicación y cuidado de nuestros ratones y ratas, haciendo más fácil el trabajo experimental.

A mis mentores, Daniel y Mónica, por su apoyo y paciencia en mi aprendizaje.

A mis compañeros de laboratorio, Bego, Estrella, David y Cintia por brindarme su ayuda, por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes y por tener siempre tendida su mano amiga.

A Fátima, aunque su estancia fue corta, pude aprender mucho de ella tanto académica como personalmente.

Para mis compañeros en general, doctorandos/as y posdocs, tengo sólo palabras de agradecimiento. En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A aquellas personas que han estado presentes en mi camino y, aunque ya no están, han puesto su granito de arena para que hoy sea quién y cómo soy.

A mis amigas, que siempre han tenido una palabra de ánimo.

Agradecer hoy y siempre a mi familia, mis padres, mis hermanos, mi tía Ramona, animándome siempre a seguir, me hicieron la persona que soy hoy en día, En especial quiero agradecer a mi abuela, que aunque ya no esté, siempre la llevaré conmigo. Nunca olvidaré sus sabios consejos.

A mi marido Marcos y mis hijos Álex e Íker, que me han dado y me dan fuerza y voluntad para continuar en los momentos en los que los ánimos flaquean, ellos son mi “todo”...POR ELLOS Y PARA ELLOS, SIEMPRE!!

A todos mi eterno agradecimiento.



BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

- Abizaid, A., & TL., H. (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept*, 149 (1-3): 3-10.
- Ahima, R., & Flier, J. (2000). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends Endocrinol Metab*, 11(8): 327-332.
- Ahmadian, M., Duncan, R., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. (2007). Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol*, 2(2): 229-237.
- Ahmadian, M., Wang, Y., & Sul, H. (2010). Lypolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 42 (5): 555-559.
- Allison, D., Kaprio, J., Korkeila, M., Koskenvuo, M., Neale, M., & Kayakawa, K. (1996). The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *International Journal of Obesity*, 20: 501-506.
- Anand, B., & Brobeck, J. (1951). Localization of a feeding center in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 77: 323–324.
- Arner, P. (2000). Obesity – a genetic disease of adipose tissue? *British Journal of Nutrition (2000)*, 83, Suppl. 1, S9–S16, 83(1): S9-S16.
- Au, W., Payne, V., O'Rahilly, S., & Rochford, J. (2008). The NR4A family of orphan nuclear receptors are not required for adipogenesis. *Int. J. Obes.*, 32: 388-392.
- Bachman, E., Dhillon, H., Zhang, C., Cinti, S., Bianco, A., Kobilka, B., & Lowell, B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, 297 (5582): 843-845.
- Bamshad, M., Aoki, V., Adkison, M., Warren, W., & Bartness, T. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275(1):R291-R299.
- Bandoh, S., Tsukada, T., Maruyama, K., Ohkura, N., & Yamaguchi, K. (1997). Differential expression of NGFI-B and RNR-1 genes in various tissues and developing brain of the rat: comparative study by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Neuroendocrinol*, 9 (1): 3-8.
- Barsh, G., Farooqi, I., & O'Rahilly, S. (2000). Genetics of body weight regulation. *Nature*, 404: 644-651.
- Barthel, A., & Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(4): E685-692.
- Bartness, T., Shrestha, Y., Vaughan, C., Schwartz, G., & Song, C. (2010). Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Molecular and cellular endocrinology*, 318(1-2):34- 43.
- Bell, C., Walley, A., & Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*, 6 (3): 221-234.
- Bernard, C. (1855). *Leçons de Physiologie Experimentale Appliquée à la Médecine*. Paris: Libraires de l'académie impériale de médecine.

- Bernardis, L., & Bellinger, L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 20(2):189-287.
- Berthoud, H. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, 26(4):393-428.
- Bhayana, S., & Hegele, R. (2002). The molecular basis of genetic lipodystrophies. *Clin. Biochem*, 35 (3): 171–177.
- Bloom, S., Kuhajda, F., Laher, I., Pi-Sunyer, X., Ronnett, G., Tan, T., & Weigle, D. (2008). The obesity epidemic: pharmacological challenges. *Mol Interv*, 8: 82–98.
- Bonet, M., Oliver, P., & Palou, A. (2013). Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1831: 969-985.
- Boss, O., & Farmer, S. (2012). Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3: 14.
- Bouchard, C. (1993). Genes and body fat. *American Journal of Human Biology*, 5: 425–432.
- Bouret, S. (2013). Organizational actions of metabolic hormones. *Front Neuroendocrinol*, 34(1):18-26.
- Bray, G., Fisler, J., & York, D. (1990). Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front. Neuroendocrinol.*, 11: 128–181.
- Brobeck, J. (1946). Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev*, 26: 541–559.
- Brodal, P. (2010). *The central nervous system: structure and function*. Oslo: Oxford University Press.
- Buijs, R., la Fleur, S., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T., . . . Nijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *The supJ Comp Neurol*, 464 (1): 36-48.
- Carpéné, C., Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Berlan, M., & Lafontan, M. (1998). Lipolytic Effects of β 1-, β 2-, and β 3-Adrenergic Agonists in White Adipose Tissue of Mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 839(1): 186-189.
- Castillo, S., Xiao, Q., Lyu, M., Kozak, C., & Nikodem, V. (1997). Organization, sequence, chromosomal localization, and promoter identification of the mouse orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *Genomics*, 41 (2): 250-257.
- Chao, L., Bensinger, S., Villanueva, C., Wroblewski, K., & Tontonoz, P. (2008). Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1. *Mol. Endocrinol.*, 22: 2596-2608.
- Chao, L., Wroblewski, K., Ilkayeva, O., Stevens, R., Bain, J., Meyer, G., . . . Tontonoz, P. (2012). Skeletal muscle Nur77 expression enhances oxidative metabolism and substrate utilization. *J. Lipid. Res.*, 53 (12): 2610-2619.

- Chao, L., Wroblewski, K., Zhang, Z., Pei, L., Vergnes, L., Ilkayeva, O., . . . Tontonoz, P. (2009). Insulin resistance and altered systemic glucose metabolism in mice lacking Nur77. *Diabetes*, 58 (12): 2788-2796.
- Chao, L., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., & Pilch, P. (2007). Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* , 21 (9): 2152-2163.
- Clegg, D., Benoit, S., Barrera, J., & Woods, S. (2003). Estrogen mediates body fat distribution and brain sensitivity to adiposity signals. *Diabetes*, 52 (suppl. 1).
- Clegg, D., Benoit, S., Fisher, M., Barrera, J., Seeley, R., & Woods, S. (2003). Sex hormones determine body fat distribution and sensitivity to adiposity signals. *Appetite*, 40: 324.
- Clegg, D., Brown, L., Woods, S., & Benoit, S. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 55(978-987).
- Clegg, D., Riedy, C., Smith, K., Benoit, S., & Woods, S. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, 52: 682–687.
- Cone, R., Cowley, M., Butler, A., Fan, W., Marks, D., & Low, M. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 5(25 Suppl.):S63–67.
- Cook, K., Min, H., Johnson, D., Chaplinsky, R., Flier, J., Hunt, C., & Spiegelman, B. (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* , 237: 402– 405.
- Cox, M., & Nelson, D. (2006). *Leningher. Principios de Bioquímica*. Editorial Omega.
- Crespo, M., González Matías, L., Lozano, M., Paz, S., Pérez, M., Gago, E., & Ferrer, F. (2009). Gastrointestinal hormones in food intake control. *Endocrinol Nutr.*, 56 (6): 317-330.
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J., Montano, S., & Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* , 50(4): 740-746.
- Daniels, S. (2006). The consequences of childhood overweight and obesity. *Future Child*, 16: 47-67.
- Davis, I., Hazel, T., Chen, R., & Blenis, J. (1993). Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol.*, 7(8): 953-964.
- Duncan, R., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., & Sul, H. (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu Rev Nutr*, 27: 79-101.
- Eells, J., Witta, J., Otridge, J., Zuffova, E., & Nikodem, V. (2000). Structure and function of the Nur77 Receptor Subfamily, a Unique Class of Hormone Nuclear Receptors. *Current Genomics* , 1 (2): 135-152.
- Elmquist, J., Elias, C., & Saper, C. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight . *Neuron*, 22: 221-232.
- Enmark, E., & Gustafsson, J. (1996). Orphan nuclear receptors—the first eight years. . *Mol. Endocrinol.*, 10: 1293-1307.

- Enquist, L. (2002). Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers. *The Journal of infectious diseases*, 186 Suppl 2:S209-214.
- Fernandez, P., Brunel, F., Jimenez, M., Saez, J., Cereghini, S., & Zakin, M. (2000). Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 141: 2392-2400.
- Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C., & Moras, D. (2005). Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nur1 ligand-binding domain. *J Biol Chem*, 280(19): 19250-19258.
- Fonnum, F. (1975). A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *Neurochem.*, 24: 407-409.
- Forman, B., Umesono, K., Chen, J., & Evans, R. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81: 541-550.
- Friedman, J. (1997). Leptin, leptin receptors and the control of body weight. *Eur J Med Res*, 2(1): 7-13.
- Friedman, J., & Halaas, J. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763-770.
- Frohlich, A. (1901). A Case of Tumor of the Hypophysis without Acromegaly. *Wien klin Rundschau*, 15: 883-886. 906-908.
- Fromme, T., & Klingenspor, M. (2011). Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300 (1): R1-8.
- Fu, M., Sun, T., Bookout, A., Downes, M., Yu, R., Evans, R., & Mangelsdorf, D. (2005). A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol. Endocrinol.*, 19: 2437-2450.
- Fu, Y., Luo, L., Luo, N., Zhu, X., & Garvey, W. (2007). NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 282: 31525-31533.
- Gao, Q., & Horvath, T. (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett*, 582(1):132-141.
- Gibbs, J., Young, R., & Smith, G. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol*, 84: 488-495.
- Giralt, M., & Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*, 154: 2992-3000.
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J*, 15 (11): 2048-2050.
- Gonzales de Buitrago, J., & Arilla, E. (2000). *Bioquímica Clínica*. Madrid: McGraw – Hill.
- Gonzalez-Jiménez, E., & Schmidt Río-Valle, J. (2012). Regulation of dietary intake and energy balance; factors and mechanisms involved. *Nutr Hosp*, 27 (6): 1850-1859.

- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320: 134–139.
- Greenwood, H., Bloom, S., & Murphy, K. (2011). Peptides and Their Potential Role in the Treatment of Diabetes and Obesity. *Rev Diabet Stud*, 8(3): 355–368.
- Gregoire, F., Smas, C., & Sul, H. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev*, 78 (3): 783-809.
- Guichet, A., Copeland, J., Erdélyi, M., Hlousek, D., Závorszky, P., Ho, J., . . . Ephrussi, A. (1997). The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature*, 385 (6616): 548-552.
- Guyton, A., & Hall, J. (2006). *Tratado de Fisiología Médica*. Mc Graw-Hill Interamericana, 11ª Edición.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., . . . Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 277 (7): 4806-4815.
- Havel, P. (1999). Mechanisms regulating leptin production: implications for control of energy balance. *Am J Clin Nutr*, 70 (3): 305-306.
- Hazel, T., Nathans, D., & Lau, L. (1988). A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proce. Natl. Acad. Sci*, 85: 8444-8448.
- Heine, P., Taylor, J., Iwamoto, G., Lubahn, D., & Cooke, P. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. 97(12729-12734).
- Hetherington, A., & Ranson, S. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, 78: 149-172.
- Hetherington, A., & Ranson, S. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J Comp Neurol*, 76: 475–499.
- Hill, J., & Peters, J. (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*, 280: 1371-1374.
- Hsu, H., Zhou, T., & Mountz, J. (2004). Nur77 family of nuclear hormone receptors. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 3: 413-423.
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y., Juhasz, M., Yancopoulos, G., Squinto, S., & Lindsay, R. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350 (6315): 230-232.
- Hynes, M., Poulsen, K., Armanini, M., Berkemeier, L., Phillips, H., & Rosenthal, A. (1994). Neurotrophin-4/5 is a survival factor for embryonic midbrain dopaminergic neurons in enriched cultures. *J Neurosci Res*, 37 (1): 144-154.
- Irani, B., Le, F., Dunn-Meynell, A., & Levin, B. (2008). Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 149: 5146-5154.
- Jungermann, K., & Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr*, 16: 179-203.

- Kalra, S., Dube, M., Pu, S., Xu, B., Horvath, T., & Kalra, P. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 20: 68–100.
- Kalra, S., Dube, M., Pu, S., Xu, B., Horvath, T., & Kalra, P. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 20(1): 68- 100.
- Kanzleiter, T., Preston, E., Wilks, D., Ho, B., Benrick, A., Reznick, J., . . . Cooney, G. (2010). Overexpression of the orphan receptor Nur77 alters glucose metabolism in rat muscle cells and rat muscle in vivo. *Diabetologia*, 53: 1174-1183.
- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z., Ferrans, V., Ozato, K., & Guroff, G. (2000). Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat. Cell Biol*, 2: 435-440.
- Kennedy, G. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 140: 579–592.
- Knauf, C., Cani, P., Ait-Belgnaoui, A., Benani, A., Dray, C., Cabou, C., . . . Burcelin, R. (2008). Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology*, 149 (10): 4768-4877.
- Knüsel, B., Winslow, J., Rosenthal, A., Burton, L., Seid, D., Nikolics, K., & Hefti, F. (1991). Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci* , 88 (3): 961-965.
- Krahmer, N., Farese, R. J., & Walther, T. (2013). Balancing the fat: lipid droplets and human disease . *EMBO Mol Med*, 5 (7): 905-915.
- Kuiper, G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 93: 5925–5930.
- Lardy, H., & Hughes, P. (1984). Regulation of gluconeogenesis at phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Curr Top Cell Regul* , 24: 171-179.
- Law, S., Conneely, O., DeMayo, F., & O'Malley, B. (1992). Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endo.*, 6: 2129-2135.
- Le, W., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S., Smith, R., & Vassilatis, D. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat. Genet.*, 33: 85-89.
- Li, L., Liu, Y., Chen, H., Li, F., Wu, J., Zhang, H., . . . Wu, Q. (2015). Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nat Chem Biol*, 11(5): 339-346.
- Li, Q., Ke, N., Sundaram, R., & Wong-Staal, F. (2006). NR4A1, 2, 3 – an orphan nuclear hormone receptor family involved in cell apoptosis and carcinogenesis . *Histol Histopathol*, 21 (5): 533-540.
- Loncar, D. (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res*, 266: 149-161.

- Mages, H., Rilke, O., Bravo, R., & Senger, G. (1994). NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3. *Mol.Endo.*, 8: 1583-1591.
- Maira, M., Martens, C., Philips, A., & Drouin, J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell Biol.*, 19: 7549-7557.
- Mangelsdorf, D., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., . . . Evans, R. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
- Marino, J., Xu, Y., & Hill, J. (2011). Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;, 22(7): 275-285.
- Martínez-González, J., & Badimon, L. (2005). The Nr4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res.*, 65 (3): 609-618.
- Maruyama, K., Tsukada, T., Bandoh, S., Sasaki, K., & Ohkura, N. (1997). Expression of the putative transcription factor NOR-1 in the nervous, the endocrine and the immune systems and the developing brain of the rat. *Neuroendocrinology*, 65 (1): 2-8.
- Maruyama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bandoh, S., Hosono, T., & Yamaguchi, K. (1998). The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily. *Int J Oncol*, 12: 1237-1243.
- Matteoni, C., Younossi, Z., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y., & McCullough, A. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116:1413–1419.
- Maxwell, M., Cleasby, M., Harding, A., Stark, A., Cooney, G., & Muscat, G. (2005). Nur77 regulates lipolysis in skeletal muscle cells. Evidence for cross-talk between the beta-adrenergic and an orphan nuclear hormone receptor pathway. *J. Biol. Chem.*, 280: 12573-12584.
- McEvoy, A., Murphy, E., Ponnio, T., Conneely, O., Bresnihan, B., FitzGerald, O., & Murphy, E. (2002). Activation of nuclear orphan receptor NURR1 transcription by NF-kappa B and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J. Immunol.*, 168: 2979-2987.
- McMorrow, J., & Murphy, E. (2011). Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem. Soc. Trans.*, 39: 688-93.
- Meinke, G., & Sigler, P. (1999). DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nature Struct. Biol.*, 6: 471-477.
- Merchenthaler, I., Lane, M., Numan, S., & Dellovade, T. (2004). Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J. Comp. Neurol.*, 473: 270–291.

- Milbrandt, J. (1988). Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*, 1: 183-188.
- Mitchell, N., Catenacci, V., Wyatt, H., & Hill, J. (2011). Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am*, 34(4): 717-732.
- Mohr, B. (1840). Hypertrophy of the hypophysis Cerebri and its Pressure on the Ventral Brain Surface, particularly on the Optic Tract and Chiasm of the Left Hemisphere. *Wschr ges Heilk*, 6: 565-571.
- Moitra, J., Mason, M., Olive, M., Krylov, D., Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., . . . Vinson, C. (1998). Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev*, 12: 3168-3181.
- Moll, U., Marchenko, N., & Zhang, X. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25: 4725-4743.
- Montague, C., Farooqi, I., Whitehead, J., Soos, M., Rau, H., Wareham, N., . . . O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908.
- Morton, G. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109):289-295.
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D., Mobbs, C., Yang, X., Clegg, D., . . . Ogawa, S. (2007). Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 2501-2525.
- Nawrocki, A., & Scherer, P. (2005). The adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discov Today*, 10: 1219-1230.
- Neary, N., Goldstone, A., & Bloom, S. (2004). Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 60(2): 153-160.
- Nordlie, R., Foster, J., & Lange, A. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr*, 19: 379-406.
- Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, Y., Hell, E., Krempler, F., & Patsch, W. (1997). Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res*, 38: 2125-2133.
- Ohkura, N., Hijikuro, M., Yamamoto, A., & Miki, K. (1994). Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1959-1965.
- Ohkura, N., Ito, M., Tsukada, T., Sasaki, K., Yamaguchi, K., & Miki, K. (1996). Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta*, 1308 (3): 205-214.
- Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P., Vidal, O., Bohlooly, M., Rudling, M., . . . Gustafsson, J. (2000). Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278: 640-645.

- Paulsen, R., Granas, K., Johnsen, H., Rolseth, V., & Sterri, S. (1995). Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. . *J. Mol. Neurosci.*, 6: 249-255.
- Pearen, M., & Muscat, G. (2010). Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease. . *Mol. Endocrinol.*, 24: 1891-1903.
- Pearen, M., Ryall, J., Maxwell, M., Ohkura, N., Lynch, G., & Muscat, G. (2006). The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. . *Endocrinology*, 147: 5217-5227.
- Pei, L., Castrillo, A., & Tontonoz, P. (2006). Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol. Endocrinol.*, 20: 787-794.
- Pei, L., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, D., Kurland, I., & Tontonoz, P. (2006). NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. . *Nat. Med.*, 12: 1048-1055.
- Peña de Ortiz, S., & Jamieson, G. (1996). HZF-3, an immediate-early orphan receptor homologous to NURR1/NOT: induction upon membrane depolarization and seizures. *Mol Brain Res*, 38: 1-13.
- Perlmann, T., & Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*, 9: 769-782.
- Peyron, C., Faraco, J., Rogers, W., Ripley, B., Overeem, S., Charnay, Y., . . . Mignot, E. (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Medicine*, 6(9): 991-997.
- Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M., Gauthier, Y., Hugo, P., & Drouin, J. (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. . *Mol. Cell. Biol.*, 17: 5946-5951.
- Pilkis, S., & Granner, D. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* , 54: 885-909.
- Pol, A., Gross, S., & Parton, R. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol*, 204 (5): 635–646.
- Queiroz, J., Alonso-Vale, M., Curi, R., & Lima, F. (2009). Control of adipogenesis by fatty acids . *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53 (5): 582-594.
- Ryseck, R., Macdonald-Bravo, H., Mattei, M., Ruppert, S., & Bravo, R. (1989). Cloning and sequence of a secretory protein induced by growth factors in mouse fibroblasts. *Exp Cell Res*, 180 (1): 266-275.
- Sargent, B., & Moore, N. (2009). New central targets for the treatment of obesity. *Br J Clin Pharmacol*, 68(6): 852-860.
- Sarjeant, K., & Stephens, J. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (9).
- Saucedo-Cardenas, O., & Conneely, O. (1996). Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. . *J Mol Neurosci*, 7: 1-11.

- Scearce, L., Laz, T., & Hazel, T. (1993). RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem.*, 268 (12): 8855-8861.
- Scherer, P. (2006). From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*, 55 (6): 1537-1545.
- Schwartz, M., & Porte, D. J. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 307: 375-379.
- Schwartz, M., Marks, J., Sipols, A., Baskin, D., Woods, S., Kahn, S., & Porte, D. (1991). Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology*, 128(5): 2645-2647.
- Schwartz, M., Woods, S., Porte, D., Seeley, R., & Baskin, D. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671.
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, 50(2):276-291.
- Shimazu, T. (1996). Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition*, 12(1): 65-66.
- Shimizu, Y., Kielar, D., Minokoshi, Y., & Shimazu, T. (1996). Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem J.*, 314 (Pt 2): 485-490.
- Song, C., Jackson, R., Harris, R., Richard, D., & Bartness, T. (2005). Melanocortin-4 receptor mRNA is expressed in sympathetic nervous system outflow neurons to white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 289(5): R1467-1476.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., & Bradley, A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 64 (4): 693-702.
- Stellar, E. (1954). The physiology of motivation. *Psychol. Rev.*, 101(2): 301-11.
- Suzuki, S., Suzuk, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S., . . . Yeh, W. (2003). Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 8276-8280.
- Suzuki, S., Suzuk, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S., . . . Yeh, W. (2003). Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 8276-8280.
- Trayhurn, P., & Wood, I. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 92: 347-355.
- Uyama, N., Geerts, A., & Reynaert, H. (2004). Neural connections between the hypothalamus and the liver. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 280(1): 808-820.
- Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., & Froguel, P. (1998). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genet*, 20: 113-114.

- Valenstein, E., & Mittleman, G. (1984). Ingestive behavior evoked by hypothalamic stimulation and schedule-induced polydipsia are related. *Science*, 224: 415–417.
- Van den Pol, A. (2003). Weighing the role of hypothalamic feeding neurotransmitters. *Neuron*, 40: 1059-1061.
- Van der Lely, A., Tschöp, M., Heiman, M., & Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*, 426-457.
- Veum, V., Dankel, S., Gjerde, J., Nielsen, H., Solsvik, M., Haugen, C., . . . Mellgren, G. (2012). The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss. *Int J Obes*, 36 (9): 1195-1202.
- Walley, A., Blakemore, A., & Froguel, P. (2006). Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Hum Mol Genet*, 15 (suppl 2): R124-R130.
- Wang, S., Myers, S., Eriksson, N., Fitzsimmons, R., & Muscat, G. (2011). Nr4a1 siRNA expression attenuates alpha-MSH regulated gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.*, 25: 291-306.
- Welsch, U. (2009). *Sobotta Histología*. München: Sobotta Histología. Editorial Medica Panamericana.
- Welsch, U. (2009). *Tejido Adiposo*. In *Sobotta Histología pp. 147-151*. . Editorial Medica Panamericana.
- Williams, K., & Elmquist, J. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior . *Nature Neuroscience*, 15: 1350–1355.
- Williams, K., Scott, M., & Elmquist, J. (2011). Modulation of the central melanocortin system by leptin, insulin, and serotonin: co-ordinated actions in a dispersed neuronal network. *Eur. J. Pharmacol.*, 660: 2–12.
- Wilson, T., Fahrner, T., Johnston, M., & Milbrandt, J. (1991). Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 252: 1296-1300.
- Woods, S. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav*, 86: 709–716.
- Woods, S., & D'Alessio, D. (2008). Central control of body weight and appetite . *J Clin Endocrinol Metab*, 93: S37–50.
- Woods, S., Seeley, R., Porte, D. J., & Schwartz, M. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280: 1378–1383.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., & Jessell, T. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell*, 64 (3): 635-647.
- Yi, C.-X., E. la Fleur, S., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2010). The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Molecular Basis of Disease.*, 416-431.
- Yu, Y., Li, W., Su, K., Yussa, M., Han, W., Perrimon, N., & Pick, L. (1997). The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the Drosophila homeodomain protein Ftz. *Nature*, 385: 552–555.

- Zetterstrom, R., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B., Olson, L., & Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, 276: 248–250.
- Zetterstrom, R., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., & Perlmann, T. (1996). Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. . *Mol. Endocrinol.*, 10: 1656-1666.
- Zetterstrom, R., Williams, R., Perlmann, T., & Olson, L. (1996). Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. . *Mol Brain Res.*, 41: 111-120.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425–432.
- Zhou, Q., & Palmiter, R. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. . *Cell*, 83 (7): 1197-1209.







La regulación de la homeostasis energética constituye en realidad un complejo proceso en el que están implicados diversos componentes tanto de origen central (hipotálamo), como hipofisario y periférico (tejido adiposo, estómago, hígado, páncreas, gónadas, etc.) que, en conjunto, forman un circuito regulador integrado.

En la búsqueda de la comprensión de esos circuitos han ido apareciendo nuevos candidatos objetos de estudio como NR4A, que es una subfamilia de receptores nucleares huérfanos, constituida por tres miembros: *Nur77* (NR4A1), *Nurr1* (NR4A2) y *Nor-1* (NR4A3). En este trabajo, además del estudio de los distintos miembros de la subfamilia NR4A bajo distintas condiciones metabólicas, estudiamos en concreto la influencia de *Nurr77* en el metabolismo energético.

