ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Sabela
Casado Masa

Tesis doctoral

LEAP-2, integración funcional tejido específica en el balance energético

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DE DOCTORADO

LEAP-2, integración funcional tejido específica en el balance energético

Sabela Casado Masa

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Dña. **Sabela Casado Masa**

Título de la tesis: **LEAP-2, integración funcional tejido específica en el balance energético.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, **16 de enero de 2023**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Dña. Sulay Tovar Carro y D. Carlos Diéguez González

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: **LEAP-2 integración funcional tejido específica en el balance energético**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña **Sabela Casado Masa**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **16 de enero de 2023**

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Dña. **Sabela Casado Masa** declara no tener ningún conflicto de interés en relación con esta tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 16 de enero de 2023

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LEAP-2, integración funcional tejido específica en el balance energético

RESUMEN

Ghrelina es una hormona orexigénica con funciones adipogénicas y que favorece la liberación de GH ejerciendo sus acciones a través del receptor de secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR1a). El descubrimiento de LEAP-2 como ligando endógeno del receptor de ghrelina, mostrando efectos opuestos a ghrelina en cuanto a ingesta ha abierto un nuevo campo de estudio fomentando la investigación sobre su potencial como una posible diana terapéutica anti-obesidad.

En la presente tesis doctoral se intentan dilucidar las acciones de LEAP-2 en la regulación de la homeostasis energética y sus efectos antagonizando ghrelina, determinando los mecanismos fisiológicos responsables de estos efectos. Utilizando modelos preclínicos de ratón se analizó el efecto de su tratamiento central sobre la termogénesis y metabolismo hepático en diferentes condiciones como son dietas que inducen obesidad y resistencia a ghrelina y durante el envejecimiento. Con el objetivo de discernir acciones centrales y acciones periféricas de LEAP-2 se realizaron experimentos in vitro con cultivos primarios de tejido adiposo y líneas celulares de hepatocitos humanos.

Nuestros resultados indican que LEAP-2 es regulado por el estado nutricional de forma inversa a ghrelina, y que su administración central ejerce importantes acciones en la homeostasis energética del organismo actuando sobre la termogénesis y el metabolismo de ácidos grasos en hígado. Por otra parte, a nivel periférico actúa de manera directa sobre hígado y tejido adiposo como confirman los experimentos realizados con modelos celulares.

En conclusión, LEAP-2 se posiciona como una hormona contrarreguladora, jugando un papel fundamental en el sistema de ghrelina y podría ser considerada como una nueva diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad, MAFLD y otras enfermedades metabólicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LEAP2, integración funcional tecido específica no balance enerxético

RESUMO

Ghrelina é unha hormona orexixénica con funcións adipoxénicas e tamén favorece a liberación de GH exercendo as súas accións a través do receptor secretagogo da hormona de crecemento (GHSR1a). O descubrimento de LEAP-2 como ligando endóxeno do receptor da ghrelina, mostrando efectos opostos á ghrelina en canto á ingesta, abriu un novo campo de estudo, fomentando a investigación sobre o seu potencial como posible diana terapéutica contra a obesidade.

Nesta tese de doutoramento tentamos dilucidar as accións do LEAP-2 na regulación da homeostase enerxética e os seus efectos antagonizando a ghrelina, determinando os mecanismos fisiolóxicos responsables destes efectos. Mediante modelos preclínicos de rato analizouse o efecto do seu tratamento central sobre a termoxénese e o metabolismo hepático en diferentes condicións como dietas que inducen a obesidade e resistencia á ghrelina e durante o envellecemento. Para discernir as accións centrais e periféricas de LEAP-2, realizáronse experimentos in vitro con cultivos primarios de tecido adiposo e liñas celulares de hepatocitos humanos.

Os nosos resultados indican que o LEAP-2 está regulado polo estado nutricional inversamente ao da ghrelina, e que a súa administración central exerce importantes accións sobre a homeostase enerxética do organismo, actuando sobre a termoxénese e o metabolismo dos ácidos graxos no fígado. Por outra banda, a nivel periférico actúa de forma directa sobre o fígado e o tecido adiposo, segundo confirman os experimentos realizados con liñas celulares.

En conclusión, LEAP-2 sitúase como unha hormona contrarreguladora, xogando un papel fundamental no sistema de ghrelina e podería considerarse como unha nova diana terapéutica no tratamento da obesidade, MAFLD e outras enfermidades metabólicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LEAP2, specific tissue functional integration in energy balance

ABSTRACT

Ghrelin is an orexigenic hormone with adipogenic functions and favors the release of GH by exerting its actions through the growth hormone secretagogue receptor (GHSR1a). The discovery of LEAP-2 as an endogenous ligand of the ghrelin receptor, showing opposite effects to ghrelin in terms of intake, has opened a new field of study, fostering research on its potential as a possible anti-obesity therapeutic target.

In this doctoral thesis we try to elucidate the actions of LEAP-2 in the regulation of energy homeostasis and its effects by antagonizing ghrelin, determining the physiological mechanisms responsible for these effects. Using preclinical mouse models, we analyzed the effect of its central treatment on thermogenesis and hepatic metabolism in different conditions such as diets that induce obesity and resistance to ghrelin and during aging. In order to discern central and peripheral actions of LEAP-2, in vitro experiments were performed with primary cultures of adipose tissue and human hepatocyte cell lines.

Our results indicate that LEAP-2 is regulated by nutritional status inversely to ghrelin, and that its central administration exerts important actions on the energy homeostasis of the organism, acting over thermogenesis and fatty acid metabolism in the liver. On the other hand, it also acts peripherally and directly on the liver and adipose tissue, as confirmed by experiments carried out with cells.

In conclusion, LEAP-2 is positioned as a counterregulatory hormone, playing a fundamental role in the ghrelin system and could be considered as a new therapeutic target in the treatment of obesity, MAFLD and other metabolic diseases.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS 25

INTRODUCCIÓN 33

1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 35

1.1 REGULACIÓN CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 36

1.2 REGULACIÓN PERIFÉRICA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 39

2. EL TRACTO 40

GASTROINTESTINAL 40

2.1 HORMONAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL 40

2.2 HORMONAS PANCREÁTICAS 41

3. EL HÍGADO 42

3.1 EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO 42

3.1.1 Lipogénesis de novo hepática 43

3.1.2 Oxidación hepática de ácidos grasos 44

3.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA 45

3.3. METABOLISMO INTERMEDIARIO, EL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO 46

4. EL TEJIDO ADIPOSO 46

4.1 TEJIDO ADIPOSO BLANCO 46

4.1.1 Metabolismo lipídico en el adipocito 47

4.1.2 Adipoquinas 48

4.2 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN 49

4.2.1 Tejido adiposo beige 50

4.2.2 El tejido adiposo y la termogénesis 50

5. DESREGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 53

5.1 LA OBESIDAD Y EL SINDROME METABÓLICO 53

5.1.1 El hígado graso asociado a disfunción metabólica (MAFLD) 54

5.1.2 La inflamación hepática 55

5.1.3 La resistencia a la insulina (RI) 56

5.2 EL ENVEJECIMIENTO 56

5.2.1 Envejecimiento y metabolismo 57

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2 Envejecimiento y GH 57

6. EL SISTEMA DE GHRELINA 57

Y SU FUNCIÓN 57

EN EL METABOLISMO 57

6.1 GHRELINA 57

6.1.1 Síntesis de ghrelina 58

6.1.2 Regulación de los niveles de ghrelina 58

6.2 EL RECEPTOR PARA SECRETAGOGOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GHS-R) 59

6.2.1 Actividad constitutiva del receptor GHS-R y acciones independientes de ligando 60

6.2.2 Interacción del receptor GHSR1a consigo mismo y con otros receptores 60

6.3 ACCIÓN DEL SISTEMA DE GHRELINA 60

6.3.1 Acceso de ghrelina al sistema nervioso central y mecanismos de acción hipotalámicos sobre ingesta 60

6.3.2 Acción sobre la adiposidad y la homeostasis de los lípidos 62

6.3.3 Efectos sobre la homeostasis de la glucosa 63

6.3.4 Acción sobre secreción de GH 64

6.3.5 Acción sobre la termogénesis 64

6.4 LEAP-2, NUEVA PIEZA DEL SISTEMA DE GHRELINA 66

HIPÓTESIS 71

OBJETIVOS 75

MATERIAL Y MÉTODOS 79

1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VIVO* 81

1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 81

1.2 MODELOS ANIMALES y ESTABULACIÓN 81

1.3 CONDICIONES NUTRICIONALES 82

1.3.1 Ayuno 82

1.3.2 Obesidad inducida por la dieta 82

1.4 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y LA MASA CORPORAL 83

1.5 FENOTIPADO METABÓLICO. ANÁLISIS MEDIANTE SISTEMA DE CALORIMETRÍA INDIRECTO (TSE) 83

1.5.1 Termoneutralidad en el TSE 83

1.6 TEST DE EXPOSICIÓN AL FRIO 83

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.7 ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS CENTRAL Y PERÍFERICAMENTE 84
1.7.1 Administración central 84
1.7.2 Administración periférica 85
1.8 CIRUGÍA PARA LA REALIZACIÓN DE OVARIECTOMÍA (OVX) 85
1.9 EUTANASIA Y RECOGIDA DE TEJIDOS 85
2. DISEÑO EXPERIMENTAL EN 86
LOS MODELOS IN VIVO 86
2.1 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEAP-2, GHRELINA, Y COADMINISTRACIÓN EN RATÓN EN DIETA ESTÁNDAR, ALTA EN GRASA Y RATONES ENVEJECIDOS 86
2.2 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEAP-2 EN RATONES EN DIETA ESTÁNDAR Y ALTA EN GRASA ANALIZADOS EN EL SISTEMA DE CALORIMETRÍA INDIRECTA (TSE) 87
2.2.1 Administración crónica de LEAP-2 en condición de termoneutralidad y posterior exposición a frío 88
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VITRO* 89
3.1 CULTIVOS CELULARES DE LINEAS HEPÁTICAS 89
3.1.1 HepG2 89
3.1.2 THLE-2 89
3.2 SILENCIAMIENTO GÉNICO-TRANSFECCIÓN TRANSITORIA 89
3.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE ADIPOCITIOS BLANCOS 90
3.4 TRATAMIENTOS REALIZADOS SOBRE LAS LINEAS CELULARES 90
3.4.1 Tratamiento con ácido oleico 90
3.4.2 Tratamiento con KHH 90
3.4.3 Tratamiento con péptidos 91
4. TÉCNICAS ANALÍTICAS 91
4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS 91
4.1.1 Tinción hematoxilina/eosina 91
4.1.2 Tinción Oil red O 91
4.1.3 Inmunohistoquímica 92
4.1.4 Adquisición y análisis de imágenes 92
4.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS 92
4.2.1 Análisis de metabolitos en sangre 92
4.2.2 Análisis del perfil lipídico en hígado 93
4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE WESTERN BLOT 93

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3.1 Extracción de proteínas 93
4.3.2 Cuantificación de proteínas 94
4.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-page 94
4.3.4 Electroforesis en SDS-page 94
4.3.5 Transferencia semi-húmeda 95
4.3.6 Inmunodetección 96
4.3.7 Cuantificación 97
4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL 97
4.4.1 Extracción de ARN 97
4.4.2 Cuantificación de ARN 98
4.4.3 Retrotranscripción 98
4.4.4 PCR a tiempo real 99
4.5 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA 101
4.5.1 Test paramétricos 101
4.5.2 Test no paramétricos 102

RESULTADOS.....105

1. REGULACIÓN NUTRICIONAL Y HORMONAL DE LA EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE LEAP-2 107

1.1 LA EXPRESIÓN DE LEAP-2 ES REGULADA POR EL ESTADO NUTRICIONAL 107

1.1.1 Efecto del ayuno en la expresión hepática de LEAP-2 en rata, ratón y líneas celulares hepáticas humanas 107

1.1.2 Efecto de las dietas altas en grasa en niveles circulantes y expresión hepática en modelos de ratón macho y hembra y líneas celulares hepáticas humanas 109

1.2 EFECTO DE LOS ESTROGENOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LEAP-2 112

2. ACCIONES DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO 113

2.1 IMPLICACIÓN DE LEAP-2 SOBRE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA EN RATONES NORMOPESO 114

2.1.1 Los ratones con tratamiento de LEAP-2 central mostraron una actividad termogénica incrementada 115

2.1.2 Los ratones tratados con LEAP-2 y expuestos a termoneutralidad no presentan diferencias en gasto energético, pero si se mantiene la disminución de masa corporal e ingesta 118

2.1.3 Los ratones tratados con LEAP-2 central mostraron un amarronamiento del tejido adiposo blanco subcutáneo 120

2.1.4 Los ratones tratados con LEAP-2 son capaces de mantener estable la temperatura corporal en condiciones de exposición a frío 122

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1.5 LEAP-2 incrementa la diferenciación hacia un programa termogénico en un cultivo primario de adipocitos de TABsc 124

2.1.6 LEAP-2 incrementa la expresión de marcadores termogénicos en un tejido ya diferenciado en un cultivo primario de adipocitos de TABsc 124

2.2 IMPLICACION DE LEAP-2 SOBRE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA 125

2.2.1 Los ratones con obesidad inducida por dieta con tratamiento central crónico de LEAP-2 mostraron una incrementada actividad termogénica 127

2.2.2 En obesidad, el TABsc de los ratones tratados con LEAP-2 no experimentan ningún cambio 130

3. EFECTO CENTRAL DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO 131

3.1 ACCIÓN DE LEAP-2 CENTRAL SOBRE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL HÍGADO EN RATONES NORMOPESO 131

3.2 LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 TIENE EFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO 132

3.3 LOS RATONES CON ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN HEPÁTICA 133

3.4 ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICA 134

4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LEAP-2 EN HEPATOCITOS HUMANOS 137

4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LEAP-2, CARACTERIZACIÓN DE DOSIS Y TIEMPO DE TRATAMIENTO 137

4.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA GLUCONEOGÉNESIS EN UN MODELO DE ESTEATOSIS HEPATICA IN VITRO 139

4.3 EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LEAP-2 EN HEPATOCITOS HUMANOS 141

5. INFLUENCIA DE LEAP-2 EN EL ENVEJECIMIENTO 143

5.1 EFECTO DE LEAP-2 CENTRAL SOBRE METABOLISMO ENERGÉTICO EN ANIMALES ENVEJECIDOS 143

5.2 EFECTOS SOBRE LA TERMOGÉNESIS Y EL AMARRONAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO 144

5.3 EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO 147

DISCUSIÓN 153

CONCLUSIONES 167

BIBLIOGRAFÍA 171

USC
DE COMPOSTELA

ANEXOS **191**

AGRADECIMIENTOS **201**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ACC: acetil-CoA carboxilasa (acrónimo del inglés: acetyl-CoA carboxilase) ***el gen se describe con las siglas: acaca***
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AG: ácido graso
AgRP: péptido relacionado con agutí (acrónimo del inglés: agouti-related peptide)
AKT: protein kinasa B-PKB
AMPK: quinasa activada por adenosina monofosfato (acrónimo del inglés: adenosine monophosphateactivated kinase)
ARC: núcleo arcuato (acrónimo del inglés: arcuate nucleus)
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNsi: ácido ribonucleico pequeño interferente (acrónimo del inglés: ARN small interfering)
ATP: trifosfato de adenosina (acrónimo del inglés: adenosine triphosphate)
BChE: butirilcolinesterasa
BHE: barrera hematoencefálica
BSA: albúmina sérica bobina
CEBPα : CCAAT/enhancer binding proteína alfa (CEBP/α)
cAMP: monofosfato de adenosina cíclico
CART: péptido relacionado con cocaína y anfetamina (acrónimo del inglés: cocaine- and amphetamineregulated transcript)
CCK: Colecistoquinina
ChREBP: proteína de unión en respuesta a carbohidratos (acrónimo del inglés: carbohydrate-responsive) ***el gen se describe con las siglas: mlxipl***
CO_2: dióxido de carbono
CPT (1α y 2): carnitina palmitoiltransferasa
CREB: elemento de unión en respuesta a AMPc (acrónimo del inglés: cAMP response element-binding)
DAG: diacilgliceridos
DEPC: dietilpirocarbonato
DIO: obesidad inducida por la dieta (acrónimo del inglés: diet induced obesity)
DM2: diabetes mellitus tipo 2
DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico (acrónimo del inglés: dorsomedial hyphotalamic nucleus)
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (acrónimo del inglés: ethylene-diamine-tetraacetic acid)
elelement-binding protein)
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (acrónimo del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

EMEM: medio de cultivo celular (acrónimo del inglés: Minimum Essential Medium Eagle)
FADH: dinucleótido de flavina y adenina (acrónimo del inglés: flavin adenine dinucleotide)
FAS: ácido graso sintetasa (acrónimo del inglés: fatty acid synthase), ***el gen se describe con las siglas: Fasn.***
FBS: suero bovino fetal (acrónimo del inglés: fetal bovine serum)
FGF21: factor de crecimiento fibroblástico 21 (acrónimo del inglés: fibroblast growth factor 21)
FoxO1: factor de transcripción (acrónimo del inglés: Forkhead box O1)
G6PC: glucosa-6-fosfato
GABA: ácido gamma-aminobutírico
GCK: glucoquinasa
GH: hormona de crecimiento (acrónimo del inglés: growth horomone)
GHS-R: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (acrónimo del inglés: growth hormone secretagogue receptor)
GHSR1a: receptor 1a del secretagogos de la hormona de crecimiento (acrónimo del inglés: growth hormone secretagogue receptor type 1a)
GHSR1b: receptor 1b del secretagogos de la hormona de crecimiento (acrónimo del inglés: growth hormone secretagogue receptor type 1b)
GIP: polipéptido inhibidor gástrico (acrónimo del inglés: gastric inhibitory polypeptide)
GK: glucoquinasa
GLP-1: péptido 1 similar al glucagón (acrónimo del inglés: glucagón-like peptide 1)
GLUT (1, 2 o 4): transportador de glucosa (tipo 1, 2 o4) (acrónimo del inglés: glucose transporter) ***el gen se describe con las siglas: Slc2a2***
GOAT: ghrelina o-acil-transferasa
GPCR: receptor acoplado a proteína G
h: hora/s
HDL: lipoproteínas de alta densidad (acrónimo del inglés: high density lipoprotein)
HPRT: gen de hipoxantina fosforibosiltransferasa (acrónimo del inglés: hypoxanthine phosphoribosyltransferase)
HSL: lipasa sensible a hormonas (acrónimo del inglés: hormone-sensitive lipase)
HSP90: proteína chaperona de shock térmico (acrónimo del inglés: heat shock protein 90)
IBMX: isobutilmetilxantina
ICV: intracerebroventricular
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1 (acrónimo del inglés: insulin-like growth factor 1)
IL: interleuquina
IMC: índice de masa corporal
IP: intraperitoneal
KHH: medio de cultivo celular (acrónimo del inglés:buffer Krebs-Henseleit-HEPES)
KO: (acrónimo del inglés: *knock out*)
LDL: lipoproteínas de baja densidad (acrónimo del inglés: low density lipoprotein)
LDLR: receptor para lipoproteínas de baja densidad (low density lipoprotein receptor)

LDN: lipogénesis de novo
LEAP-2: péptido antimicrobiano 2 que se expresa en el hígado (acrónimo del inglés: liver expressed antimicrobial peptide 2)
Lep-R: receptor de leptina
LHA: área hipotalámica lateral (acrónimo del inglés: lateral hypothalamic area)
LPL: lipoproteína lipasa
LXR: receptor nuclear hepático X (acrónimo del inglés: liver X receptor) ***el gen se describe con las siglas: Nr1h2***
MAFLD: enfermedad de hígado graso asociada a disfunción metabólica (acrónimo del inglés: metabolic-associated fatty liver disease)
MCH: hormona concentradora de melanina (acrónimo del inglés: melanin concentrating hormone)
MG: monoacilglicéridos
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero (acrónimo del inglés: mammalian target of rapamycin)
Mttp: proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (acrónimo del inglés: microsomal triglyceride transfer)
Myf5: factor miogénico 5 (acrónimo del inglés: myogenic factor 5)
NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina (acrónimo del inglés: nicotinamide adenine dinucleotide)
NE: norepinefrina
NEFAs: ácidos grasos libres (acrónimo del inglés: non-esterified fatty acids)
NPY: neuropéptido Y
O_2: oxígeno
OCR: tasa de consumo de oxígeno (acrónimo del inglés: oxygen consuption rate)
OMS: organización mundial de la salud
OVX: ovarectomía
OX: orexina
OXM: oxintomodulina
OXPHOS: complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial
PBS: solución salina tamponada con fosfato (acrónimo del inglés: phosphate buffered saline)
PC: piruvato carboxilasa
PCK:fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (acrónimo del inglés: phosphoenolpyruvate carboxykinase) ***el gen se describe con las siglas: pck***
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (acrónimo del inglés: polymerase chain reaction)
PDH: piruvato deshidrogenasa (acrónimo del inglés: piruvate deshidrogenase)
PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa (acrónimo del inglés: piruvate deshidrogenase kinase)
PFK: fosfofructoquinasa
PGC1: coactivador de PPARγ 1 (acrónimo del inglés: PPAR γ coactivator 1)
PI3K: fosfoinositol 3 kinasa (acrónimo del inglés: phosphoinositide 3-kinase)
PK: piruvato quinasa (acrónimo del inglés: pyruvate kinase)
PKA: proteína quinasa A (protein kinase A)

PKC: proteína quinasa C (protein kinase C)
POMC: proopiomelanocortina
PP: polipéptido pancreático
PPAR (α y γ): receptor activado del proliferador del peroxisoma (acrónimo del inglés: peroxisome proliferator activated receptor)
Prdm16: dominio Pr 16 (acrónimo del inglés: Pr domain zinc finger 16)
PVDF: difluoruro de polivinilideno
PVN: núcleo paraventricular hipotalámico (acrónimo del inglés: paraventricular nucleous)
PYY: péptido YY
QM: quilomicrones
RE: retículo endoplasmático
RI: resistencia a la insulina
ROS: especies reactivas de oxígeno (acrónimo del inglés: reactive oxygen species)
rpm: revoluciones por minuto
RQ: cociente respiratorio (acrónimo del inglés: respiratory quotient)
RT-PCR: PCR a tiempo real
SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1 (acrónimo del inglés: -CoA desaturase 1)
SDS: dodecil-sulfato sódico (acrónimo del inglés: sodium dodecylSulfate)
SEM: error estándar de la media (acrónimo del inglés: standard error of the mean)
SHAM: "impostor", grupo control de OVX
SIRT1: sirtuina 1
SNC: sistema nervioso central
SNPS: sistema nervioso parasimpático
SNS: sistema nervioso simpático
SREBP1c: proteína de unión reguladora de esterol tipo 1-c (acrónimo del inglés: sterol regulatory elementbinding protein 1c) ***el gen se describe con las siglas: Srebf1*.**
STD: estándar (acrónimo del inglés: standard), también empleado en el texto para denominar a la dieta estándar de los roedores.
TA beige: tejido adiposo beige
TAB: tejido adiposo blanco
TABep: tejido adiposo blanco epididimal
TABsc: tejido adiposo blanco subcutáneo
TAE: Tris-acetato-EDTA
TAM: tejido adiposo marrón
TCA: ciclo del ácido cítrico o tricarboxílico (acrónimo del inglés: tricarboxylic acid cycle)
TG: triglicéridos
THLE-2: (acrónimo del inglés: Transformed Human Liver Epithelial-2)
TNFα: factor α de necrosis tumoral (acrónimo del inglés: tumor necrosis factor α)
UCP1: proteína desacopladora 1 (acrónimo del inglés: uncouplign protein 1)
UGN: uroguanilina
VHFD: dieta muy alta en grasa (acrónimo del inglés: very high fat diet)
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (acrónimo del inglés: very low density lipoprotein)

UVG

VMH: núcleo ventromedial hipotalámico (acrónimo del inglés: ventromedial hyphotalamic nucleus)
WT: controles de tipo salvaje (acrónimo del inglés: wild type)
α-MSH: hormona estimulante de melanocitos α (acrónimo del inglés:
β 3Adr: siglas de receptor adrenérgico β 3

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

En el siglo XIX el fisiólogo francés Claude Bernard declaró el principio de la constancia del medio interno. Posteriormente, Walter B. Cannon acuñó la palabra "homeostasis" (palabra resultante de la combinación de dos términos griegos "homoios" que significa constancia y "stasis" que significa posición, estabilidad) para describir los mecanismos que mantienen constantes las condiciones del medio interno de un organismo, a pesar de grandes oscilaciones en el medio externo.

Desde los años 90 se sabe que un aumento de la ingesta asociada a un aumento de masa corporal se asocia, a su vez, a un aumento en el gasto energético. Del mismo modo, la restricción calórica, con su consecuente pérdida de masa corporal se ve compensada con una reducción en el gasto energético (1). Estos datos evidenciaban la existencia de un sistema regulador de la homeostasis energética muy sensible, que mantiene la masa corporal entre unos umbrales específicos.

Así mismo, la energía de cualquier sistema cerrado ni se crea ni se destruye, sino que se transforma, según la primera ley de la termodinámica. Esta ley fisicoquímica dice que, la variación de la energía interna de un sistema adiabático (que no tiene intercambio de calor con otros sistemas o el entorno) viene determinado por la suma de calor y trabajo. En este contexto, un organismo vivo podría considerarse un sistema adiabático, ya que incorpora nutrientes y transforma la energía química (por oxidación de los combustibles) en otros elementos químicos mediante procesos anabólicos, o en energía mediante procesos catabólicos. Sin embargo, los organismos son variables entre sí y la termodinámica no tiene en cuenta el incremento del gasto energético cuando se aumenta de masa corporal y viceversa.

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

Para simplificar, nos referiremos al balance energético como la variación de las reservas de energía, equivalente a la diferencia entre la ingesta y el gasto de energía donde gasto energético está constituido por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis adaptativa, mientras que la energía absorbida se debe exclusivamente a la ingesta calórica (imagen 1).

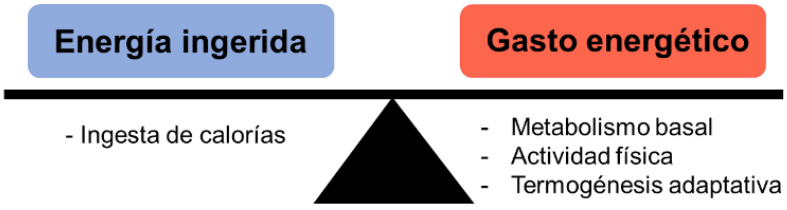


Imagen 1. Balance energético (elaboración propia, mediante Power Point).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sin embargo, esta forma de simplificar el balance energético no contempla que no todos los nutrientes ingeridos, son absorbidos por el tracto digestivo. Una fracción de los alimentos consumidos termina siendo excretado, bien por excreción fecal o por filtración renal. Esta pérdida de absorción de nutrientes muy a menudo no se tiene en cuenta en el balance energético, pero si juega un importante papel, de hecho, se estima que esta pérdida en heces y orina puede llegar a suponer un 5 % de la energía ingerida. Por este motivo, la retención de nutrientes y excreción de calorías han surgido como dos componentes que potencialmente afectan la masa corporal humana (2).

El balance energético de un organismo refleja la homeostasis energética; es decir, la capacidad del organismo para mantener un equilibrio dinámico entre la energía obtenida, almacenada y gastada (metabolismo) gracias a una red de sistemas de control retroalimentados que constituyen los mecanismos de autorregulación. Un balance energético positivo refleja un fenotipo obeso, y se produce cuando existe un desequilibrio crónico, siendo el número de calorías ingeridas superior al número de calorías consumidas; mientras que el negativo un fenotipo anoréxico, ejemplos ambos de desequilibrio en el balance energético (3).

A pesar de esta aparente sencillez, la homeostasis energética está influenciada por múltiples factores, tanto endógenos (genéticos y hormonales) como exógenos (factores nutricionales, culturales, ambientales y psicológicos), lo cual hace que su estudio sea más complejo y para entenderlo tengamos que profundizar más en su regulación (4).

1.1 REGULACIÓN CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El principal centro regulador de la homeostasis energética es el cerebro y de todas sus regiones, el hipotálamo es el principal centro de control. El hipotálamo orquesta y coordina la regulación neuroendocrina del equilibrio energético. Lo hace por una vía compleja a través de señales aferentes recibidas desde la periferia, que van a depender del estado nutricional; y vías eferentes que incluyen el sistema nervioso simpático (SNS), que promueve el gasto de energía, y el sistema nervioso parasimpático (SNPS), que promueve el almacenamiento de la energía. (5).

El hipotálamo está constituido por grupos neuronales anatómicamente definidos, llamados núcleos, que forman circuitos neuronales interconectados a través de proyecciones axonales. Los núcleos hipotalámicos son sensibles a nutrientes y hormonas, modificando la expresión, secreción y actividad de los neurotransmisores y neuromoduladores específicos, lo que resulta en cambios en la ingesta y el gasto energético (6). Estos núcleos están interconectados, y los circuitos originados en esta área cerebral tienen un papel muy especializado en la homeostasis energética. Sin embargo, para una mejor comprensión se pueden definir por su función principal, siendo el núcleo arcuato (ARC) el centro que regulan la ingesta, el núcleo ventromedial (VMN) junto con el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH) que se encargan de la regulación de la saciedad, el núcleo hipotálamo lateral (LHA), que es considerado el centro del hambre, y el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo que recibe e integra la información aferente de otros núcleos cerebrales relacionados con la ingesta.

Núcleo arcuato (ARC). Es una población de neuronas ubicada en el hipotálamo medio basal, en la base del tercer ventrículo y adyacente a la eminencia media, donde la barrera hematoencefálica (BHE) es semipermeable. Este hecho permite el paso de numerosas señales circulantes periféricas transportadas por el fluido cerebroespinal, pudiendo así responder rápidamente a fluctuaciones hormonales y nutricionales en el organismo. Debido a que integra señales hormonales y metabólicas circulantes, está considerado uno de los núcleos más importantes en la regulación y control del gasto y la ingesta de energía (7). Los grupos neuronales que componen este núcleo están muy inervados por axones de distintas zonas cerebrales y presentan receptores para una gran variedad de hormonas. Se distinguen dos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

poblaciones neuronales antagónicas que juegan un papel esencial en la regulación de la homeostasis energética:

Las neuronas AgRP. Son neuronas que expresan neuropéptido Y/ péptido relacionado con agutí (NPY/AgRP). Son neuronas orexigénicas, lo que quiere decir que promueven un balance energético positivo aumentando la ingesta de alimentos y la masa corporal y disminuyendo el gasto energético. La administración central de AgRP o bien su sobreexpresión genética induce un aumento de la ingesta y una disminución del gasto energético, causando de esta manera obesidad. La activación de estas neuronas genera una liberación de AgRP y ácido gamma-aminobutírico (GABA) actuando sobre diferentes poblaciones neuronales hipotalámicas (8).

Las neuronas POMC. Son neuronas que expresan pro-opiomelanocortina/ transcripción regulada de cocaína y anfetamina (POMC/CART). Son neuronas anorexigénicas, lo que implica que favorecen el balance energético negativo, disminuyendo la ingesta de alimentos y la masa corporal, y aumentando el gasto energético. La deficiencia genética de estas neuronas en roedores y humanos produce obesidad e hipofagia y la estimulación de estas reduce la ingesta (9). La activación de las neuronas POMC da como resultado la liberación de péptidos POMC y CART. El péptido POMC se procesa para generar la hormona estimulante de melanocitos α (α-MSH), que se libera y agoniza los receptores de melanocortina 4 (MC4R) en las neuronas de otras regiones del cerebro. POMC también actúa como precursor de la adrenocorticotropina (ACTH) y de β-endorfina (10,11). Este paradigma de la población neuronal POMC está cuestionándose en la actualidad, recientemente se ha visto que este grupo de neuronas son una población neuronal heterogénea y diversa. Varios estudios con métodos sesgados y no sesgados sugieren que diferentes poblaciones de neuronas POMC pueden influenciar respuestas metabólicas divergentes u opuestas como resultado de sus propiedades intrínsecas intracelulares, incluyendo la expresión de receptores concretos (de leptina, insulina, GLP-1…) y neurotransmisores (GABA, Glutamato, α-MSH, β-endorfina, POMC…) implicados en el control metabólico (12).

La mayoría de las neuronas del ARC expresan los receptores de leptina (13) e insulina (14) y ambas hormonas inhiben la actividad de las neuronas NPY/AgRP, mientras que ghrelina (15) estimula la actividad de estas. En contraposición, las neuronas POMC/CART son activadas por leptina e insulina (16) e inhibidas por ghrelina (17).

Estas neuronas en el núcleo ARC constituyen el primer orden de neuronas implicadas en la regulación de la ingesta y proyectan a otras áreas hipotalámicas cuyas neuronas constituyen las neuronas de segundo orden.

Hipotálamo lateral (LHA). Está situado inferior al núcleo ventromedial, anterior a los núcleos mamilares y posteroinferior al núcleo supraóptico. Es un área considerada como un centro esencial en la regulación de la masa corporal y de la ingesta. Este núcleo se caracteriza por recibir e integrar numerosas señales, participando en funciones como aprendizaje, emoción, memoria y respuestas motoras. El LHA recibe proyecciones aferentes del ARC a través de dos rutas distintas, una que incluye fibras que pasan a través del DMH desde la vía periventricular y una ruta ventral que pasa ventral y lateral al VMH. En este núcleo se secretan neuropéptidos orexigénicos que van a intervenir en el sistema mesolímbico de recompensa modulando la parte hedónica de la ingesta (18). Los principales neuropéptidos en este núcleo son la orexina (OX) y la hormona concentradora de melanina (MCH). La orexina (OX) es un neuropéptido orexigénico, que presenta dos isoformas (A y B) derivadas de un mismo precursor: la pre-pro-orexina. Las acciones de este péptido son mediadas por dos receptores acoplados a proteínas G, los receptores de orexina 1 y 2 (19). La expresión de pre-pro-orexina se incrementa en ayuno y la administración de cualquiera de las isoformas de orexina, aumentan la ingesta. Además, representan un modulador crucial de la tasa metabólica y de la termogénesis, ya que proyectan

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

hacia las neuronas simpáticas del núcleo del rafe pálido incrementando la termogénesis del tejido adiposo marrón (TAM) (20,21). La hormona concentradora de melanina (MCH) es también un neuropéptido orexigénico, cuya inyección en el núcleo LHA incrementa la ingesta de alimentos en ratas (22,23) y estos efectos son revertidos por la administración de leptina. Se ha demostrado que tanto los animales sometidos a ayuno como animales con obesidad monogénica (ob/ob) presentan niveles elevados de MCH y Además, se ha descrito que los ratones carentes de MCH, que son hipofágicos y delgados (24) y aquellos ratones KO para el receptor 1 de MCH tienen el gasto energético y la actividad locomotora incrementados y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta (DIO) (23).

Núcleo dorsomedial (DMH). Es una estructura cerebral adyacente al tercer ventrículo, que se encuentra caudal y ventral al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Su porción lateral es adyacente tanto al fórnix como al LHA. El DMH se subdivide en dos porciones distintas: una zona difusa y otra compacta y está involucrado en múltiples procesos fisiológicos como la termorregulación, el apetito, el estrés y ritmos circadianos. El DMH recibe proyecciones del ARC y manda proyecciones hacia el LHA y el PVH integrando y procesando esta información (25). Las neuronas del DMH expresan NPY y un aumento de NPY mediante manipulación farmacológica o genética en este núcleo estimula la ingesta y aumento de masa corporal (26).

Núcleo paraventricular (PVN). Está situado en el hipotálamo anterior, en la parte superior del tercer ventrículo y juega un papel importante en la integración de la ingesta de alimentos y la función neuroendocrina. En este núcleo convergen numerosas vías neuronales desde otras regiones hipotalámicas, incluyendo proyecciones de neuronas AgRP/NPY, POMC y OX, implicadas en el balance energético. Sus neuronas expresan los receptores de melanocortinas receptor 3 y receptor 4. Las neuronas AgRP/NPY inhibe la expresión del gen de la hormona liberadora de TSH (TRH) mientras que α-MSH estimula su expresión y revierte la expresión inducida por el ayuno de la hormona liberadora de tirotropina. El PVH también contiene neuronas de la hormona liberadora de corticotropina, que forman circuitos recíprocos con las neuronas NPY en el ARC. Todo esto, hace que el PVN desempeñe un papel importante en la integración de señales nutricionales con la glándula tiroides y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (27).

Núcleo ventromedial (VMH). Es un núcleo con una estructura en forma de pera, situado en la región tuberal del hipotálamo. Fue denominado en la década de los cuarenta "centro de la saciedad" al comprobarse que lesiones bilaterales en este núcleo causaban hiperfagia y obesidad. Además, está implicado en un gran número de funciones homeostáticas y comportamentales como el comportamiento sexual femenino, la alimentación, el balance energético y la función cardiovascular (28). El VMH se caracteriza por ser un elemento integrador de señales periféricas ya que tiene numerosas conexiones neuronales con otros núcleos hipotalámicos y con otras áreas del cerebro implicadas en la ingesta. Este núcleo además se considera el principal núcleo regulador del control del gasto energético mediante la modulación de la termogénesis en el TAM por la inhibición de la kinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (29). Las neuronas del VMH muestran una gran abundancia de receptores de leptina, ghrelina, estrógenos, hormonas tiroideas y neuropéptidos. Sin embargo, a pesar de la identificación de estos receptores, los mecanismos moleculares que regulan la ingesta en el VMH aún no están bien establecidos. El factor esteroidogénico1 se expresa exclusivamente en el VMH y se ha visto que ratones *knock out* (KO) en este factor de transcripción presentan obesidad, pudiendo incluso alcanzar el doble de su masa corporal (30). Además, en este núcleo se expresa el factor neurotrófico derivado del cerebro, (en siglas, BDNF) que también está implicado en la regulación de la ingesta y la masa corporal (31).

USC DE COMPOSTELA

1.2 REGULACIÓN PERIFÉRICA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La plasticidad sináptica de los circuitos neuronales centrales asociados con la ingesta, son regulados por señales periféricas como una respuesta a los cambios en el estado energético del organismo (32). Estudios recientes muestran que, estas vías específicas presentes en el sistema nervioso central (SNC), también se conectan directamente a tejidos periféricos como el hígado, el tejido adiposo blanco (TAB) y el TAM, y por tanto influyen directamente en el metabolismo hepático y de los adipocitos (33,34).

Existe una gran cantidad de señales cuya función es informar al SNC sobre el estado y las necesidades energéticas del organismo. Los tejidos periféricos secretan señales que llegan hasta el SNC, el cual a través del sistema nervioso simpático (SNS) y el parasimpático (SNPS), inerva de manera diferencial el tracto gastrointestinal, el hígado, el TAB y el TAM, modulando la función metabólica y secretora de estos órganos periféricos, completando así un circuito de información entre el SNC y la periferia.

El control de la ingesta se produce por dos tipos de señales circulantes que se relacionan directamente con las concentraciones de metabolitos en sangre y la reserva energética en el tejido adiposo (35). Las señales que se generan a corto plazo controlan la cantidad de alimento ingerido, el número y duración de las comidas y se ven influidas por señales fisiológicas, patrones conductuales-culturales o por el estrés ambiental. Las señales de más largo plazo son aquellas que hacen posible la existencia de los depósitos de energía del organismo. Estas señales dan lugar a mensajes que informan al cerebro sobre la masa grasa corporal total, interactúan con los circuitos neuronales catabólicos y anabólicos, provocando un cambio en la sensibilidad del cerebro a las señales de saciedad. En general, la acción de los mecanismos de control a largo plazo minimiza el efecto de los factores a corto plazo (36).

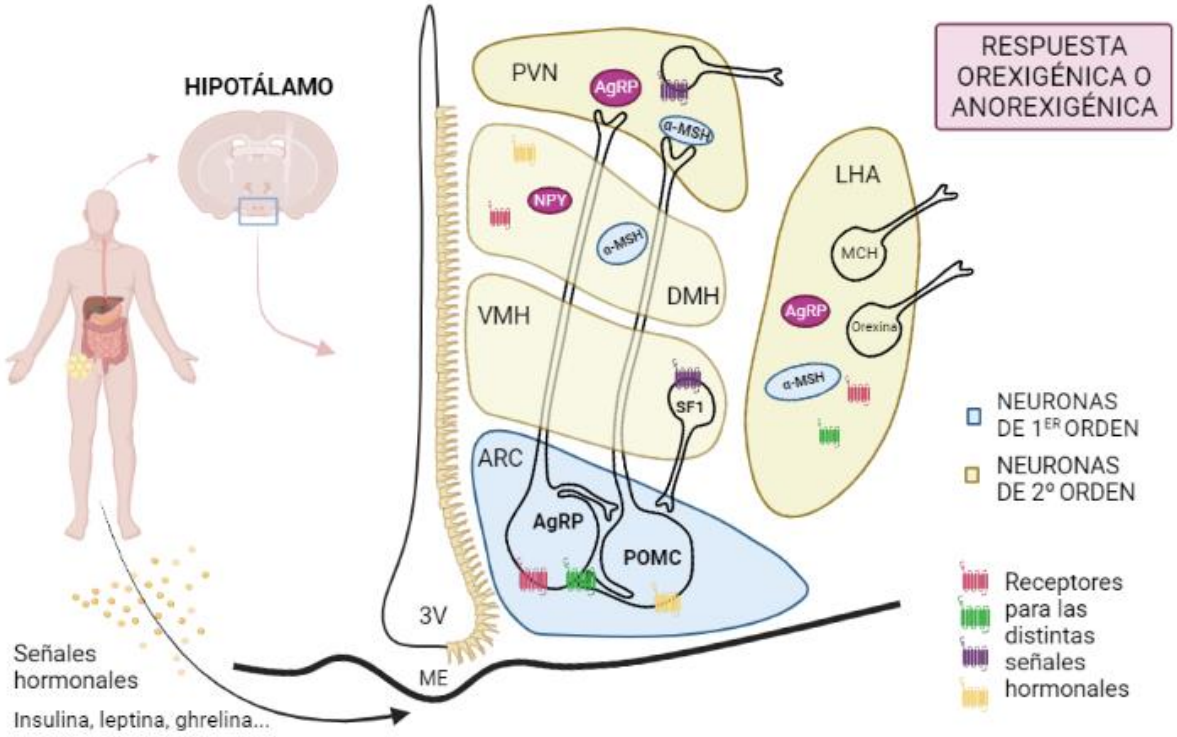


Imagen 2. Esquema de la integración de señales centrales y periféricas por el hipotálamo (elaboración propia, mediante BioRender).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. EL TRACTO GASTROINTESTINAL

El tracto gastrointestinal juega un papel crucial en la regulación de la ingesta de alimentos, informando al SNC sobre la cantidad de alimento ingerido y la composición nutricional del mismo. La información que se genera durante la ingesta converge fundamentalmente en el núcleo del tracto solitario. Así, la señal de saciedad es transmitida al tallo cerebral por medio del nervio vago o fibras aferentes, que pasan a la médula espinal a partir del tracto gastrointestinal superior. En las últimas décadas el conocimiento sobre el eje intestino-cerebro ha aumentado considerablemente, y se sabe que, además de las funciones propiamente gástricas, el sistema nervioso entérico está implicado en la secreción exocrina gástrica y pancreática, la motilidad intestinal, el riego sanguíneo y la liberación de hormonas (37,38).

2.1 HORMONAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Las hormonas peptídicas procedentes del tracto gastrointestinal juegan un importante papel en el control de la ingesta. Excepto ghrelina que es orexigénica, el resto de las hormonas gastrointestinales aisladas hasta el momento, son anorexigénicas (32,39).

Ghrelina, es un péptido acilado que fue identificado como ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) (15). La administración central o periférica de ghrelina estimula la ingesta y la adiposidad (40), por lo que es considerada moduladora de la homeostasis energética. Una vez liberada, ghrelina es capaz de atravesar la BHE y unirse a su receptor hipotalámico GHSR1a. Debido a la relevancia de esta hormona en este trabajo, trataré sobre el sistema de ghrelina de forma más extensa, en una sección específica, al tratarse del tema central de este trabajo de investigación.

Incretinas, **s**on una serie de hormonas que se producen en el intestino, y se liberan al torrente sanguíneo en respuesta a la ingesta de alimentos. Uno de sus efectos más importantes es la secreción de insulina por el páncreas y, por consiguiente, la disminución en los niveles de glucosa en sangre. Las incretinas principales son el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y la oxintomodulina (OXM)**.** GIP, es un péptido que se sintetiza principalmente en las células K que se encuentran en el duodeno y la primera parte del yeyuno, mientras que GLP-1 y la OXM son unas incretinas derivadas del procesamiento postranscripcional del gen pre-pro-glucagón por las células L que se encuentran principalmente en el íleon y el colon. GLP-1 ejerce sus efectos a través del receptor 1 de GLP-1, mientras que, para la OXM aún no se ha descrito ningún receptor específico por lo que, hasta el momento, se asume que su acción se ejerce a través del receptor de GLP-1, pero con menos especificidad. Respecto a las funciones de GLP-1, además de incrementar la secreción de insulina, inhibe la secreción de glucagón, inhibe la motilidad gastrointestinal y la secreción ácida del estómago (41,42). A nivel central, GLP-1 no sólo actúa en el hipotálamo disminuyendo la ingesta de alimentos (43), sino que afecta al metabolismo lipídico en el tejido adiposo mediante la reducción del almacenamiento de triglicéridos (TG) independientemente de la ingesta (44). Además, a nivel de TAM se ha descrito que el GLP-1 central induce una activación de la termogénesis mediada por el SNC (45). En cuanto a las acciones de la OXM,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se sabe que reduce la secreción de ácido por el estómago, y que su administración reduce la ingesta, además de provocar pérdida de masa corporal y adiposidad en roedores (46).

Colecistoquinina (CCK), fue la primera hormona a nivel intestinal a la que se le atribuyó un efecto anorexigénico sobre el apetito. La liberación de CCK tiene lugar en las células endocrinas tipo I localizadas en la mucosa del duodeno y yeyuno, en respuesta a la presencia de nutrientes en el intestino. Se han caracterizado dos receptores para CCK, el receptor 1, presente mayoritariamente en el tracto gastrointestinal; y el receptor 2, principalmente en el cerebro. Sus funciones intestinales principales son el retraso del vaciado gástrico, la estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas, y la contracción de la vesícula biliar. Se ha descrito que la administración periférica de CCK produce saciedad y disminuye la cantidad de alimento ingerido (47).

Péptido YY (PYY), pertenece a la familia del neuropéptido Y. Es un péptido secretado por las células L del íleon y del colon inmediatamente tras la ingesta de alimento. Entre las funciones fisiológicas del PYY se ha descrito que retrasa el vaciamiento gástrico e inhibe la secreción pancreática y de la vesícula biliar. En lo referente a las acciones de PYY sobre el apetito es principalmente un factor de saciedad y este efecto es ejercido por una forma molecular especifica: PYY3-36 (48).

Uroguanilina (UGN), es un péptido secretado por el tracto gastrointestinal y que recientemente se ha postulado como una nueva señal en la regulación de la homeostasis energética por su efecto dual regulando tanto ingesta como gasto energético (49).

2.2 HORMONAS PANCREÁTICAS

Otro órgano anexo al tracto gastrointestinal es el páncreas. Como glándula exocrina segrega jugo pancreático al duodeno a través del conducto pancreático. Pero este órgano también actúa como glándula endocrina, segregando al torrente sanguíneo varias hormonas importantes, entre las que se encuentran insulina, glucagón o el polipéptido pancreático.

Insulina, es una hormona polipeptídica que es secretada por las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa en sangre. Su acción sobre sus receptores (de tipo tirosin-kinasa) genera una respuesta hipoglucemiante, mediante el incremento de la captación de glucosa por los tejidos. La insulina es la hormona de mayor potencial anabólico, ya que favorece la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, inhibe la degradación y liberación de ácidos grasos (AG) y glucosa al torrente sanguíneo, favoreciendo, por lo tanto, el almacenamiento energético en tejidos periféricos como músculo, grasa e hígado. Sin embargo, su administración intracerebroventricular (ICV) causa una disminución de la ingesta y de la masa corporal. Esta acción es mediada por receptores de insulina distribuidos en diferentes núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta, siendo especialmente abundantes en neuronas POMC/CART y AgRP/NPY del ARC (50).

Glucagón, es una hormona que actúa en el metabolismo de los hidratos de carbono. Esta hormona es sintetizada por las células α de los islotes de Langerhans pancreáticos. Su liberación es estimulada por bajos niveles de glucosa en sangre. Tiene un efecto hiperglucemiante que genera mediante el incremento de la liberación y generación de novo de glucosa en el hígado. Es decir, estimula la gluconeogénesis. Además, tiene potente efecto glucogenolítico, e inhibe la glucólisis. Pero, además de su efecto hiperglucemiante en condiciones de hipoglucemia, el glucagón también disminuye la ingesta y la masa corporal en ratones y humanos, además de incrementar la tasa metabólica (51).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Polipéptido pancreático (PP), es un péptido que pertenece a la familia de péptidos que también incluye a PYY y NPY. La PP es producida principalmente por células periféricas de los islotes de Langerhans, el páncreas exocrino y el tracto gastrointestinal distal. El efecto anorexígeno de la PP está mediado por el receptor Y5 y se ejerce a través de las vías del tronco encefálico (en el área postrema). El péptido PP genera una regulación de neuropéptidos hipotalámicos (NPY y OX) y la modulación de la expresión de ghrelina (52).

3. EL HÍGADO

Dentro de los procesos metabólicos implicados en la homeostasis energética, el hígado juega un papel fundamental, ya que es el principal órgano encargado del procesamiento inicial de los nutrientes. Tras la absorción en el intestino de los productos de la digestión, estos son conducidos por la vena porta hasta el hígado para ser procesados y posteriormente distribuidos al resto del organismo. La regulación de sus funciones ocurre a través del nervio vago del SNPS, que traslada la información sobre el estado energético del organismo desde el SNC al hígado, mediando en su metabolismo, lo que contribuye decisivamente a mantener constantes los niveles sanguíneos de diversos metabolitos (53).

El hígado interviene en el metabolismo de aminoácidos y lípidos, actúa como glándula exocrina responsable de la producción de ácidos biliares. Es el órgano central en la realización de lipogénesis, gluconeogénesis y en el metabolismo del colesterol. Es además el principal órgano detoxificado del organismo y también desempeña un papel esencial en la homeostasis metabólica, siendo el principal lugar de síntesis, metabolismo, almacenamiento y redistribución de carbohidratos, proteínas y lípidos. Además, el hígado actúa como almacenaje de energía en forma de glucógeno hepático.

El balance metabólico en el hígado está en gran medida regulado por la insulina y el glucagón, que actúan de forma directa sobre este órgano para conseguir un control de la actividad de las rutas metabólicas de los hidratos de carbono y de los lípidos (54).

3.1 EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

La grasa constituye la principal forma de almacenaje de energía en los mamíferos, y numerosos órganos y tejidos están implicados en su metabolismo, siendo los más importantes el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado.

El metabolismo de lípidos empieza con la ingesta de grasas, y gran parte de esos lípidos de la dieta se encuentran en forma de triglicéridos (TG), que consisten en tres AG esterificados en un esqueleto de glicerol. Estos TG son digeridos a lo largo del tracto digestivo por acción de diferentes lipasas, y de las sales biliares, que emulsionan los TG, dando lugar a diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MG) y AG libres. Estos son por los enterocitos intestinales, donde son nuevamente esterificados, dando lugar a TG que, junto con el colesterol de la dieta, fosfolípidos y ciertas apoproteínas, forman los quilomicrones (55).

Los quilomicrones salen de la mucosa intestinal hacia el sistema linfático, desde donde son drenados a la circulación sanguínea, donde se asocia con apolipoproteínas. Esto provoca la digestión de los TG de los quilomicrones dando lugar a AG y glicerol que finalmente son capturados y almacenados en los adipocitos u oxidados en el músculo. Asimismo, cuando el organismo incrementa la demanda de energía, los TG almacenados en el tejido adiposo se

USC DE COMPOSTELA

liberarán como AG a través de la lipólisis y se transportan a la circulación como AG libres unidos a la albúmina.

Todos los AG liberados de una forma u otra al torrente sanguíneo son incorporados por el hígado a través de la vena porta. La elasticidad hepática en relación con la capacidad de almacenaje de TG, le permite acomodarse a distintas concentraciones plasmáticas de AG libres. Dado que los AG y sus metabolitos son la principal causa de la lipotoxicidad y promueven la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), los AG cuando llegan al hígado son re-esterificados con glicerol-3-fosfato para generar de nuevo TG, que son lípidos relativamente inertes. Estos TG, pueden ser almacenados para su futuro uso como tales en gotas lipídicas en el hepatocito, o rápidamente metabolizados y procesados, tras el acoplamiento a la apoproteína Apo B100, en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para ser secretados hacia el TAB y otros tejidos extrahepáticos (56,57).

Esta flexibilidad permite la neutralización de la toxicidad generada por los AG libres, en condiciones normales. Sin embargo, alteraciones metabólicas pueden producir disfunciones en esta ruta metabólica y en esta señalización hepática, y causar o predisponer a sufrir la enfermedad de hígado graso asociada a disfunción metabólica (MAFLD, acrónimo del inglés: metabolic-associated fatty liver disease), resistencia a la insulina (RI) y/o diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

3.1.1 Lipogénesis de novo hepática

La lipogénesis de novo (LDN) es el mecanismo de producción hepática de lípidos. Los pasos del metabolismo de los lípidos hepáticos están orquestados por una delicada interacción entre hormonas, receptores nucleares, vías de señalización intracelulares y factores de transcripción. Los dos sistemas enzimáticos más relevantes en la LDN son la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintetasa (FAS). El mecanismo de reacción comienza con la producción de malonil-CoA a partir de un precursor de acetil-CoA, derivado de la glucosa u otros carbohidratos precursores, bajo la actividad catalítica regulada de ACC. La lipogénesis está regulada en el paso de la enzima ACC mediante modificadores alostéricos, fosforilación/desfosforilación, e inducción y represión de la síntesis de la enzima. El malonil-CoA es posteriormente transformado por FAS en una secuencia de reacciones que dan como producto final palmitato.

Los niveles de glucosa e insulina, ambos inducidos por la alimentación son claves en la regulación de esta ruta metabólica, activando la expresión de factores de transcripción claves en la regulación de la LDN.

Cuando la vía de la insulina se activa, a través de la vía de señalización de AKT, receptor nuclear hepático X (LXR) y mTOR (58), se promueve la liberación proteolítica de la forma madura de SREBP1c, que se encuentra en forma de precursor anclada en la membrana del aparato de Golgi. Una vez liberada es capaz de dirigirse al núcleo y promover la transcripción de sus genes diana, entre los que se incluyen FAS y ACC (59).

La glucosa y altos niveles postprandiales de carbohidratos que llegan a los hepatocitos promueve la lipogénesis activando ChREBP, que al igual que SREBP1c, regula de forma positiva la expresión de múltiples genes involucrados en la síntesis de AG como son ACC, FAS y la esteoril-CoA desaturasa (SCD1) (60), y también incrementa la expresión de genes involucrados en la glucólisis, como la piruvato quinasa (PK), la cual proporciona piruvato que es convertido a acetil-CoA mediante la piruvato deshidrogenasa (PDH), lo cual proporciona más sustratos para la síntesis de AG y TG (60).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Si bien el LDN no es muy abundante en un hígado sano, se ha sugerido que está anormalmente aumentado en pacientes con MAFLD, contribuyendo hasta en un 26 % de las concentraciones de TG hepáticos (61).

3.1.2 Oxidación hepática de ácidos grasos

Los AG derivados de la hidrólisis de los depósitos de TG hepáticos, de la LDN o de los lípidos circulantes, pueden oxidarse por múltiples vías para generar energía. La oxidación de los AG se produce dentro de las mitocondrias, los peroxisomas y el RE.

La β-oxidación mitocondrial es la ruta principal para la oxidación de la mayoría de los AG que se encuentran en los hepatocitos, y consiste en la descomposición de AG en cadenas más cortas por una serie de deshidrogenasas. Los AG de cadena muy larga (C20-C26) y ramificada tienen que sufrir una primera oxidación en los peroxisomas para poder entrar a la mitocondria (62).

La entrada en la mitocondria es un factor clave en la regulación de la β-oxidación. Los AG entran en la mitocondria con la ayuda de carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2 (CPT1 y CPT2). CPT1, localizada en la membrana mitocondrial externa agrega carnitina a los AG para facilitar el transporte mitocondrial, mientras que CPT2, que se encuentra en la cara interna, elimina la carnitina (63). La expresión de CPT1 es el principal mecanismo encargado de controlar el flujo de la β-oxidación hepática, y por ello, su expresión está estrechamente regulada. El receptor activado por el proliferador de peroxisomas α (PPARα) induce la expresión de genes implicados en la oxidación de AG tanto mitocondriales como extra mitocondriales (64). Mientras que el malonil-CoA, un intermediario temprano de la LDN que se acumula tras la activación del receptor de insulina, es un inhibidor alostérico de CPT1 (65).

La oxidación finaliza con la liberación de acetil-CoA, el cual puede entrar en el ciclo del ácido cítrico en la mitocondria, para continuar oxidándose a agua (H_2O) y dióxido de carbono (CO_2), o podría condensarse en cuerpos cetónicos que sirven como sustratos energéticos oxidables para tejidos extrahepáticos.

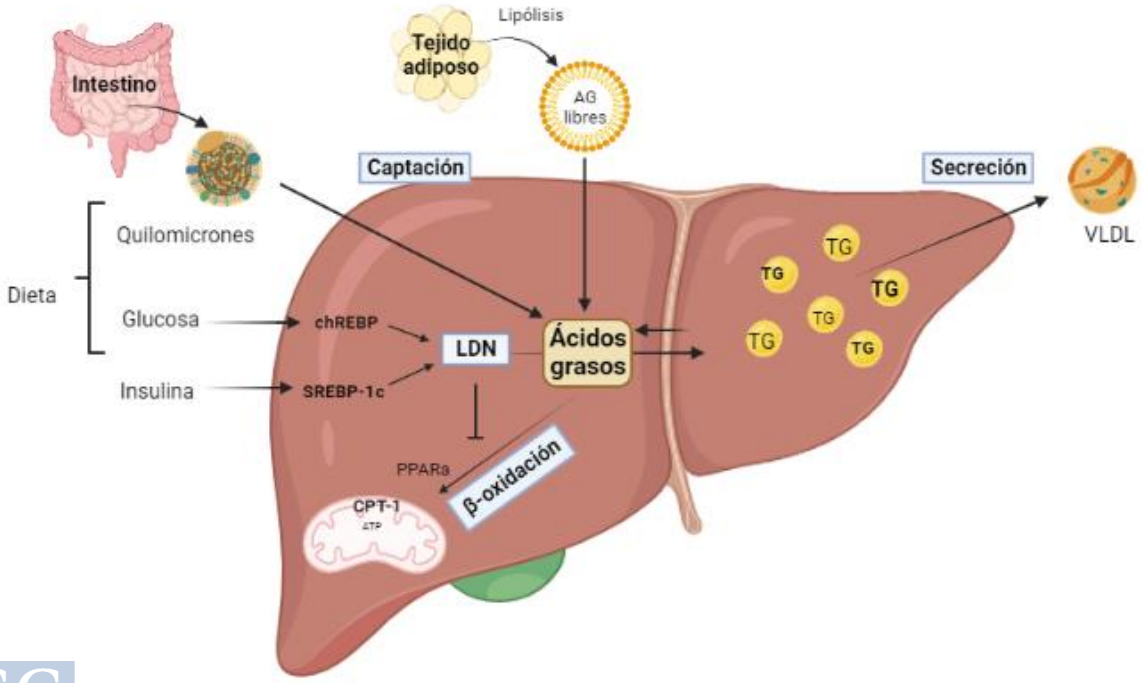


Imagen 3. Modelo del flujo lipídico en el hígado (elaboración propia, mediante BioRender).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 PAPEL DEL HÍGADO EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Como ya se ha descrito antes, tanto la insulina como el glucagón regulan la homeostasis de la glucosa en el organismo. Cuando se eleva el nivel de glucosa en plasma, las células β (beta) de los islotes de Langerhans del páncreas segregan insulina. La insulina, en el tejido hepático, activa la ruta metabólica PI3K/AKT a través de la cual se induce la captación de glucosa por el hepatocito.

Esta captación comienza por su paso a través de la célula mediado por el transportador de glucosa, GLUT2, en el hepatocito. Es un transportador de membrana con alta capacidad y baja afinidad por la glucosa y, a diferencia de otros transportadores de glucosa, la expresión y actividad de GLUT2 es independiente de insulina.

A partir de ahí, la glucosa es transformada a glucosa-6-fosfato por la glucoquinasa hepática (GCK), también conocida como hexoquinasa IV. Al contrario que otras hexoquinasas, GCK no es inhibida por su producto, lo que permite el almacenamiento de glucógeno en los hepatocitos durante el estado postprandial, además se trata de un enzima altamente regulado a nivel transcripcional por factores de transcripción como SREBP1c o FoxO1 (54). La glucosa-6-fosfato es incapaz de abandonar la célula, por lo que será procesada en la glucólisis o utilizada en la síntesis de glucógeno en función del estado metabólico.

Cuando hay un nivel bajo de glucosa en plasma, las células α (alfa) de los islotes de Langerhans del páncreas segregan glucagón, que actúa sobre el hígado para que este descargue glucosa, aumentando el nivel de glucosa en sangre. Para ello es necesario que se estimule la ruta catabólica llamada glucogenólisis, que degrada el glucógeno almacenado y lo transforma en glucosa, que pasa al torrente sanguíneo y se distribuye a todo el organismo para así aumentar la glucemia.

Si el organismo requiere energía se activa la ruta de la glucólisis. Esta es la ruta inicial del catabolismo de los hidratos de carbono, encargada de oxidar la glucosa y obtener energía. Se trata de una ruta de reacciones enzimáticas que consta de 10 pasos, mediante los que se convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, generando dos moléculas de ATP. La glucólisis se encuentra regulada principalmente por cuatro enzimas: la glucoquinasa (GK), la fosfofructoquinasa (PFK), la piruvato quinasa (PK) y la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK).

Cuando el organismo requiere de un aporte continuado de glucosa a los tejidos periféricos, si las reservas de glucógeno se han agotado y se continúa el estado de ayuno o de alta demanda energética, se activa en el hígado una ruta anabólica implicada en la síntesis de glucosa de novo, conocida como gluconeogénesis. En este proceso, se obtiene glucosa de novo a partir de precursores no glucídicos, como son los aminoácidos, el lactato y el glicerol. Para incorporarse a la gluconeogénesis, los aminoácidos pueden ser convertidos directamente a piruvato o a intermediarios del ciclo de Krebs; el lactato puede ser convertido directamente a piruvato por la lactato deshidrogenasa y el glicerol es convertido a dihidroxiacetona fosfato, que es un intermediario gluconeogénico (66).

La gluconeogénesis constituye la ruta opuesta a la glucólisis, compartiendo ambas 7 reacciones comunes, puesto que son reversibles. Difieren en los puntos de control, que en la gluconeogénesis los constituyen las enzimas piruvato deshidrogenasa (PDH), piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6PC), que catalizan reacciones irreversibles, siendo determinantes para la regulación del proceso gluconeogénico.

La regulación de la producción hepática de glucosa es un proceso complejo, dado que se realiza a nivel de sustrato, a nivel alostérico y a nivel transcripcional, donde confluyen factores de transcripción (como FoxO1, CREB, CEBP/α y PPARγ) y coactivadores (como PGC-1α) que

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

integran y median las diferentes respuestas desencadenadas por el estado nutricional y las hormonas reguladoras de la glucosa, dando lugar a la activación o a la represión de la expresión de los diferentes genes implicados en la producción de glucosa (67).

3.3. METABOLISMO INTERMEDIARIO, EL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO

El metabolismo intermediario es clave en la interconexión de las principales rutas metabólicas mencionadas hasta ahora. Tanto de la degradación de la glucosa, de AG o de aminoácidos, se genera como metabolito el acetil-CoA. La oxidación de este acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico (también llamado ciclo de Krebs, ciclo del ácido tricarboxílico, TCA) es el proceso central del metabolismo energético. A pesar del papel central que juega este ciclo en el metabolismo energético su función no se limita solo a la conservación de energía. Es un ciclo anfibólico, los intermediarios de 4 y 5 átomos de carbono generados en el ciclo actúan como precursores de una amplia gama de productos, como es la generación de aminoácidos, glucosa o AG. Además, las células emplean las reacciones anapletóricas (de relleno) que permiten reponer los intermediarios del ciclo de Krebs, generando un equilibrio dinámico.

Una familia de coactivadores estrechamente ligada a la regulación transcripcional del metabolismo intermediario es la del coactivador del receptor gamma 1 (PGC1). Sus principales miembros, PGC1α y β juegan un importante papel en la regulación de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo oxidativo a través de la coactivación junto con PPARα de sus genes diana, implicados en la oxidación de AG y en la fosforilación oxidativa (68). También, PGC1α estimula la expresión de genes glucogénicos, mientras que PGC1β estimula la síntesis y liberación de TG al activar la expresión de genes lipogénicos a través de la coactivación directa de SREBP1c, LXR y ChREBP en los hepatocitos (69,70).

4. EL TEJIDO ADIPOSO

Incluyendo al ser humano, los mamíferos presentan una alimentación intermitente, pero gastan energía de forma continua, por lo que es necesario un almacenamiento temporal de energía. Dicho almacenaje de energía se realiza mediante depósitos de lípidos que conforman el tejido adiposo. En mamíferos, existen 3 tipos distintos de tejido adiposo, que se diferencian por su distribución, color, vascularización y actividad metabólica.

El TAB funciona principalmente para almacenar energía, está ampliamente distribuido y constituye la mayor parte de la grasa corporal. El TAM y el TA beige, además de metabolizar y almacenar lípidos, son capaces de disipar energía en forma de calor, presentando claras diferencias con el TAB no solo en su función, sino también en cuanto a su morfología, distribución y expresión génica.

Su origen es el mismo, todos parten de células madre mesenquimales, pero durante la diferenciación, en los pre-adipocitos que conformarán el TAM se activa el gen Myf5, que codifica la proteína del factor miogénico 5, que dan lugar a adipocitos marrones y mioblastos esqueléticos. Mientras que el TAB y el TA beige carecen de Myf5 (71,72).

4.1 TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El tejido adiposo blanco (TAB) está compuesto por los adipocitos y el estroma vascular (fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y pre-adipocitos). Se distribuye en

USC UNIDADE DE COMPOSTELA

depósitos localizados en distintas zonas del cuerpo que presentan diferencias estructurales en cuanto a organización, tamaño celular y actividad biológica.

Como se ha mencionado antes, deriva de células mesenquimales y tiene como etapas intermedias a los adipoblastos y a los pre-adipocitos que expresan el factor de transcripción 21, pero no Myf5 (71,72). En función de su localización, puede ser clasificado en visceral (retroperitoneal), subcutáneo (TABsc), perirrenal y epididimal (también llamado perigonadal, TABep).

El volumen de tejido graso en el organismo es el producto del número y el tamaño de los adipocitos. El tamaño del adipocito varia de 10 a 100µ de acuerdo con el estado nutricional, ya que los adipocitos modifican su sus diámetros y consecuentemente su volumen, según almacenen más o menos TG. Estos cambios son posibles debido a la elasticidad de su membrana plasmática, que le permite aumentar notablemente su volumen antes de alcanzar el tamaño "critico", a partir del cual se pone en marcha el mecanismo se puede producir mediante hiperplasia o hipertrofia de los adipocitos. La hipertrofia es una respuesta común en todos los estados de obesidad. Los individuos con obesidad se caracterizan por tener un mayor tamaño y número de adipocitos que los individuos normopeso (73).

Clásicamente el TAB se consideraba un simple depósito de grasa para almacenaje de la energía, actuando como aislante térmico y como soporte estructural. Sin embargo, la consideración de tejido pasivo ha sido poco a poco desbancada por diferentes estudios que han demostrado que el TAB es un importante órgano endocrino con capacidad para secretar una gran variedad de moléculas claves en la regulación de distintos procesos biológicos: el metabolismo lipídico y de carbohidratos, termogénesis, respuesta inmune, función reproductora, proliferación celular, angiogénesis…

4.1.1 Metabolismo lipídico en el adipocito

El TAB tiene la capacidad de almacenar TG, que pueden ser hidrolizados a AG para la liberación al torrente sanguíneo para su utilización por otros tejidos.

La inervación y capilarización del tejido adiposo es elevada, estando generosamente irrigado (por lo menos un capilar toma contacto con cada adipocito). Este tejido es sensible a múltiples influencias hormonales y metabólicas que posibilitan un funcionamiento perfectamente adaptado a su función de reserva energética, lo que permite una perfecta adaptación a los cambios en el metabolismo de los AG.

En estado postprandial, los TG llegan a los capilares del tejido adiposo transportados por los quilomicrones y las VLDL, desde donde sus AG son liberados por acción de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), que es una enzima marcapaso para la provisión de los AG s a los tejidos y por lo tanto responsable de la velocidad de síntesis de TG. Tras la hidrólisis, los AG ingresan rápidamente al adipocito, tanto pasivamente, por difusión; como activamente, por procesos mediados por transportadores, como la translocasa de ácidos grasos CD36, lo que permite la absorción de AG de cadena larga (74). Una vez dentro, los AG son esterificados a TG para su almacenaje.

Los AG en los adipocitos también pueden originarse a partir de glucosa mediante la síntesis endógena. La glucosa ingresa al adipocito a través de los transportadores de glucosa GLUT4, sensible a insulina y GLUT1, no sensible a insulina. Una vez dentro, la glucosa se metaboliza a través de la glucólisis, proceso en el cual parte de la glucosa se convierte en glicerol-3-fosfato (glicerol-3P), que constituye la columna vertebral del triacilglicerol. Después de la glucólisis, la glucosa puede oxidarse en el ciclo del ácido cítrico para producir energía o convertirse en AG mediante la LDN (75). Aun así, en condiciones nutricionales normales en el humano, la contribución de la LDN en el adipocito a los TG almacenados parece limitada (76).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Cuando existe un requerimiento energético, el tejido adiposo libera AG mediante la lipólisis. Estos AG son transportados por la albúmina hasta el hígado y el músculo, quienes los utilizan para la síntesis de VLDL. La lipolisis es estimulada por el frío, el ejercicio y la hipoglucemia a través de la activación hipotalámica del sistema simpático, cuyas terminales simpáticas liberan noradrenalina en los tejidos efectores, estimulando al receptor ß-adrenérgico. El tejido adiposo blanco expresa los tres tipos de receptores β-adrenérgicos tipo 1, 2 y 3 y el receptor inhibitorio α2-adrenérgico. En este proceso es muy importante la acción de la HSL, ya que es la encargada de iniciar el proceso de hidrólisis de los TG para generar MG que serán liberados al torrente sanguíneo para ser consumido por los tejidos periféricos (77). La actividad de esta enzima es regulada fundamentalmente por las catecolaminas por intermedio de los receptores adrenérgicos. Por otro lado, la inhibición de la lipólisis está regulada por la insulina pancreática.

Además de la regulación mediante hormonas y transmisores, existe una comunicación nerviosa bidireccional entre el tejido adiposo y el SNC. Abundantes pruebas anatómicas indican que la regulación del TAB por el SNC está mediada principalmente por el SNS. El origen de la señal que transmite la información al tejido adiposo proviene de múltiples regiones centrales, como desde el núcleo PVN y el ARC en el hipotálamo y desde el NTS y el raphe del tronco del encéfalo (78).

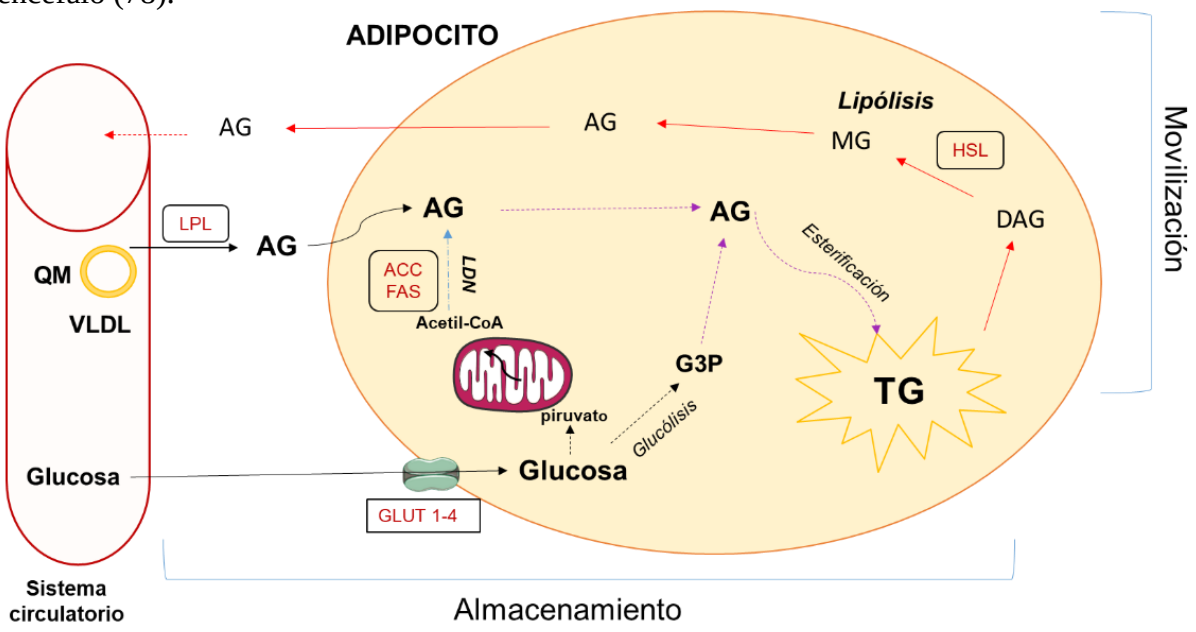


Imagen 4. Esquema del metabolismo lipídico en los adipocitos (elaboración propia mediante Power Point).

4.1.2 Adipoquinas

Como ya se ha mencionado anteriormente, el TAB no es solo un órgano de almacenamiento de lípidos, sino que es un importante órgano endocrino que secreta una gran variedad de hormonas implicadas en la regulación de la homeostasis energética, conocidas como adipoquinas. Las adipoquinas funcionan como parte de un complejo sistema de control fisiológico que regula el tejido local, pero también la fisiología global del organismo. Estas hormonas tienen acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas que se ejecutan en respuesta a diferentes estímulos que llegan al TAB, lo que convierte al TAB en un verdadero órgano endocrino clave en la regulación de diferentes procesos fisiológicos (79). La secreción de adipoquinas se encuentra regulada, entre otros factores, por el ayuno, la ingesta y la obesidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este caso, destacamos las adipoquinas involucradas en el balance energético y el metabolismo.

Leptina. Es una hormona peptídica descubierta cuando se clonó e identificó el producto del gen ob que se denominó leptina (80). Es secretada por el tejido adiposo en proporción a la cantidad de masa grasa. Su principal función es controlar la ingesta y el gasto energético, y ejerce acciones tanto a nivel central como periférico. Todas sus funciones son mediadas por su receptor, Lep-R, a través de la vía de señalización JAK-STAT. A nivel central la leptina debe atravesar la BHE mediante un proceso de transcitosis en los tanicitos, por un mecanismo dependiente del Lep-R. Una vez en el hipotálamo actúa de manera directa sobre las neuronas POMC hipotalámicas regulando la homeostasis glucídica y la sensibilidad hepática a la insulina, independientemente de sus efectos sobre la masa corporal. A nivel periférico, leptina promueve el gasto energético, aumenta la β-oxidación y reduce la esterificación de AG en páncreas, tejido adiposo e hígado (81).

Adiponectina. Es una proteína secretada abundantemente por el tejido adiposo, que presenta numerosas modificaciones postraduccionales. Fue descubierta casi simultáneamente por diversos investigadores, y por ello para esta proteína se recogen 5 nombres diferentes (Acrp 30, adipoQ, ApM1, GBP28 y adiponectina) en esta tesis, nos quedaremos con el nombre de adiponectina para nombrar a esta proteína (82,83). La expresión de la adiponectina se encuentra disminuida en procesos relacionados con la obesidad y la RI, aunque son datos bastante controvertidos. Esta hormona presenta alta afinidad por los receptores de adiponectina, 1 y 2 presentes ambos en neuronas hipotalámicas (84).

Resistina. Fue descubierta independientemente por tres grupos diferentes, que le otorgaron tres nombres distintos (FIIZ3, ADSF y resistina) en esta tesis, nos quedaremos con el nombre de resistina para nombrar a esta proteína (85). Es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas de secreción “Resistin Like Molecules (RELMs)”, y se encuentra bajo control hormonal y nutricional. En ratones, donde la hormona se expresa predominantemente en TAB, la carencia de resistina genera niveles bajos de glucosa en ayuno, debido a la reducción de la gluconeogénesis hepática. La resistina además de disminuir la ingesta, se ha implicado en la patogenia de la RI mediada por la obesidad y la DM2, al menos en modelos de roedores (86). En humanos la resistina es expresada principalmente por macrófagos y parece estar involucrada en el reclutamiento de otras células inmunes y la secreción de factores proinflamatorios, aunque no se puede descartar su papel en la resistencia a la insulina. Además de su papel en el metabolismo de la glucosa, la resistina también está implicada en el control del metabolismo de los lípidos, tanto hipotalámicos como periféricos, y en la regulación de la ingesta de alimentos (87).

4.2 TEJIDO ADIPOSO MARRÓN

Como ya se ha dicho, el tejido adiposo marrón (TAM) se caracteriza por poseer funciones fisiológicas diferentes a las del TAB, destacando su capacidad termogénica. Además, provienen de linajes celulares distintos, ya que el TAM proviene de un linaje miogénico (positivo para la expresión de Myf5), lo que quiere decir que los adipocitos marrones no provienen de los blancos, sino de células precursoras de músculo (71,72). En roedores, el TAM se localiza principalmente en la zona interescapular. En humanos adultos, se encuentra en la región supraclavicular y en las áreas cervical, axilar, paravertebral y perirrenal.

El TAM se denomina "clásico" para distinguirlo del tejido adiposo inducible o beige, que tiene características moleculares y de desarrollo únicas (88). El TAM, a pesar de estar compuesto por células grasas es, desde un punto de vista morfológico, totalmente diferente al TAB: contiene múltiples gotas lipídicas citoplasmáticas multilobulares, un núcleo central y un

USC DE COMPOSTELA

gran número de mitocondrias en sus adipocitos. Debe su coloración parduzca a la elevada vascularización del tejido y al gran número de mitocondrias. La amplia vascularización del tejido facilita además el intercambio de oxígeno y nutrientes y la disipación de calor, así como la liberación de adipoquinas a la circulación. Los lípidos son su fuente primaria de combustible y la gran cantidad de mitocondrias existentes en las células del TAM son fundamentales para la fosforilación oxidativa y la producción de calor (89).

El TAM está ampliamente inervado lo que permite su rápida estimulación por parte del SNS. El SNS libera catecolaminas como la norepinefrina (NE) que activan los receptores adrenérgicos β3 acoplados a proteína G que se expresan en gran medida en los adipocitos marrones maduros y los receptores adrenérgicos β1 en los precursores de los adipocitos marrones (89).

4.2.1 Tejido adiposo beige

Existe un nuevo y diferenciado tipo de adipocitos, denominados adipocitos inducibles o beige, que han sido encontrados tanto en humanos como en roedores. Estos adipocitos beige están inmersos en las regiones subcutáneas del TAB, pertenecen al linaje celular del TAB ($Myf5^-$) y tienen su misma apariencia hasta que, debido a estímulos, como la exposición al frío, a una dieta hipercalórica o por activación del SNS mediante liberación de agonistas adrenérgicos, en un proceso denominado "amarronamiento" estos adipocitos adoptan características anatómicas y funcionales intermedias entre los adipocitos blancos y marrones (90).

Los pre-adipocitos beige residen alrededor de regiones muy vascularizadas del TABsc y proliferarán a adipocitos beige maduros en respuesta a los estímulos previamente mencionados. Estos precursores pueden ser $PDGFR\alpha^+Ebf2^+$ que se convierten en adipocitos beige maduros, mientras que los que son solo $PDGFR\alpha^+$ pueden dar lugar a adipocitos beige, adipocitos blancos o células fibrogénicas. Además, los propios adipocitos blancos pueden ser reprogramados y transdiferenciados a adipocitos beige (91,92).

Aunque el tejido adiposo beige tiene diferente origen de desarrollo y perfil de expresión génica que el TAM, ambos son tejidos termogénicos y comparten muchas características morfológicas y bioquímicas: contienen muchas pequeñas gotas de lípidos (y por lo tanto se denominan multiloculares, en comparación con los adipocitos blancos uniloculares) y mitocondrias densamente empaquetadas, expresan genes termogénicos clave (UCP1, PPARα, PGC1α, PPARγ, Prdm16), y tienen la capacidad de activar la termogénesis en respuesta a diversos estímulos (como el frío) (91).

4.2.2 El tejido adiposo y la termogénesis

Como se ha comentado anteriormente, el balance energético es la diferencia entre la energía obtenida a través de la ingesta y el gasto energético. Dentro del gasto energético podemos diferenciar entre: metabolismo basal (es la energía consumida por un individuo en ayunas, reposo y condiciones de termoneutralidad); la termogénesis asociada a la actividad física, y la termogénesis adaptativa (imagen 1).

La termogénesis adaptativa se define como la producción de energía térmica (calor), producida por el músculo o el TAM, en respuesta a cambios en la temperatura ambiente y/o al estado nutricional. En 1953, Barlow y Sellers observaron que los animales sometidos a frío inicialmente tiritaban con el fin de mantener la temperatura corporal, pero con el tiempo dejaban de tiritar a pesar de que su metabolismo seguía elevado (93). A este metabolismo se le llamó termogénesis no temblorosa. Esta termogénesis ocurre a través de la activación de adipocitos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

marrones, así como la activación y reclutamiento de adipocitos beige, ubicados dentro de depósitos TABsc (amarronamiento).

La termogénesis por frío en mamíferos es activada y coordinada por el hipotálamo, 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 adiposos marrón (89). En respuesta a la exposición al frío, la NE liberada por la activación del SNS activa los receptores adrenérgicos β3 en los adipocitos marrones y beige. La NE es un factor clave en la activación termogénica de los adipocitos ya que promueve la proliferación de pre-adipocitos, la diferenciación en los adipocitos maduros y es capaz de regular directamente la expresión del gen de la proteína desacopladora-1 (UCP1).

La actividad funcional del TAM en cualquier condición fisiológica dada está determinada por dos factores: los efectos agudos de la NE, que dan como resultado la estimulación de la termogénesis, mediante la utilización de diferentes grados de la capacidad máxima ("estado de actividad"); y la capacidad termogénica total en ese momento particular en el tejido ("estado de reclutamiento"). La capacidad termogénica está determinada a su vez por el número total de adipocitos marrones en el tejido (que está determinado por las tasas de proliferación y apoptosis) más el grado de diferenciación del tejido, incluyendo la densidad mitocondrial y la cantidad de UCP1 (89).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, en respuesta al frío se libera NE, por la activación del SNS, que actúa sobre los receptores adrenérgicos β3 en el TAM. El receptor activado, estimula a una proteína G asociada a él, lo que genera la activación de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), lo que a su vez provoca la activación de la proteína kinasa A (PKA), induciendo la termogénesis. La PKA provoca un incremento en la lipólisis conduciendo a un aumento de AG libres en el citosol, esto ocurre principalmente gracias a la activación de la HSL. Estos AG a continuación son importados a la mitocondria a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 a (CPT1α) y 2 (CPT2), donde son oxidados primeramente mediante la β-oxidación primero y posteriormente en el ciclo del ácido cítrico (TCA) como subproductos, conduciendo a la formación de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y de dinucleótido de flavina y adenina (FADH), que luego serán oxidados en la cadena de transporte electrónico (94) (imagen 5).

El proceso de termogénesis tiene lugar principalmente en las mitocondrias de las células del TAM donde se incrementa la expresión de UCP1. Nicholls y colaboradores demostraron que el desacoplamiento de la mitocondria del TAM genera una disociación de la cadena de transporte electrónico presente en la membrana mitocondrial interna de las células de este tejido lo que permite el libre movimiento de protones a través de la membrana mitocondrial: en este punto es donde situamos a UCP1 también conocida como termogenina, localizada en la membrana mitocondrial interna y considerada el marcador termogénico de este tejido (95). Esta disipación del gradiente electroquímico de protones, que se genera durante la respiración mitocondrial, genera energía que se pierde en forma de calor (89) (imagen 5).

La activación mejor estudiada es debida a exposición al frío, pero hay múltiples factores endocrinos, paracrinos y autocrinos, secretados por una gran variedad de tejidos y órganos (algunos ya mencionados) que juegan un papel clave en la regulación del desarrollo, mantenimiento y función del TAM y TA beige, así como en la termogénesis. Unas hormonas con un papel clave en la regulación termogénica son las hormonas tiroideas, ya que durante el hipotiroidismo y el hipertiroidismo se produce una disminución y un aumento de la temperatura corporal, respectivamente. Las hormonas tiroideas actúan sobre TAM o TAB para inducir la respiración desacoplada mediante la inducción de UCP1 para generar calor. También promueven la remodelación del TAB el proceso de amarronamiento en condiciones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

termoneutrales. Aumentan el potencial termogénico de TAM y TAB porque inducen la β-oxidación de AG, la lipogénesis, la captación de glucosa, la biogénesis mitocondrial y la autofagia (96).

La proteína UCP1 posee también una regulación a nivel genético mediada por múltiples factores de transcripción, coactivadores y correpresores que posibilitan la expresión del programa termogénico. Uno de los primeros reguladores transcripcionales de la termogénesis identificados es PPARγ. La habilidad de PPARγ para estimular la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos blancos o marrones/beige viene determinada por los coactivadores con los que se asocia. Uno de los coactivadores es PGC1α (coactivador tipo 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas), que es inducido por el frío en el TAB, y actúa como un regulador master de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo, así como en la diferenciación de los adipocitos. La deleción de PGC1α en el tejido adiposo tiene como consecuencia una disminución de la respuesta termogénica a la exposición al frío y es indispensable para la activación de los adipocitos marrones (97). Otro factor regulador clave en el linaje y función de los adipocitos marrones es la proteína Prdm16. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Prdm16 en células precursoras miogénicas es suficiente para reprogramar estas células a adipocitos marrones (98). Otro de los principales mediadores es el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), presente en el TAM y el TAB y que juega un papel clave en la activación del programa termogénico y en la diferenciación de los adipocitos beige, ya que actúa como coactivador de PGC1α (99). Otro miembro de esta familia, PPARα es un factor de transcripción bien conocido como activador de la β-oxidación y de la respiración mitocondrial. Su expresión también ha sido relacionada con la conversión de adipocitos blancos a beige y con la activación de la termogénesis del TAM y beige, ya que directamente estimula la expresión de los coactivadores PGC1α y Prdm16 (97,98).

También existen mecanismos de termogénesis independientes de UCP1 Recientemente, el ciclo del sustrato de creatina y el ciclo del Ca2+ se han identificado como vías termogénicas independientes de UCP1 (100).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

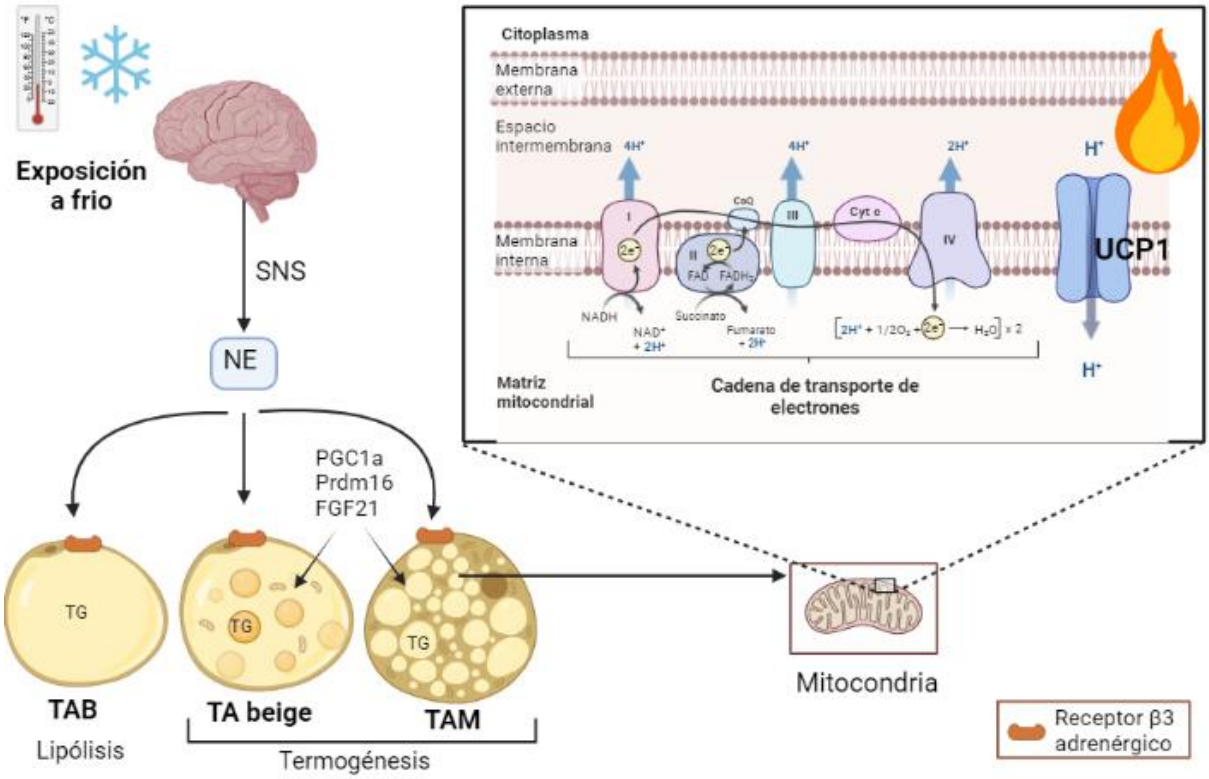


Imagen 5. Esquema de la activación de la termogénesis en el TAM y TA beige por la exposición a frío (elaboración propia, mediante BioRender).

La termogénesis representa un mecanismo homeostático en la regulación de la temperatura corporal pero además se ha planteado que su actividad puede tener un importante impacto en el balance energético del organismo. Por ello, el TAM se ha propuesto como una estrategia terapéutica prometedora para combatir la obesidad y sus patologías asociadas como la DM2 o MAFLD (101).

5. DESREGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

A pesar de existir mecanismos de control exhaustivos, cruciales para mantener la salud de un organismo, la desregulación del sistema ocurre con frecuencia dando lugar a patologías.

5.1 LA OBESIDAD Y EL SINDROME METABÓLICO

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anómala o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Como ya se ha mencionado anteriormente, la obesidad resulta de un balance energético positivo crónico, es decir, un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto de energía. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el sobrepeso y la obesidad en adultos en base al índice de masa corporal (IMC) que se define como

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

la masa en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros (kg/m^2) (102). Sin embargo, su etiología es más compleja y multifactorial. Las circunstancias socioeconómicas, el estilo de vida y las interacciones genotipo-fenotipo deben tenerse en cuenta para poder comprender la fisiopatología de la obesidad (103).

La obesidad es uno de los problemas de salud pública a nivel mundial más graves del siglo XXI. Las últimas cifras que ofrece la OMS son alarmantes, indicando que en el año 2016 el 39 % de las personas adultas (mayores de 18 años) padecían sobrepeso, y el 13 % obesidad. De hecho, la OMS la ha identificado como el mayor problema de salud crónico en adultos. Además, las cifras también se elevan a un ritmo vertiginoso en la población infanto-juvenil (5-19 años), donde más de 340 millones en 2016 padecían sobrepeso o eran obesos. Según la OMS, la obesidad se ha convertido en una de las principales causas de mortalidad, de la cual cada año fallecen en torno a 2,8 millones de personas (102).

En la clínica además de la obesidad se evalúa el síndrome metabólico que se define como conjunto de alteraciones metabólicas de riesgo entre las que se incluyen la obesidad y la RI. La obesidad es fundamental para el desarrollo del síndrome metabólico y en la mayoría de los casos precede al resto de los factores de riesgo. Los componentes que definen el síndrome metabólico de acuerdo con los criterios del instituto nacional de salud (NIH, National Institutes of Health) son: circunferencia abdominal elevada, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, niveles bajos niveles de HDL, niveles de glucosa en sangre elevados. Si se presentan tres o más de dichos componentes el paciente se diagnostica con síndrome metabólico y tendrán un mayor riesgo de padecer comorbilidades tales como: enfermedad cardiovascular (hipertensión, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares…), DM2, trastornos del aparato locomotor (osteoartritis), enfermedad hepática, problemas respiratorios e incluso se asocia a una mayor prevalencia de algún tipo de cáncer; lo que aumentan el riesgo de mortalidad del paciente (104).

Por todo ello, existe una creciente necesidad de mejora de nuestro conocimiento en este campo para una búsqueda de nuevas vías terapéuticas para esta enfermedad crónica y sus comorbilidades.

5.1.1 El hígado graso asociado a disfunción metabólica (MAFLD)

Como ya se mencionó en un apartado anterior, el hígado es un órgano central en la lipogénesis, gluconeogénesis y el metabolismo del colesterol y por ello es un órgano altamente susceptible a alteraciones en el contenido de lípidos de la dieta.

Los mecanismos por los que el hígado acumula lípidos y genera un desequilibrio en el almacenamiento graso pueden ser debido a: 1) incremento de la captación de lípidos, 2) aumento en la LDN de AG, 3) desajuste en la síntesis o secreción de lipoproteínas VLDL y 4) una reducción de la oxidación de los AG (105).

La MAFLD, es una manifestación hepática del síndrome metabólico. Se presenta como una enfermedad inflamatoria hepática crónica que se inicia con la acumulación excesiva de TG en los hepatocitos y que abarca un espectro de enfermedades que van desde la simple acumulación de TG en los hepatocitos (esteatosis hepática), a la esteatosis inflamatoria con fibrosis (esteatohepatitis), la cual puede progresar a cirrosis hepática y a hepatocarcinoma. Cuando la MAFLD progresa a estos estadios tardíos, el trasplante hepático es la única opción de tratamiento (106).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

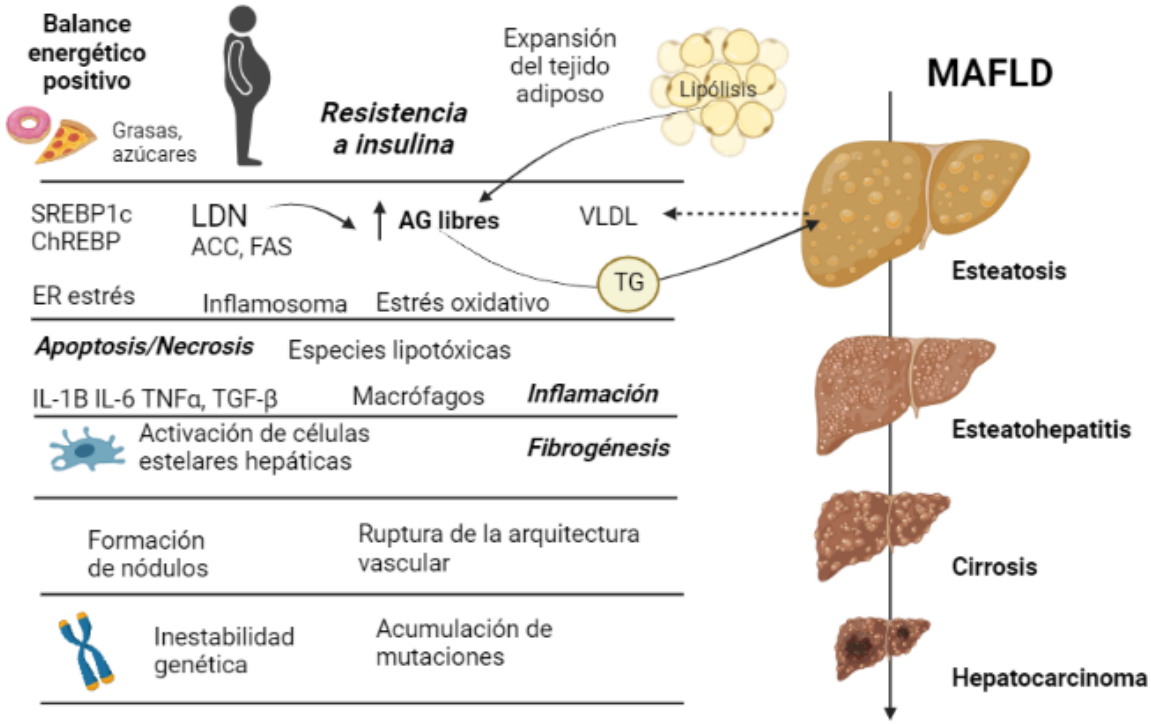


Imagen 6. Progresión de la enfermedad de hígado graso asociado a disfunción metabólica (elaboración propia, mediante BioRender).

En este trabajo nos centraremos solo en los primeros estadios de la enfermedad, la esteatosis hepática. Esta esteatosis no siempre se acompaña de lesión hepática debido a la gran capacidad funcional del hígado, pero suele producirse hepatomegalia y el hígado adopta un aspecto moteado y blando. Al microscopio óptico se observa como los hepatocitos muestran gotas lipídicas que pueden ser de gran tamaño y existir pocas (célula en anillo de sello, más característico de situaciones crónicas) o ser pequeñas y abundantes (célula espumosa, más típico de situaciones agudas).

La prevalencia de esteatosis en pacientes con obesidad es alrededor del 75 % (107). La esteatosis hepática, puede ser fuente de complicaciones en caso de obesidad, otros trastornos hepáticos, DM2...

5.1.2 La inflamación hepática

Se sabe que los macrófagos contribuyen en el proceso inflamatorio sistémico general. Los macrófagos han sido implicados en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación inducida por la obesidad, además, son claves en la génesis de estado inflamatorio implicado en el desarrollo de aterosclerosis y RI que aparecen con la obesidad (108).

Los macrófagos tradicionalmente son divididos según su fenotipo en proinflamatorios (M1), cicatrizadores de la herida (M2) e inmunosupresivos (macrófagos reguladores). Los macrófagos M1, son inducidos por interferón γ (IFN-γ), lipopolisacáridos (LPS) y TNFα y expresan citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL6 e IL1. Los macrófagos M2 que son inducidos por IL4, IL10 y IL13; producen IL10, TGF-β, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF); poseen efectos antiinflamatorios y promueven la cicatrización del daño hepático. El desequilibrio M1/M2 a favor de M1, culmina con la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias (108).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) es una citoquina proinflamatoria que se sintetiza fundamentalmente en la fracción estromal del tejido adiposo blanco (108). La pérdida de masa corporal reduce los niveles circulantes de TNFα llevando consigo un incremento en la sensibilidad a la insulina. La administración crónica TNFα reduce la sensibilidad a la insulina y, de tal modo, si administramos bloqueantes se incrementa la sensibilidad a la insulina. Dicho fenómeno se observa en roedores, pero no en seres humanos. El ratón carente de TNFα presenta protección contra la RI debida a la obesidad (109).

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina inmuno-moduladora multifuncional que se ha sugerido que tiene funciones importantes en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La IL-6 se secreta desde el tejido adiposo hacia la circulación y su expresión se correlaciona positivamente con el IMC y el tejido adiposo total. Los ratones carentes de IL-6 desarrollan obesidad, que puede revertirse en parte mediante el reemplazo de IL-6, lo que sugiere un papel de IL-6 en la regulación a largo plazo de la masa de tejido adiposo (110).

5.1.3 La resistencia a la insulina (RI)

La esteatosis hepática puede ser tanto resultado de una RI como la causa de esta, ya que ambas patologías están estrechamente ligadas.

La RI es otra manifestación relacionada con el síndrome metabólico, que se define como un desajuste en la capacidad de la insulina para regular el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. En los hepatocitos, la insulina tiene un papel lipogénico y antigluconeogénico. La aparición la RI se asocia mayoritariamente a defectos en la vía de señalización de la propia insulina, aunque también se han propuesto diversas rutas metabólicas y mecanismos moleculares que juegan un importante papel en el desarrollo de la RI como son la inflamación, la activación del estrés del RE o la acumulación de lípidos extrahepáticos (107,111).

Los efectos de la RI sobre el hígado se dan tanto a nivel propiamente hepático como por alteraciones en otros órganos como el músculo y el tejido adiposo. En adipocitos y miocitos, la RI provoca una disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina, lo que lleva en la mayor parte de los casos a un incremento en la captación de esa glucosa por parte de los hepatocitos y la consecuente activación hepática de la LDN (111). Por otro lado, la disminución de la entrada de la glucosa en el tejido adiposo disminuye la glucólisis, incrementa la lipolisis y disminuye la actividad de la LPL. Todo esto lleva a una elevada concentración de AG circulantes, lo que contribuye a la acumulación hepática de los mismos (112).

5.2 EL ENVEJECIMIENTO

Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad, y finalmente a la muerte. Ahora bien, esos cambios no son lineales ni uniformes, y su vinculación con la edad de una persona en años es más bien relativa.

El incremento en la esperanza de vida y, en algunos países, la baja tasa de natalidad, están originando un crecimiento acelerado en el porcentaje de personas mayores, que tiene como consecuencia un aumento de la población envejecida. A nivel global, la población mayor de 65 años crece a un ritmo más rápido que el resto de los segmentos poblacionales y, actualmente se considera un problema de salud pública tanto a nivel nacional como internacional. El mundo está experimentando una transformación demográfica: para el 2050 se prevé que el porcentaje de personas de 60 años o más se duplique, y que el número de personas de 80 años o más se triplique (113). Con esta previsión de extensión de la esperanza de vida, comprender por qué el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

envejecimiento genera una susceptibilidad cada vez mayor a la morbilidad crónica, la discapacidad y la fragilidad se ha convertido en una prioridad de salud pública.

5.2.1 Envejecimiento y metabolismo

En cuanto a la relación del envejecimiento con el metabolismo, existe una estrecha relación entre el envejecimiento con el riesgo de desarrollar cambios en la composición corporal, desequilibrio en la producción y utilización de energía y, por tanto, una desregulación homeostática. De una forma más concreta, las personas mayores experimentan una disminución en la relación entre la masa magra y la masa grasa, especialmente en el músculo, y una redistribución progresiva de la grasa de las regiones subcutáneas a las viscerales. Esta redistribución de la grasa contribuye a un ciclo de avance de aumento de la masa grasa visceral conduciendo a la obesidad asociada con la edad, esto genera también una disminución de la sensibilidad a la insulina en muchos tejidos y aumento de la insulina sérica. En los casos más graves, estos procesos patológicos conducen a DM2 y a un consiguiente daño en los órganos diana (114). Así mismo, el envejecimiento está asociado con un deterioro termogénico severo; el TAM disminuye más de un 75 % en masa y actividad en la edad anciana (115), que también podría estar contribuyendo a la obesidad asociada con la edad (116).

5.2.2 Envejecimiento y GH

La disminución relacionada con la edad en la actividad del eje somatotrópico (GHRH, GH e IGF-1) se ha denominado “somatopausia”. Esta disminución de la hormona de crecimiento (GH) está muy bien documentada, y ocurre en diferentes especies de mamíferos. La somatopausia se debe principalmente a la reducción de la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de GH (GHRH) con la consiguiente disminución de la biosíntesis y liberación de GH por la hipófisis anterior (117). Esto, a su vez, conduce a una reducción en los niveles circulantes del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), el mediador clave de la acción de la GH (118). La secreción de GH, y en consecuencia la de IGF-1, disminuye con el tiempo hasta que solo se pueden detectar niveles bajos en individuos de 60 años o más (118).

6. EL SISTEMA DE GHRELINA Y SU FUNCIÓN EN EL METABOLISMO

6.1 GHRELINA

Ghrelina es una hormona peptídica que fue descubierta por vez primera en 1999 como ligando endógeno para el receptor del secretagogo de la hormona de crecimiento (GHS-R) (15). Las células encargadas de la producción de ghrelina constituyen un grupo de células endocrinas dispersas en la mucosa gástrica en su mayoría, aunque también se encuentran en menor proporción en el intestino delgado y en el páncreas. Se denominan “X/A like cells” y representan un 20 % de las células endocrinas en las glándulas oxínticas (119). Ghrelina está presente en dos formas principales en la sangre, las formas acilada (n-octanoilada) y no acilada (UAG), pero solo la acil-ghrelina (a partir de ahora se hará referencia a ella como ghrelina) puede unirse al receptor de secretagogo de la hormona del crecimiento tipo 1 (GSH-R1a) (120).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.1.1 Síntesis de ghrelina

En el ser humano el gen de ghrelina está localizado en el cromosoma 3, en el locus 3p25-26. Ghrelina se sintetiza en forma de pre-pro-hormona, precursor polipeptídico formado por 117 aminoácidos que comparte un 82.9 % de homología entre roedores y humanos (120).

En la membrana del retículo endoplasmático (RE) ghrelina sufre una acilación post traduccional, llevada a cabo por la ghrelina O-acil-transferasa (GOAT). GOAT pertenece a una superfamilia de enzimas O-acil-transferasa unida a membrana denominadas MBOAT. Se expresa en los mismos tejidos que ghrelina, y su mayor expresión se encuentra en el estómago. GOAT se encarga de la transformación de pro-ghrelina a ghrelina, péptido de 28 aminoácidos, tras el paso por el aparato de Golgi y su secreción mediante vesículas fuera de la célula, esterificando un grupo n-octanoil específicamente en la serina número 3 de ghrelina, no modificando los otros residuos de serina, esto es lo que le permite a ghrelina su unión con el receptor GHSR1a (121,122).

La acilación por GOAT puede ser revertida por la butirilcolinesterasa (BChE) y por carboxilesterasas. Estas enzimas, secretadas principalmente en el hígado, son capaces de hidrolizar la esterificación de la serina 3 de la ghrelina, transformándola en la forma no acilada de la hormona (UAG). Se ha demostrado que la sobreexpresión de BChE disminuye los niveles de ghrelina. La acción de la BChE es especialmente importante en humanos, mientras que en roedores está acción es realizada predominantemente por las carboxilesterasas, que son ocho veces más rápidas desacilando ghrelina (123).

Aunque ghrelina es la forma activa, su vida media en plasma es mucho menor que la de UAG, siendo esta la forma mayoritaria en sangre (90 %). Esto es debido fundamentalmente al rápido proceso de desacilación de ghrelina para dar lugar a UAG y a la unión de ghrelina al receptor en distintos tejidos. A pesar de que se han descrito un buen número de estudios en relación con los efectos de UAG sobre el balance energético, los datos disponibles son relativamente confusos dado que se han descrito efectos de todo tipo: aumento, disminución y falta de efecto. Las razones de estas discrepancias no están muy claras, aunque si se sabe que UAG no es capaz de unirse al receptor GHSR1a. El receptor de UAG aún no se ha descrito (120).

Derivado del mismo precursor de ghrelina se sintetiza un pequeño péptido denominado obestatina (segmento 76 a 98 de pro-ghrelina). Es sintetizado en forma de pequeño péptido de 23 aminoácidos con un grupo amida en el extremo C-terminal, que parece importante para su actividad biológica (122,124). En roedores, se ha descrito su expresión en: intestino, estómago (mucosa), riñón, córtex cerebral y páncreas perirrenal de ratas, y células de Leydig (124). Al igual que para UAG, se desconoce el receptor.

6.1.2 Regulación de los niveles de ghrelina

El factor que mejor se conoce en cuanto a la regulación de la secreción de ghrelina es la ingesta, siguiendo un ritmo circadiano que se ajusta a los períodos de ingesta diaria. Los niveles de ghrelina en plasma en un estado prepandial son elevados, también se elevan los niveles de ghrelina en condiciones de restricción calórica para estimular la ingesta de alimentos y el almacenamiento de grasa, y para prevenir la bajada de glucosa en sangre (125). En contraposición, los niveles postprandiales de ghrelina en plasma son más bajos, al igual que en casos de excedente de energía, como en la obesidad (126,127).

Además, se han observado diferencias de concentración plasmática de la hormona en función del IMC. Los niveles plasmáticos de ghrelina están inversamente correlacionados con el IMC, en personas con un IMC elevado (obesas) los niveles de ghrelina son más bajos en comparación con los niveles de ghrelina de una persona con IMC normal (126,128). Sin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

embargo, en pacientes obesos diagnosticados con síndrome de Prader-Willi se detectan niveles elevados de ghrelina (129).

Hay múltiples hormonas que inhiben la producción de ghrelina, como son la somatostatina, la leptina, la insulina, o IGF-1. Otros factores como una dieta rica en grasas o la obesidad también pueden generar una inhibición de su producción.

La ghrelina también es regulada en el envejecimiento. En ancianos sanos de normopeso los valores son tan bajos como los de los jóvenes obesos, y significativamente inferiores a los de los jóvenes no obesos (130). Si esta disminución se debe al envejecimiento per se, o pueda ocurrir como consecuencia de los cambios relacionados con la edad en otros factores que regulan la síntesis y liberación de ghrelina, no está completamente determinado.

6.2 EL RECEPTOR PARA SECRETAGOGOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GHS-R)

Las hormonas circulantes ghrelina y péptido antimicrobiano 2 que se expresa en el hígado (LEAP-2) actúan a través de un receptor acoplado a proteína G (GPCR), el receptor GHS-R, que se describió originalmente en la glándula pituitaria y el hipotálamo como el objetivo de los secretagogos de la hormona del crecimiento (GH) (131).

El gen de Ghsr es un gen altamente conservado que se expresa en el cromosoma 3q26.2. Está compuesto por 2 exones y 1 intrón: el exón 1 codifica para los primeros 265 aminoácidos, que incluyen la región transmembrana I a V, mientras que el exón 2 da lugar a la región transmembrana VI y VII (132). Hay dos variantes para este receptor derivados de este gen: tipo 1a y tipo 1b. El GHSR1a está formado por 366 aminoácidos con 7 dominios transmembrana, presentando el extremo C-terminal intracelular y el N-terminal extracelular y se localiza en la membrana plasmática (132), la otra isoforma, GHSR1b, está truncada en el extremo C-terminal, no se une a ghrelina, a los secretagogos de GH ni a LEAP-2 y no posee actividad de señalización conocida hasta el momento.

Mediante distintas técnicas se ha comprobado la expresión del receptor GHSR1a en un amplio rango de tejidos: hipófisis (especialmente en las células somatotropas), hipotálamo (especialmente núcleo ARC), médula oblonga, plexo coroideo del córtex cerebral y algunos tejidos periféricos como el páncreas, glándula tiroidea, miocardio, glándula adrenal, gónadas, arterias, pulmón, hígado, bazo, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo, venas, útero, piel, nódulos linfoides, estómago e intestino (133,134). La expresión del receptor en el hipotálamo y a nivel hipofisario es coherente con su papel en la regulación de la secreción de GH, mientras que su presencia en otras regiones del SNC y algunos tejidos periféricos puede indicar su participación en diferentes funciones fisiológicas. Sin embargo, la forma del receptor más ampliamente distribuida es el GHSR1b que se encuentra en: pulmón, mucosa bucal, esófago, fundus estomacal, duodeno, yeyuno, íleon, colon, hígado, mama, ovario, trompa de Falopio, placenta, testículo, próstata, nódulos linfoides, piel, tejido adiposo, músculo y tejidos vasculares (133–135).

GHS-R (tanto el 1a, como el 1b) está acoplado a tres proteínas G: Gαq, Gαi/o y Gα12/13 e induce una cascada de señalización intracelular a través de diferentes rutas celulares. El receptor, también es capaz de reclutar a β-arrestina y el complejo adaptador 2 (AP2) de manera independiente del ligando. El reclutamiento de β-arrestina, puede dar lugar a la internalización del receptor mediante un tráfico del receptor de la membrana a las vesículas endosomales donde es reciclado para volver nuevamente a la membrana plasmática (136,137). La internalización del receptor es un mecanismo de protección celular frente a la sobreestimulación, característico de los receptores acoplados a proteínas G.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.2.1 Actividad constitutiva del receptor GHS-R y acciones independientes de ligando

Una de las características de GHS-R es que presenta una alta actividad constitutiva en ausencia de ligando, aproximadamente un 50 % de su capacidad máxima calculada mediante la acumulación de inositol fosfato (138,139).

El receptor también puede internalizarse. Mediante estudios cinéticos se ha comprobado que GHS-R pasa al interior mediante vesículas de clatrina, a través de un mecanismo endosomal (136): GHS-R media la entrada de ghrelina y la degradación mediante una ruta de internalización implicando esencialmente a vesículas de clatrina, la disociación del complejo ligando receptor en endosomas y la reaparición del receptor en la superficie de la membrana mediante vías de reciclaje. En este sentido, la desensibilización del receptor y endocitosis previenen una sobreestimulación y determina la frecuencia de respuesta a ghrelina.

6.2.2 Interacción del receptor GHSR1a consigo mismo y con otros receptores

El receptor GHS-R es capaz de formar homodímeros, se piensa que puede ser una forma de evitar que se unan dos moléculas de ghrelina al mismo tiempo, aunque no así de otros agonistas no peptídicos más pequeños. Además, las dos isoformas de GHS-R pueden formar heterodímeros, lo que atenúa la expresión del receptor en la superficie celular (140).

El GHS-R es capaz de formar heterodímeros con otros receptores GPCR como el receptor para la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRHR), esta interacción fomenta la liberación de la GH mediante la vía cAMP-PKC**.** Existen otras interacciones con otros receptores como el receptor de adenosina 2β, que potencia la señal GHSR1a (Ca^{2+}) vía Gα/cAMP-PKA y la activación de fosfoinositol 3-quinasa (IP3K). Además, se ha demostrado que GHS-R interacciona con el receptor de otras proteínas como: con el receptor de melanocortinas 3, con los receptores de dopamina 1 y 2, con el receptor de orexina, con el receptor de serotonina 5-hidroxitriptamina, y con el receptor 5 de la somatostatina (141).

6.3 ACCIÓN DEL SISTEMA DE GHRELINA

Un año después de su descubrimiento, se describió que ghrelina actúa en el cerebro para regular la ingesta de alimentos, la masa corporal, la adiposidad y el metabolismo de la glucosa (40). En años posteriores, se descubrió también que la ghrelina modula el metabolismo sistémico a través de la activación de los circuitos neurales orexigénicos (142,143). Para que ghrelina produzca su efecto orexigénico, tiene que interaccionar con su receptor, GHSR1a.

6.3.1 Acceso de ghrelina al sistema nervioso central y mecanismos de acción hipotalámicos sobre ingesta

Ghrelina accede al hipotálamo desde la circulación sanguínea. Se sabe que ghrelina puede atravesar la BHE en regiones como el área postrema a través del líquido cefalorraquídeo (144), y además puede penetrar a través de los capilares fenestrados de la eminencia media cerca del ARC (145).

La unión de ghrelina con el receptor GHSR1a de forma específica en el hipotálamo activa distintas vías de señalización, para generar su efecto orexigénico. El receptor de ghrelina se expresa en el ARC predominantemente en las neuronas NPY/AgRP (146). Las neuronas NPY/AgRP son despolarizadas y activadas por la ghrelina, mientras que las neuronas POMC son hiperpolarizadas por el incremento de las corrientes postsinápticas inhibidoras de GABA. Además, la ghrelina inhibe la expresión y liberación de α-MSH (143) lo que inhibe la activación del receptor de melanocortina resultando en una disminución de la ingesta, o lo que es igual, una potenciación del efecto orexigénico. La deleción genética tanto de NPY como de AgRP

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

inhibe por completo la ingesta inducida por ghrelina. Por este mecanismo, ghrelina promueve la ingesta de alimentos, incrementa de adiposidad (grasa blanca) e induce la lipogénesis, lo que hace que se incremente la masa corporal y disminuya el gasto energético (143).

AMPK juega un papel en la mediación de parte del efecto orexigénico de ghrelina. En el ARC, en relación con su efecto orexigénico destaca la vía de activación de la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina -proteína quinasa activada por AMP (CaMMK2-AMPK) cuya activación por el GHSR1a parece dependiente de la sirtuina 1 (Sirt1) y la proteína 53 (p53). La activación de esta vía genera finalmente un incremento de la expresión de AgRP y NPY (147). El mecanismo traduccional del eje ghrelina-GHSR1a-CaMKK2-AMPK en la regulación del apetito incluye la inhibición dependiente de AMPK de la vía de síntesis de AG de novo en el VMH (148). Esto reduce la concentración hipotalámica de malonil-CoA y, en consecuencia, activa la carnitina palmitoiltransferasa-I (CPT1) (148). La activación del eje AMPK-CPT1 mejora la respiración mitocondrial y reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) al desacoplar la proteína 2 (UCP2) que amortigua el exceso de ROS. Por lo tanto, ghrelina no solo controla el metabolismo lipídico central y periférico (148), sino que mediante la activación de la vía AMPK-CPT1-UCP2, ghrelina mantiene la capacidad bioenergética de las neuronas AgRP/NPY y aumenta su actividad.

En las neuronas que expresan NPY en el ARC, ghrelina es capaz de activar NPY directamente por otro mecanismo de acción, el cual da como resultado un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular debido a la movilización de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo N activando la vía cAMP-PKA (149).

Otro mecanismo descrito para ghrelina en el ARC es la activación de la ruta de señalización de mTOR mediante su fosforilación y activación de factores como la proteína ribosómica S6 quinasa 1 fosforilada (pS6K1). Esta cascada de señalización incrementa a la expresión de factores de transcripción como pCREB, FoxO1, que genera la activación de las neuronas NPY/AgRP y por lo tanto incrementa la ingesta de alimentos (150), aunque este es un mecanismo menos estudiado.

Por otro lado, parece que ghrelina podría interaccionar con las neuronas orexinérgicas en el LHA. Las fibras de ghrelina se proyectan a la LHA para hacer sinapsis con las neuronas inmunorreactivas de orexina. La administración ICV de ghrelina induce la expresión de cFos en neuronas que expresan orexina, pero no en neuronas que expresan MCH. Estos hallazgos indican que ghrelina puede estimular la alimentación, no solo a través de los sistemas NPY y AgRP, sino también a través del sistema de orexina (151).

A su vez, ghrelina podría actuar sobre el SNC a través del nervio vago, que detecta señales periféricas y transmite la señal al cerebro, regulando así la ingesta de alimentos. La gran mayoría de las fibras del nervio vago en el subdiafragma son fibras aferentes sin mielina, delgadas y sensibles a la capsaicina. Se ha visto que en animales vagotomizados o a los que se les administra capsaicina por vía intravenosa, ghrelina no es capaz de incrementar la ingesta, adiposidad o masa corporal (145). Sin embargo, la vagotomía no es representativa de la fisiología normal y esto limita la utilidad del estudio para evaluar la participación vagal en el funcionamiento fisiológico de ghrelina.

El efecto orexigénico de ghrelina depende también de otras redes centrales implicadas en el equilibrio energético, vías con las que ya hemos visto que el receptor GHSR1a interaccionaba (141):

El sistema de dopamina: el receptor de ghrelina se expresa en las neuronas dopaminérgicas, principalmente en el área tegmental ventral, donde los receptores de ghrelina co-localizan con los receptores de dopamina. La activación central de estos receptores dopaminérgicos bloquea, al menos en parte, la ingesta de alimentos inducida por ghrelina (152).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El sistema opioide: la vía del receptor kappa-opioide (KOR) también media las acciones de ghrelina en el ARC. La inhibición farmacológica del KOR con un antagonista inhibe el efecto orexigénico producido por ghrelina y disminuye la expresión de los péptidos orexigénicos, independientemente de AMPK. Además, la administración de ghrelina incrementa, en el ARC y PVN, los niveles del precursor del ligando endógeno de KOR, conocido como dinorfina (153).

El sistema cannabinoide: ghrelina activa las neuronas parvocelulares del PVN. Esto genera la apertura de los canales de Ca^{2+} y el consiguiente aumento del nivel de Ca^{2+} intracelular activa la enzima diacilglicerol lipasa-α (DAGL), directamente o a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) activando la vía cAMP-PKC, lo que resulta en un aumento de la síntesis y liberación de 2-araquidinoil glicerol en el espacio extracelular que actúa sobre el receptor de canabinoides presináptico inhibiendo la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato de los axones que inervan las neuronas del PVN. Por ello, el sistema cannabinoide endógeno es necesario para la mediación de los efectos orexigénicos y estimulantes de la AMPK central de ghrelina (154).

El sistema serotoninérgico: en el control homeostático y hedónico de la ingesta interaccionan la señalización de serotonina y ghrelina (155,156). Ghrelina, en ratas, reduce la liberación de serotonina en los sinaptosomas hipotalámicos (156). Además, la administración farmacológica de serotonina o el uso de agonistas de los receptores de serotonina, amortiguan el aumento de los niveles plasmáticos de ghrelina en ayunas (157).

En una condición de obesidad, aparece una resistencia al efecto orexigénico de ghrelina. Esta reducción del efecto orexigénico de ghrelina en roedores con obesidad inducida por dieta se debe a la activación y plasticidad reducidas de las neuronas NPY/AgRP (158).

6.3.2 Acción sobre la adiposidad y la homeostasis de los lípidos

Como ya se ha descrito previamente, ghrelina es capaz de regular el balance energético a corto plazo mediante la inducción del apetito, pero también regula la homeostasis energética a largo plazo mediante el aumento de la adiposidad (40,159,160) y este efecto está asociado con cambios en la homeostasis de los lípidos, induciendo la lipogénesis en TAB e hígado (161,162).

Ghrelina induce la adiposidad de manera totalmente independiente de la ingesta de alimentos, de la secreción de GH o del gasto energético (40,142,148,162,163). La administración crónica de ghrelina promueve el aumento de masa corporal y la adiposidad en roedores (40). La administración ICV de ghrelina afecta la homeostasis energética, lo que desencadena la utilización de carbohidratos, reduce la oxidación de grasas y estimula la síntesis de lípidos (40).

Tanto en el TAB como en el hígado, la infusión central crónica de ghrelina aumenta la captación de TG, glucosa y la expresión de enzimas que promueven el almacenamiento de grasa, como la LPL, ACC, FAS y SCD1; mientras que la expresión de CPT1α, gen que controla el paso limitante en la velocidad en la β-oxidación, se reduce. Esto conduce a un mayor depósito de grasa, y por tanto se incrementa la adiposidad en el TAB (164). En el hígado, el tratamiento con ghrelina incrementa la LDN, induciendo la esteatosis hepática mediante el incremento del número de gotas lipídicas y el contenido de TG hepáticos de una forma GHSR1a dependiente (162). Además, la infusión central crónica de ghrelina también aumentó el colesterol plasmático total debido al colesterol de lipoproteínas de alta densidad más alto (165).

El hecho de que la adiposidad inducida por ghrelina sea independiente de su acción orexigénica sugiere la existencia de diferentes vías neuronales que controlan la alimentación y la adiposidad. En un modelo de ratón con la ausencia de señalización del SNS, es decir, ratones carentes de los receptores adrenérgicos, la administración central de ghrelina no reproduce este

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

efecto en la adiposidad lo cual indica que estas acciones del sistema de ghrelina en el SNC sobre el tejido adiposo están mediadas por el SNS (164).

En ratones con deficiencia de ghrelina hubo una disminución en LPL y la expresión de SCD1 en comparación con los animales control (*wild type, WT*) a pesar de que no hubo diferencias en la masa corporal (164), la masa grasa o ingesta de alimentos. Al igual que en los ratones que carecen de ghrelina, los ratones con deficiencia de GHSR1a están protegidos de la obesidad inducida por la dieta (DIO) cuando se alimentan con dieta HFD. Esto podría explicarse, en parte, por una hipofagia leve y una utilización preferencial de la grasa como sustrato energético en estos ratones (166). Consistentemente, los ratones que carecen tanto de ghrelina como de receptor de ghrelina tienen niveles de colesterol más bajos (165).

Así mismo, como ya ha sido mencionado antes, el efecto orexigénico de ghrelina se ve afectado en animales obesos, sin embargo, su efecto adipogénico persiste (158,167–169).

6.3.3 Efectos sobre la homeostasis de la glucosa

La glucosa es una importante fuente de energía en los mamíferos. Mantener la concentración de glucosa en sangre controlada (homeostasis de glucosa) es crucial para un suministro constante de glucosa a los tejidos del cuerpo, particularmente al cerebro. La homeostasis de la glucosa es un mecanismo fisiológicamente bien equilibrado que depende de tres procesos coordinados y simultáneos que implican la secreción de insulina por el páncreas, la producción hepática de glucosa y la captación de glucosa por los tejidos periféricos.

Ghrelina regula la homeostasis de la glucosa directa e indirectamente (a través de la acción de GH), restringiendo la liberación de insulina y/o reduciendo la sensibilidad a la insulina. Se sabe que la administración de ghrelina tanto en humanos como en roedores aumenta de forma aguda la glucosa en sangre. Este efecto que genera ghrelina sobre los niveles de glucosa se debe a su influencia tanto en los niveles de insulina como de glucagón (169,170).

Gran parte de los efectos de ghrelina sobre la secreción de insulina están mediados desde el páncreas, donde ghrelina actúa directamente sobre las células β para inhibir la liberación de insulina estimulada por la glucosa, atenuando el incremento de Ca^{2+}. Este efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina está mediado, al menos en parte, por la vía AMPK-UCP2 (170–173).

Ghrelina también estimula la secreción de glucagón en las células α del páncreas (170) aunque la información no es del todo clara. Algunos estudios si han encontrado el receptor GHS-R en grupos de células α aisladas y en líneas de células α, pero este hallazgo no es universal. Otros estudios sugieren que las acciones de la ghrelina sobre la liberación de glucagón también pueden ser indirectas a través de la activación de los GHS-R expresados en las neuronas AgRP. En cualquier caso, es de resaltar que la reducción de la secreción de insulina y/o la sensibilidad a la insulina, sumado a que ghrelina también incrementa la producción de glucosa en el hígado a través de la gluconeogénesis y reduce la captación de glucosa por los tejidos periféricos, forma un conducto importante a través del cual ghrelina eleva la glucosa en sangre. En consonancia se ha visto que ghrelina induce una intolerancia a la glucosa en situaciones posprandiales y condiciones de obesidad. Por ello, la elevación de los niveles de glucosa por ghrelina puede generar efectos diabetogénicos durante la obesidad inducida por la dieta y algunas formas monogénicas de diabetes. La evidencia sugiere que la inhibición del sistema de ghrelina (ghrelina, GHSR1a, GOAT) puede ser beneficiosa en el tratamiento de la DM2 en personas obesas, con un efecto protector frente a la resistencia a la insulina, reduciendo la glucosa en sangre y por ende, aumentando la sensibilidad a la insulina (173).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por la contra, estudios recientes muestran que el sistema de ghrelina es esencial para mantener la supervivencia durante un balance energético negativo sostenido, como la inanición o una

restricción calórica prolongada. En concreto se ha descrito que el sistema de ghrelina es esencial para prevenir la hipoglucemia que puede ser potencialmente mortal. Cuando a ratones adultos, carentes de alguno de los componentes clave del sistema de ghrelina (ghrelina, GOAT (175) o GHSR1a (176)) se les somete a una restricción calórica del 40 % durante una semana, desarrollan hipoglucemia marcada, lo que conlleva un aumento de mortalidad.
En resumen, la evidencia señala que ghrelina juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa corporal. La administración exógena de ghrelina disminuye la liberación de insulina inducida por glucosa y aumenta el nivel de glucosa en sangre en humanos y roedores. Así mismo, como se acaba de describir, se ha visto que su efecto sobre la regulación e la glucosa depende mucho del estado metabólico (177).

6.3.4 Acción sobre secreción de GH

La hormona del crecimiento (GH), que también se conoce como somatotropina, e IGF-1 ejercen una miríada de efectos pleiotrópicos a través de varias vías de señalización intracelular similares y distintas. Una de las principales acciones comunes a GH e IGF-1 es la promoción del crecimiento. Las acciones de GH afectan el crecimiento, el metabolismo y la composición corporal y se han asociado con el envejecimiento y la longevidad. Sin embargo, la GH y el IGF-1 actúan de manera muy diferente sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos; La GH bloquea la acción de la insulina, promueve la lipólisis e impide la lipogénesis, mientras que el IGF-1 tiene efectos opuestos (178).

A principios de la década de los 90, previo al descubrimiento de ghrelina, la industria farmacéutica diseño sustancias peptídicas y no peptídicas llamadas secretagogos de GH (GHSs), que estimulaban la liberación de GH desde la hipófisis en humanos y otros animales. Estos secretagogos son capaces de generar la liberación de GH, pero también tenían acciones sobre ingesta de alimentos (179)**.** Posteriormente, Kojima verificó que la inyección de ghrelina inducía la liberación de GH en la hipófisis (15). Después de eso, se descubrió e identificó que la función orexigénica de ghrelina se debe a su acción sobre el receptor GHSR1a en las neuronas NPY/AgRP. Así se definió a ghrelina como un agonista endógeno de GHSR1a que estimula la secreción pulsátil de GH y el apetito. El efecto orexigénico de ghrelina está mediado, al menos parcialmente, por el receptor de GH central, y se atenúa en animales con deleción genética del GH-R (180).

El mecanismo a través del cual la activación del sistema ghrelina/GHSR1a desencadena la secreción de GH, es uno de los mejor caracterizados para este receptor. En las células somatotropas, la enzima fosfolipasa C, actúa sobre el fosfoinositol 4,5 difosfato en la cara interna de la membrana plasmática generando inositol-3-fosfato (que media la liberación de Ca^{2+} desde el RE) y diacilglicerol (que activa PKC). La liberación de Ca^{2+} dependiente de inositol-3-fosfato causa la inhibición de canales de K^{+} independientes de voltaje, y esto, junto con la activación de PKC por DAG, causan la despolarización de la membrana, la apertura de canales de Ca^{2+} y la entrada de éste. Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular disparan la liberación de GH al medio extracelular (181).

6.3.5 Acción sobre la termogénesis

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad termogénica del TAM se correlaciona positivamente con el gasto energético, y la desregulación de la termogénesis se asocia con obesidad en humanos (101). El sistema de ghrelina, junto con la ingesta y el incremento de adiposidad, también posee efectos sobre el gasto energético, actuando sobre el TAM y TAB.
Por un lado, se ha estudiado que, el tratamiento crónico con ghrelina genera una disminución de la expresión del ARNm de UCP1 y UCP3 en el TAM en ratones (182–184). Se sabe además

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

que ghrelina suprime la liberación de NE mediada por vía vagal en el TAM (185,186). Este efecto se bloquea con la vagotomía. Esta supresión de la liberación de NE inducida por ghrelina tampoco se observa en ratas con ablación de GHSR1a, lo que sugiere que los aferentes vagales transmiten la señal de ghrelina periférica al SNS que inerva al TAM (182–184). Por lo tanto, el sistema de ghrelina genera una disminución del gasto de energía a través de una disminución de la termogénesis, favoreciendo el almacenamiento de energía.

Sin embargo, lo más estudiado ha sido la supresión de la señalización del sistema de ghrelina debido a sus efectos beneficiosos sobre la termogénesis. Hay varios estudios que demuestran que la ablación del receptor GHSR1a aumenta el gasto de energía y la tasa metabólica, con un incremento de la expresión del receptor β3 adrenérgico (β3Adr) en TAM, todo ello independientemente de la ingesta de alimentos o la actividad física (182,187). Así mismo, en ratones con obesidad, se ha visto que la ablación del receptor GHSR1a les hace resistentes a engordar (166,188). Además, en ratones ancianos con supresión de la señalización de ghrelina mejoran su capacidad termogénica (189).

Estos resultados sugieren que el sistema de ghrelina, a través de mecanismos centrales y periféricos, regula la cascada de señalización termogénica en TAM. Aunque algunos autores han sugerido que los antagonistas de GHSR1a podrían representar un enfoque novedoso para combatir la obesidad estos han demostrado una eficacia en humanos muy baja en comparación a las nuevas terapias generadas a partir de las incretinas GLP-1 y GIP.

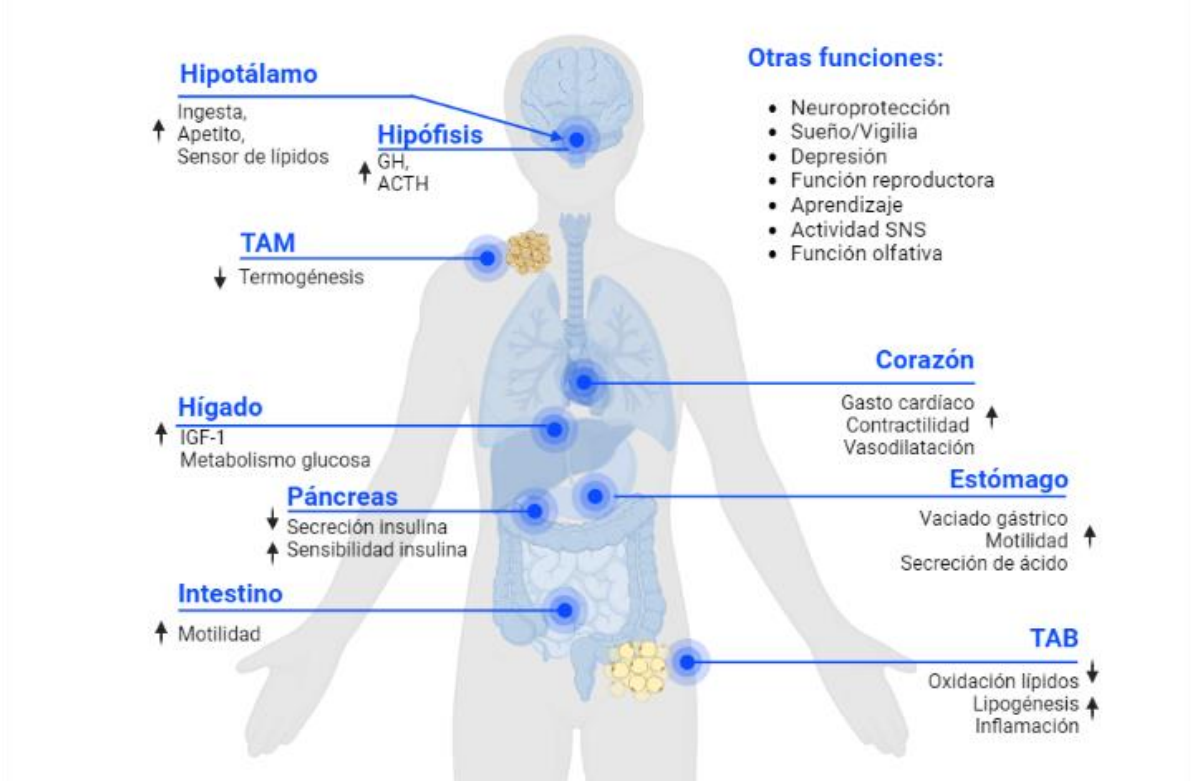


Imagen 6. Esquema de las acciones fisiológicas de ghrelina (elaboración propia, mediante BioRender)

Además de estas acciones que aquí destacamos dado a su relevancia para este trabajo, ghrelina también posee otras numerosas acciones centrales y periféricas como la estimulación de la motilidad gástrica y la secreción de jugos gástricos, la regulación de los ciclos sueño/vigilia, sensación de sabor y comportamiento de recompensa relacionado con la ingesta, modulación del estrés, estado de ánimo, la ansiedad y la depresión; protección contra la atrofia

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muscular, mejora de funciones cardiovasculares tales como vasodilatación y contractilidad cardíaca. Además, posee acciones sobre el aprendizaje y la memoria, así como sobre la función reproductora masculina y femenina. (imagen 6).

6.4 LEAP-2, NUEVA PIEZA DEL SISTEMA DE GHRELINA

El péptido antimicrobiano 2 que se expresa en el hígado (LEAP-2) fue descubierto en 2003 por Krause y colaboradores (190), quienes aislaron un péptido altamente conservado de un hemoflitrado de sangre humana y lo denominaron péptido antimicrobiano 2 que se expresa en hígado (LEAP-2) debido a su similitud con otros péptidos antimicrobianos endógenos.

El gen de LEAP-2 se encuentra localizado en el cromosoma 5q31 y se genera mayoritariamente en el hígado, aunque también en las células enterocíticas del lumen y yeyuno, en el duodeno, en el íleon y en menor parte en los riñones. LEAP-2 es originado a partir de un precursor de 77 aminoácidos y, a pesar de presenta diversas variantes postraduccionales, el péptido de mayor longitud, 40 aminoácidos, se considera la forma madura (190). Todas las variantes de LEAP-2 poseen una estructura con dos puentes disulfuro entre las cisteínas 17-28 y 23-33, y un extremo N-terminal, y el tamaño de la proteína varía entre los 3 a los 4,5 KDa (191). Su estructura posee una región interna con carga positiva debido a un mayor contenido en lisina y arginina y una cubierta hidrofóbica, que está implicada en la unión a la membrana fosfolipídica bacteriana (191). Pese a su denominación y aunque altas concentraciones si han demostrado actividad antimicrobiana (190,192), su actividad antimicrobiana a niveles fisiológicos de la hormona es baja o nula.

La relación de LEAP-2 con el sistema de ghrelina no se descubrió hasta 2018, cuando Ge y colaboradores reportaron por primera vez que LEAP-2 era un antagonista no competitivo de GHSR1a, mediante la detección de este péptido frente a un panel de 168 líneas celulares que expresan GPCR diseñadas estables (193). Hasta entonces, se creía que ghrelina era el único ligando endógeno del receptor GHSR1a.

Estudios posteriores revelaron que LEAP-2 presentaba una actividad agonista inversa, en la que, la región su extremo hidrofóbico N-terminal, que es la región del péptido con afinidad hacia el receptor GHSR1a, se encarga de estabilizar e inhibir la conformación de este, reduciendo también su actividad constitutiva en ausencia de ghrelina (194).

En cuanto a los niveles circulantes de LEAP-2, se sabe que responde a la disponibilidad de nutrientes de forma opuesta a ghrelina. En roedores, el ayuno reduce los niveles plasmáticos del LEAP-2, y la realimentación tras el ayuno recupera los niveles basales (193). Esta disminución de LEAP-2 plasmático en el ayuno es debida a la reducción de la expresión del péptido a nivel hepático (195,196). De hecho, Islam y colaboradores postulan que ghrelina reduce la expresión de LEAP-2 en el hígado por activación de la vía de ghrelina-AMPK-SREBP1, lo que explica su disminución durante el ayuno (195). Por otro lado, en ratones DIO, los niveles plasmáticos de LEAP-2 se ven incrementados. Hay una relación con el metabolismo energético correlacionando positivamente los niveles de LEAP-2 con el IMC y muchos parámetros metabólicos de la obesidad (grasa, glucosa, HOMA-IR, TG y un incremento en ratio del volumen del tejido adiposo visceral entre el volumen del tejido adiposo subcutáneo, así como un incremento en el contenido lipídico en el tejido hepatocelular) (196), mientras que disminuye después del ayuno, cirugía de bypass gástrico o manga vertical gastrectomía (196). De igual modo, se ha visto que la proporción plasmática de LEAP-2/ghrelina parece ser determinante para modular la actividad del receptor GHSR1a (197,198).

Un estudio reciente mostró que existe diferencia en los niveles circulantes de LEAP-2 en niños y durante la pubertad incrementándose durante la pubertad, sin embargo, encontraron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dimorfismo sexual en los niveles séricos de LEAP-2 que se incrementa más durante la pubertad en las chicas, respecto a los hombres (199).

En cuanto a las acciones biológicas de LEAP-2 se ha visto que la administración de LEAP-2 de forma aguda, actúa tanto a nivel central como periférico; antagonizando algunos de los principales efectos biológicos in vivo de ghrelina como la hiperfagia, la hiperglucemia y la liberación de GH en roedores (195).

Como ya se ha comentado anteriormente, ghrelina es conocido por su papel como hormona orexigénica. Por ello es de vital importancia revisar los datos existentes sobre LEAP-2 e ingesta. En este caso, Ge y colaboradores encontraron que el incremento en la ingesta mediado por la administración de ghrelina se revierte cuando se realiza un pretratamiento con LEAP-2 a los ratones, antes de la administración de ghrelina. Además, vieron que una administración única de LEAP-2 reduce la ingesta por debajo de los valores del grupo control (193). Posteriormente, se demostró que la administración intracerebroventricular (ICV) de LEAP-2 antes de la fase oscura no elimina la ingesta de alimentos, pero si la reduce en ratas tratadas con ghrelina y LEAP-2, en comparación con las ratas tratadas solo con ghrelina. Además, la administración intraperitoneal (IP) de LEAP-2 30 minutos antes de la administración ICV de ghrelina, no suprime los efectos de ghrelina, sin embargo, los efectos centrales de LEAP-2 si suprimen los efectos orexigénicos de ghrelina tras su administración IP (195). El estudio de nuestro grupo demuestra que la administración aguda de LEAP-2 inhibe la ingesta de forma dosis-dependiente, y que LEAP-2 antagoniza la ingesta de alimentos inducida por ghrelina en modelos de ratón alimentados con dieta estándar y también en ratones DIO (200).

La acción orexigénica de ghrelina, se encuentra mediada, en parte por las neuronas NPY, que se encuentran en el núcleo arcuato del hipotálamo y expresan altamente GHS-R. En este contexto, un trabajo demostró que la administración de LEAP-2 producía una hiperpolarización de las neuronas NPY y que la administración de ghrelina no era capaz de revertir esa hiperpolarización (196). No obstante, otro estudio público que LEAP-2 no es capaz de suprimir los efectos de NPY sobre la ingesta de alimentos, sugiriendo que NPY no es una diana de LEAP-2 (195) y un estudio de nuestro grupo muestra que los efectos de LEAP-2 son independientes de NPY (200).

Anteriormente se mencionó que ghrelina es esencial en el mantenimiento de los niveles de glucosa, sobre todo en condiciones de restricción calórica (175,201,202) y que por tanto es una hormona hiperglucemiante. Por ello, cabe resaltar los estudios que existen en relación con LEAP-2 y el metabolismo de la glucosa. Ge y colaboradores (193), demostraron que tras someter a los ratones a 15 días de una restricción calórica del 40 % los niveles circulantes de LEAP-2 disminuyen. La sobre expresión de LEAP-2 en los ratones sometidos a la restricción calórica demostró que la sobre expresión de LEAP-2 generaba una inhibición sobre GH y ghrelina, lo que causaba consecuentemente una inhibición de la gluconeogénesis hepática (193).

Así mismo, y dado que otras de las acciones de ghrelina es el incremento de GH, Ge y colaboradores demostraron que la administración intravenosa de LEAP-2, 10 minutos antes a la administración de ghrelina, reduce el pico de secreción y la cantidad de GH liberada de manera dosis dependiente, por lo que LEAP-2 antagoniza los efectos de ghrelina sobre la liberación de GH 207. Para ahondar más en sus acciones, y ver si LEAP-2 endógeno era importante en la inhibición de la secreción de GH, los autores administraron dos anticuerpos anti-LEAP-2 a ratones sometidos a un ayuno durante 24 h para estimular la secreción de ghrelina y medir los efectos sobre la GH. La administración de ambos antagonistas produjo un incremento de los niveles de GH en suero en comparación con los controles, indicando que

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

LEAP-2 endógeno estaba controlando la secreción de GH estimulada por ghrelina (193). Otro estudio, con ratones carentes de LEAP-2, mostró que la inhibición de LEAP-2 generaba un incremento de la alimentación inducida por ghrelina y la liberación de GH (203).

Todos los estudios hasta ahora aquí mostrados apoyan el potencial terapéutico de LEAP-2, sin embargo, un reciente ensayo en humanos dio un paso más hacia un posible uso clínico como diana terapéutica de LEAP-2. Hagemann y colaboradores dieron otro paso adelante hacia la farmacoterapia clínica dirigida al sistema de ghrelina. En este estudio se realizó una infusión intravenosa continua de LEAP-2 o placebo en el ensayo cruzado aleatorio, en hombres jóvenes sanos. Aquellos que recibieron el tratamiento con LEAP-2 habían suprimido la ingesta de alimentos ad libitum y la duración de las comidas, y los perfiles de glucosa y lípidos posprandiales también mejoraron. También vieron que la infusión de LEAP-2 suprime la liberación de la GH posprandial pero no cambia los niveles de ghrelina (204).

Todos estos estudios muestran a LEAP-2 como una señal de excedente de energía y un regulador eficiente del equilibrio energético, lo que ha fomentado la investigación sobre su potencial como una posible diana terapéutica anti-obesida

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

HIPÓTESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Se ha descrito que LEAP-2 actúa sobre el mismo receptor que ghrelina antagonizando sus efectos. Por lo tanto, LEAP-2 podría ser un factor esencial en la regulación del metabolismo energético. Ahondar en sus acciones y comprender sus mecanismos podría aportar datos relevantes que apuntasen a LEAP-2 como una nueva diana terapéutica para la mejora del estado metabólico y prevenir el desarrollo de la obesidad y MAFLD.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El objetivo general será caracterizar el efecto de LEAP-2 y la interacción entre LEAP-2 y ghrelina en sus efectos sobre metabolismo energético en modelos de roedores y en modelos celulares.

Los objetivos concretos en la presente tesis doctoral serán:

1. Analizar si los niveles circulantes y la expresión hepática de LEAP-2 están condicionados por el estado nutricional.
2. Estudiar el efecto central crónico de LEAP-2 en la regulación del gasto energético.
3. Estudiar la relación de LEAP-2 en la termogénesis adaptativa en diferentes modelos asociados a obesidad.
4. Estudiar las acciones de LEAP-2 sobre el metabolismo lipídico en el hígado.
5. Estudiar el efecto central crónico de LEAP-2 sobre un modelo de envejecimiento.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

Para la realización de esta tesis doctoral se emplearon dos procedimientos experimentales preclínicos complementarios. Por un lado, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* que nos permiten ver los efectos en modelos animales. Por otro lado, se realizaron experimentos complementarios *in vitro* como un acercamiento a un modelo más cercano a un efecto en tejidos humanos.

1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los experimentos con animales han sido revisados y aprobados por el comité ético de la universidad de Santiago de Compostela (procedimiento de la Dra. Sulay Tovar Carro; 15010/17/002) de acuerdo con la normativa europea y española para el uso de animales de experimentación animal; realizado, por tanto, en cumplimiento de la directiva 63/2010/CE 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 RD 53/2013, de 1 de febrero, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Todos los trabajos con animales han sido realizados por personal del laboratorio acreditado con la capacitación para el trabajo con animales de experimentación. Las instalaciones del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de Santiago (CIMUS) fueron las empleadas para la realización del proyecto.

Todos los experimentos han sido ajustados a las condiciones 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). Debido a la naturaleza y perspectiva fisiológica del estudio se limitó seriamente la posibilidad del reemplazo del uso de animales. La homeostasis energética implica la comunicación de los tejidos periféricos con el SNC a través de señales que transcurren por el torrente sanguíneo; por ello, la sustitución de los modelos animales por otro tipo de modelos experimentales no se consideró factible. Sin embargo, si se redujo al mínimo el número de roedores utilizados en cada experimento. En base a estos principios, a lo largo de la realización de esta tesis doctoral, se aseguró que los procedimientos realizados fueran aquellos que: implicaran el uso mínimo de animales, afectara lo mínimo a la capacidad de sentir dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y, por tanto, tuvieran mayores probabilidades de producir resultados satisfactorios.

1.2 MODELOS ANIMALES y ESTABULACIÓN

Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado el siguiente animal de experimentación: Ratón (*Mus musculus*) y Rata (*Rattus norvegicus*):

- Ratones jóvenes 6-8 semanas de edad de la línea C57BL/6 suministrados por el animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela.
- Ratones jóvenes 8 semanas de edad de la línea C57BL/6 suministrados por Charles River.
- Ratones envejecidos de la cepa C57BL/6 suministrada por Janvier a la edad de 18 semanas.
- Ratas Lewis, suministradas por Janvier a las 8 semanas de edad con una masa corporal aproximado de 200-250 g.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Todos los animales fueron estabulados en el momento de su llegada cuando procedían de otros animalarios. En cualquier caso, los roedores tienen siempre un período mínimo de aclimatación de 7 días antes de comenzar los experimentos. Los roedores han sido estabulados en condiciones controladas de luz-oscuridad de 12 horas (h), a temperatura constante (22 ºC), humedad (40-50 %), con acceso libre a agua y comida hasta la realización de los experimentos, y con enriquecimiento ambiental mediante el suministro de material de nidificación.

1.3 CONDICIONES NUTRICIONALES

Para el mantenimiento general y cría, los animales se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituye la dieta estándar de los animales (Standard Diet, STD) (Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Envigo) con acceso libre a la comida, *ad libitum*.

1.3.1 Ayuno

Como control en los experimentos en los que se realiza algún tipo de ayuno, se emplean animales alimentados *ad libitum*, es decir, con acceso libre a comida.

Ayuno: En algunos experimentos concretos, se empleó el ayuno de los animales para observar los efectos que este producía. El ayuno consiste en la retirada total de alimento al animal durante 12 h o 24 h.

Ayuno con realimentación: tras 12 h de ayuno los ratones tuvieron acceso libre a comida durante las 10 h previas al sacrificio.

Restricción calórica: En un experimento concreto, se empleó el método de la restricción calórica que consiste en restringir el alimento en un 60 % respecto a lo que come el animal ad-libitum, es decir, el animal tiene acceso únicamente a un 40 % de lo que comería en condiciones normales. En este caso, se genera un déficit nutricional, con un balance energético negativo.

1.3.2 Obesidad inducida por la dieta

Como control en los experimentos en los que se interviene con algún tipo de dieta, se emplean animales alimentados ad libitum, es decir, con acceso libre a comida, con una dieta estándar de los animales (Standard Diet, STD) (Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Envigo).

En ciertos experimentos en los que será indicado, se utilizaron diferentes dietas para explorar los efectos sobre el metabolismo, e inducir obesidad y/o esteatosis hepática generando un superávit nutricional y un balance energético positivo: dieta alta en grasa con un 60 % de contenido de grasa (VHFD; very high fat diet) (D12492, Research Diets); dieta rica en fructosa, con un 60 % de contenido en fructosa (D02022704, Research Diets). La composición calórica de macronutrientes para cada dieta aparece representada en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de las dietas STD, VHFD y fructosa, en % Kcal.

	STD	VHFD (60 %)	FRUCTOSA (60 %)
PROTEÍNA (%KCAL)	19	20	20
GRASA (%KCAL)	6	60	10
CARBOHIDRATOS (%KCAL)	44	20	70
DENSIDAD ENERGÉTICA (KCAL/G)	3.1	5.21	3.81
METIONINA (% MASA)	S	S	S
COLINA (% MASA)	S	S	S

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y LA MASA CORPORAL

Se lleva siempre un control de los animales mediante la monitorización periódica de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico y la adaptación al manejo por el personal del laboratorio, tratando así de minimizar el posible estrés generado durante el desarrollo de los procedimientos experimentales. La asignación de los animales en los diferentes grupos experimentales se realizó de forma aleatoria.

La determinación de la masa corporal y de la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión (DUNE DCT 201). Para la medición de consumo de comida se realizan mediciones periódicas, siempre a la misma hora del día en cada experimento, preferiblemente, al inicio de la fase lumínica 8-10 am.

1.5 FENOTIPADO METABÓLICO. ANÁLISIS MEDIANTE SISTEMA DE CALORIMETRÍA INDIRECTO (TSE)

Se realiza un fenotipado metabólico empleando un sistema de calorimetría indirecta (PhenoMaster, TSE System) de 12 cajas que realiza mediciones simultáneas cada 30 minutos, durante 48 h (con una adaptación previa de 48 h en las cajas metabólicas). Este sistema nos permite medir el consumo de oxígeno como volumen (vO_2), la producción de dióxido de carbono como volumen (vCO_2) y actividad locomotora, además de la ingesta de alimentos.

Con todos los parámetros que nos da el sistema, podemos determinar, además de la ingesta, el gasto energético resultante (Kcal/48 h) que fue normalizado por la masa corporal de cada individuo, actividad locomotora (cortes en los haces) en el tiempo que se detecta utilizando sensores de luz infrarroja que registran el movimiento en sentido horizontal y vertical, y el cociente respiratorio (RQ, respiratory quotient,) que se calcula dividiendo el vCO_2 producido entre el vO_2 consumido (vCO_2/ vO_2).

La utilización de recursos energéticos se estima por el RQ. La tasa del RQ de carbohidratos, grasas y proteínas es 1.0, 0.7 y 0.8 respectivamente, esto nos permite detectar cuál es el principal combustible oxidado en el organismo. Cuando hay un adecuado reparto entre los nutrientes energéticos el RQ es 0.85.

1.5.1 Termoneutralidad en el TSE

Para la realización de este experimento, los animales entran en el sistema calorimetría indirecta y fenotipado metabólico y se aclimatan de forma progresiva al incremento de temperatura. Se incrementa cada día la temperatura 2 ºC hasta alcanzar los 30 ºC (22-24-26-28-30 ºC). Una vez que se alcanza la termoneutralidad se realizan las medidas del TSE de forma idéntica a lo descrito anteriormente.

1.6 TEST DE EXPOSICIÓN AL FRIO

Para realizar este test es necesario estabular a los animales en una cámara fría que permanezca a 4 ºC durante la realización de este. En primer lugar, antes de introducir los animales en dicha cámara fría, se toma la temperatura por vía rectal usando una sonda rectal conectada a un termómetro digital (*BAT-12 Microprobe- Thermometer; Physitemp*, Clifton, NJ). Posteriormente, se introducen los animales en la cámara fría y se realizan mediciones de la temperatura por vía rectal cada 60 minutos, siendo la última medición a las 6 h.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.7 ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS CENTRAL Y PERÍFERICAMENTE

Los experimentos in vivo que aquí se detallan vienen apoyados por la gran experiencia en la manipulación de animales y en técnicas de cirugía del grupo.

1.7.1 Administración central

Sedación**:** Para la realización de estos procedimientos que a continuación se describen, es necesaria una sedación previa del animal. Para ellos se empleó un anestésico líquido inyectable formado por un combinado de ketamina y xilacina. La solución anestésica consistente en 80 mg/kg (1 mL) de ketamina (Imalgene® 1000 inyectable, Merial) y 8 mg/kg (0,25 mL) de xilacina (Rompún® 2 %, Bayer HealthCare), para ratón, se prepara y administra disuelta en suero fisiológico (6 mL) (Suero fisiológico isotónico, Physan). El volumen final inyectado se calcula según la masa corporal del animal, inyectando 10µL/g de masa corporal. Esta administración se realiza mediante una inyección intraperitoneal (IP) en la parte ventro-caudal del animal por debajo del peritoneo. Se inmoviliza el animal por la espalda intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras, y se inserta la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16 mm, BD Medical Surgicals Systems) acoplada a una jeringa (1 mL BD slip-tip siringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems) prácticamente de manera perpendicular a éste. Esta anestesia se considera una anestesia de grado II-III, y dura un período de 1-2h, siendo la mortalidad despreciable. Se comprueba la total sedación del animal antes de la realización de cualquier procedimiento, evaluando el reflejo podal.

Canulación intracerebroventricular (ICV)**:** Esta intervención se realiza para administrar agentes farmacológicos en el ventrículo lateral del cerebro del ratón. La inyección de sustancias en dicho ventrículo permite la difusión de dichas sustancias al hipotálamo. Para ello se emplean cánulas de infusión cerebral (ICV) especiales (P1 Technologies, REF: 3300P Osmotic Pump Single Guide Cannula, 30 Gauge Stainless-Steel, cut 3 mm below pedestal)) con la altura deseada para los experimentos crónicos con bombas. Para la colocación de las cánulas, se realiza una incisión en la zona superior de cráneo y se visualizan las suturas craneales. Una vez localizada la posición del ventrículo lateral (Coordenadas: 0,6 mm AP, ± 1,2 mm L, 2 mm DV) (205) se procede a realizar una trepanación del cráneo empleando una broca quirúrgica. La cánula se implanta en el lado derecho o izquierdo (asignado aleatoriamente) del ventrículo lateral. Una vez implantada la cánula se sella bien toda la zona abierta empleando cianocrilato (SuperGlue-3, Loctite) para que la cánula quede perfectamente fijada y se sutura la incisión. Una vez canulados los animales se estabularon individualmente y se dejó un período de recuperación de 4 días antes de proceder a la administración de sustancias por la cánula.

Bombas mini-osmóticas: Para la administración crónica de sustancias en el SNC se requiere, además de la canulación para la infusión cerebral, una bomba mini-osmótica que puede ser de 7, 14 o 28 días; cada una posee diferente volumen total y flujo de infusión lo que permite administrar mediante un proceso de ósmosis de forma continuada una sustancia. Para los experimentos de 7 días se emplearon las Alzet, modelo 1007D (Durect, CA), que poseen un flujo de 0,5 µL/h. Para los experimentos de 14 días se emplearon las Alzet modelo 1002 (Durect, CA) que poseen un flujo de 0.25 µL/h. Para su correcto funcionamiento, la bomba mini osmótica se rellena con la solución de interés, una solución salina en la que va disuelto el compuesto o compuestos a administrar, y se le coloca un tubo de silicona (2110060110IZ Degane Silicone Tubos Silclear) que luego nos servirá de unión con la cánula ICV. Para su activación, la bomba mini osmótica debe ser sumergida en solución salina a 37 ºC toda la noche previa a su implantación. La bomba se coloca bajo la piel del animal en la zona intersecapular. Tras ello, se sutura la abertura con seda quirúrgica.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta vía fue utilizada para la administración de vehículo, ghrelina y LEAP-2 cuyas especificaciones se describen en la tabla 2.

Todas las sustancias se reciben liofilizadas para una mayor estabilidad del compuesto, una vez recibidas y antes de ser empleadas son resuspendidas en vehículo a la dosis deseada. Mediante estos métodos se han administrado o coadministrado los siguientes compuestos:

Tabla 2. Lista de compuestos administrados o coadministrados en los procedimientos

COMPUESTO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
VEHÍCULO: suero fisiológico vitulia 0,9 % de cloruro de sodio, solución para perfusión.	Laboratorios ERN S.A.	999792.2
GHRELINA: ghrelin (mouse, rat) trifluoroacetate salt	BACHEM	4033077
LEAP-2: human liver expressed antimicrobial peptide 2 (38-77) peptide	BIORBYT	orb71731

Tras la operación los animales se estabularon de forma individual y se monitoriza la ingesta y la masa corporal diariamente durante la duración del experimento.

1.7.2 Administración periférica

Administración por inyección intraperitoneal (IP): Para la administración de sustancias por esta vía no se precisa anestesia; se realiza en la parte ventro-caudal del animal por debajo del peritoneo. Se inmoviliza el animal por la espalda intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras, y se inserta la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16 mm, BD Medical Surgicals Systems) acoplada a una jeringa (1 mL BD slip-tip siringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems) prácticamente de manera perpendicular a éste. Esta vía fue utilizada para la administración de anestesia general con ketamina-xilacina, previamente descrita.

1.8 CIRUGÍA PARA LA REALIZACIÓN DE OVARIECTOMÍA (OVX)

Con el fin de minimizar el nivel de estrógeno circulante de origen gonadal, se realizó una cirugía de ovarectomía bilateral a ratones hembra de la cepa C57BL/6. Como método de sedación, previo al procedimiento, se empleó la administración IP de ketamina/xilacina, previamente descrita.

Se realiza una incisión lo más pequeña posible en el lateral de la zona abdominal, se extrae el ovario, se liga la trompa de Falopio con seda y se retira mediante un corte el ovario. Se sutura la zona. Este procedimiento se realiza para los dos ovarios. Como grupo control de la cirugía se emplea un grupo de hembras a las cuales se le realizó la intervención invasiva, pero sin retirar los ovarios. A este grupo se le denomina "*sham*".

Tras la ovarectomía de los ratones, estos se dividieron en grupos alimentados con una dieta estándar, VHFD o fructosa, durante tres meses, en las que se hizo un seguimiento de la masa corporal y de la ingesta de alimentos.

1.9 EUTANASIA Y RECOGIDA DE TEJIDOS

Al final de los diversos procedimientos, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 o mediante decapitación.

Dado a que los experimentos crónicos, debido a la implantación de cánulas nos impiden analizar la composición corporal mediante resonancia magnética, se realizó el pesado de los principales depósitos grasos post-mortem en una balanza de precisión.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La sangre de los ratones fue obtenida mediante punción cardíaca, esta fue recolectada en tubos para obtención de suero y plasma Sarstedt ®. Se centrifuga la sangre y se recolecta el sobrenadante en ambos casos, y se guardan las muestras a -20 ºC.

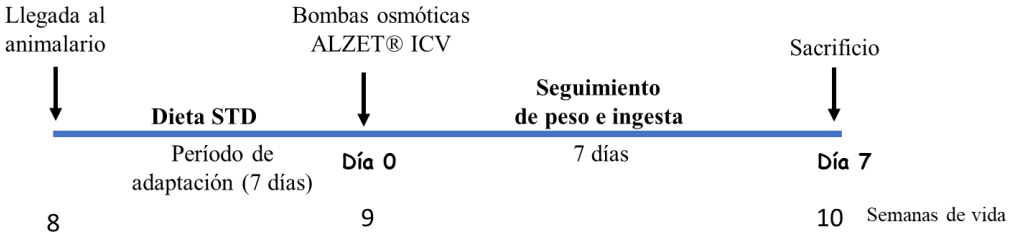
2. DISEÑO EXPERIMENTAL EN LOS MODELOS IN VIVO

2.1 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEAP-2, GHRELINA, Y COADMINISTRACIÓN EN RATÓN EN DIETA ESTÁNDAR, ALTA EN GRASA Y RATONES ENVEJECIDOS

Para la determinación de la influencia central del efecto de LEAP-2, ghrelina o la coadministración de ambos péptidos (G+L) en el metabolismo periférico, se emplearon ratones C57BL/6 en una dieta estándar, en una dieta alta en grasa (60 %) o animales envejecidos.

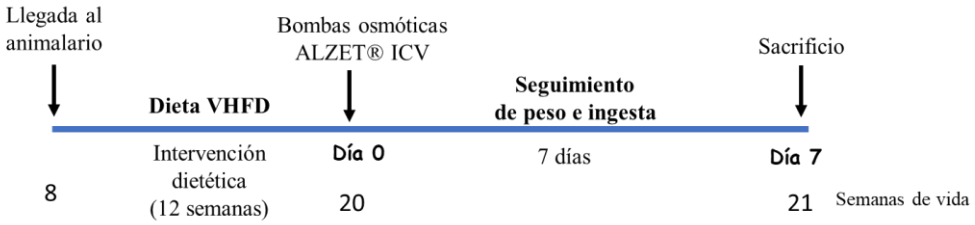
Las dosis administradas fueron de 10 µg/día para LEAP-2 y de 16,5 µg/día para ghrelina. La dosis es la misma para cada sustancia cuando son coadministradas. El vehículo y disolvente de los compuestos es suero fisiológico. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Ratones C57BL/6 jóvenes, alimentados con dieta estándar (STD):



- Vehículo (n = 8)
- Ghrelina (n = 6)
- Ghrelina+LEAP-2 (G+L) (n = 8)
- LEAP-2 (n = 8)

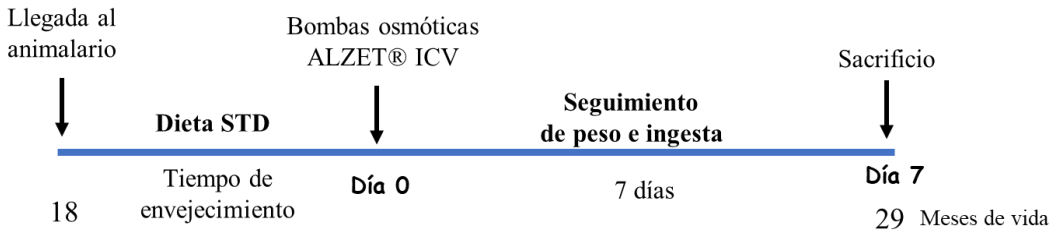
Ratones C57BL/6 jóvenes, alimentados con dieta alta en grasa (VHFD):



- Vehículo (n = 5)
- Ghrelina (n = 7)
- Ghrelina+LEAP-2 (G+L) (n = 7)
- LEAP-2 (n = 8)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ratones C57BL/6 envejecidos: alimentados con dieta estándar (STD):



- Vehículo (n = 8)
- Ghrelina (n = 7)
- Ghrelina+LEAP-2 (G+L) (n = 6)
- LEAP-2 (n = 8)

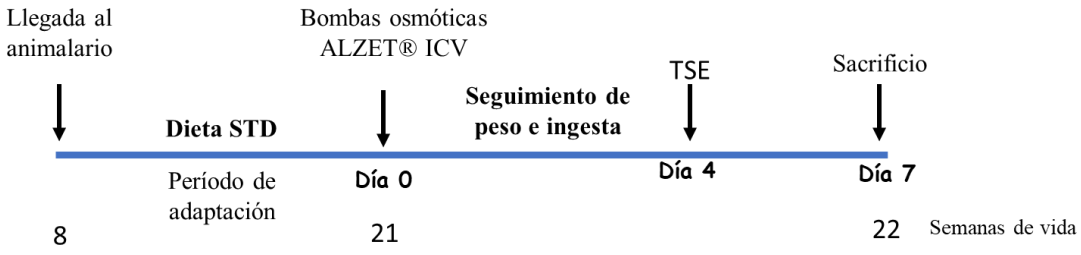
Tras la operación los animales se estabularon de forma individual y se monitorizó diariamente la ingesta de alimentos y la masa corporal.

2.2 ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE LEAP-2 EN RATONES EN DIETA ESTÁNDAR Y ALTA EN GRASA ANALIZADOS EN EL SISTEMA DE CALORIMETRÍA INDIRECTA (TSE)

Para la determinación la influencia central de LEAP-2 en el metabolismo periférico, se realiza la intervención para la administración crónica ICV durante 7 días mediante el uso de bombas osmóticas en ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar o dieta alta en grasa (VHFD 60 %). Las dosis administradas fueron de 10 µg/día para LEAP-2. El vehículo y disolvente de los compuestos es suero fisiológico.

Para el fenotipado metabólico, los ratones entraron en el sistema de calorimetría indirecta (TSE) el segundo día tras la intervención, pasan dos días en período de adaptación y se empiezan a medir las 48 h del cuarto hasta el sexto día de tratamiento. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

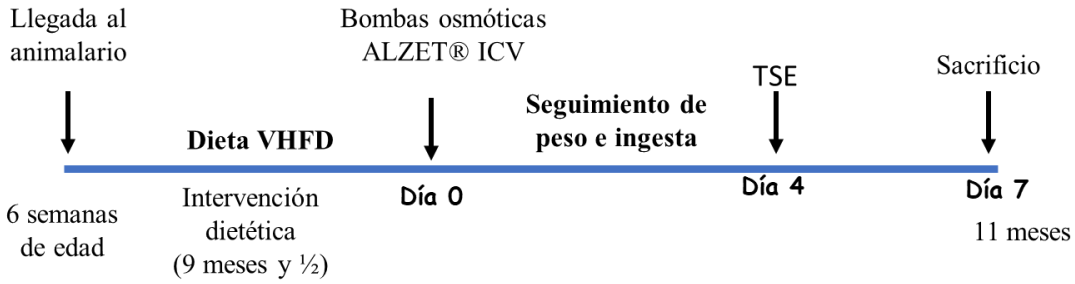
Ratones C57BL/6 jóvenes, alimentados con dieta estándar (STD):



- Vehículo (n = 5)
- LEAP-2 (n = 5)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ratones C57BL/6 jóvenes, alimentados con dieta alta en grasa (VHFD):

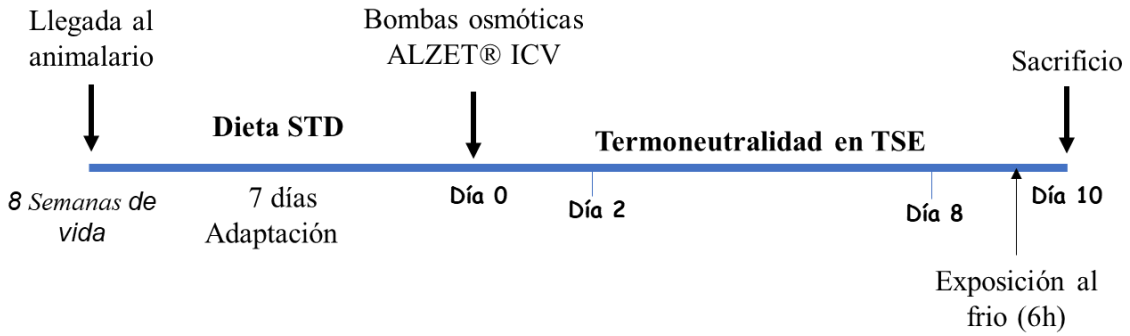


- Vehículo (n = 5)
- LEAP-2 (n = 6)

2.2.1 Administración crónica de LEAP-2 en condición de termoneutralidad y posterior exposición a frío

Para la determinación la influencia central de LEAP-2 en el metabolismo periférico, se realiza la intervención para la administración crónica ICV durante 14 días mediante el uso de bombas osmóticas. Para el fenotipado metabólico, los ratones entraron en el sistema de calorimetría indirecta (TSE) el segundo día tras la intervención, hasta el octavo. La dosis administrada para LEAP-2 fue de 10 µg/día. El vehículo y disolvente de los compuestos es suero fisiológico. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Ratones C57BL/6 jóvenes, alimentados con dieta estandar (STD):



- Vehículo (n = 6)
- LEAP-2 (n = 5)

Tras la operación los animales se estabularon de forma individual y se monitorizó diariamente la ingesta de alimentos y la masa corporal.

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

3.1 CULTIVOS CELULARES DE LINEAS HEPÁTICAS

3.1.1 HepG2

La línea celular de hepatocitos HepG2 (85011430, ECACC, European Collection of Authenticated Cell Cultures) Se trata de una línea celular inmortal con morfología epitelial cuya procedencia es una biopsia de un carcinoma hepatocelular bien diferenciado de un varón caucásico de 15 años. Presentan una morfología epitelial, una capacidad secretora de una variedad de proteínas plasmáticas importantes, y poseen capacidad de adherencia a la placa. Estas células fueron mantenidas en crecimiento en monocapa usando Minimum Essential Medium Eagle (EMEM, M2279, MERCK) suplementado con 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) solución de glutamina-penicilina-estreptomicina y 1 % (v/v) aminoácidos no esenciales (M7145, MERCK) como medio de crecimiento. Estas células fueron mantenidas en condiciones de 5 % de CO_2 a 37 ºC. Se renueva el medio entre dos y tres veces por semana, se pasaban cuando alcanzaban una confluencia de 80 % y se realiza el pase en una proporción 1:4 -1:6 en función de los requerimientos usando tripsina/EDTA.

3.1.2 THLE-2

La línea celular de hepatocitos THLE-2 (CRL-2706, ATCC, American Type Culture Collection) presenta morfología epitelial y procede de la inmortalización con el "SV40 large tumor antigen" de hepatocitos no tumorales del lóbulo izquierdo de un humano adulto. Las THLE-2 crecen en BEBM "Bronchial Epithelial cell Basal Medium" (Ref: cc-3171, Lonza/Clonetic Corporation) suplementado con los factores de crecimiento Bullekit (excluyendo epinefrina y gentamicina/anfotericina, cc-3170, Lonza/Clonetics), 70 ng/mL de fosfoetanolamina (P0503, MERCK), 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (E9644, MERCK), 10 % (v/v) FBS y 1 % (v/v) solución de glutamina-penicilina-estreptomicina (G6784, MERCK). Este medio de crecimiento completo se conoce como BEGM "Bronchial Epithelial cell Growth Medium". Las células fueron mantenidas a 37 ºC con 5 % CO_2. El subcultivo se produjo en ratios 1:3 - 1:4 y el medio fue renovado cada 48 h durante la fase de mantenimiento. La adherencia de las células THLE-2 depende del pretratamiento de las placas de cultivo durante 15 minutos con una mezcla de 0,01 mg/mL de fibronectina (33010-018, Gibco), 0,03 mg/mL de colágeno tipo I (sc-136157, Santa Cruz Biotechnology) y 0,01 mg/mL de BSA (bovine serum albumin, A4503 MERCK) disuelto en medio BEBM sin suplementar.

Para cada línea celular, el mantenimiento, congelación/descongelación y el contaje fueron realizados según procedimientos estándar de cultivo celular.

3.2 SILENCIAMIENTO GÉNICO-TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Para la realización del silenciamiento génico en esta tesis se ha utilizado la manipulación genética de la línea celular HepG2 con small-interference ARN (siARN) de la casa comercial Dharmacon para inhibir la expresión del gen de LEAP-2, cuya referencia se indica debajo.

Específicamente hicimos uso de los diseños ON-TARGET plus-SMART pool: siLEAP2 (L-015178-02-0005, 5 μM, Dharmacon) Que consistía en una mezcla de 4 secuencias "sense" diferentes: CAAGAGAAGUUGUGGCAUA; CAGCAGCACUCCAUUUAUA; GGACAUAAAGUUACAAUUC y GCGAUUAUGUGCCCAAAUA.

El grupo control fue administrado con la cantidad equivalente de siARN no dirigido (ON-TARGET plus Non-targeting Pool Dharmacon, D-001810-10- 05, 5 μM). Que consistía en una

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

mezcla de 4 secuencias "sense" diferentes: CAAGAGAAGUUGUGGCAUA; CAGCAGCACUCCAUUUAUA; GGACAUAAAGUUACAAUUC y GCGAUUAUGUGCCCAAAUA.

Para la transfección utilizamos Trans-IT siQuest Transfection reagent (MIR2110, MIRUS) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se sembraron $3x10^5$ células en placas de 6 pocillos y tras 24 h en cultivo se transfectaron con los correspondientes ARNsi. Tras 8 h, cambiamos el medio de cultivo y a las 48 h desde el inicio de la transfección recogemos los extractos celulares.

3.3 AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE ADIPOCITIOS BLANCOS

Para la obtención de pre-adipocitos blancos, la grasa blanca subcutánea (TABsc) es extraída de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad. Posteriormente, en el laboratorio, se emplea una disgregación tanto mecánica, con tijeras, como enzimático empleado una solución que contiene colagenasa tipo IV para el TABsc (1 mg/mL de colagenasa tipo A, Roche) a 37 ºC.

La suspensión celular pasó a través de un colador de células de 100 µm (Falcon) para eliminar el estroma y los residuos y se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante mediante aspiración, y se resuspende el pellet en 10 mL de medio de crecimiento (DMEM/F12 (1:1) + GlutaMax, suplementado con 10 % FBS, 1 % P/S) y se vuelve a pasar por un filtro de 70 µm que se vuelve a centrifugar y a resuspender en medio de cultivo.

Seguidamente se siembran los pre-adipocitos en placas de 12 pocillos, que se incuban a 37 ºC con 5 % CO_2. El medio se cambia día si día no y se mantienen en estas condiciones hasta que los pre-adipocitos están 100 % confluyentes.

Una vez confluyentes se induce la diferenciación a adipocitos, empleando el medio de crecimiento suplementado con 5 mg/mL de insulina, 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 µm de dexametasona y 1 µM de roxiglitazona. El proceso de diferenciación dura 7 días, durante los cuales se cambia el medio día si día no y se mantienen en condiciones de incubación a 37 ºC con 5 % CO_2. A partir del día 7 pueden realizarse los experimentos.

3.4 TRATAMIENTOS REALIZADOS SOBRE LAS LINEAS CELULARES

3.4.1 Tratamiento con ácido oleico

El tratamiento con ácido oleico es ampliamente utilizado como un modelo de esteatosis hepática in vitro, ya que es un método efectivo en la inducción de la acumulación de lípidos en los hepatocitos. Con el objetivo de inducir la acumulación de TG citoplasmáticos hemos tratado las células con ácido oleico (Sigma-Aldrich) 1 mM unido a BSA libre de AG (Capricorn) en una proporción molar 2:1. Las células fueron mantenidas en el incubador diferentes tiempos con el tratamiento. ara comprobar que la acumulación de lípidos se había producido realizamos tinciones de Oil red O, la cual será detallada más adelante.

Medio control: medio libre de FBS suplementado con etanol (vehículo del stock de ácido oleico), 1 mM KOH y 0,05 mM BSA sin ácidos grasos.

3.4.2 Tratamiento con KHH

El KHH constituye un medio de ayuno muy relevante para el estudio de la gluconeogénesis, carente de nutrientes ni hormonas. En todos los experimentos en los que las células HepG2 fueron sometidas a ayuno, se utilizó el buffer Krebs-Henseleit-HEPES (KHH), compuesto por: NaCl 120 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl2 2.5 mmol/L, MgSO4 1.2 mmol/L, KH2PO4 1.2 mmol/L, NaHCO3 25 mmol/L, HEPES pH 7.4 25 mmol/L).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.4.3 Tratamiento con péptidos

El tratamiento con la hormona LEAP-2 se llevó a cabo sobre las células HepG2 para estudiar su efecto sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. Las células se cultivaron en el medio EMEM suplementado ya mencionado. Sobre ese medio, se añadía la hormona en una concentración de 0,1nmol. Tras el tiempo de tratamiento, se realiza un doble lavado con PBS y posteriormente se lleva a cabo la extracción de ARN o proteína según el experimento.

4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS

Para realizar el análisis histológico, las muestras fueron procesadas en función de la técnica a emplear. Para las muestras que se van a incluir en parafina, se introduce durante el sacrificio una fracción de la muestra en un cassete de histología que se embebe en paraformaldehído al 10 % para su posterior inclusión en parafina. Para llevar a cabo la técnica de tinción Oil red O una fracción de la muestra de cada hígado se congela a -20ºC, frescas. En ambos casos se realizaron cortes histológicos que fueron debidamente colocados en un portaobjetos por el personal técnico (Ana Senra) encargado de la realización de las histologías en el Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas. Aun así, para una mejor comprensión del análisis de las histologías, se procede aquí a describir brevemente los procedimientos para la realización de cada tinción.

4.1.1 Tinción hematoxilina/eosina

Para esta tinción el tejido fijado con formalina tamponada al 10 % se incluyó en parafina para ser seccionado en un micrótomo. Esta técnica tiñe las estructuras celulares mostrando de forma general, la estructura del tejido. La hematoxilina es de naturaleza catiónica (básica) por lo que tiñe de azul estructuras basófilas (de naturaleza ácida) como los núcleos celulares. Por otro lado, la eosina es de naturaleza ácida, tiñendo de rosa estructuras de naturaleza básica (acidófilas) como el citoplasma. Para la tinción, el tejido debe de estar incluido en parafina previa perfusión del animal. Los cortes de parafina son preparados con xilol para eliminar los excesos de esta. Después se pasan los cortes por un proceso de rehidratación, consistente en alcoholes de concentración decreciente (100º, 95º y 70º). Tras un lavado con H2O destilada se sumerge en hematoxilina durante 10 minutos, se lava e inmediatamente se pasa por un alcohol ácido. Tras lavarlo se sumerge 30 segundos en eosina. Para deshidratar la muestra se pasan los cortes por alcoholes de graduaciones creciente, y antes de montar se deja sumergido 10 minutos en xilol.

4.1.2 Tinción Oil red O

Esta tinción colorea las gotas lipídicas del tejido en un tono rojizo. La tinción de Oil red O se realizó secciones congeladas de hígado justo después de la extracción del tejido del ratón. Para ello se cortaron en un criostato (8 µm) y se colocaron en portaobjetos. Estos se sumergieron en tinción Oil red O durante 10 minutos. Después se lavaron en H2O destilada y se contra tiñeron con hematoxilina Meyers durante 3 minutos. Los portaobjetos se montaron en medio de montaje acuoso.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.3 Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido adiposo extraído en el momento del sacrificio se fijaron en formaldehído tamponado al 10 % y posteriormente se deshidrataron (en concentraciones crecientes de alcohol) para su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina. Para la inmunohistoquímica de UCP1, los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 µm que se procesaron, desparafinando en xileno, rehidratando y enjuagando en agua destilada. A continuación, las secciones se incubaron durante toda la noche con e anticuerpo primario (UP1, dilución 1:500, Abcam) y luego lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario ENVISION (una mezcla de anti-ratón y anticonejo de Dako).

4.1.4 Adquisición y análisis de imágenes

Una vez que el personal técnico nos entrega los portas con las histologías ya fijadas, se observaron los cortes con un microscopio (Olympus). Se sacan fotografías digitales utilizando los objetivos de 20 y 40 aumentos.

Para el análisis cuantitativo de las tinciones, se toman 2 o 3 fotografías de cada corte histológico. Posteriormente, las imágenes obtenidas son procesadas mediante el software ImageJ (206) (ImageJ-1.52a, Wayne Rasband) o FIJI (207) (ImageJ-1.53q Wayne Rasband). Las imágenes se dividieron en canales separados de color, se ajustaron los limites comprobando todas las imágenes y se realizó un análisis de partículas. En el caso de la tinción Oil red O, en células, para el cálculo final de cantidad de lípidos acumulado, contamos el número de células por imagen.

Para la cuantificación del tamaño de los adipocitos, se toman 3 fotografías representativas de cada corte, como el TABsc tiene adipocitos menores que el TABep, 40x para TABsc se emplearon imágenes a 40x y para TABep a 20x. Para el análisis de las imágenes empleamos el software FIJI (207) (ImageJ 1.53q Wayne Rasband) con la aplicación *Adiposoft*, procedimiento descrito por Galarraga M. et al. (208). Una vez determinadas las áreas de los adipocitos de interés, se calcula la distribución de frecuencias usando la función de frecuencia en Excel. En el caso del TABep se eliminan los datos por debajo de un área de 350µm^2 ya que estas células pueden ser una mezcla de adipocitos y células vasculares del estroma. En el caso del TABsc se sabe que existen dos poblaciones de adipocitos: una de diámetro pequeño (<50µm) y otra de diámetro mayor (>150µm). El beneficio de usar una distribución de frecuencia en lugar del área promedio de adipocitos surge cuando hay un cambio en el número de adipocitos además del tamaño.

Para determinar si hay un cambio en el número y tamaño de adipocitos entre tratamientos, determinamos una correlación entre el volumen promedio de adipocitos y la masa del depósito adiposo. Se asume un modelo circular-esférico para calcular el volumen promedio de los adipocitos. Con el volumen promedio para cada tejido se calcula una correlación lineal con una comparación de dos colas de pendiente e intersección y se compara entre diferentes grupos de tratamiento.

4.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Análisis de metabolitos en sangre

Para la detección plasmática de metabolitos y hormonas circulantes se emplearon kits ELISA comerciales siguiendo las instrucciones de cada casa comercial: Leptina (Merk Millipore), LEAP-2 (Phoenix pharmaceuticals INC).

Para la detección de triglicéridos, colesterol, y ácidos grasos libres (WAKO) se utilizaron kits comerciales de ensayos enzimáticos colorimétricos específicos siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

4.2.2 Análisis del perfil lipídico en hígado

El procedimiento de extracción de TGs para el tejido hepático se adaptó a partir de métodos descritos anteriormente (209). Se homogeneizaron muestras de tejido hepático (de aproximadamente 0,05 g) en cloroformo/metanol (2:1, vol/vol) empleando el *Tissue Lyser* II (Qiagen) a una frecuencia de 22 l/s, durante 4 minutos. Posteriormente, se dejan rotando con agitación a temperatura ambiente entre 3-5 h. Para la separación de fases, se añadió H2O Milli-Q, se centrifugaron las muestras y se recogió la capa orgánica inferior. El disolvente orgánico se dejó evaporar durante toda la noche en una campana de extracción de gases. El precipitado que se obtuvo tras la evaporación corresponde a la grasa extraída del tejido.

El contenido de TGs de cada muestra se midió por duplicado después de la evaporación del disolvente orgánico usando un método enzimático colorimétrico, para TG y colesterol (Spinreact) y para ácidos grasos libres (NEFAs) (WAKO).

La cuantificación de TG se realizó con un kit comercial (Spinreact). Se determina la concentración tras la evaporación de una parte de la fase orgánica, añadiendo el reactivo al precipitado e incubando 5 minutos a 37 ºC; durante ese tiempo se produce una reacción enzimática que produce una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de TG en la muestra. La lectura de las muestras y de la recta patrón se realiza con un espectrofotómetro a 505 nm y se calcula la concentración de TG teniendo en cuenta la masa del tejido.

4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE WESTERN BLOT

El Western Blot, también llamado inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada para detección de proteínas específicas en una muestra determinada. La especificidad de unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una proteína específica dentro de la mezcla de proteínas que presente la muestra. Esta técnica se emplea como criterio de identificación positivo de una proteína específica, obteniendo datos semicuantitativos. Dado que las proteínas son moléculas bastante termolábiles, se ha llevado a cabo todo el proceso en hielo para evitar su posible desnaturalización. El proceso se compone de diferentes etapas.

4.3.1 Extracción de proteínas

Las muestras se conservaron en ultra congeladores a -80 ºC, en tubos eppendorf correctamente marcados. Para su procesado, el tejido se extrae, se corta una porción de tejido, que se introduce en un eppendorf de fondo redondo, sin descongelar. Seguidamente se añade tampón de lisis (tabla 3) y una bola de acero en el eppendorf. El volumen del tampón de lisis depende de la muestra a extraer (Hígado 900 µL, TAM 100 µL, TAB 300 µL, cultivo celular 80-40 µL por pocillo).

El tejido se lisa mediante homogenización mecánica empleando el *Tissue Lyser* II (Qiagen) con una frecuencia de 23 l/s durante 6 minutos. A continuación, se centrifuga a 13,2 rpm a 4 ºC durante 15 minutos. Posteriormente, se recoge el sobrenadante evitando la grasa acumulada. Se han realizado varias centrifugaciones hasta conseguir un sobrenadante libre de grasa.

Tabla 3. Componentes del tampón de lisis, disueltos en agua destilada

TrisHCl pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
Tritón X-100	1% vol/vol
Ortovanadato Sódico	1 mM
Fluoruro Sódico	50 mM
Pirofosfato Sódico	5 mM
Sacarosa	0,27 M

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	1 mM
Cocktail inhibidor proteasas (ROCHE®)	1 pastilla/50 mL

Continuación de la tabla 3.

4.3.2 Cuantificación de proteínas

A continuación, se cuantificó el contenido de proteínas del extracto total por el método de Bradford (210). Para ello, previamente se realiza una dilución para que la concentración de proteína pueda ser medida mediante espectrofotometría. El volumen de agua se estimaba para cada tipo de muestra, ya que no todos los tejidos poseen la misma cantidad de proteína, se toman 10µL de muestra y se diluye en un volumen de agua destilada. Posteriormente, en una placa multipocillo de 96 pocillos, se añaden 10 µL de la muestra diluida en cada pocillo y por duplicado, para obtener valores de mayor exactitud durante la cuantificación. Así mismo, para conocer la concentración de proteínas de las muestras se emplea una recta patrón que se realiza empleando albúmina de suero bovino (BSA), de la cual se añade también 10 µL de cada punto de la recta, por duplicado. Luego se añaden 250 µL de solución Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, BIO-RAD®) previamente diluida 1:5, en cada uno de los pocillos. Por último, se efectúa la lectura en el espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific®) bajo condiciones previamente estabuladas de 37 ºC y longitud de onda de 590 nm. Se espera obtener un r = 0.9999 para la recta, para que la cuantificación sea estadísticamente significativa.

4.3.3 Preparación de las muestras para la electroforesis SDS-page

La cantidad total de proteína de la muestra usada varió entre 5 y 20µg dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado y el tejido analizado. Tras la cuantificación preparamos las muestras junto con el tampón de carga o tampón de Laemmli (tabla 4). A cada muestra se le añadió la misma proporción de solución de carga. Este tampón permite dotar a todas las proteínas de carga negativa en proporción a su tamaño gracias al dodecilsulfato sódico (Sodium DodecylSulfate, SDS; Sigma-Aldrich), permite la desnaturalización de las proteínas con el β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) eliminado los puentes disulfuro. Todo esto facilita su carga en el gel y además se añade un colorante para identificar el frente de migración (azul de bromofenol, Merck). Todas las muestras deben tener la misma concentración final para que en el volumen de carga de cada muestra en la electroforesis haya la misma cantidad de proteína. Tras añadir el tampón de carga, y previamente a realizar la electroforesis, las muestras deben calentarse a 95 ºC durante 5 minutos para su completa desnaturalización. Una vez utilizadas se almacenan a -20 ºC.

Tabla 4. Composición del tampón de laemmli, disuelto en agua destilada

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

4.3.4 Electroforesis en SDS-page

La técnica se emplea para la separación de las proteínas en disolución por tamaño (masa) y carga eléctrica, cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Las muestras son sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS, con un porcentaje de acrilamida de 6, 8, 10 y 12 %, con un grosor de gel de 1.5 mm (tabla 5). En primer lugar, se montaron los cristales en una estructura, de forma que se puede añadir la mezcla para la polimerización del gel. Primero se añaden aproximadamente 8 mL de la mezcla para el gel separador. Luego se añade aproximadamente 1 mL de isopropanol (Sigma®) para evitar la formación de burbujas durante

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la polimerización y que la parte superior del gel quede recta y uniforme. Una vez que el gel ha polimerizado, retiramos el isopropanol y eliminamos los restos que puedan quedar con agua destilada. Posteriormente, se añaden 2 mL de la mezcla para el gel concentrador (tabla 5 bis) y se insertan los peines (en este caso de 15 pocillos) que permiten la formación de los pocillos de carga. Tras la polimerización, los geles ya listos, se introducen en una cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis 1X (tabla 6). En esta tesis se emplearon también geles comerciales de 10 %, grosor de gel de 1 mm y 26 pocillos BioRad (10 % Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel, 26 well, 15 µL, ref. 5678035).

Tabla 5. Composición de geles sds-page, separador con distintos %

Gel separador	6%	8%	10%	12 %
H2O destilada	13,2 mL	11,5 mL	9,9 mL	8,2 mL
30% Acrilamida/Bis	5 mL	6,7 mL	8,3 mL	10 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	6,3 mL	6,3 mL	6,3 mL	6,3 mL
10% SDS	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
10% persulfato amónico	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,02 mL	0,015 mL	0,01 mL	0,01 mL

Tabla 5 BIS. Composición de geles sds-page, gel concentrador

Gel concentrador	5%
H2O destilada	4,1 mL
30% Acrilamida/Bis	1 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,75 mL
10% SDS	0,06 mL
10% persulfato amónico	0,06 mL
TEMED	0,006 mL

Tabla 6. Tampón de electroforesis

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

Antes de cargar, se retiran los peines de los geles. Primero cargamos 6µL del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BioRad®), en el primer pocillo del gel. A continuación, se cargan los µL correspondientes de cada muestra en cada pocillo. Por último, asegurándonos de que el tampón de electroforesis cubra bien los pocillos, se conecta la tapa de la cubeta de electroforesis a la fuente de alimentación (comprobando que los electrodos están correctamente colocados) y se dejan correr las muestras a 80V-100V durante aproximadamente 2 h.

4.3.5 Transferencia semi-húmeda

Se emplea esta técnica con el fin de transferir las proteínas separadas en el gel mediante la electroforesis a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Para ello se someten a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde se realizarán las incubaciones con los diferentes anticuerpos.

Se utilizaron membranas de PVDF (Polivinylidene Fluoride Immobilion-P membrane, Millipore) cortadas con unas dimensiones de 8,6 x 7,1 cm que fueron activadas previamente durante 5 minutos en metanol, 5 minutos en H_2O destilada y 5 minutos en tampón de transferencia (tabla 7) El papel de transferencia (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) se empapó en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para la transferencia.

Tabla 7. Composición del tampón de transferencia

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

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El montaje del sistema consiste en posicionar la membrana y el gel una debajo del otro y separadas por papel de transferencia, con ayuda de un rodillo se eliminaron las posibles burbujas que podían quedar entre las capas. Todo ello se cierra entre las placas que crearán el voltaje (Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). El proceso se realiza a amperaje constante 0,8mA por cm2 durante una 1 h y 40 minutos conectado a una fuente de energía (PowerPac HC High Current Power Suppy, Bio-Rad).

La eficacia de la transferencia se comprobó mediante la tinción de rojo Ponceau (Ponceau S Red, Sigma-Aldrich) y/o tinción de azul brillante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G, Sigma-Aldrich) En el caso de la tinción con rojo Ponceau, se lavó el exceso con agua destilada y TBS-T para acabar de eliminar la tinción.

4.3.6 Inmunodetección

Para llevar a cabo la detección de las proteínas de interés, se emplea un método de detección inmunológico, que consiste en:

Bloqueo: La membrana de difluoruro de polivinilideno se incuba a temperatura ambiente en una solución de agente proteico bloqueante disuelto en tampón de lavado (TBS Tween 0,1 %). El agente bloqueante empleado es BSA al 5 % (Sigma), alternativamente puede emplearse una solución de leche en polvo desnatada polvo desnatado comercial (Dietisol, leche desnatada polvo 350 g; Dietisa; Nutrition & Santé) también al 5 %. El agente bloqueante se une a todos aquellos lugares de la membrana que no estén ocupados por las proteínas transferidas desde el gel. De esta forma, los anticuerpos sólo podrán unirse a su antígeno específico, reduciendo así las uniones inespecíficas. El bloqueo se lleva a cabo durante al menos 1 h a temperatura ambiente.

Anticuerpo primario: A continuación, se realiza la incubación, a 4 ºC durante toda la noche, de la membrana con el anticuerpo primario específico (tabla 9), diluidos en TBS Tween 1x con BSA al 3 % a la concentración indicada por la casa comercial. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario, y seguidamente, se realizan 3 lavados de las membranas con TBS Tween 1x (tabla 8), con un intervalo de 10 minutos entre lavados.

Tabla 8. Composición del tampón de lavado (TBS-TWEEN).

Tris-HCl	20 mM
NaCl	146 mM
Tween-20	0´1% vol/vol

Anticuerpo secundario: se incuba la membrana durante 1 h con un anticuerpo secundario (Dako) asociado a peroxidasa (Horseradish Peroxidase) que reconoce la parte constante del anticuerpo primario para detectar la presencia de la proteína y amplificar la señal del anticuerpo primario. Se diluye en solución de incubación a una concentración de 1:5000. El tipo de secundario utilizado vendrá determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario. Tras ese tiempo de incubación se retira el anticuerpo y se realizan tres lavados de 10 minutos con la solución de lavado (TBS-T).

Revelado y fijación de la señal: el complejo de anticuerpos unido a la proteína de interés se detecta incubando la membrana con el sustrato de la peroxidasa y un potenciador de quimioluminiscencia también conocido como sistema ECL de Amersham (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) a volúmenes iguales (1:1) incubándose durante 3 minutos en oscuridad con este sustrato. Inmediatamente después, para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coloca la membrana en el medio de

USC DE COMPOSTELA

unas transparencias (APLI®) en un casete de autorradiografía (Hypercassette, Amersham Biosciences). El revelado tiene lugar en una sala oscura en donde se introducen dentro del casette placas radiográficas Fujifilm (FujiMedical X-Ray Film Super RX, Fujifilm Corporation) sobre las membranas. Tras el tiempo de exposición deseado en función de la señal de cada proteína se retira la película y se sumerge en una solución reveladora (dilución 1:10) (Developer/Replenisher, Agfa-Gevaert Group) hasta que se visualiza la señal buscada y en ese momento se sumerge la película en líquido fijador (dilución 1:5) (Manual Fixing Bath, Agfa-Gevaert Group) durante un par de minutos con el fin de fijar la señal. Por último, se lava la película con agua corriente y se deja secar.

4.3.7 Cuantificación

Las bandas que se visualizan tras las inmunodetección son escaneadas mediante CannonScan® 9900F, a una resolución de 800X y digitalizadas para su cuantificación mediante el programa *Image J* (ImageJ 1.33. nih). El estudio cuantitativo se realiza corrigiendo la densidad óptica de las señales de inmunodetección por la señal de fondo de cada película fotográfica. Las áreas de medición son idénticas en todos los casos.

Tabla 9. Lista de anticuerpos utilizados para la inmunodetección mediante Western Blot.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-Conejo Inmunoglobulina/HRP (anticuerpo secundario)	1:5000	DAKO	P0448
Anti-Ratón Inmunoglobulina/HRP (anticuerpo secundario)	1:5000	DAKO	P0260
ß3ADR	1:1000	Abcam	ab 94506
Complejos mitocondriales (Ratón)	1:1000	Abcam	ab 110413
CPT1	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-20514
CPT1 L	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-20669
FGF21	1:1000	Abcam	ab 171941
PGC1α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-517380
PPARα	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-398394
PPARγ	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-7273
PRDM16	1:1000	Abcam	ab 106410
UCP1	1:5000-1:10000	Abcam	ab 10983
GAPDH (Control carga)	1:5000	Merk-Millipore	CB1001
HSP90 (Control carga)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology	sc-13119
VINCULINA (Control carga)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology	sc-73614

4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

4.4.1 Extracción de ARN

Para proceder a la extracción, lo primero es obtener la muestra de tejido a analizar. En el caso de aislamiento de regiones hipotalámicas concretas, los cerebros se extrajeron e inmediatamente se congelaron y almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. Luego, el cerebro se colocó en una matriz cerebral de ratón con la superficie ventral en la parte superior.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los fragmentos deseados se extrajeron de todo el hipotálamo cortando entre los límites rostral y caudal de la eminencia media paralelos a la base del hipotálamo y 1 mm a cada lado lateral de la eminencia media. La profundidad de cada sección aislada fue de alrededor de 2 mm de espesor en cerebro de ratón. Para el resto de los tejidos, se corta una porción del tejido a analizar.

Para la extracción total del contenido de ARN de cada tejido, se utiliza el reactivo Trizol (Invitrogen®), compuesto con tiocinato de guanidio para la degradación proteica y fenol/cloroformo para el aislamiento de ácidos nucleicos. Las muestras se homogenizan con trizol, y una bola de acero en el *Tissue Lyser* II (Qiagen) con una frecuencia de 27 1/s durante 6 minutos. El volumen de Trizol a emplear depende del tejido a extraer, para hígado se emplea 500 µL, para grasa 200 µL, para cultivo celular 120 µL por pocillo, para extracción del hipotálamo MB se emplean 180 µL.

A continuación, se centrifuga a 13,2 rpm durante 5 minutos a 4 ºC y se pasó el homogenizado a otro tubo de polipropileno. Posteriormente se debe aislar el ARN añadiendo cloroformo (en proporción 1:5, respecto al trizol) se agita y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga de nuevo a 13,2 rpm y 4 ºC durante 15 minutos para la separación de la fase acuosa (donde se encuentra el ARN) de la orgánica (proteínas y lípidos), quedando el ADN en la interfase. Se toma la fase acuosa y se añade isopropanol en proporción 1:2, respecto al trizol). Se agita y se pone 10 minutos a -20 ºC. A continuación, se centrifuga a 13,2 rpm y 4 ºC durante 10 minutos. Luego se elimina el sobrenadante y se lava el precipitado de ARN con etanol al 70 %, diluido con H_2O DEPC (en proporción 1:1, respecto al trizol), se agita y se vuelve a centrifugar 5 minutos a 13,2 rpm y 4 ºC. Se elimina el etanol y para purificar más el precipitado se vuelve a centrifugar 1 minuto. Finalmente, se resuspende el precipitado en H_2O DEPC y se calienta a 60 ºC 15 minutos.

4.4.2 Cuantificación de ARN

Para la determinación de la pureza del ARN en cada muestra se utiliza un espectrofotómetro NanoDrop 2000c Spectophotometer (Thermo Scientific) que determina el cociente de la absorbancia del ARN (260 nm) y de las proteínas (280 nm). Se consideraron aceptables valores del cociente entre 1,8 y 2. Luego se determinó la cantidad de ARN con el valor de absorbancia de 260 nm, finalmente se realizaron alícuotas para cada muestra a la concentración deseada.

4.4.3 Retrotranscripción

Consiste en la amplificación del ARN en forma de ADN complementario (ADNc), mejorando así la estabilidad de la muestra para la PCR en tiempo real. La reacción se realiza con un volumen final de 30 µL y con los siguientes compuestos (tabla 10):

Tabla 10. Reactivos para la reacción de retrotranscripción

Reactivo	Volumen (µL)
H2O DEPC	3,58
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer, Invitrogen)	6
Mezcla de dNTPs 100mM (dTTp, dCTp, dATp, dGTp) (Invitrogen)	6
MgCl2 de 50 mM (Invitrogen)	1,5
Cebadores aleatorios (Random primers, Invitrogen)	0,17
Inhibidor de ARNasa (RNAsaOUT®, Invitrogen)	0,25
Transcriptasa reversa (m-MLV, Invitrogen)	1
Muestra de ARN	10

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La mezcla se introduce en un termociclador con un programa de pasos consecutivos para su incubación a diferentes tiempos y temperaturas: 1 h a 37 ºC, 15 minutos a 42 ºC y 5 minutos a 95 ºC. Una vez finalizado las muestras se almacenan a -20 ºC.

4.4.4 PCR a tiempo real

Una vez obtenido el ADNc, se determinaron los niveles de ARNm de los genes de interés mediante PCR a tiempo real (PCR cuantitativa, RT-PCR o qPCR). Esta técnica se basa en la capacidad de detectar el producto de PCR (amplicón) en cada ciclo, utilizando fluorescencia. cambio en los niveles de expresión de ARNm de un gen en forma de ADNc comparándolo con los niveles de expresión de ARNm de un gen control (en nuestro caso el gen de hipoxantina fosforibosiltransferasa, *hprt*). La qPCR es un sistema basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre dos moléculas contenidas en una sonda. El proceso consiste en el diseño de cebadores para amplificar el ADNc del gen de estudio y una sonda cebadora. En esta tesis se utilizaron dos formas diferentes para detectar los productos de PCR:

Sonda cebadora TaqMan®.

Esta técnica se basa en el empleo de sondas específicas unidas a dos fluorocromos: uno, denominado reporter, se encuentra unido de forma covalente en el extremo 5´ de un oligonucleótido y el otro, un desactivador de fluorescencia (quencher) se encuentra en el extremo 3´. El quencher inhibe la fluorescencia del reporter cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador. Cada sonda específica hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso. A medida que la Taq polimerasa sintetiza en sentido 5´-3´, la actividad exonucleasa 5´-3´de esta misma enzima degrada la sonda quedando separado el fluoróforo del quencher y permitiendo así la emisión de la fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de fluróforo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADNc de interés presente en el producto de PCR.

Esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso, cuando la polimerasa detecta los cebadores y amplifica, se topa con la sonda degradando por el extremo 5’ una de las moléculas (quencher) que impedía la emisión de la fluorescencia de la molécula del extremo 3’. El aparato debe ser sensible al fluoróforo y tras cada ciclo de amplificación, detecta la intensidad de fluorescencia emitida permitiendo la cuantificación del material amplificado. En nuestro caso el fluorescente para sonda TaqMan® es el TAMRA con una absorción máxima de 560 nm y un máximo de emisión de 580 nm.

Para determinar la concentración de ADNc en cada muestra se analiza el valor CT, este es el ciclo a partir del cual se ha amplificado la mitad del contenido del ADNc y es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc. Utilizando la curva patrón con una mezcla del ADNc de todas las muestras, se relativiza la cantidad de ARNm de cada gen contenido en la muestra (normalizado con el gen control *hprt*).

Tabla 11. Reactivos para la rt-pcr, empleando sondas TaqMan

Reactivo	Volumen (µL)
H2O DEPC	2,82
Cebador directo (10 µM)	0,36
Cebador reverso (10 µM)	0,36
Sonda Taqman®	0,36
TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems)	6
Muestra ADNc, tras retrotranscripción (0,01-0,05 µg/µL)	2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La mezcla de PCR para este método se muestra en la tabla 11 y se calcula para un volumen final de 12 µL por cada pocillo. El protocolo usado para la amplificación consistió en 40 ciclos de 2 minutos a 50 ºC, 10 minutos a 95 ºC, 10 minutos a 95 ºC, 15 segundos a 95 ºC y 1 minuto a 60 ºC en un aparato de PCR en tiempo real *7500 Real Time PCR system* (Applied Biosystems).

Tabla 13. Lista de cebadores y sondas utilizados para el análisis de expresión mediante PCR a tiempo real.

Nombre del gen (proteína)	Especie	Método	Casa comercial/Referencia/Secuencia
Acaca (ACC α1)	*Mus musculus*	TaqMan	Diseñado Eurofins: 5'-3' Directo TGGGCGGGATGGTCTCTTT Reverso AGTCGCAGAAGCAGCCCATT Sonda ACCTTTGAAGATTTCGTCAGGATCTTTGATGA
Adgre1 (f4/80)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystem: Mm 00802529_m1
Adr ß3	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 02601819_g1
Fasn (FAS)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00662319_m1
Fgf21	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00840165_g1
Hprt	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 03024075_m1
IL1b	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00446190_m1
IL6	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00446190_m1
Leap2	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00461982_g1
Ldlr	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 01177349_m1
Nr1h2 (Lxr)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00437265_g1
Mac2	*Mus musculus*	TaqMan	Diseñado Eurofins: 5'-3' Directo CCAACGCAAACAGGATTGTTCT Reverso CCTGCTTCGTTGTTACACACAATG Sonda ATGTTGCCTTCCACTTTAACCCCCGC
MLxipl (Chrebp)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 02342723_m1
Mttp	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00435015_m1
Pck-1	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 01247058_m1
Pparα	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 004409939_m1
Pparγ	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00440940_m1
Pparγ c1α (PGC1α)	*Mus musculus*	TaqMan	Diseñado Eurofins: 5'-3' Directo CGATCACCATATTCCAGGTCAAG Reverso CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT Sonda AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA
Pparγ c1α (PGC1α)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 01208835_m1
Prdm16	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 01266512_m1
Srebf1 (Srebp1)	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00550338_m1
Scd1	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 00772290_m1
Tnfα	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm 99999068_m1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ucp1	*Mus musculus*	TaqMan	Applied biosystems: Mm01244861_m1
ACACA (ACC α1)	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 01046047_m1
FASN (FAS)	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 01005622_m1
G6PC	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 02802676_m1
HPRT	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 02800695_m1
LEAP2	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 00364834_m1
MLXIPL (CHREBP)	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 00975714_m1
PCK	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 00159918_m1
SLC2A2 (GLUT2)	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 01096908_m1
SREBF1 (SREBP1)	*Homo sapiens*	TaqMan	Applied biosystems: Hs 01088679_g1

Continuación de la tabla 13.

Toda el H_2O utilizada en este protocolo fue pretratada a 37 ºC en agitación durante 1 h con dietilpirocarbonato 0,1 % (DEPC) para inactivar ARNasas, y posteriormente autoclavada.

4.5 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

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 los procedimientos experimentales (211).

Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante el software estadístico Microsoft Excel (Microsoft Office 2021) y GraphPad Instad para Windows (GraphPad Instad® Software. V8) mediante el cual también se han realizado las figuras para este trabajo.

Antes de realizar el análisis estadístico, se realiza un test de normalidad. Se utilizó el test Shapiro-Wilk para un conjunto de muestras de n ≤2 0 y ≥ 7, y el test Kolgomorov- Smirnov cuando el n ≤ 6 (212). El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados y se representa con la letra "n".

Cuando las poblaciones analizadas muestran una distribución normal, se realizan test estadísticos paramétricos y cuando no pasan el test de normalidad, se realizan test estadísticos no paramétricos (213).

Los resultados del análisis estadístico tras la aplicación del test correspondiente se consideran significativos con una probabilidad de error menor o igual de 0.05, 0.01 o 0.001. Los datos han sido expresados como media de los grupos ± error estándar de la media (SEM, "standard error of the mean").

4.5.1 Test paramétricos

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

T-Test. Compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un n ≤ 5 (214,215). En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (una cola) la desigualdad en la

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

hipótesis señala en una sola dirección. En el desarrollo de esta tesis, se utilizó t-test de dos colas (216).

ANOVA de una vía. El análisis de la varianza (ANOVA) determina si hay diferencia entre las medias de tres o más poblaciones que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Una vez realizado el test, en caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, es necesario realizar un test a posteriori (post hoc) para comprobar qué medias son las que causan significación. Para ello se utilizó el tes de Tukey con corrección de Kramer que permite que los diferentes grupos tengan diferente tamaño muestral, y que a diferencia del test a posteriori Bonferroni, con el test Tukey-Kramer, se pueden comparar dos a dos los grupos experimentales de forma simultánea (217).

4.5.2 Test no paramétricos

Se aplica en aquellos experimentos cuyos grupos experimentales no siguen una distribución Gaussiana (normal).

Test Mann-Whitney. Para comparar dos poblaciones con una distribución no paramétrica se utiliza el test de Mann-Whitney (218).

Test Kruskal-Wallis. Al igual que con el ANOVA, para hacer comparaciones entre múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal, se realiza el análisis de la varianza mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de un post hoc empleando el test de Dunn para determinar entre qué poblaciones existe la significancia (219,220).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. REGULACIÓN NUTRICIONAL Y HORMONAL DE LA EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE LEAP-2

Como ya se ha descrito en el apartado de introducción, el péptido antimicrobiano que se expresa en el hígado-2 (LEAP-2), es sintetizado en su mayor parte en el hígado, liberándose luego al torrente sanguíneo. Además, ya ha sido descrito que LEAP-2 tiene un efecto antagónico respecto a ghrelina en cuanto a la ingesta de alimentos en un tratamiento agudo.

Por este motivo, y dado que aún no se conocen en profundidad los mecanismos implicados en las posibles acciones de LEAP-2, ni su posible variación en diferentes estados metabólicos, lo primero que nos propusimos fue analizar la expresión de LEAP-2 en el hígado de diferentes modelos en diferentes situaciones metabólicas.

1.1 LA EXPRESIÓN DE LEAP-2 ES REGULADA POR EL ESTADO NUTRICIONAL

1.1.1 Efecto del ayuno en la expresión hepática de LEAP-2 en rata, ratón y líneas celulares hepáticas humanas

Ha sido ampliamente descrito que los niveles séricos de ghrelina se incrementan en el ayuno**.** Así mismo**,** experimentos previos de nuestro grupo y de otros han demostrado la disminución de los niveles plasmáticos de LEAP-2 en ayuno. Sin embargo, no se conocía si eso estaba correlacionado con la expresión hepática del péptido, por ello, el primer objetivo fue analizar la expresión de LEAP-2 en hígado en modelos murinos y en células en situación de ayuno.

Para ello, medimos la expresión hepática de LEAP-2 y observamos una disminución significativa en las condiciones de ayuno, en comparación con "*ad libitum"* en ratones y en ratas. Este análisis nos reveló que existe una disminución de la expresión hepática de LEAP-2 tanto en ratones sometidos a un ayuno tanto de 12 h como de 24 h (Fig. 1 b, c) como en ratas (Fig. 1 d). Por otra parte, esta disminución también ocurría cuando los ratones eran sometidos a una restricción calórica del 60 % durante 5 días (Fig. 1 a).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

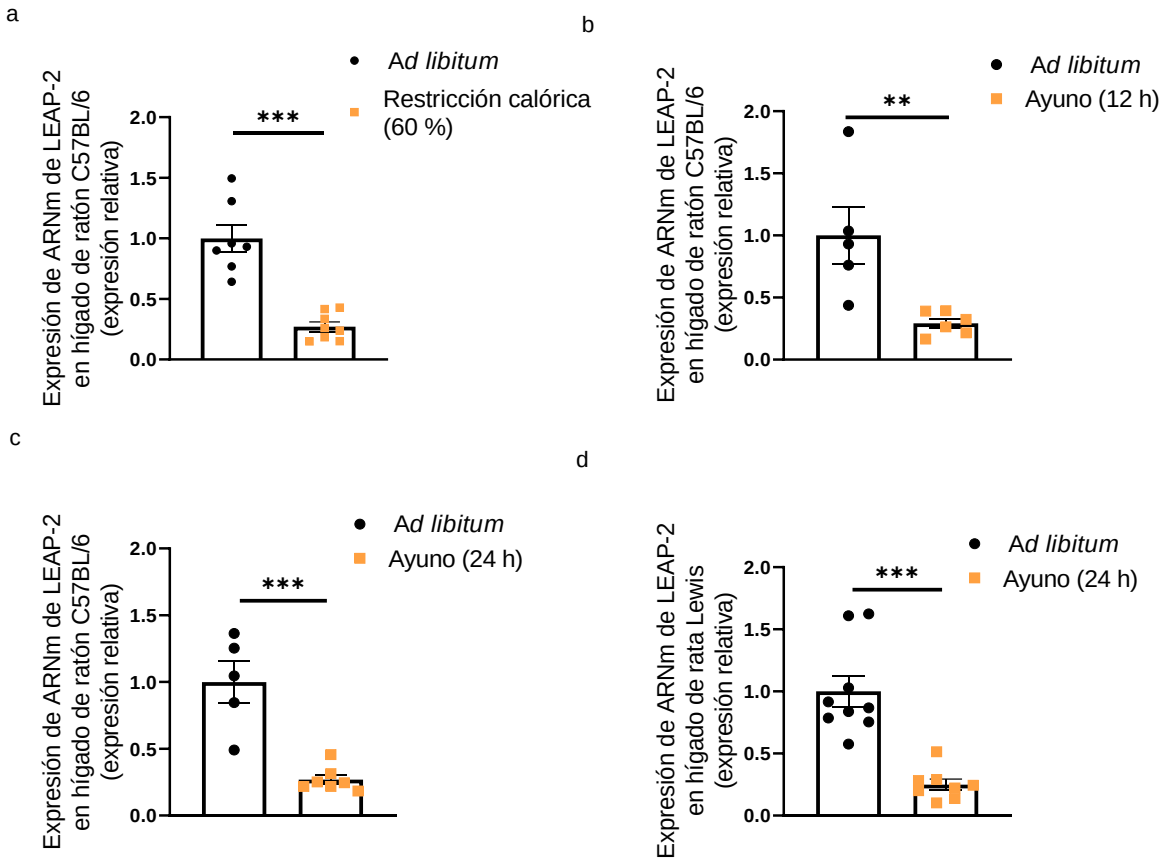


Figura 1. La expresión de LEAP-2 se encuentra disminuida en ratón y rata expuestos a un ayuno. a) Niveles de ARNm de LEAP-2 en hígado de ratones macho C57BL/6 *ad libitum* (n=7) y expuestos durante 5 días a restricción calórica del 60 % respecto a los ratones control (n=8). b) Niveles de ARNm de LEAP-2 en hígado de ratones macho C57BL/6 *ad libitum* (n=5), expuestos durante 12 h a ayuno (n=6). c) Niveles de ARNm de LEAP-2 en hígado de ratones macho C57BL/6 *ad libitum* (n=5) y expuestos durante 24 h a ayuno (n=7). d) Niveles de ARNm de LEAP-2 en hígado de ratas jóvenes Lewis ad libitum (n=9) y expuestas durante 24 h a ayuno (n=8). Los datos se expresan como media±SEM. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Tras aplicar el t-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

Para ver si esa disminución era debido a un efecto directo sobre las células hepáticas, analizamos el efecto de una deprivación energética que simula una condición de ayuno en líneas celulares hepáticas humanas, tanto en células HepG2 (Fig. 2 a) como en las THLE-2 (Fig. 2 b) vemos una disminución de la expresión de LEAP-2 tras el tratamiento con el medio KHH, libre de nutrientes, y que por tanto emula una condición de ayuno.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

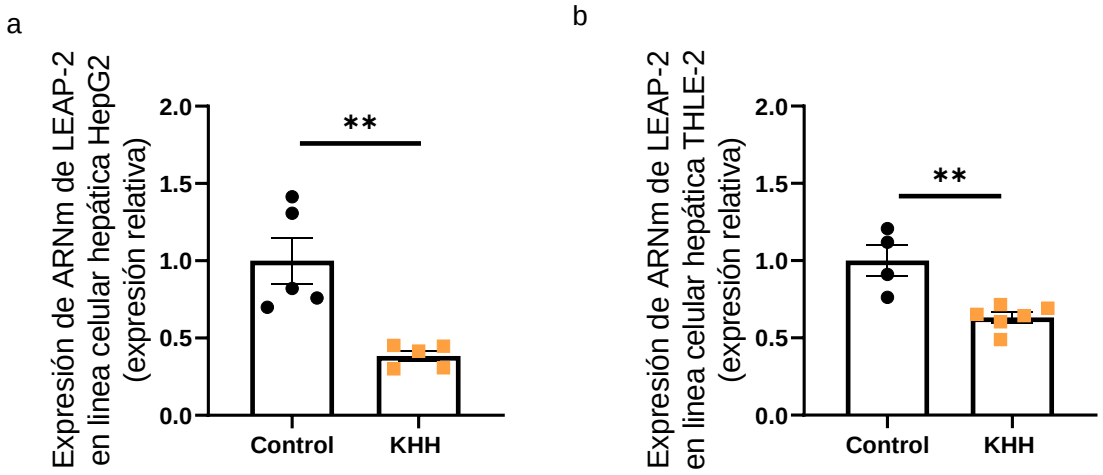


Figura 2. La expresión de LEAP-2 se encuentra disminuida en células hepáticas humanas expuestas durante 6 h a un ayuno con medio KHH. a) Niveles de ARNm de LEAP-2 en línea celular hepática humana HepG2, control (n=5) y con medio KHH (n=6). b) Niveles de ARNm de LEAP-2 en línea celular hepática humana THLE-2, control (n=4) y con medio KHH (n=6). Los datos se expresan como media±SEM. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Tras aplicar el t-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

1.1.2 Efecto de las dietas altas en grasa en niveles circulantes y expresión hepática en modelos de ratón macho y hembra y líneas celulares hepáticas humanas

El consumo excesivo de dietas altas en grasa, y dietas ricas en fructosa está asociado con la resistencia a la insulina, la obesidad y la MAFLD. Además, estudios previos de nuestro grupo, y de otros, ya han descrito que existe una variación de los niveles plasmáticos de LEAP-2 cuando hay una exposición a dietas altas en grasa. Por ello, quisimos explorar que pasaba con la expresión de LEAP-2 en ratones expuestos a dietas obesogénicas.

En cuanto a los niveles séricos de LEAP-2, los resultados muestran que los niveles circulantes de LEAP-2 en ratones expuestos a dieta VHFD o fructosa durante 3 meses genera un incremento significativo de los niveles circulantes del péptido en machos (Fig. 3 a, b), mientras que, en hembras, sólo se genera un incremento de los niveles circulantes de LEAP-2 cuando se exponen a dieta alta en grasa (Fig. 3 c), pero no con la dieta rica en fructosa (Fig. 3 d).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

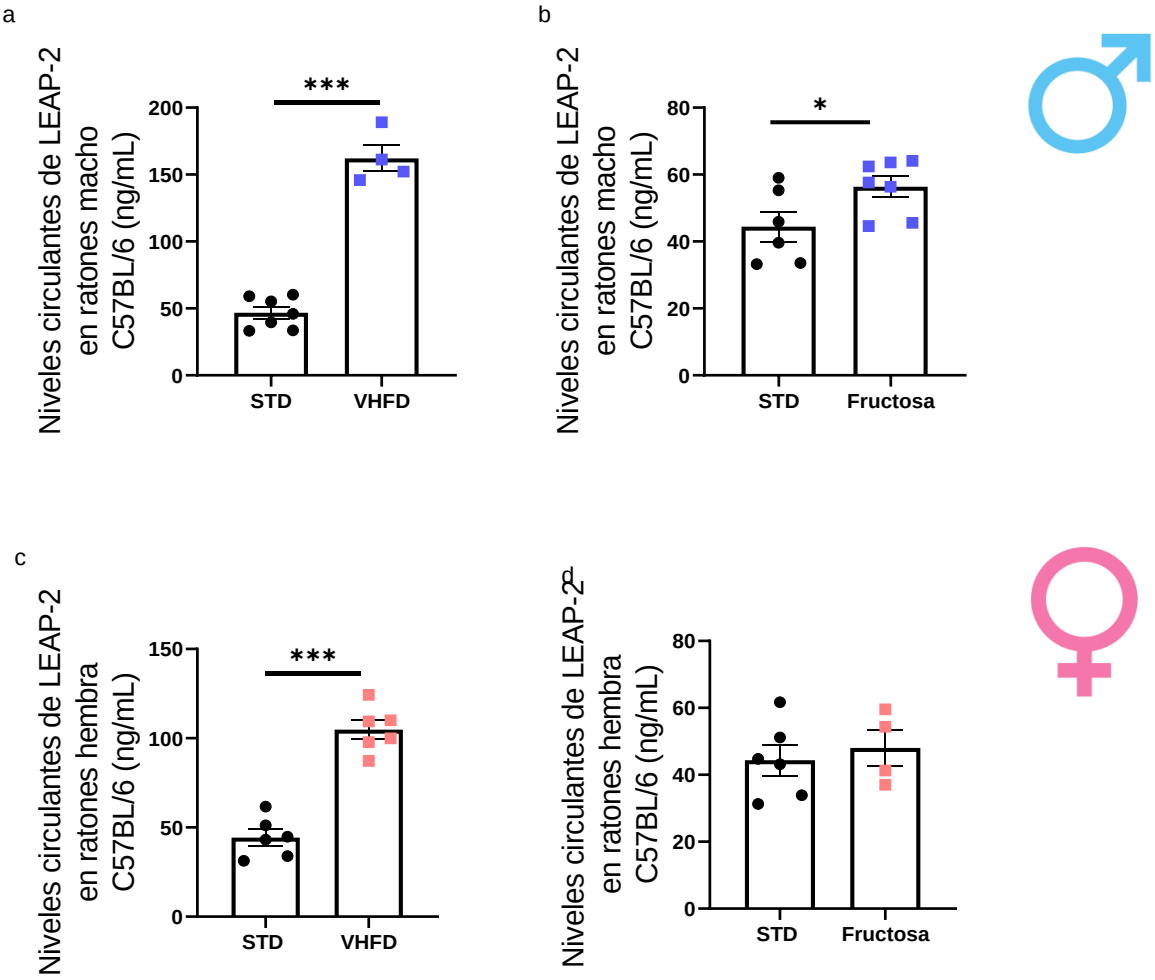


Figura 3. Los niveles circulantes de LEAP-2 se encuentran incrementados en ratones expuestos a diferentes dietas hiper energéticas. a) Niveles circulantes en ratones macho expuestos durante 12 semanas a STD (n=8) o VHFD (n=4). b) Niveles circulantes en ratones macho expuestos durante 12 semanas a STD (n=6) o fructosa (n=7). c) Niveles circulantes de LEAP-2 en ratones hembra C57BL/6 expuestos durante 12 semanas a STD (n=8) o VHFD (n=4). d) Niveles circulantes en ratones hembra expuestas durante 12 semanas a STD (n=6) o fructosa (n=4). Los datos se expresan como media±SEM. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

Así mismo, quisimos averiguar si esas variaciones a nivel sérico se correlacionaban o eran independientes de la expresión de LEAP-2 en hígado. En este caso vimos que los niveles de expresión hepática se incrementan en los macho con la exposición a las diferentes dietas VHFD y fructosa (Fig. 4 a, b,), mientras que, en hembras, sólo se genera un incremento de la expresión hepática de LEAP-2 cuando se exponen a dieta alta en grasa (Fig. 4 c), pero no con la dieta rica en fructosa (Fig. 4 d) al igual que ocurría con los niveles circulantes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

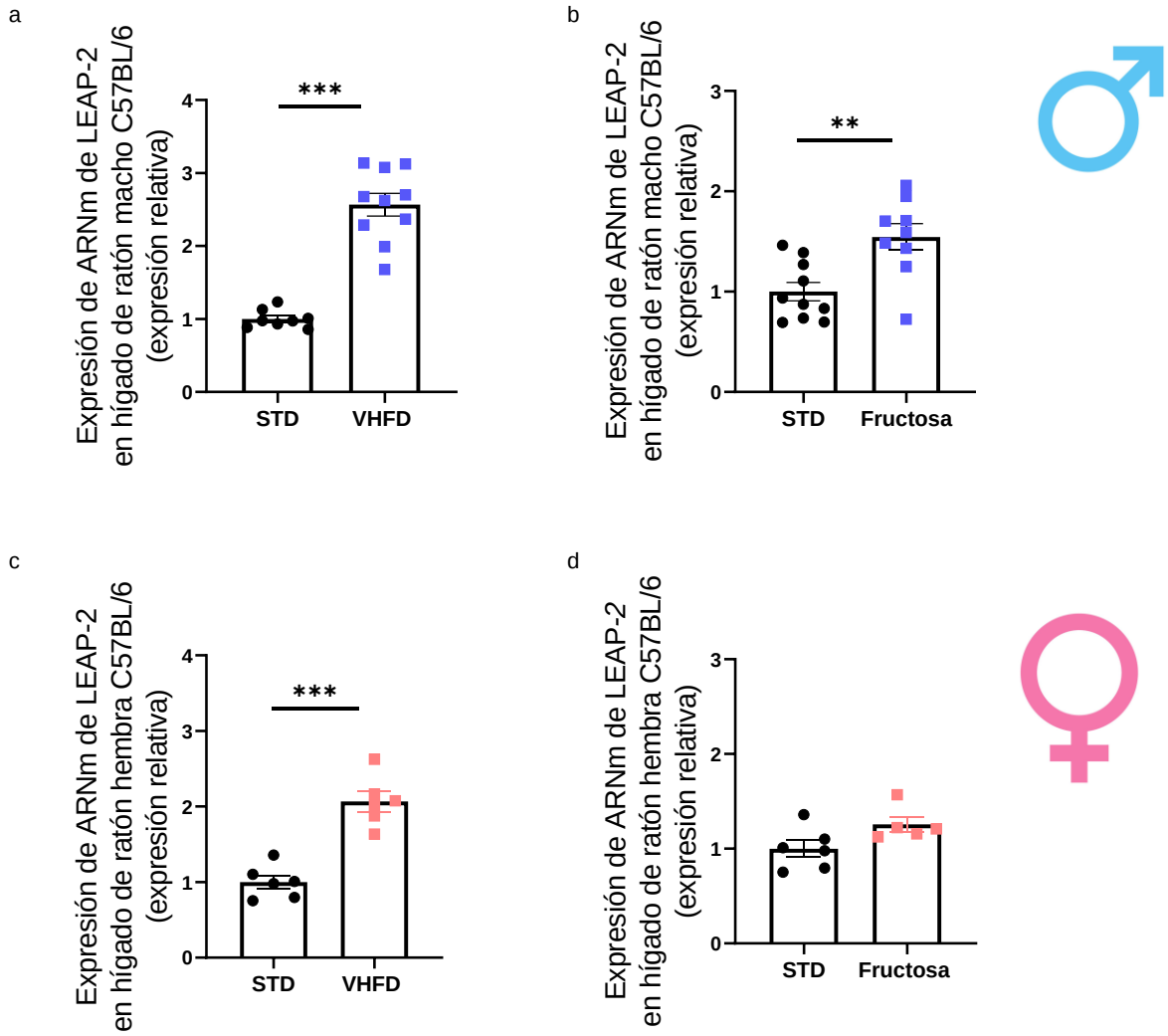


Figura 4. La expresión hepática de LEAP-2 se encuentra incrementados en ratones expuestos a diferentes dietas hiper energéticas Niveles de ARNm de leap-2 en hígado de ratones C57BL/6 a) machos expuestos durante 12 semanas a dieta STD (n=8) o VHFD (n=10), b) macho C57BL/6 expuestos durante 12 semanas a STD (n=10) o fructosa (n=9), c) hembras expuestos durante 12 semanas a STD (n=6) o VHFD (n=6), d) hembra C57BL/6 expuestos durante 12 semanas a STD (n=6), o fructosa (n=5). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

Por otro lado, y para poder evaluar si esto ocurría también en humanos, dado el incremento que existe de la patología de MAFLD en la población, analizamos el efecto de una exposición a ácido oleico durante 24 h en líneas celulares hepáticas humanas, tanto en células HepG2 (Fig. 5 a) como en las THLE-2 (Fig. 5 b) vemos un incremento significativo de la expresión de LEAP-2.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

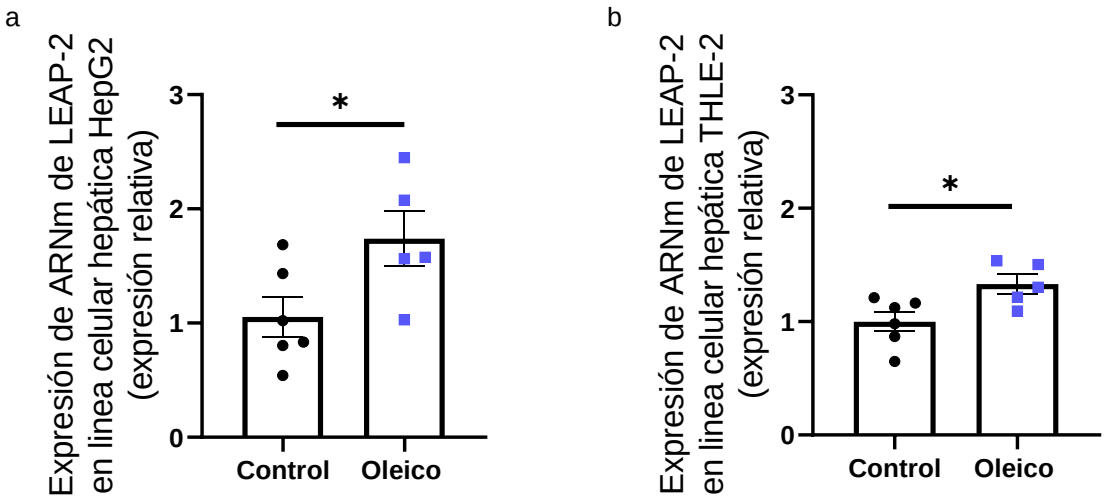


Figura 5. La expresión hepática de LEAP-2 se encuentra incrementados en células hepáticas humanas expuestas a tratamiento con ácido oleico durante 24 h. Niveles de ARNm en línea celular hepática humana a) HepG2, control (n=6) y expuestas a tratamiento con ácido oleico (n=5), b) Niveles de ARNm en línea celular hepática humana THLE-2, control (n=6) y expuestas a tratamiento con ácido oleico (n=5). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

1.2 EFECTO DE LOS ESTROGENOS SOBRE LA REGULACIÓN DE LEAP-2

Dado las diferencias encontradas en las distintas dietas con machos y hembras y habiendo sido descrito que los estrógenos juegan un papel protector frente a la obesidad y en la evolución a esteatosis hepática. Nos propusimos estudiar qué ocurriría con la expresión LEAP-2 en un modelo de ratón hembra sometidos a una ovarectomía.

Al grupo control se denomina "*Sham*", y se le realiza la intervención, pero sin extracción de los ovarios y el grupo al que denominamos OVX son las hembras a las que se le practica la cirugía de ovarectomía.

Como se observa en la figura (Fig. 6 a), y coincidente con lo descrito, la ovariectomía produce un claro incremento de masa corporal tanto en dieta estándar como en una dieta alta en fructosa (Fig. 6 d), sin embargo, esto no se acompaña con cambios en la expresión de LEAP-2 (Fig. 6 b, e) y tampoco se observan diferencias en los niveles circulantes (Fig. 6 c, f). Como se puede apreciar, los niveles de LEAP-2 no se alteran por cambios en los niveles circulantes de estrógenos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

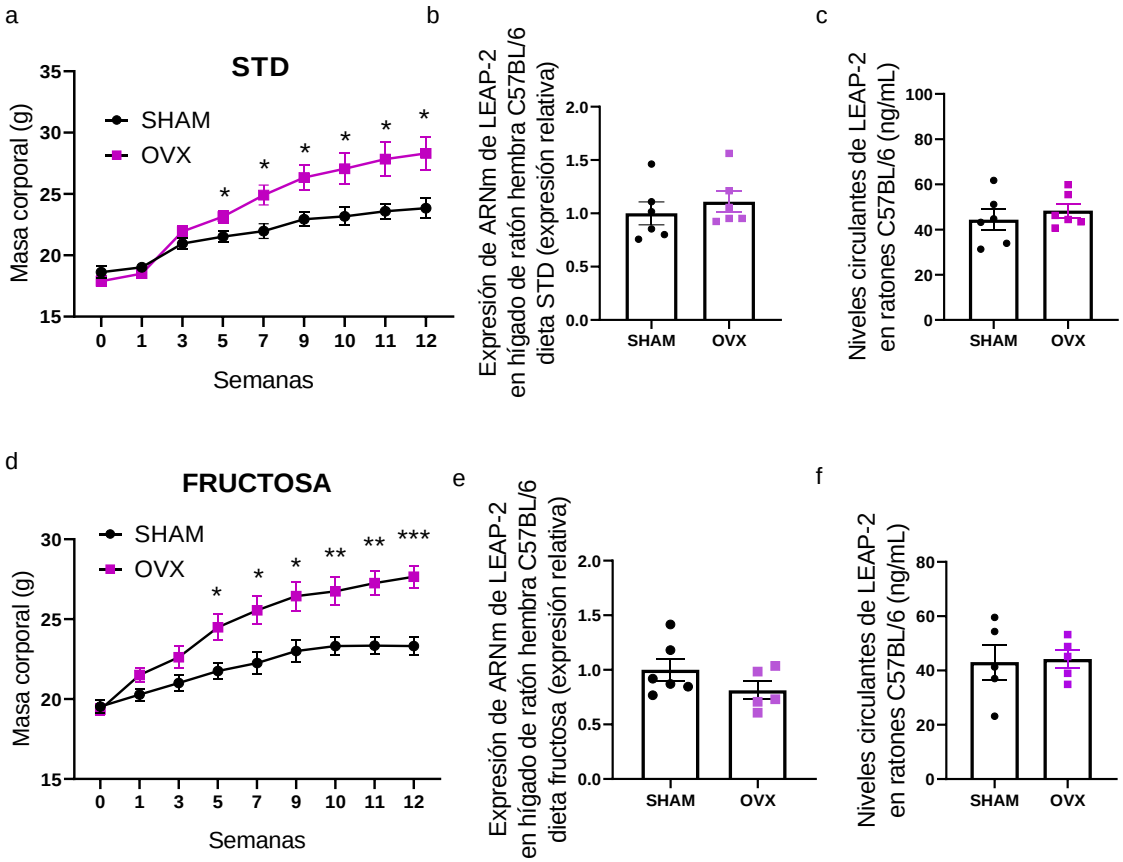


Figura 6. Efecto de la presencia o ausencia de estrógenos en la expresión y los niveles séricos de LEAP-2 en ratones hembra c57bl/6 SHAM y OVX expuestos durante 12 semanas a dieta STD o fructosa: a) masa corporal (g) en una dieta estándar, b) expresión hepática de LEAP-2, en dieta estándar, c) niveles circulantes de LEAP-2 en dieta estándar, d) masa corporal (g) en una dieta rica en fructosa, e) expresión hepática de LEAP-2, en dieta rica en fructosa c) niveles circulantes de LEAP-2 en dieta rica en fructosa. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 7-5 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos control y los tratados.

2. ACCIONES DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO

Nuestro propósito en este apartado fue estudiar el potencial papel de LEAP-2 sobre la homeostasis energética. Nos planteamos utilizar un modelo de administración crónica de LEAP-2 para ver tanto acciones sobre ingesta como sobre adiposidad en un modelo de ratón C57BL/6, normopesos y obesos por la dieta, que sufren resistencia al efecto orexigénico de ghrelina. En ambos modelos se administra centralmente al ventrículo lateral: vehículo, ghrelina, LEAP-2 o una coadministración de ambos péptidos (ghrelina+LEAP-2, que se simbolizará como G+L). En todos los casos el grupo tratado con vehículo se considera el grupo control frente al cual se comparan el resto de los valores obtenidos para los grupos tratados.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1 IMPLICACIÓN DE LEAP-2 SOBRE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA EN RATONES NORMOPESO

En los ratones C57BL/6 normopeso, la administración central de vehículo, ghrelina (16,5 µg/día), LEAP-2 (10 µg/día), o ghrelina+LEAP-2 mediante el uso de bombas osmóticas al ventrículo lateral del cerebro de ratón durante una semana redujo la ingesta y generó una menor ganancia de masa corporal (Fig. 10 a, b). Así mismo, la coadministración de ghrelina y LEAP-2 disminuyó la ganancia de masa corporal generada por ghrelina (Fig. 10 a).

Debido al efecto adipogénico de ghrelina, nos propusimos analizar los niveles de leptina circulante, cuyos niveles varían en relación con la cantidad de tejido adiposo presente en el organismo. Lo que observamos es que, los ratones tratados con ghrelina tenían unos altos niveles de leptina como era esperado, contrariamente, los ratones tratados con LEAP-2 muestran bajos niveles de leptina respecto a los controles, confirmando que el descenso de masa corporal se debe en parte a un descenso en la masa grasa. (Fig. 10 c). Así mismo, el grupo con la coadministración de ghrelina y LEAP-2 tienen una disminución de los niveles de leptina respecto al efecto del tratamiento solo con ghrelina (Fig. 10 c).

Medimos también los niveles circulantes de parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico como son colesterol (Fig. 10 d), triglicéridos (Fig. 10 e) y ácidos grasos libres (Fig. 10 f). En cuanto al colesterol y los triglicéridos estos niveles se vieron reducidos con la administración central de LEAP-2, mientras que los niveles de colesterol y ácidos grasos libres se incrementan con el tratamiento central de ghrelina.

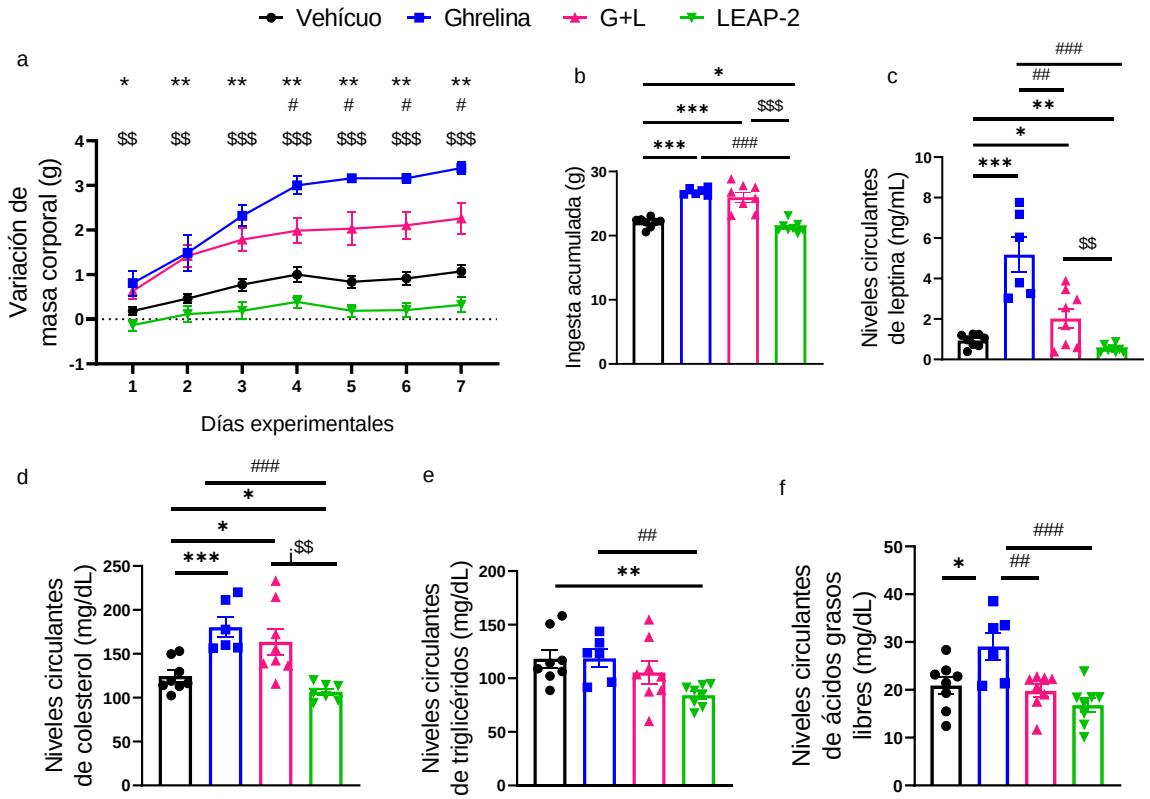


Figura 7. Efecto de la administración crónica de vehículo, ghrelina, ghrelina+LEAP-2 o LEAP-2, en ratones C57BL/6 normopeso sobre: a) variación de masa corporal (g), b) ingesta acumulada (g) y sobre los niveles circulantes de c) leptina (ng/mL), d) colesterol (mg/dL), e) triglicéridos (mg/dL), f) ácidos grasos libres (mg/dL). Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: *

p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

Para ahondar sobre el efecto central de LEAP-2 evaluamos el gasto energético mediante calorimetría indirecta en ratones tratados con una administración central crónica de vehículo o LEAP-2 (10 µg/día) durante 7 días. Este análisis reveló que, en condiciones fisiológicas, el tratamiento con LEAP-2 incrementa el gasto de energía de forma significativa (Fig. 14 a, b) sin generar cambios en la actividad locomotora (Fig. 14 c). Estos resultados podrían ser, en parte, una explicación de la disminución de masa corporal y adiposidad que se observa en los ratones tratados con LEAP-2.

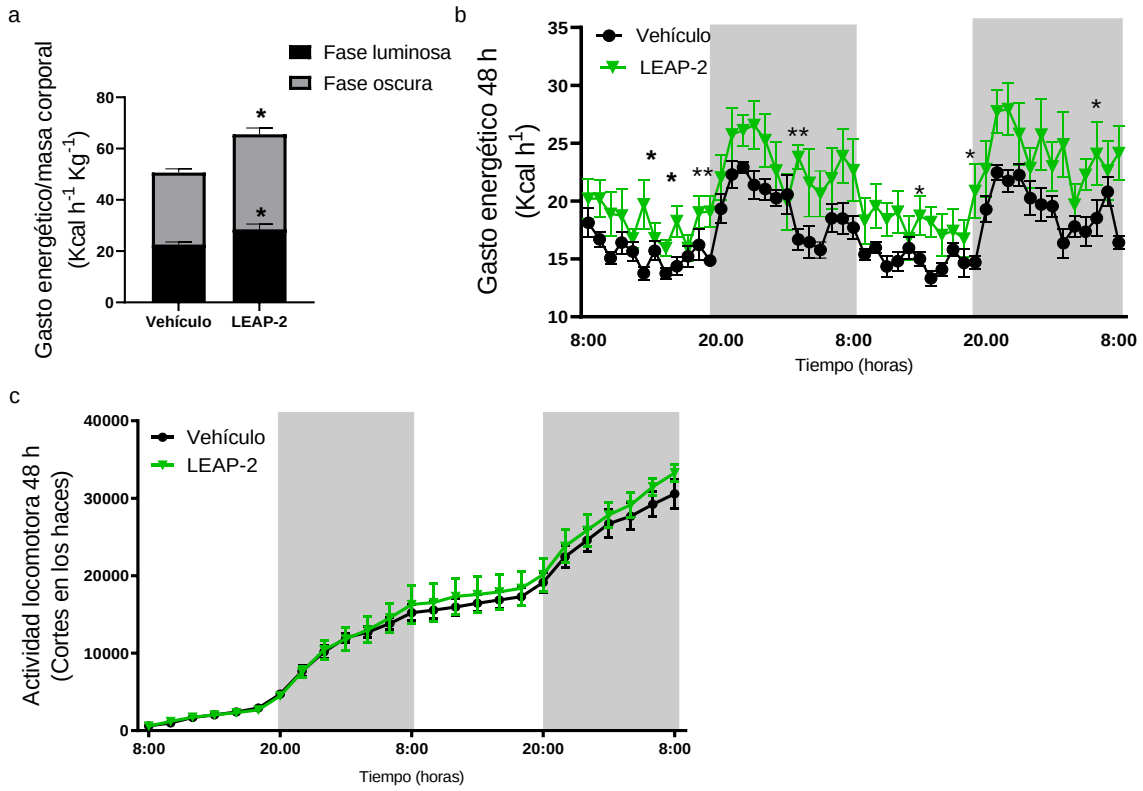


Figura 8. Efecto de la administración crónica de LEAP-2, en ratones C57BL/6 normopeso sobre: a) gasto energético, corregido por la masa corporal, b) gasto energético en 48 h corregido por la masa corporal, c) actividad locomotora en 48 h. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-6 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.1.1 Los ratones con tratamiento de LEAP-2 central mostraron una actividad termogénica incrementada

Dado el incremento del gasto energético que se producía en los ratones tratados con LEAP-2 nos propusimos investigar si eso pudiera ser debido a un incremento de la actividad termogénica y, por ello, analizamos el tejido adiposo marrón (TAM) y el tejido adiposo blanco subcutáneo (TABsc).

El TAM es el principal tejido donde se lleva a cabo el proceso de la termogénesis ya que, como se ha explicado anteriormente, este tejido tiene una capacidad única para disipar el exceso de energía en forma de calor. La regulación de la termogénesis del TAM en respuesta a las señales metabólicas puede contribuir al balance energético, a la regulación de las reservas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

corporales de tejido adiposo y al control de los niveles de glucosa. Así mismo, es ampliamente conocido que ghrelina genera una disminución de la termogénesis, acompañado de un incremento de la adipogénesis.

Debido a que, los ratones tratados con LEAP-2 incrementan su gasto energético, al menos cuando son alimentados con una dieta estándar, quisimos investigar los mecanismos subyacentes detrás del aumento de ese gasto de energía, y si este pudiera estar ligado al TAM.

El análisis histomorfológico del TAM reveló gotas lipídicas más pequeñas en aquellos ratones tratados centralmente con LEAP-2 durante una semana (Fig. 17 a) comparando con los demás grupos. Además, la masa del depósito de TAM en el momento del sacrificio es estadísticamente menor en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control (Fig. 17 b).

Para ahondar en lo que podría estar ocurriendo, se realizó una inmunohistoquímica de la proteína termogénica UCP1 en TAM (Fig. 17 c) donde se ve una disminución estadísticamente significativa de la expresión de esta proteína termogénica en los ratones tratados con ghrelina, resultado esperado ya que es un efecto ya descrito para ghrelina, y un incremento de su expresión en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 17 d).

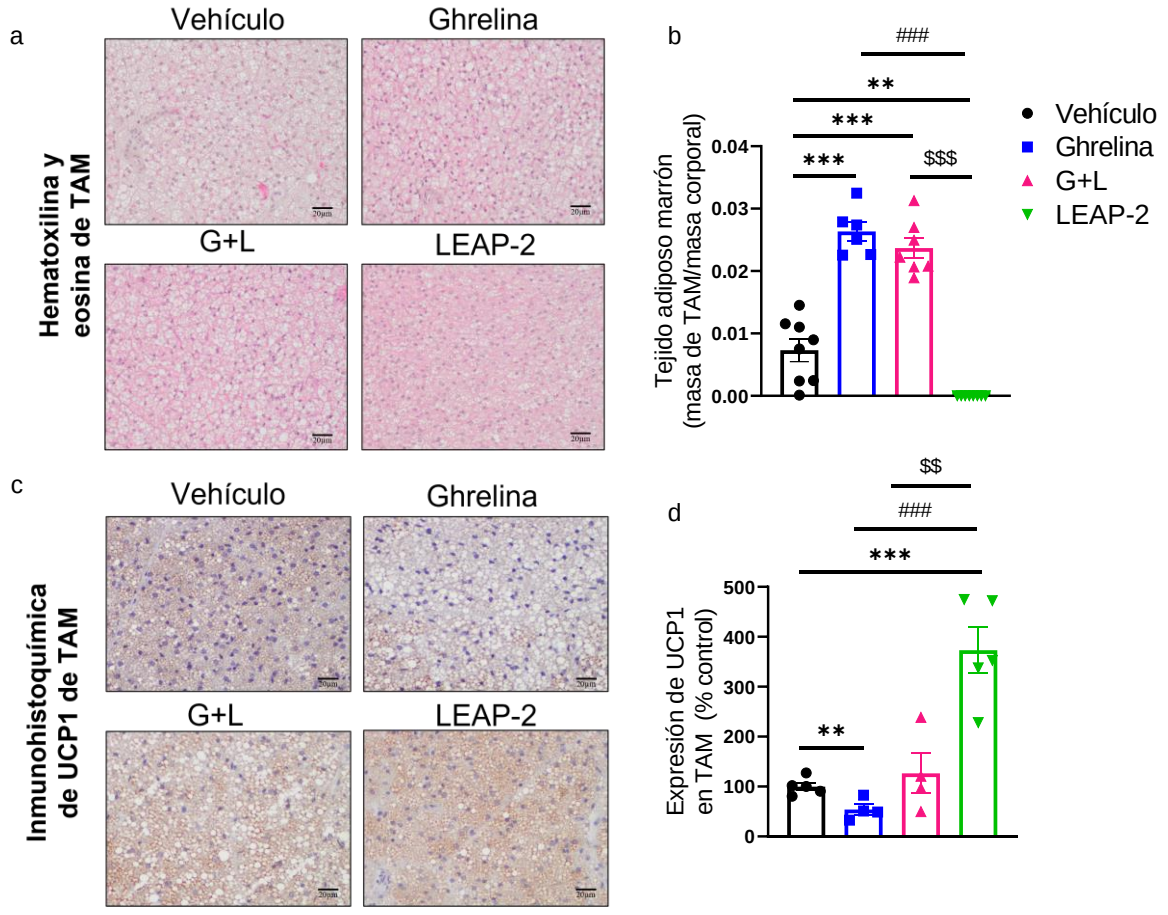


Figura 9. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones normopeso sobre el TAM. a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del TAM en el momento del sacrificio, c) análisis inmunohistoquímico de UCP1 en TAM, d) semi cuantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP1. Los datos se expresan como media±SEM con un n= 4-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para confirmar el resultado de la inmunohistoquímica, decidimos explorar que ocurría en el TAM a nivel génico y proteico. Primero, se midieron los niveles de expresión de ARNm de diferentes marcadores de termogénesis (Fig. 18 a) en el TAM de los ratones control y los ratones tratados con LEAP-2. Se confirmó el incremento de expresión de UCP1, así como del receptor β3 adrenérgico (β3Adr) y de PPARγ. También se genera un incremento de FGF21, del que se ha descrito que promueve la activación de la actividad termogénica.

El estudio de la expresión de proteína reveló de nuevo el incremento en los niveles de expresión de varios biomarcadores termogénicos como UCP1, Prdm16, β3Adr y PPARγ (Fig. 18 b).

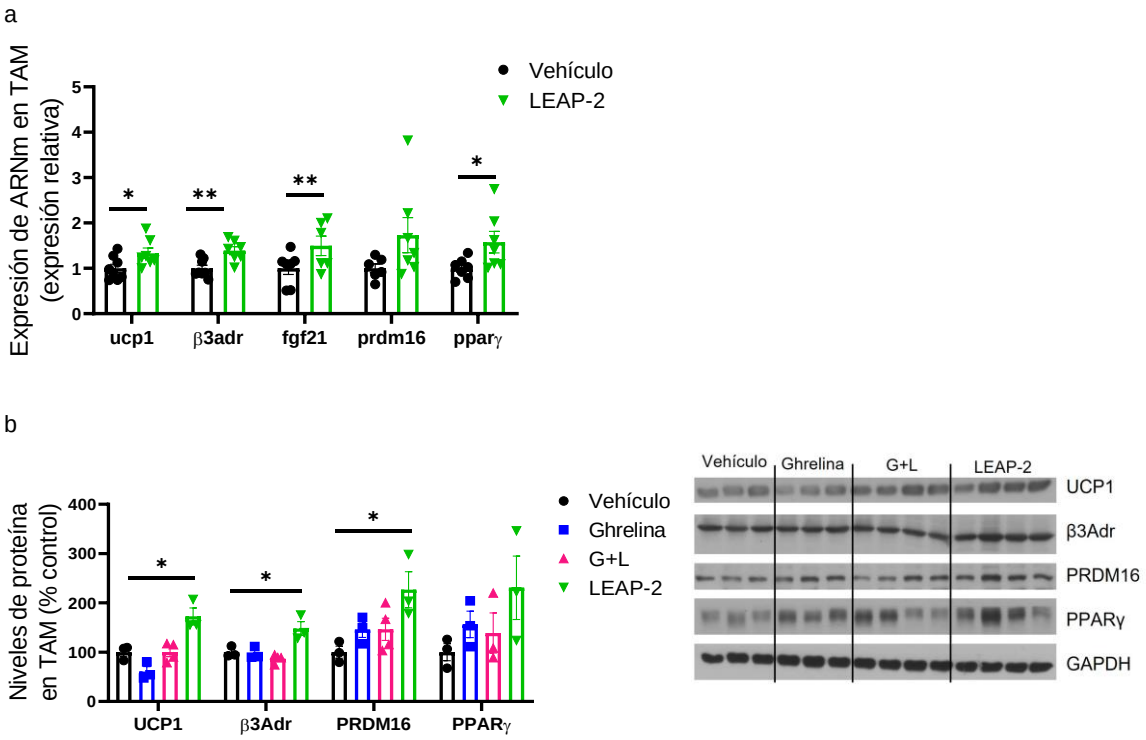


Figura 10. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones normopeso sobre el metabolismo del TAM. Cuantificación relativa de proteínas mediante western blot y expresión génica mediante qPCR relacionado con: a) expresión de ARNm de UCP1, ß3Adr, FGF21, PRMD16, PPARγ, b) proteínas relacionadas con la termogénesis (UCP1, ß3Adr, PRMD16, PPARγ) y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH, con grupos experimentales: vehículo (n=3), ghrelina (n=3), G+L (n=4), LEAP-2 (n=4). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm, de un n 5-7 ratones por grupo. Los datos se expresan como media±SEM, tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

En cuanto a la actividad mitocondrial analizamos la expresión de PPARα factor de transcripción implicado en la activación de la β-oxidación y encontramos que había un incremento en su expresión en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 11 a), así como otras proteínas relacionada con el desacoplamiento de la cadena electrónica como son los complejos mitocondriales: complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo V (ATP Sintasa), Complejo III (Citocromo bc1), Complejo IV (Citocromo C oxidasa) cuya expresión esta incrementada en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control (Fig. 11 b).

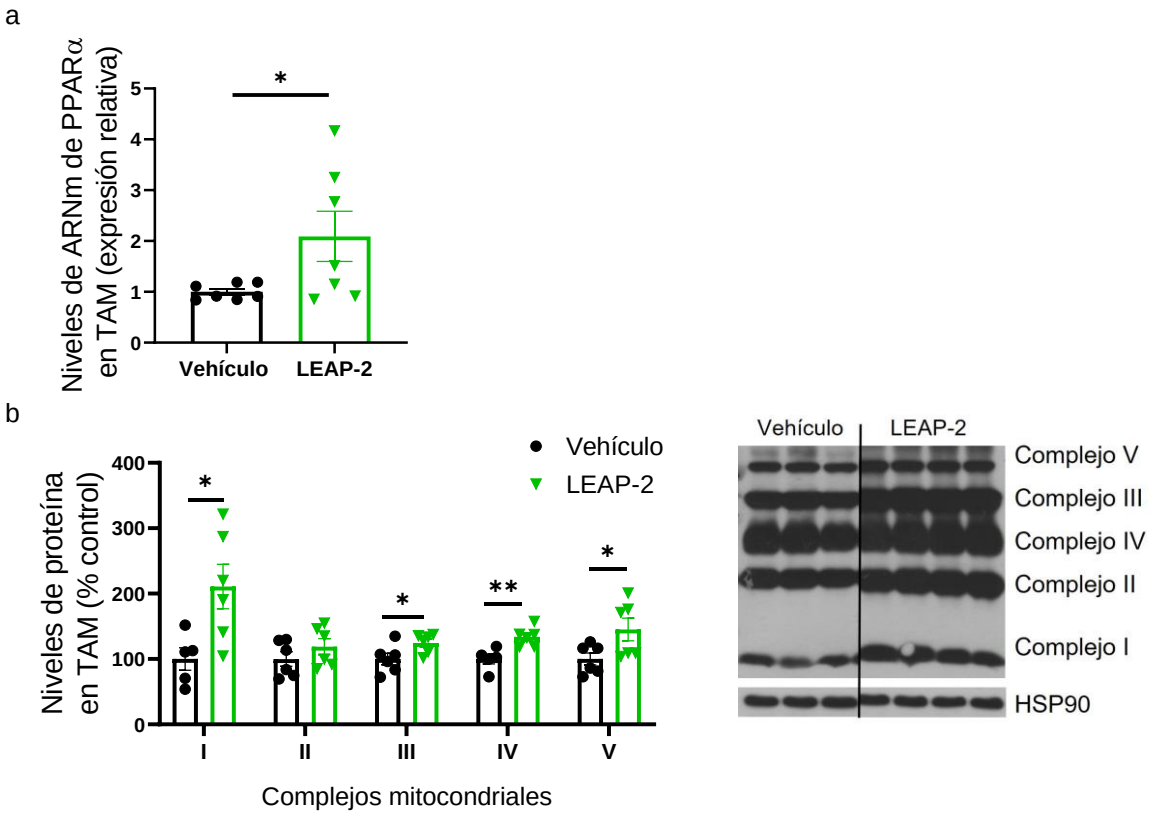


Figura 11. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, en ratones normopeso sobre el metabolismo mitocondrial en el TAM. Cuantificación relativa de proteínas mediante western blot y expresión génica mediante qPCR: a) expresión de ARNm de PPARα, b) proteínas marcadoras de actividad mitocondrial como son los 5 complejos mitocondriales y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga HSP90. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n=5-7 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.1.2 Los ratones tratados con LEAP-2 y expuestos a termoneutralidad no presentan diferencias en gasto energético, pero si se mantiene la disminución de masa corporal e ingesta

La termoneutralidad en un organismo se define como temperatura ambiental en el que la tasa metabólica es próxima a 0, por lo que la que la temperatura suele ser constante dado que no tiene que generar ni perder calor.

En este contexto, quisimos explorar si LEAP-2 era capaz de actuar en condiciones de metabolismo basal mínimo como ocurre en termoneutralidad (30 ºC). Nuestros resultados mostraron que si bien sigue habiendo una disminución de ingesta y de masa corporal (Fig. 12 a, b, c), no se produce ningún cambio en el gasto energético (Fig. 12. d, e), que si se observaba en los ratones mantenidos a una temperatura de 22 ºC (Fig. 12 a, b), indicando que el incremento del gasto energético producido por LEAP-2 es temperatura dependiente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

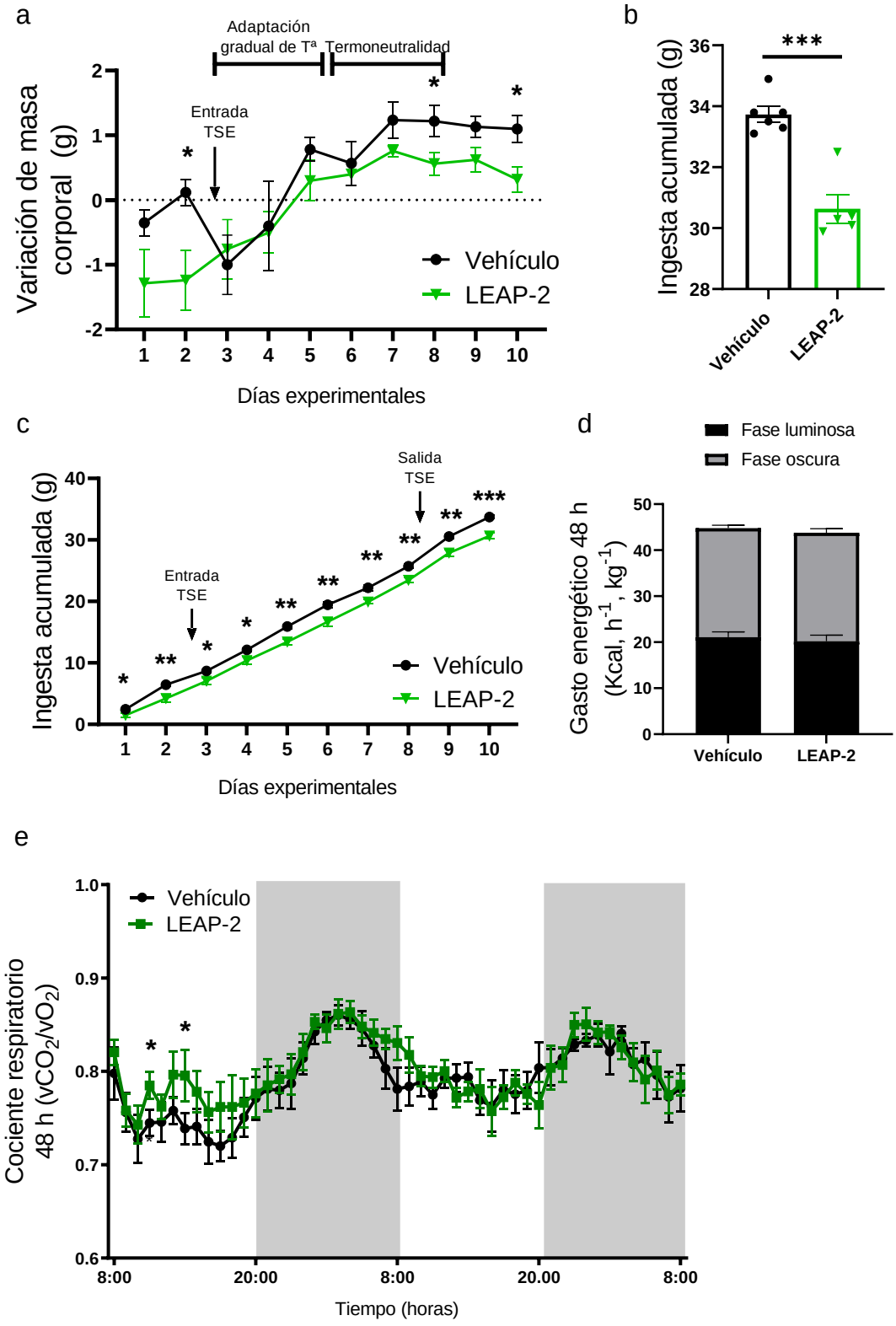


Figura 12. Efectos de la exposición a termoneutralidad de ratones tratados con LEAP-2. a) variación de masa corporal (g), b) ingesta acumulada total (g), c) ingesta acumulada (g) durante el experimento, d) coeficiente respiratorio en 48 h, e) gasto energético en 48 h corregido por la masa corporal. Los datos se expresan como media±SEM de un n = 5-6 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

USC DE SANTIAGO

2.1.3 Los ratones tratados con LEAP-2 central mostraron un amarronamiento del tejido adiposo blanco subcutáneo

Otro de los órganos que se ven afectados con el incremento de la actividad termogénica es el TABsc, que sufre una adaptación incrementando su actividad en un proceso conocido como amarronamiento. El análisis histomorfológico por tinción hematoxilina y eosina de la sección adiposa reveló adipocitos con un tamaño mayor en los ratones tratados con ghrelina, así, mientras que los ratones tratados con LEAP-2 disminuyen su tamaño (Fig. 13 a). Además, en cuanto a la masa del tejido en el momento del sacrificio, los ratones tratados con ghrelina presentan un incremento en la masa del depósito de TABsc respecto al control, mientras que los ratones tratados con LEAP-2 la masa del tejido no varía respecto al control, aunque si se aprecia que el contratamiento con ambos péptidos reduce la masa del tejido respecto a los ratones solo tratados con ghrelina (Fig. 13 b). Un análisis que permite la cuantificación con mayor detalle sobre el tamaño de los adipocitos mostro que, los ratones tratados con ghrelina incrementan el tamaño de sus adipocitos, así como la frecuencia de los adipocitos con tamaño mayor, mientras que hay una clara reducción del tamaño de los adipocitos observada en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control, así como en aquellos ratones co-tratados con ambos péptidos (Fig. 13 c, d) lo cual indica que, aunque no haya una reducción en la masa del tejido en los ratones tratados con LEAP-2, si existe una reducción en el tamaño de los adipocitos.

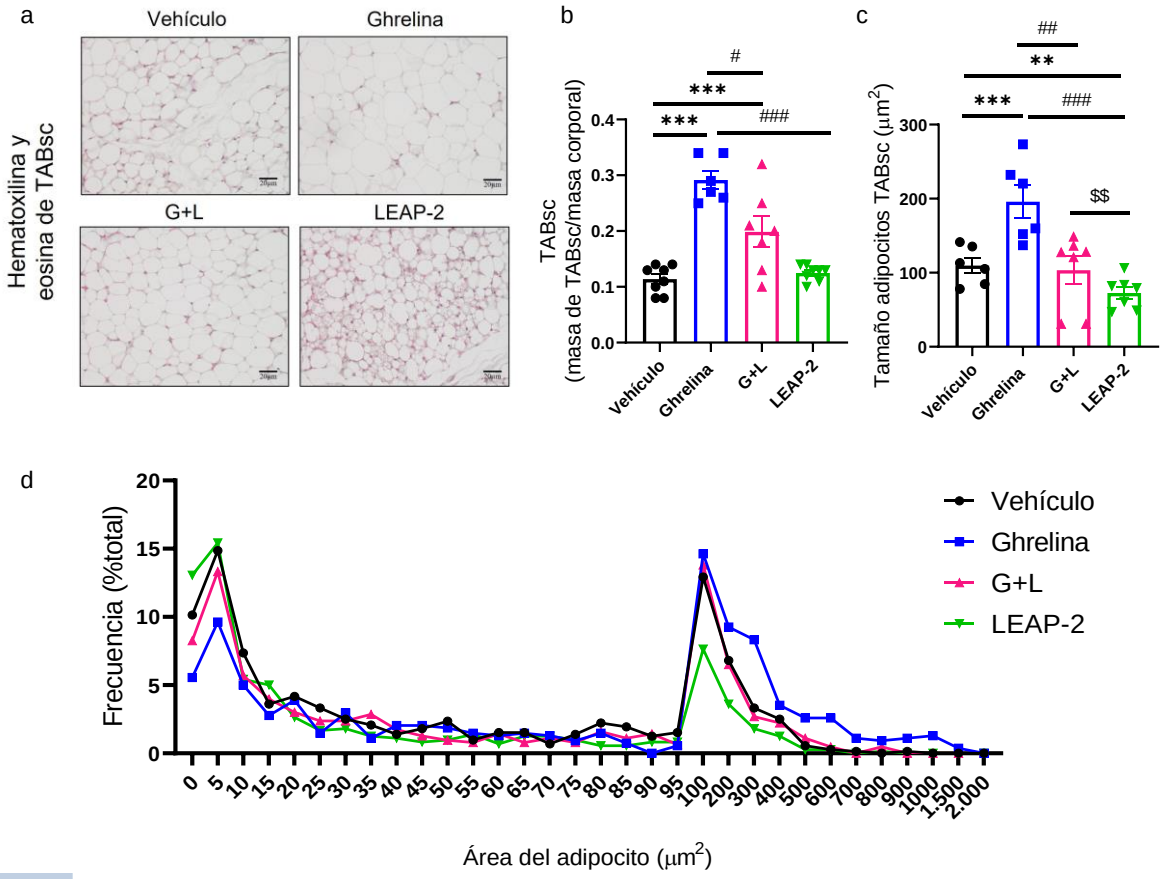


Figura 13. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones normopeso sobre el tamaño de los adipocitos del TABsc. a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del TABsc en el momento del sacrificio, corregida por la masa corporal c) tamaño de los adipocitos (μm^2), d) frecuencia del tamaño de los adipocitos. Los datos se expresan como media±SEM de un n = 6-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

Una de las proteínas claves para determinar el amarronamiento es UCP1, que se analizó en el TABsc mediante inmunohistoquímica, observando que, en efecto, hay un incremento de la expresión de UCP1 en el TABsc de los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 14 a, b).

Así mismo, miramos la expresión de varias proteínas marcadoras de termogénesis y que indicarían el proceso de amarronamiento y la termogénesis como son, β3Adr, PPARγ, FGF21, y de nuevo UCP1 (Fig. 14 c). Tanto la proteína UCP1 como el receptor β3Adr están disminuidos en los ratones tratados con ghrelina y se encuentran incrementados en los ratones tratados con LEAP-2. Así mismo, PPARγ y FGF21 que además de su asociación con el amarronamiento del TAB se relacionan con una mayor captación y oxidación de glucosa, y ambas proteínas están incrementadas en los ratones tratados con LEAP-2.

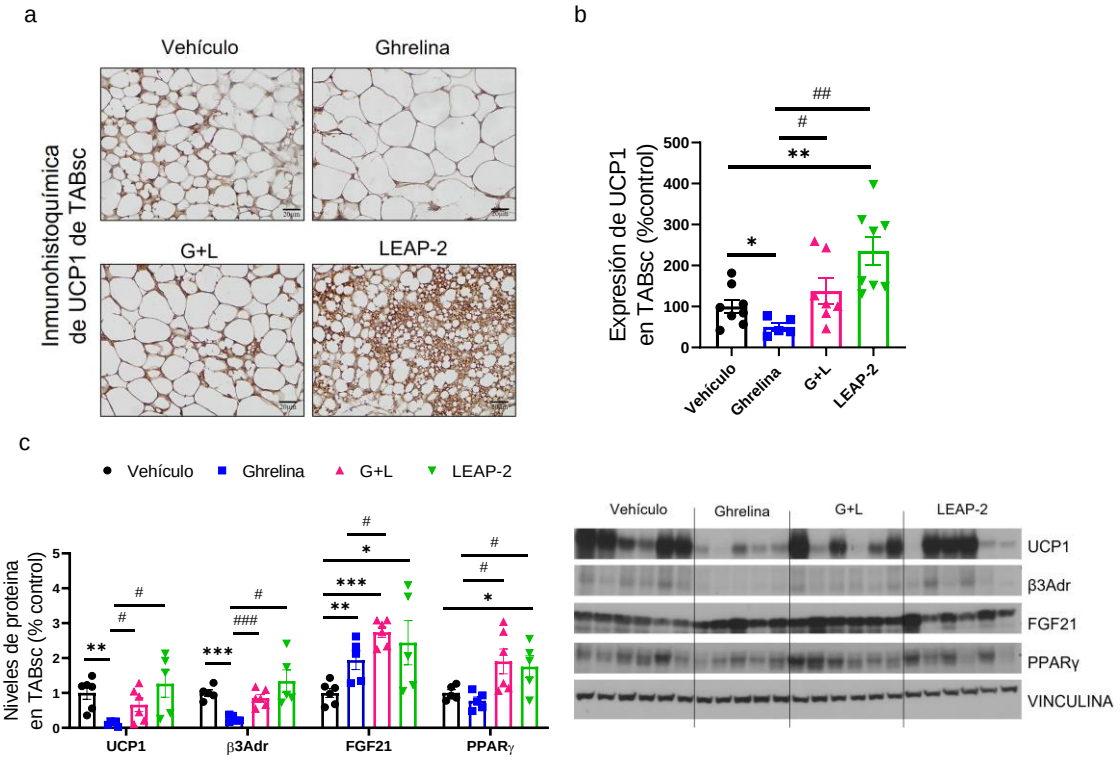


Figura 14. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones normopeso sobre el metabolismo termogénico y amarronamiento del TABsc. a) Análisis inmunohistoquímico de UCP1, b) semi cuantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP1, c) cuantificación de proteínas relacionadas con la termogénesis por western blot (UCP1, ß3Adr, FGF21, PPARγ) y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga vinculina. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1.4 Los ratones tratados con LEAP-2 son capaces de mantener estable la temperatura corporal en condiciones de exposición a frío

Para analizar la importancia funcional de los efectos de LEAP-2 sobre la termogénesis adaptativa, sometimos a los ratones a una prueba de tolerancia al frío que consiste en exponer al animal a una temperatura constante de 4 ºC durante un tiempo determinado, en nuestro caso 6 h.

Este experimento mostró que, los ratones tratados con LEAP-2 tras 3 h de exposición a frío, mantienen mejor su temperatura corporal a las 3 h, en comparación a los ratones tratados con vehículo que se emplean como control (Fig. 15 a), indicando una mayor activación de la termogénesis para la adaptación al cambio de temperatura.

Para analizar el comportamiento en esas condiciones, tanto del TAM como del TABsc, se realizó un análisis histomorfológico mediante la tinción hematoxilina y eosina mediante la cual podemos apreciar que, en ambos tejidos de los ratones tratados centralmente con LEAP-2 durante una semana, presentan unas gotas lipídicas de menor tamaño que el grupo control (Fig. 15 b, e, d).

Además, mediante inmunohistoquímica, vemos que, en los ratones tratados con LEAP-2, se incrementa la expresión de UCP1 respecto al control tanto en TAM ((Fig. 15 b, c), como en TABsc (Fig. 15 d, e), indicándonos un incremento en el programa termogénico. Además, en el TABsc disminuye el tamaño de los adipocitos (Fig. 15 f).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

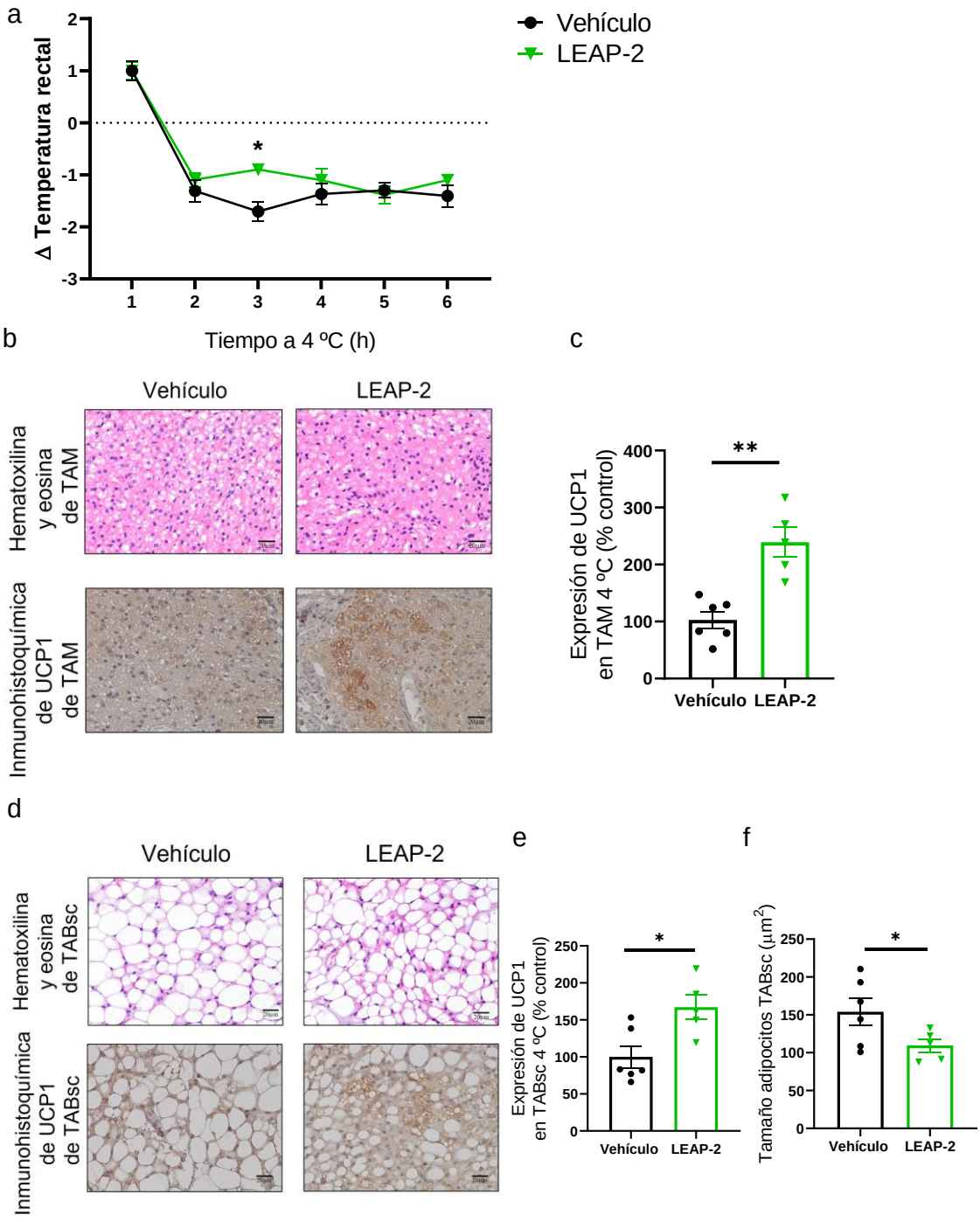


Figura 15. Efecto de la exposición al frío en ratones tratados con LEAP-2. Ratones tratados de forma central ICV durante 11 días con vehículo (n=6) o LEAP-2 (n=5) expuestos a 4°C durante 6 h. a) Temperatura rectal tras exposición al frío (+4°C) durante 6 h, b) hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica de UCP1 de TAM, c) semi cuantificación de la inmunohistoquímica de UCP1 en TAM, d) hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica de UCP1 de TABsc, e) semi cuantificación de la inmunohistoquímica de UCP1 en TABsc f) tamaño de los adipocitos de TABsc (µm^2). Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-6 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.1.5 LEAP-2 incrementa la diferenciación hacia un programa termogénico en un cultivo primario de adipocitos de TABsc

Para discernir si el incremento del amarronamiento ejercida por LEAP-2 era debida exclusivamente por un control central o si había acción local, analizamos el efecto de la administración de LEAP-2 sobre un cultivo primario de adipocitos procedentes de TABsc de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad.

En un cultivo aún sin diferenciar, se le añadió durante el proceso de diferenciación LEAP-2 0,1 nM al medio. Lo que vemos con este experimento es que LEAP-2 fomenta la diferenciación de los adipocitos de TABsc, con un incremento de PPARγ y de UCP1 (Fig. 16 a, b).

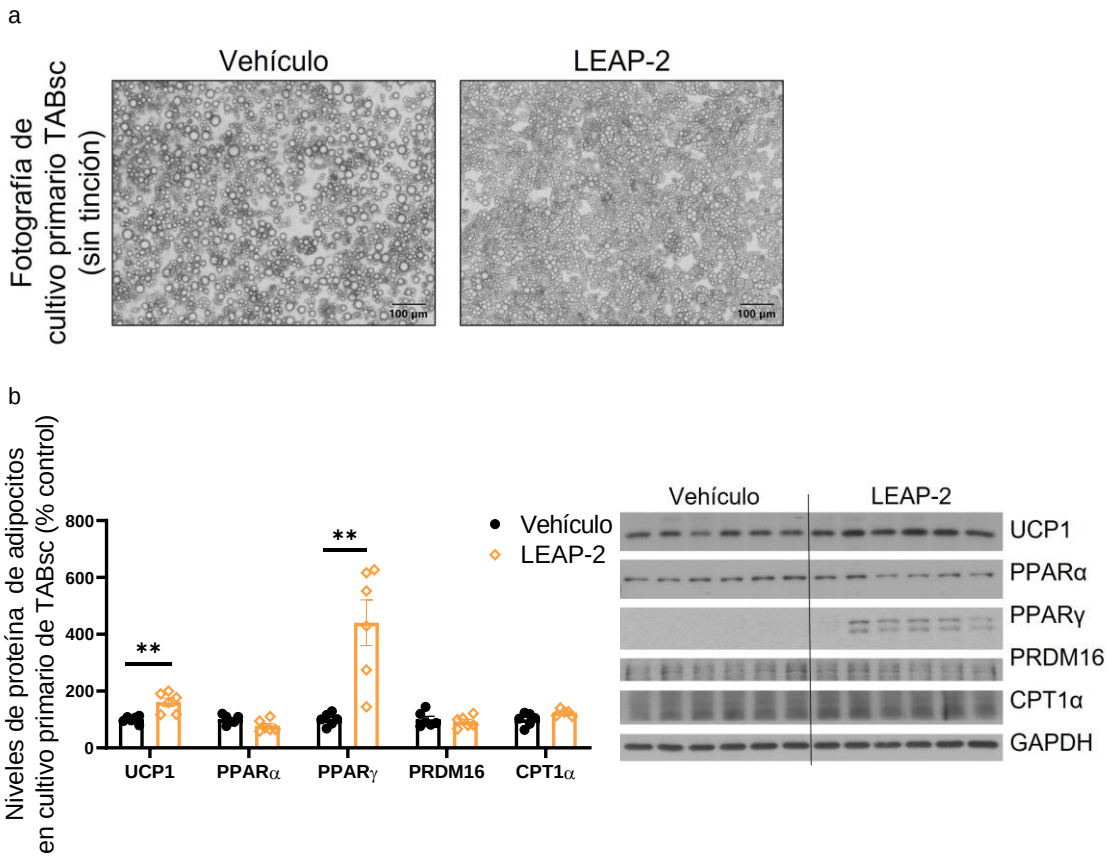


Figura 16. Efecto del tratamiento con LEAP-2 en adipocitos de cultivo primario durante el proceso de diferenciación. a) Fotografías del cultivo tras el tratamiento con LEAP-2, b) proteínas relacionadas con la termogénesis (UCP1, PPARα, PPARγ, Prdm16, CPT1α) y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de 6 replicados por grupo, tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.1.6 LEAP-2 incrementa la expresión de marcadores termogénicos en un tejido ya diferenciado en un cultivo primario de adipocitos de TABsc

Para ver si también se producía un incremento de los marcadores termogénicos en el tejido ya diferenciado realizamos otro experimento en el cual, en un cultivo ya diferenciado, se añadió un tratamiento con LEAP-2 0,1 nM al medio, durante 6 h.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lo que vemos con este experimento es que LEAP-2 en los adipocitos de TABsc, incrementa UCP1, marcador termogénico por excelencia, y de CPT1α, enzima encargada de transportar los AG a la mitocondria donde son oxidados en la β-oxidación (Fig. 17 a, b).

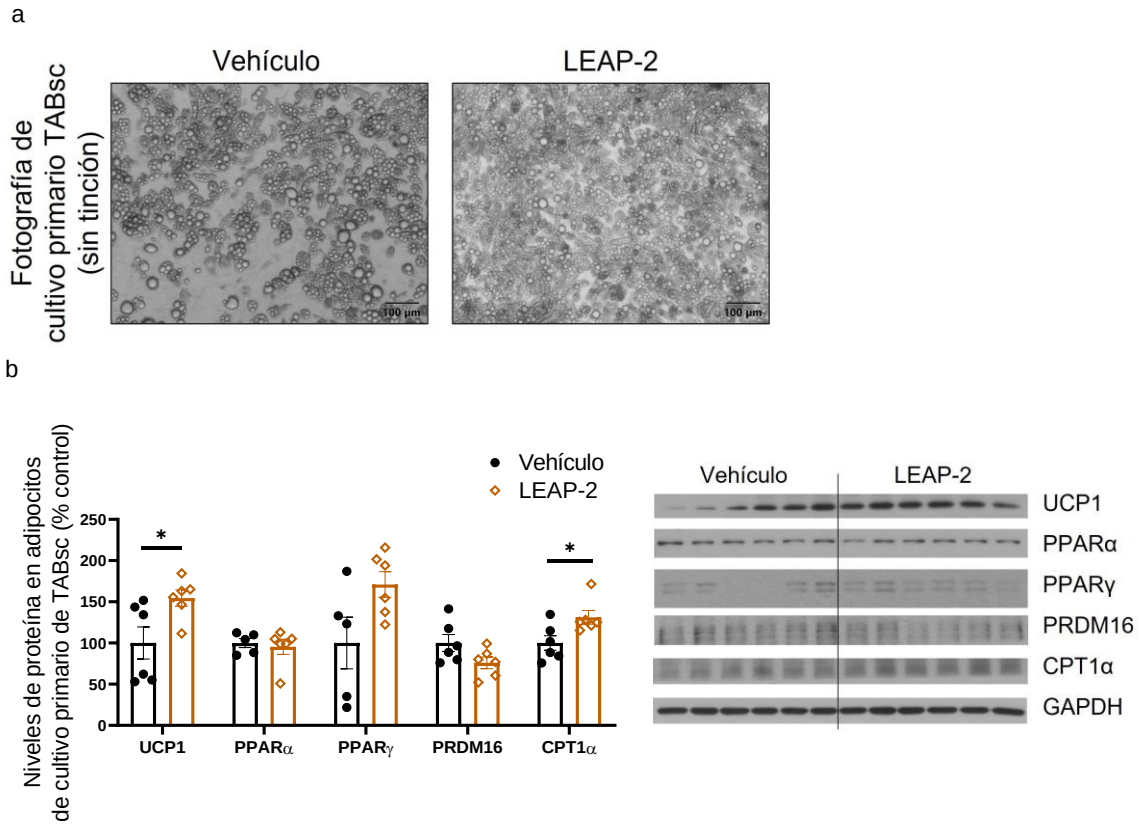


Figura 17. Efecto del tratamiento durante 6h con LEAP-2 en adipocitos de cultivo primario ya diferenciados. a) Fotografías del cultivo tras el tratamiento con LEAP-2, b) proteínas relacionadas con la termogénesis (UCP1, PPARα, PPARγ, Prdm16, CPT1α) y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de 6 replicados por grupo, tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.2 IMPLICACION DE LEAP-2 SOBRE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA

Tras los datos observados en los ratones normopeso en el apartado anterior, decidimos explorar si estos mismos efectos serían observables en un modelo de obesidad inducida por la dieta, modelo en el cual existe una resistencia al efecto orexigénico de ghrelina, ya que una disminución del tejido adiposo, así como un incremento en la termogénesis serían dos efectos beneficiosos que junto con la disminución de la ingesta podría hacer que LEAP-2 fuese una buena diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades.

En estos ratones obesos, en los que se replicaron las condiciones experimentales que habíamos realizado con los ratones normopeso, ni la administración central de ghrelina ni de LEAP-2 consiguió generar una variación de la masa corporal respecto al control (Fig. 18 a) pero los ratones tratados con LEAP-2 si consiguieron reducir la ingesta en comparación con el grupo control (Fig. 18 b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a los niveles de leptina, vemos que no existe diferencia en el grupo tratado con ghrelina, indicando que existe esa resistencia a su efecto sobre adiposidad, pero si vemos un descenso, aunque no es estadísticamente significativo en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 18 c).

Medimos también los niveles circulantes de parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico como el colesterol (Fig. 18 d), los triglicéridos (Fig. 18 e) y los ácidos grasos libres (Fig. 18 f) sin observarse ningún cambio en ninguno de los parámetros analizados en comparación con el grupo control.

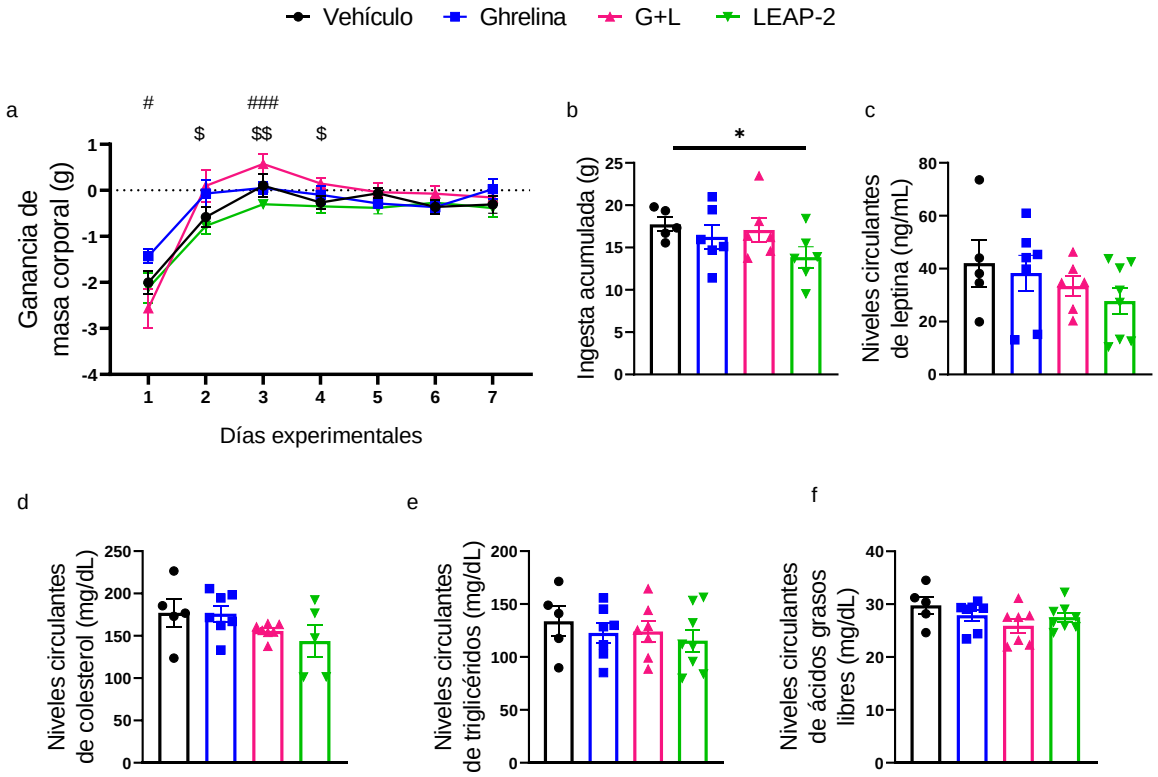


Figura 18. Efecto de la administración crónica de LEAP-2, en ratones C57BL/6 obesos por la dieta sobre: a) masa corporal (g), b) ingesta (g) y sobre los niveles circulantes de: c) leptina (ng/mL), d) colesterol (mg/dL), e) triglicéridos (mg/dL), f) ácidos grasos libres (mg/dL). Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

De nuevo, reproduciendo los experimentos antes realizados con los ratones normopeso, evaluamos el gasto energético mediante calorimetría indirecta mediante el uso de bombas osmóticas al ventrículo lateral del cerebro de ratón en condiciones de obesidad inducida por una dieta VHFD.

En los ratones obesos por la dieta, somos incapaces de ver ningún cambio en el gasto energético (Fig. 16 a, b), ni la actividad locomotora (Fig. 16 c) con la administración de LEAP-2.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

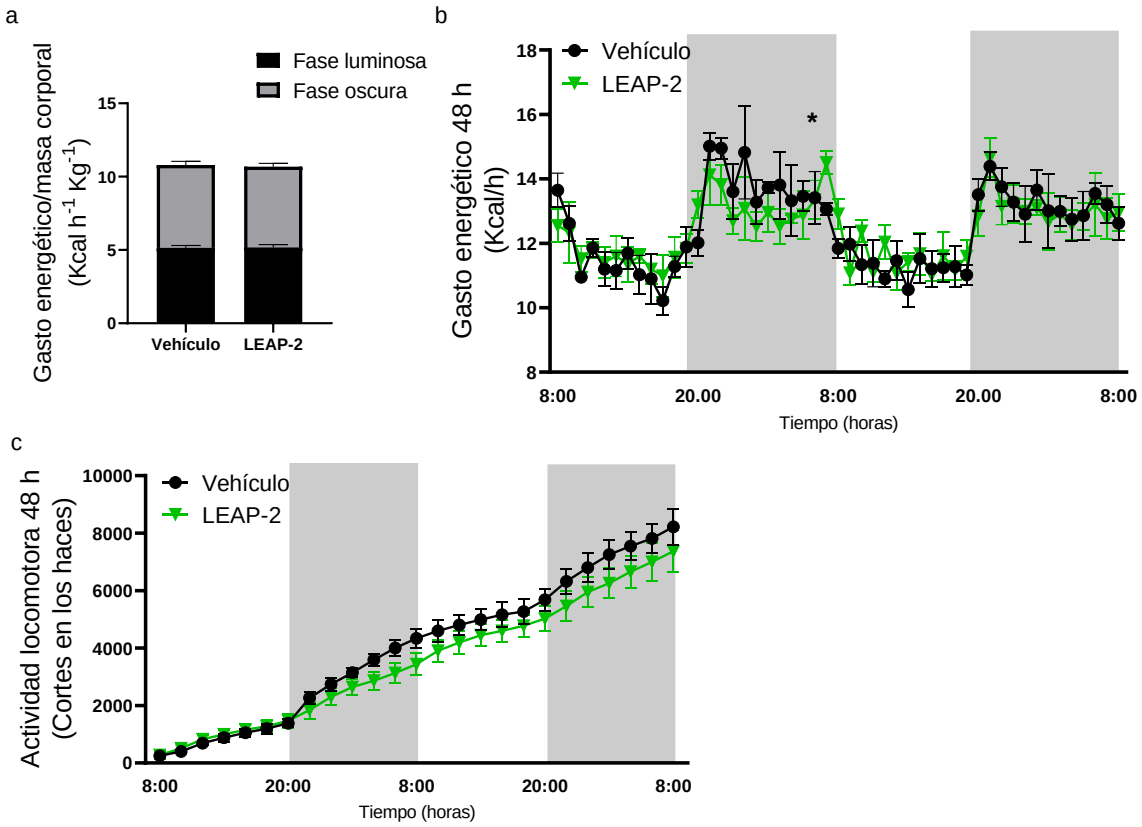


Figura 19. Efecto de la administración crónica de LEAP-2, en ratones C57BL/6 obesos por la dieta sobre: a) gasto energético, corregido por la masa corporal, b) gasto energético en 48 h corregido por la masa corporal, c) actividad locomotora en 48 h. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-6 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.2.1 Los ratones con obesidad inducida por dieta con tratamiento central crónico de LEAP-2 mostraron una incrementada actividad termogénica

Al realizar el análisis histomorfológico del TAM mediante la tinción de hematoxilina y eosina, no encontramos diferencias en el grupo tratado con ghrelina comparado con el grupo control. Sin embargo, tanto con el tratamiento de LEAP-2, como en el co-tratamiento de LEAP-2 y ghrelina se aprecia una disminución de las gotas lipídicas (Fig. 24 a).

Este efecto también queda reflejado en la masa del depósito graso de TAM, donde se aprecia una disminución estadísticamente significativa para aquellos ratones tratados con LEAP-2 así como para los ratones en co-tratamiento (Fig. 24 b). Al realizar inmunohistoquímica para UCP-1 se observó que, tanto los ratones tratados con LEAP-2, como aquellos con co-tratamiento (Fig. 24 c, d) tienen un claro aumento en la expresión de UCP1.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

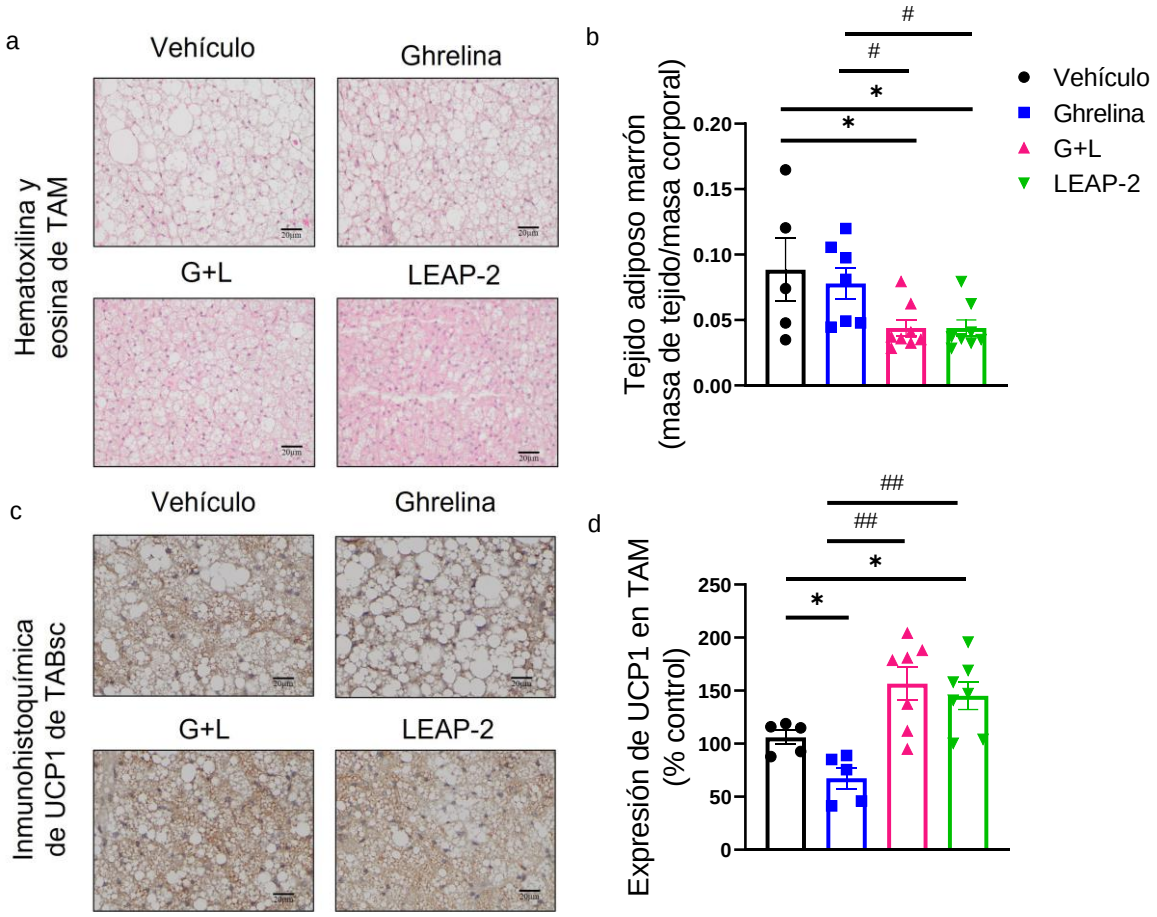


Figura 20. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones DIO sobre el TAM y la termogénesis. a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del TAM en el momento del sacrificio, c) análisis inmunohistoquímico de UCP1 en TAM, d) semi cuantificación de datos inmunohistoquímicos de UCP1. Los datos se expresan como media±SEM con un n-5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

Bajo un punto de vista más molecular, medimos la expresión de ARNm de distintos marcadores termogénicos y encontramos que había un incremento de los niveles de UCP1 y el receptor β3Adr (Fig. 21 a).

Estos datos se confirmaron también mediante los niveles de proteína, obteniendo un incremento de los niveles de las proteínas UCP1 y el receptor β3Adr, así como FGF21en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control (Fig. 21 b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

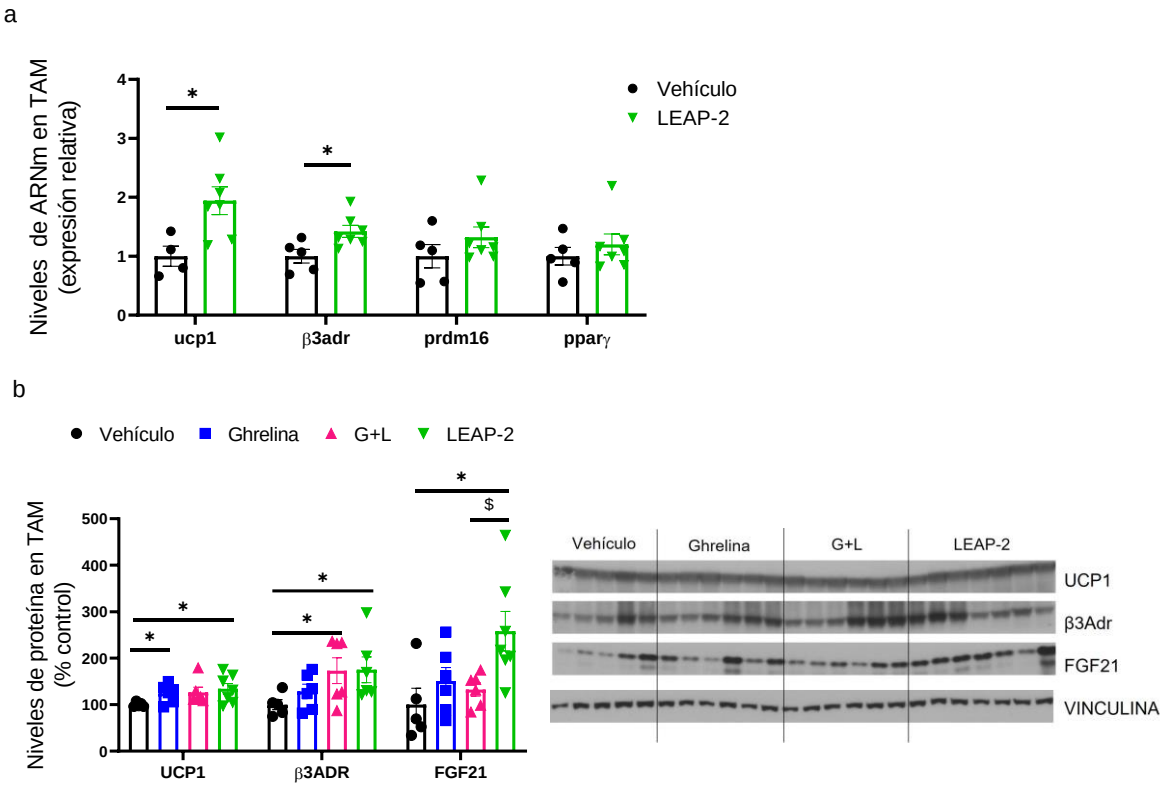


Figura 21. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones DIO sobre el programa termogénico en el TAM. Cuantificación relativa de proteínas mediante western blot y expresión génica mediante qPCR: a) expresión de ARNm de UCP1, ß3Adr, PRMD16, PPARγ) b) proteínas relacionadas con la termogénesis (UCP1, ß3Adr, FGF21) y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga vinculina, con grupos experimentales: vehículo (n=5), ghrelina (n=6), G+L (n=6), LEAP-2 (n=7). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm, de un n 4-7 ratones por grupo. Los datos se expresan como media±SEM, tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

En cuanto a la actividad mitocondrial analizamos la expresión de PPARα factor de transcripción implicado en la activación de la β-oxidación y encontramos que había un incremento en su expresión en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 22 a). Sin embargo, al analizar proteínas relacionada con el desacoplamiento de la cadena electrónica como son los complejos mitocondriales: complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo V (ATP Sintasa), Complejo III (Citocromo bc1), Complejo IV (Citocromo C oxidasa) no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, aunque si hay una tendencia hacia un incremento en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control (Fig. 22 b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

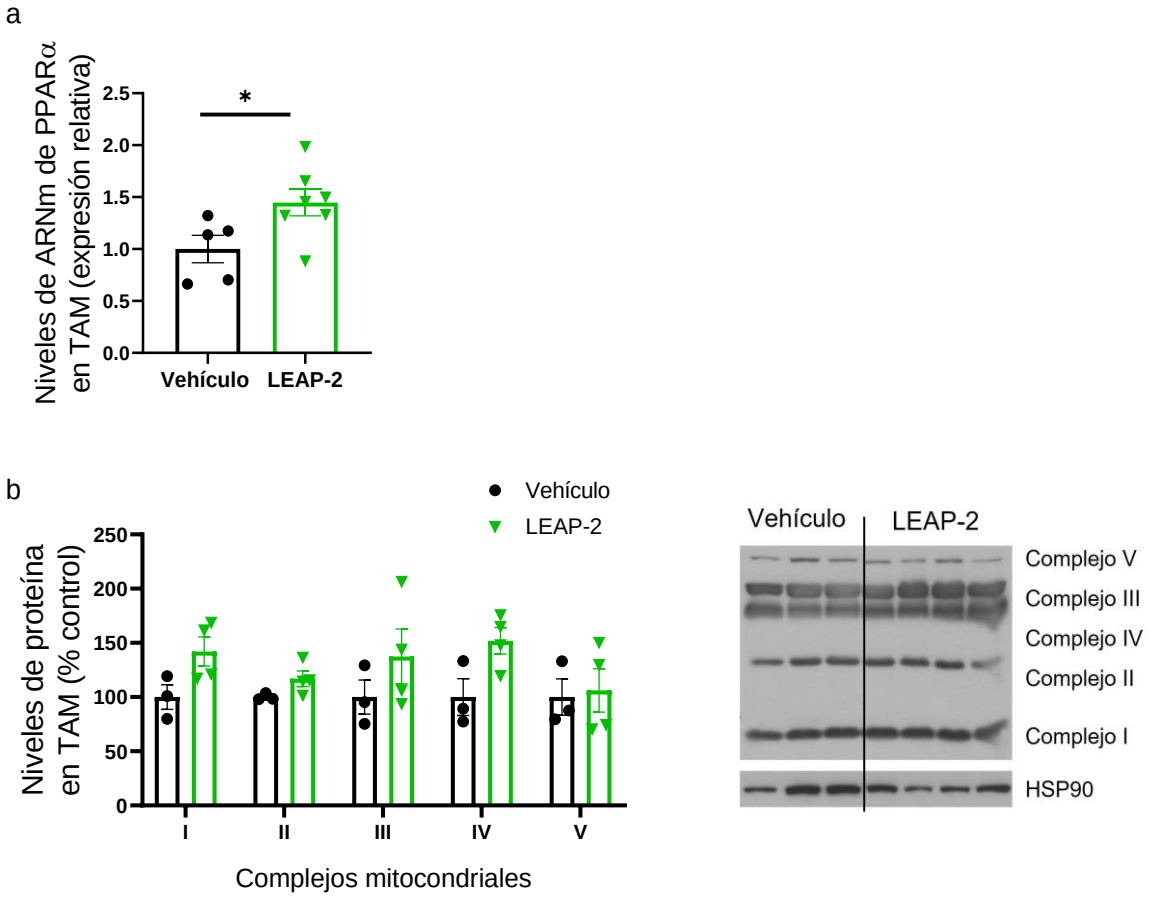


Figura 22. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, en ratones DIO sobre el metabolismo mitocondrial en el TAM. Cuantificación relativa de proteínas mediante western blot y expresión génica mediante qPCR: a) expresión de ARNm de PPARα, b) proteínas marcadoras de actividad mitocondrial como son los 5 complejos mitocondriales y las imágenes representativas. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga HSP90. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n=5-7 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

2.2.2 En obesidad, el TABsc de los ratones tratados con LEAP-2 no experimentan ningún cambio

Con los resultados obtenidos en el TAM, quisimos ver si esto podría afectar o generar de alguna forma, amarronamiento en el TABsc.

Analizamos histomorfológicamente el tejido, pesamos el depósito de grasa y medimos el tamaño de los adipocitos del TABsc, sin encontrar ningún cambio estadísticamente significativo, aunque si se aprecia una tendencia a una frecuencia menor en el tamaño de los adipocitos en los ratones tratados con LEAP-2. (Fig. 23 a, b, c, d,).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

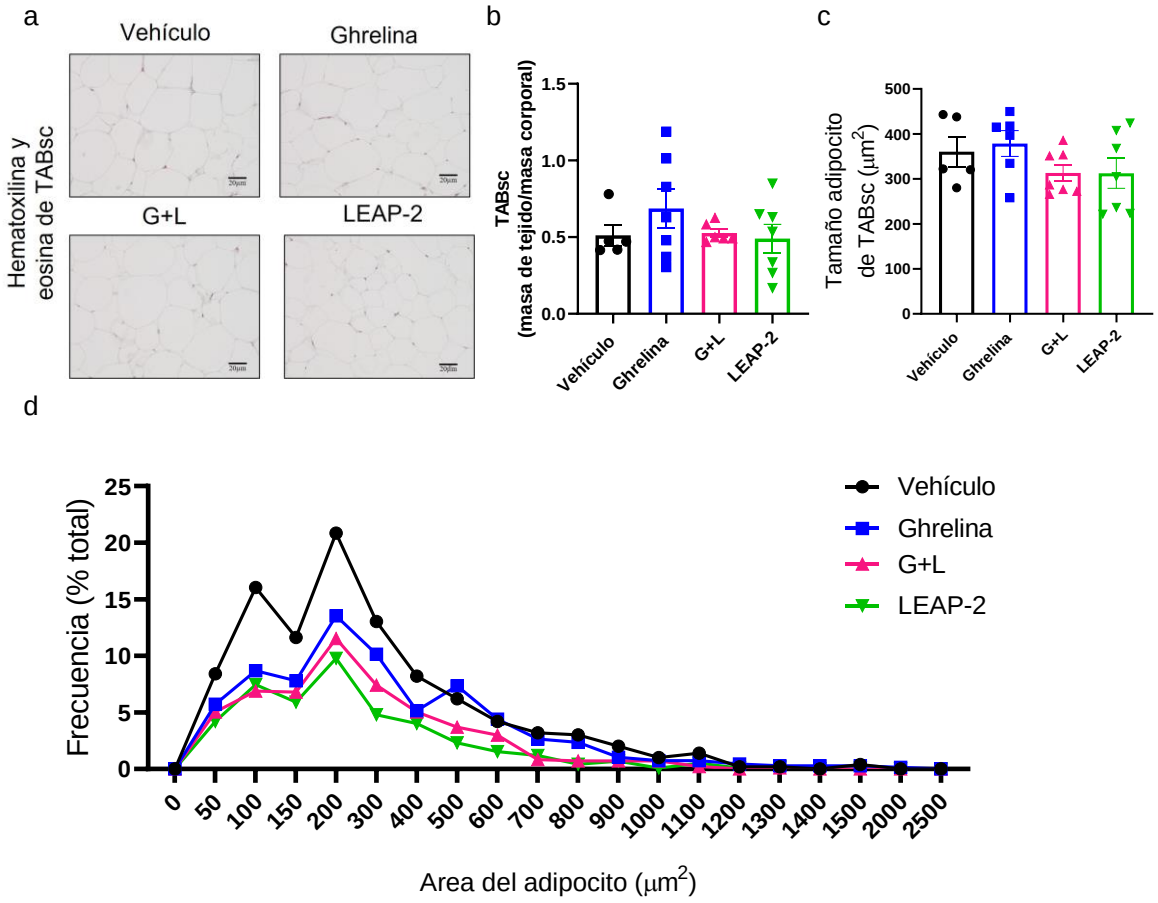


Figura 23. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones DIO sobre el tamaño de los adipocitos del TABsc a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del TABsc en el momento del sacrificio, c) tamaño de los adipocitos (μm²), d) frecuencia del tamaño de los adipocitos. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-7 ratones por grupo.

3. EFECTO CENTRAL DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO

Dado que ha sido descrito como ghrelina central favorece el almacenamiento hepático de lípidos y reduce su movilización, nos propusimos analizar el posible efecto de LEAP-2 sobre el hígado. Para ello, decidimos analizar los efectos de LEAP-2 en el metabolismo hepático en un tratamiento crónico, en los animales normopeso y en el modelo de obesidad inducida por dieta, en el cual existe una resistencia a ghrelina.

3.1 ACCIÓN DE LEAP-2 CENTRAL SOBRE LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN EL HÍGADO EN RATONES NORMOPESO

Para comprobar el papel de LEAP-2 a nivel hipotalámico en la regulación periférica del metabolismo lipídico en el hígado, realizamos primero un análisis histológico del hígado, no

encontrando una gran diferencia entre grupos (Fig. 24 a), aunque si se observa un incremento de la masa del hígado en los ratones tratados con ghrelina, y una disminución de este en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 24 b).

Por este motivo, analizamos la cantidad de TG hepáticos y AG libres, así como la deposición de lípidos en el hígado medido mediante la tinción Oil red O (Fig. 24 c, d, e, f), encontramos como era esperado un claro incremento en la acumulación de TG hepáticos en los ratones tratados con ghrelina, además, la tinción Oil red O nos confirmó el mayor número de acumulación de grasa en esos ratones y su inhibición por LEAP-2. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo tratado con LEAP-2, aunque los ácidos grasos libres están bajos en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control.

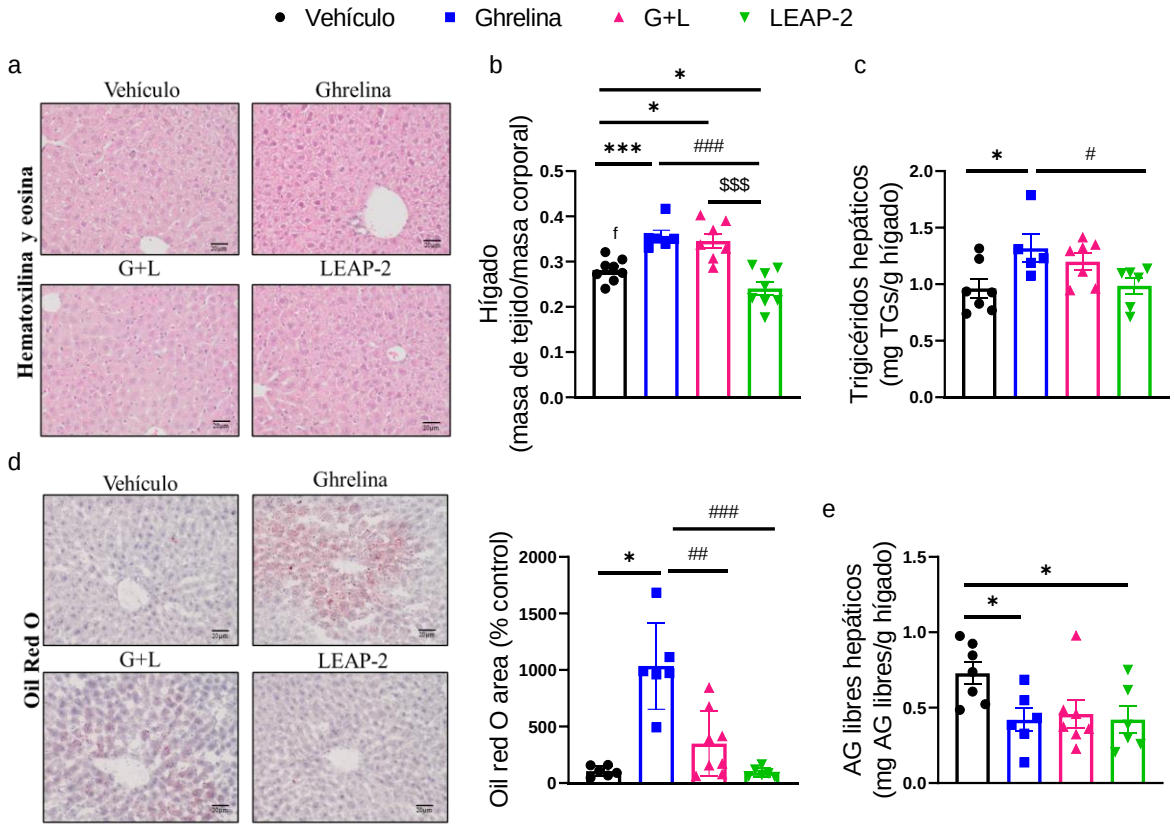


Figura 24. Efecto de la administración crónica ICV de LEAP-2 en el hígado sobre la acumulación de lípidos de ratones normopesos: a) tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del hígado en el sacrificio c) niveles de triglicéridos hepáticos d) tinción de Oil red O de secciones de hígado y cuantificación de la tinción Oil red O, e) niveles de ácidos grasos libres hepáticos. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

3.2 LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 TIENE EFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

La resistencia al acúmulo de grasa en hígado en los ratones tratados con ghrelina y LEAP-2 y sus efectos sobre los AG libres, nos ha llevado a pensar que quizás LEAP-2 podría tener alguna acción directa en el metabolismo lipídico hepático.

Por ello, en primer lugar, quisimos ver la posible influencia en LDN por lo que se analizó la expresión de *fasn*, *mlxipl* y *scd1* encontrando un claro descenso en la expresión de esos genes (Fig. 25 a).

Se analizaron también genes implicados en la incorporación de lipoproteínas remanentes del plasma (*nr1h2, ldlr*) y el en empaquetamiento de lipoproteínas para su secreción (*mttp*) pero en ninguna de ellas se observó ninguna diferencia de expresión entre ambos grupos (Fig. 25 b).

Un posible efecto podría ser un incremento en la actividad mitocondrial, por ello analizamos la expresión de proteínas implicadas en la β-oxidación mitocondrial y, por tanto, claves en la en la activación de la oxidación lipídica como es el transportador de AG CPT1α que mostro un incremento estadísticamente significativo, al igual que el FT implicado en la activación de este proceso PPARα, así como PGC1α y Prdm16 implicadas en la regulación de la dinámica mitocondrial (Fig. 25 c).

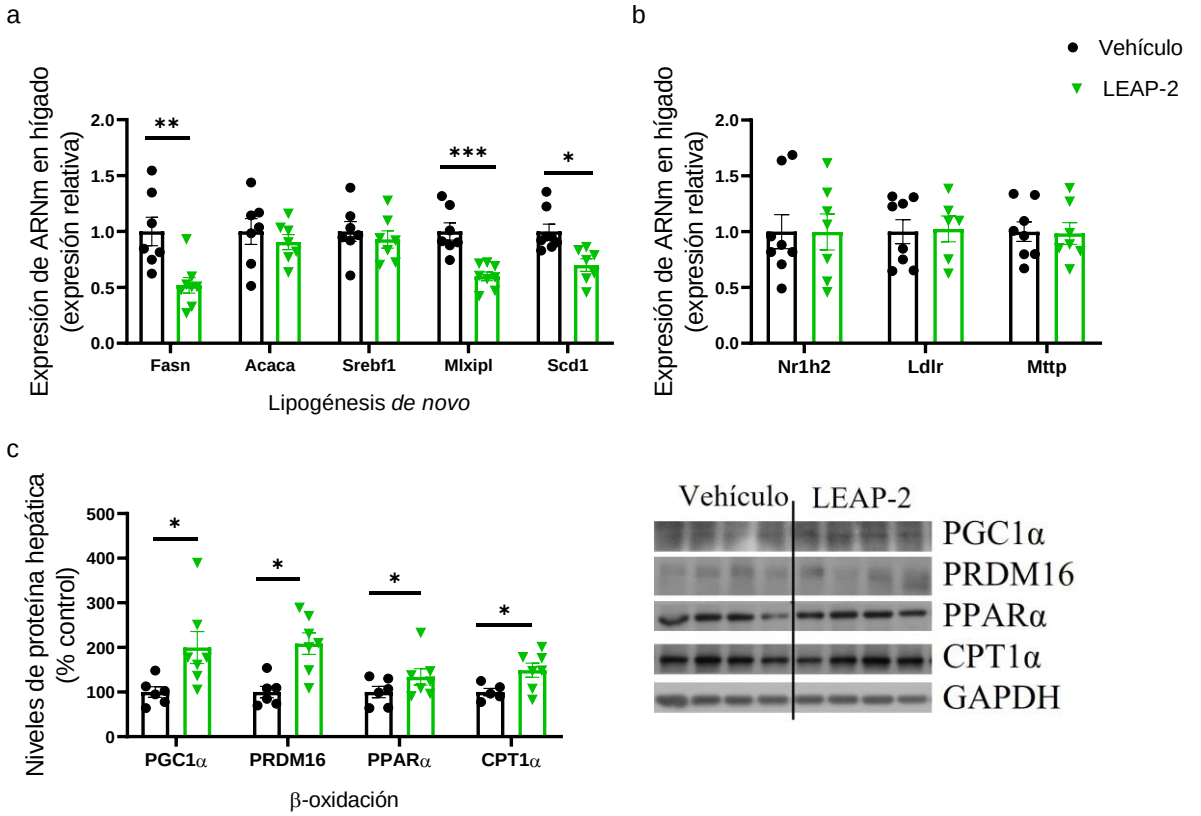


Figura 25. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, en ratones normopeso y obesos sobre el metabolismo lipídico hepático. a) análisis de la expresión de ARNm de proteínas y factores de transcripción relacionados con la lipogénesis de novo como fasn, acaca, srebf1, mlxipl1, scd1, b) análisis de la expresión de ARNm de proteínas relacionadas con el transporte lipídico como Lxr, Ldlr y Mttp, c) proteínas relacionadas con la lipólisis y actividad mitocondrial (PGC1α, PRMD16, PPARα, CPT1α) y las imágenes representativas. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

3.3 LOS RATONES CON ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN HEPÁTICA

Debido a que en los primeros estadios de la enfermedad metabólica hepática cursan con estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático (RE), inflamación y apoptosis quisimos ver si el tratamiento con LEAP-2 podría suponer, de algún modo, una mejora. Lo que observamos es que, en los ratones en dieta estándar se produce una reducción en los marcadores de inflamación hepática como es el factor de necrosis tumoral *tnfα*, y en los marcadores de macrófagos, *mac2* y *adgre1 (f4/80)* (Fig. 26).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

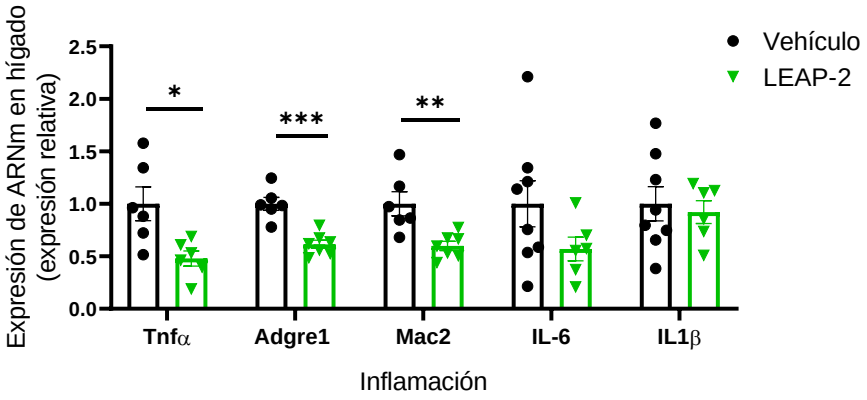


Figura 26. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones normopeso sobre la inflamación hepática. a) análisis de la expresión de ARNm de factores relacionados con la inflamación (*tnfa*, *adgre1* y *mac2*, *IL6*, *IL1β*). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

3.4 ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE LEAP-2 EN RATONES CON OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS HEPÁTICA

Cuando analizamos los ratones sometidos a una dieta muy alta en grasa (VHFD), de nuevo en el análisis histomorfológico no encontramos diferencia entre grupos (Fig. 27 a), aunque los ratones tratados con LEAP-2 manifestaron una disminución de la masa del hígado, que no llega a ser estadísticamente significativo (Fig. 27 b). De forma interesante, observamos una clara prevención frente a la esteatosis hepática en los ratones tratados con LEAP-2 como mostró la tinción con Oil red O (Fig. 27 d, e). El análisis de los TG hepáticos no reveló ninguna diferencia entre grupos (Fig. 27 c). Aunque si se vieron cambios en los AG libres, que se ven incrementados en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

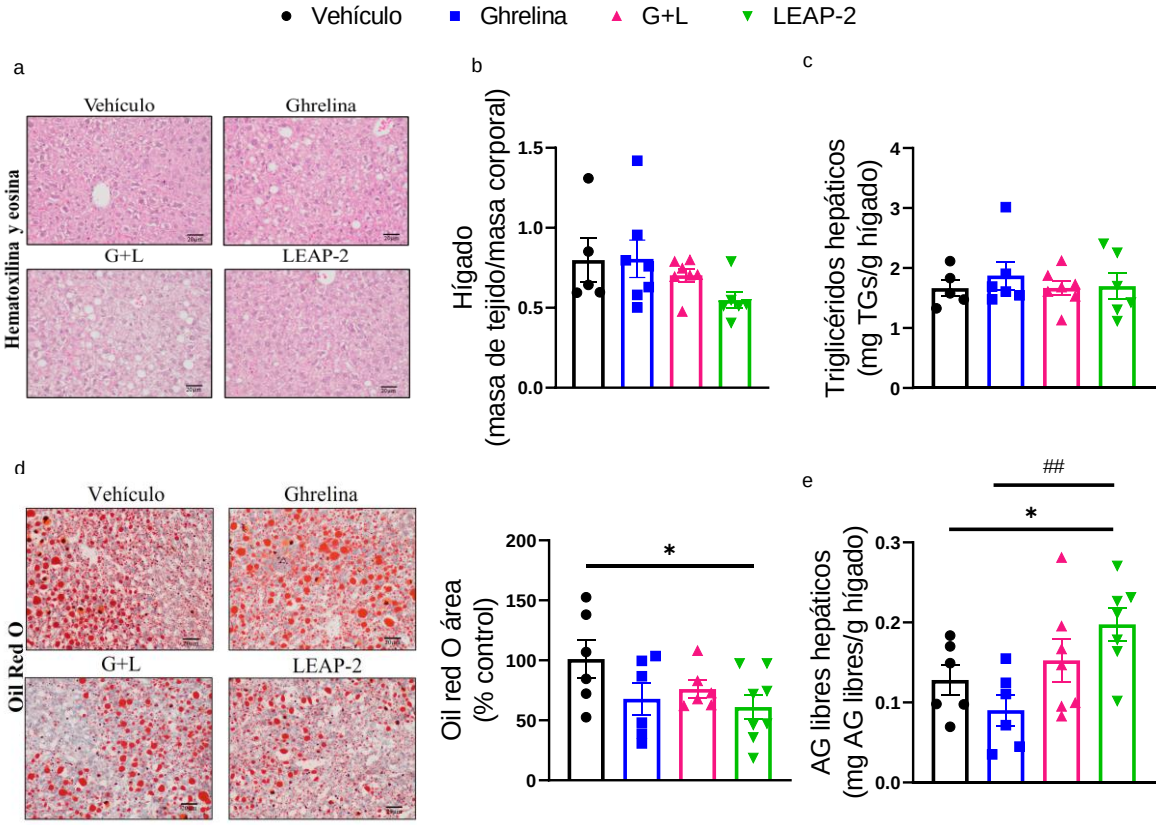


Figura 27. Efecto de la administración crónica ICV de LEAP-2 en el hígado sobre la acumulación de lípidos de ratones obesos por la dieta: a) tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del hígado en el momento del sacrificio c) niveles de triglicéridos hepáticos d) tinción de Oil red O de secciones de hígado y cuantificación de la tinción Oil red O, e) niveles de ácidos grasos libres hepáticos. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

Se sabe que la obesidad está relacionada con la enfermedad del hígado graso y estadios posteriores de MAFLD, por ello, quisimos ver si el tratamiento con LEAP-2 podría ser de alguna forma protector frente a esta acumulación hepática de lípidos en los ratones DIO.

Por ello, como ya se había realizado antes con el modelo alimentado con una dieta estándar, lo primero que analizamos fue la influencia sobre la LDN por lo que se analizó la expresión de genes relacionado como: *fasn, acaca, srebf1* y *mlxipl*, encontrando un incremento en la expresión de algunos de esos genes (Fig. 28 a).

Otra de las formas en las que puede disminuir la acumulación de lípidos en el hígado es por un incremento en la β-oxidación mitocondrial, clave en la en la activación de la oxidación lipídica, pero no hemos visto ningún cambio en ninguna de las proteínas analizadas (Fig. 28 b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

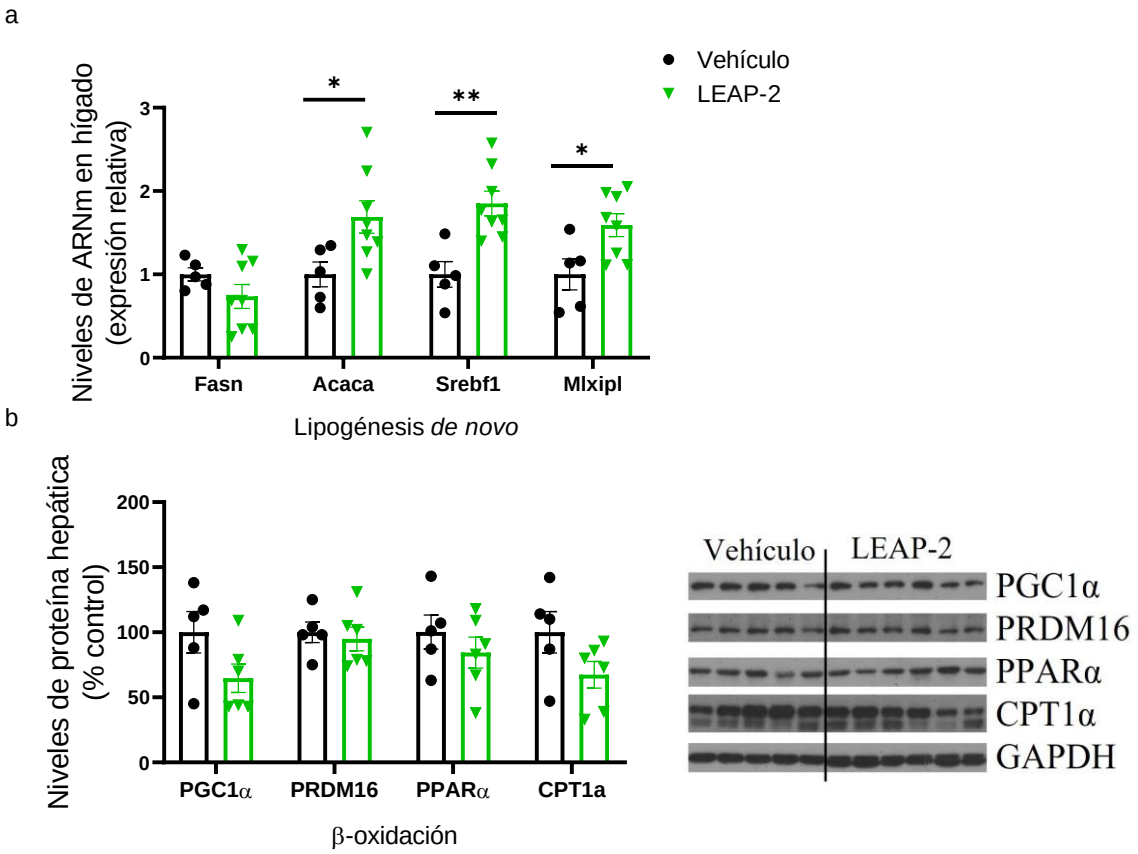


Figura 28. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, en ratones obesos por la dieta sobre el metabolismo lipídico hepático. a) análisis de la expresión de ARNm de proteínas y factores de transcripción relacionados con la lipogénesis de novo como *fasn*, *acaca*, *srebf1*, *mlxipl* b) proteínas relacionadas con la lipólisis y actividad mitocondrial (PGC1α, PRMD16, PPARα, CPT1α) y las imágenes representativas. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

Debido a que en los primeros estadios de MAFLD aparecen relacionados estadios de inflamación y apoptosis hepáticos quisimos ver si el tratamiento con LEAP-2 podría suponer, de algún modo, una mejora. Lo que observamos es que, tanto en los ratones en dieta alta en grasa se produce una reducción en los marcadores de inflamación hepática como es *tnfα*, y en los marcadores de macrófagos, *mac2* y *adgre1 (f4/80)* (Fig. 29).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

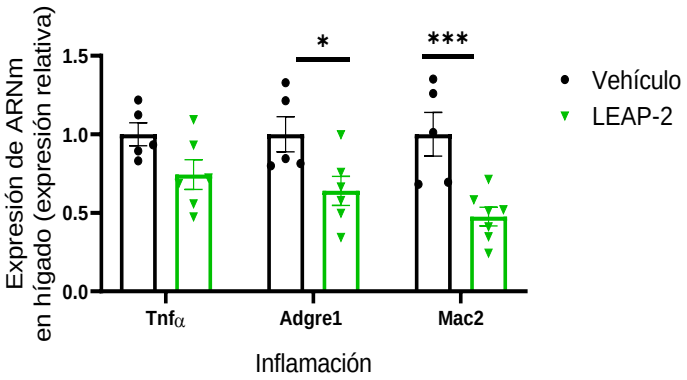


Figura 29. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina y co-tratamiento en ratones obesos por la dieta sobre la inflamación hepática. a) análisis de la expresión de ARNm de factores relacionados con la inflamación (tnfα, adgre1 y mac2), Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LEAP-2 EN HEPATOCITOS HUMANOS

Las acciones centrales de LEAP-2 sobre metabolismo periférico parecen bastante claras, sin embargo, nos preguntábamos si tendría acciones directas en hígado y si estas acciones se reproducirían en humano. Para ello utilizamos la línea celular hepática HepG2, línea celular que posee el receptor de ghrelina GHSR1a (receptor por el que actúa LEAP-2), y que responden a ghrelina.

4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LEAP-2, CARACTERIZACIÓN DE DOSIS Y TIEMPO DE TRATAMIENTO

Lo primero que quisimos averiguar era si las células HepG-2 expresaban y liberaban LEAP-2 y si esto se veía afectado por los niveles de grasa en el medio.

Pudimos comprobar que efectivamente había expresión de LEAP-2, y que el tratamiento con ácido oleico en el medio a 1 mM durante 24 h incrementaba su expresión (Fig. 30 a). Además, las células HepG2 no solo expresaban LEAP-2 sino que eran capaces de liberarlo al medio de forma gradual y acumulativa en el tiempo (Fig. 30 b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

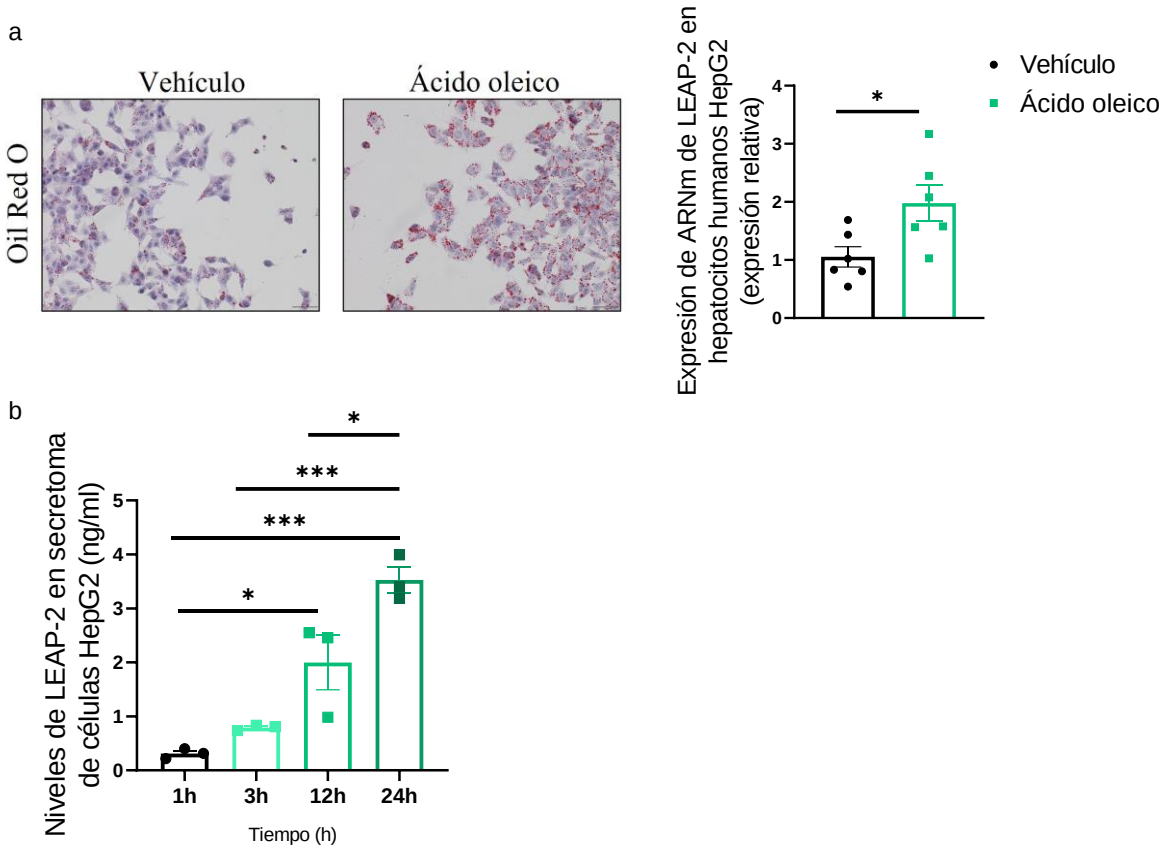


Figura 30. Las células hepáticas HepG2 expresan LEAP-2, y liberan de forma tiempo dependiente LEAP-2 al medio de cultivo. a) Imágenes de la tinción histológica Oil red O y expresión de ARNm de LEAP-2 en células HepG2 e imagen de las células, b) niveles de LEAP-2 en el medio de cultivo de las células HepG2 medido mediante ELISA (ng/mL). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 3-6 replicados por grupo. Tras aplicar el T-test o ANOVA: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

El siguiente paso fue generar el modelo de esteatosis hepática en las células HepG2 mediante la aplicación durante 24 h de tratamiento con ácido oleico 1 mM. Se realizaron experimentos dosis-respuesta (0, 0,1 y 1 nM) y tiempo-respuesta (3 h y 6 h) con LEAP-2 para establecer una dosis de trabajo. Pudimos observar que ambas dosis producían una disminución de las gotas lipídicas en las células tratadas con ac oleico, y que a las 3 h el efecto era mayor que a las 6 h en ambas dosis. (Fig. 31 a, b)

En base a estos resultados, se establece el tratamiento de LEAP-2 sobre células HepG2 con una dosis de 0,1 nM porque es la dosis más baja probada con la que se obtiene efecto, y además ya estaba descrita para ghrelina en células HepG2. En cuanto al tiempo de tratamiento, decidimos emplear la de 3 h, ya que es con la que se observaba un descenso más claro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

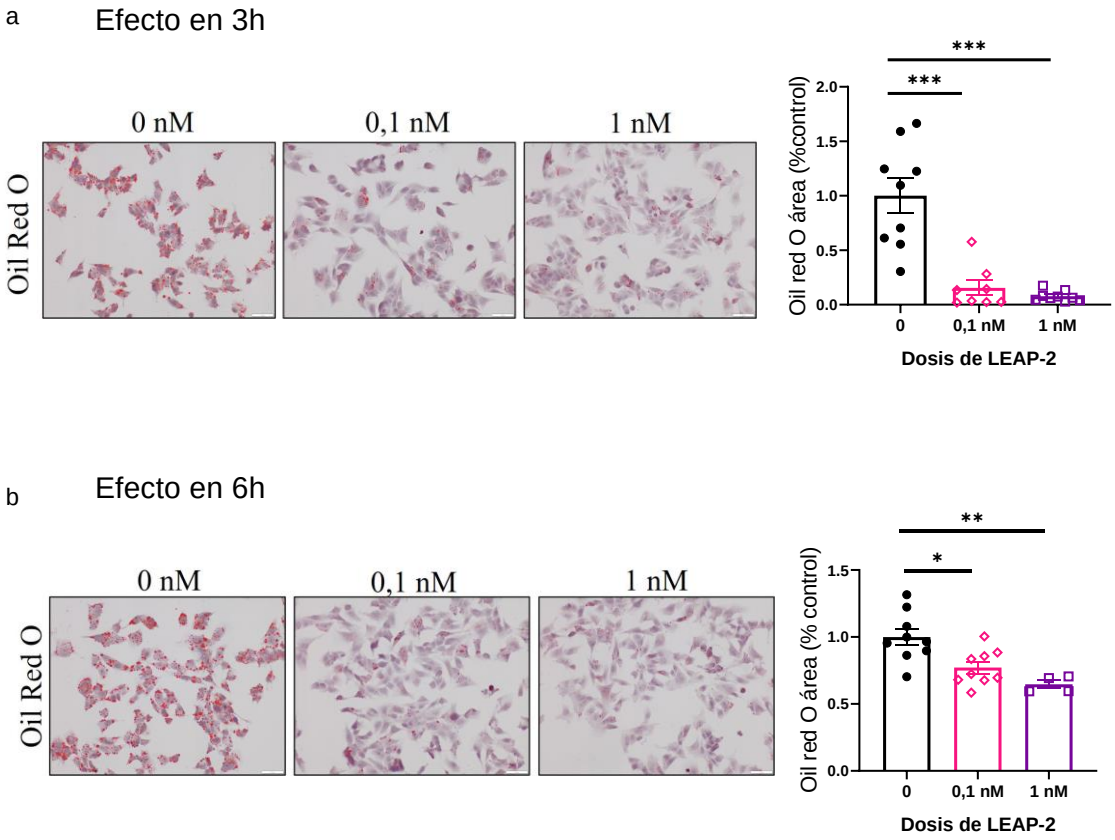


Figura 31. Efecto del tratamiento de LEAP-2 en un modelo celular de esteatosis hepática in vitro en hepatocitos humanos HepG2. Imágenes de la tinción histológica Oil red O y cuantificación en células HepG2 con tratamiento con LEAP-2 0 nM,1 nM y 1 nM a) durante 3 h, b) durante 6 h. Los datos se expresan como media±SEM de un n de n= 4-9 replicados. Tras aplicar ANOVA: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

4.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LEAP-2 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA GLUCONEOGÉNESIS EN UN MODELO DE ESTEATOSIS HEPATICA IN VITRO

Con el objetivo de averiguar el posible mecanismo por el que LEAP-2 ejercía su efecto sobre la acumulación lipídica, tratamos las células HepG2 con LEAP-2 a una dosis de 0,1 nM durante 3 h, en ausencia o presencia de pretratamiento con ácido oleico 1 mM durante 24 h.

El tratamiento durante 3 h con LEAP-2 a 0,1 nM a las células en ausencia de ácido oleico genera una disminución de la expresión de marcadores de la lipogénesis de novo como *FASn* y *MLXIPL* (Fig. 32 a). Por otro lado, el análisis proteico de marcadores lipolíticos reveló un incremento de proteínas implicadas en la oxidación lipídica como son CPT1α, Prdm16, PPARα y pAMPK (Fig. 32 c)

El tratamiento con LEAP-2 también disminuye la expresión de enzimas de la gluconeogénesis *G6PC* y *PCK1*, y del receptor de glucosa en el hígado *SLC2A2* (gen que codifica GLUT2) (Fig. 32 b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

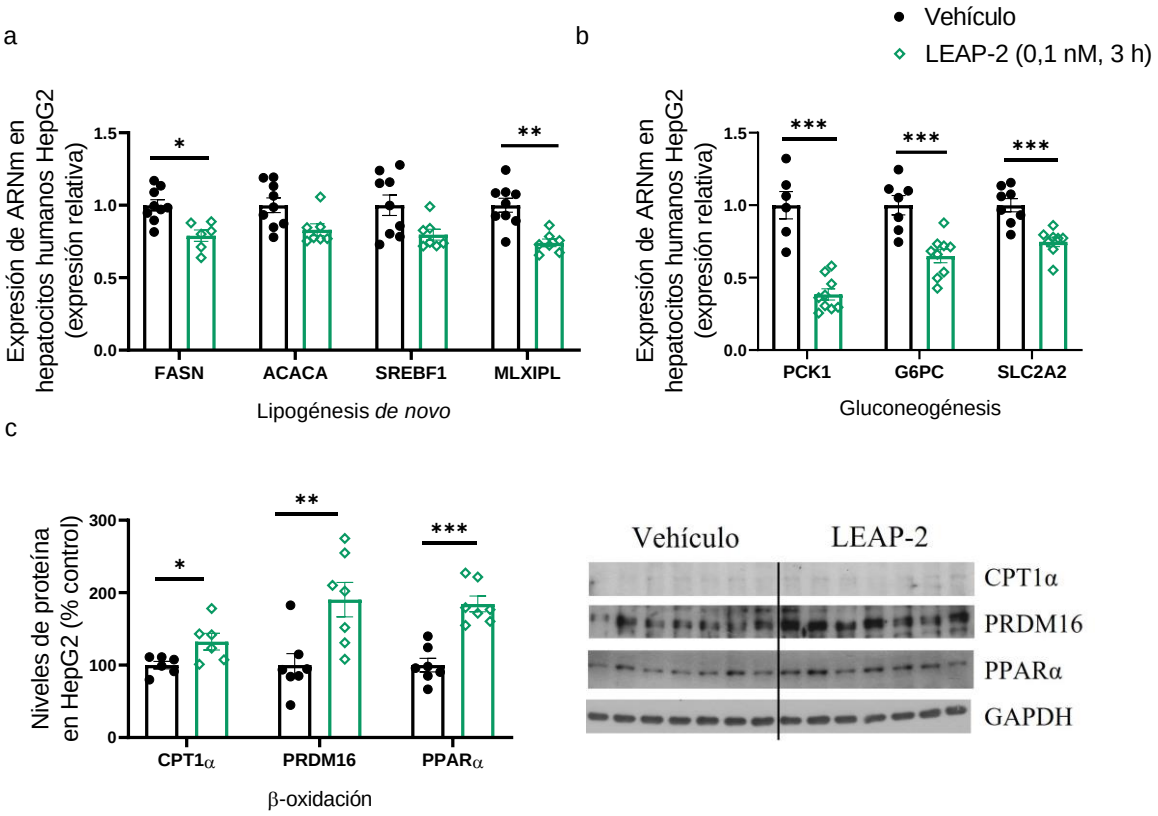


Figura 32. Efectos del tratamiento de LEAP-2 0,1 nM durante 3 h sobre el metabolismo de los hepatocitos humanos. a) Análisis de la expresión de ARNm de FAS, ACC, SREBP1, ChREBP1, b) análisis de la expresión de ARNm de PCK1, G6Pasa, SLC2A2, c) cuantificación de imágenes obtenidas por western blot de marcadores proteicos relacionados con la oxidación de AG (CPT1α, Prdm16, PPARα). Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 6-9 replicados por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

Por otro lado, cuando a las células se les administraba ácido oleico 1mM previo al tratamiento con LEAP-2 (24 h) se producía de nuevo una disminución de la expresión de los marcadores de la lipogénesis de novo *FASn, ACACA, SREBF1* y *MLXIPL* (Fig. 33 a). En este caso, el tratamiento con LEAP-2 también disminuye la expresión de enzimas de la gluconeogénesis *G6PC* y *PCK1*, y del receptor de glucosa en el hígado *SLC2A2* (gen de GLUT2) (Fig. 33 b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

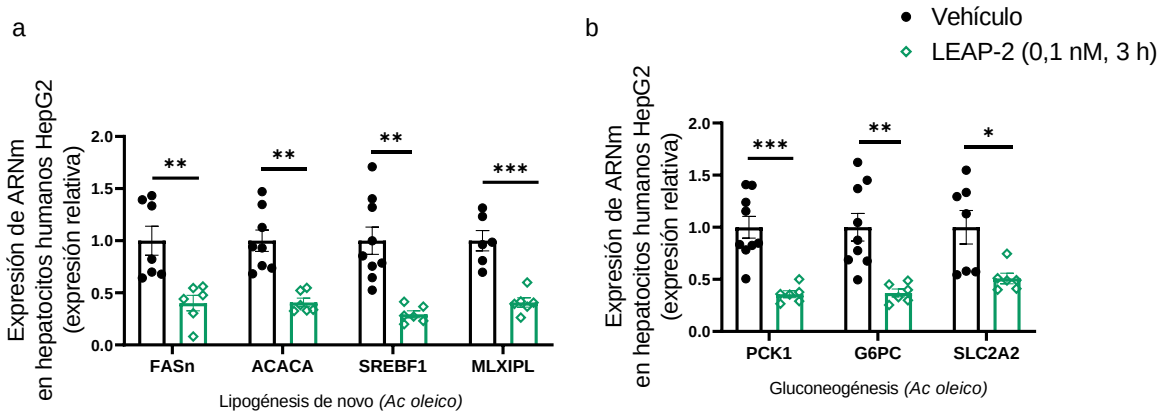


Figura 33. Efectos del pretratamiento con ácido oleico 1mM durante 24 h y tratamiento de LEAP-2 0,1 nM durante 3 h sobre el metabolismo de los hepatocitos humanos. a) Análisis de la expresión de ARNm de FASn, ACACA, SREBF1, MLXIPL, b) análisis de la expresión de ARNm de PCK1, G6PC, SLC2A2. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 replicados por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

4.3 EFECTOS DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LEAP-2 EN HEPATOCITOS HUMANOS

Tras ver el claro efecto que el tratamiento de LEAP-2 genera sobre el metabolismo lipídico de las células HepG2, decidimos explorar si la ausencia de LEAP2 revertía el efecto de este sobre la lipolisis y LDN. Pera ello utilizamos un siRNA específico para silenciar LEAP-2 en esta línea celular.

La eficiencia del silenciamiento se confirmó analizando los niveles de LEAP-2 presentes tanto en el lisado celular como en el medio mediante ELISA (Fig. 34 a, b).

Al analizar el contenido lipídico mediante la tinción Oil red O pudimos observar que tras 24 h de exposición a ácido oleico 1 mM, y en las células a las que se les realiza el silenciamiento de LEAP-2 presentaban una mayor acumulación de lípidos estadísticamente significativa comparándolas con el grupo control (si-vacío) (Fig. 34 d).

El análisis molecular reveló que la inhibición de LEAP-2 provocaba un incremento en la expresión de *FASn* y de *PCK1*, aunque no llega a ser estadísticamente significativo (Fig. 34 c). Confirmando que LEAP-2 parece ejercer un efecto directo sobre la acumulación de grasa en los hepatocitos,

Todos estos efectos observados con el silenciamiento son opuestos a aquellos que vemos cuando las células son tratadas con LEAP-2 lo que nos hace pensar que LEAP-2 si pueda ejercer una acción directa sobre el hígado, jugando un papel importante en la esteatosis hepática.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

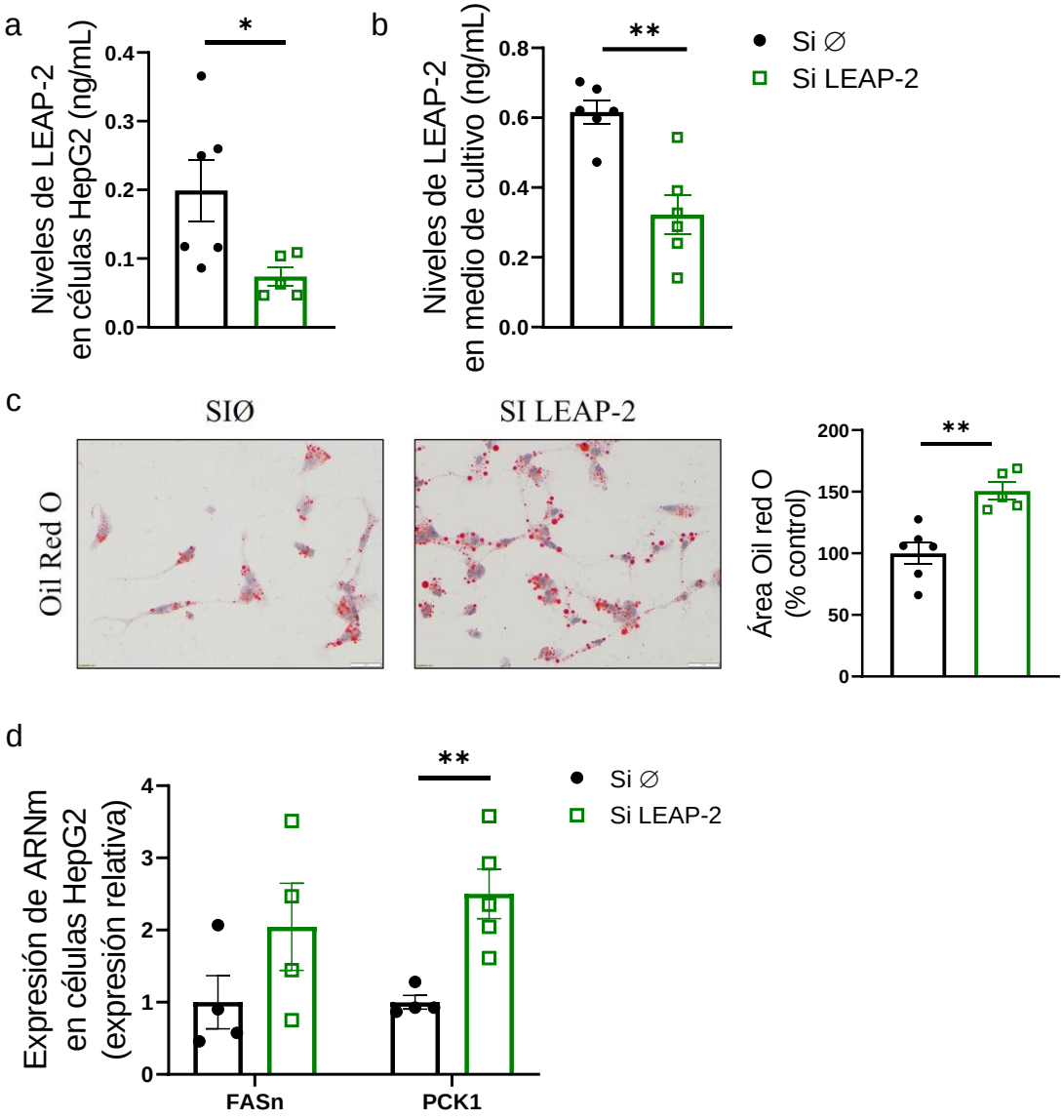


Figura 34. Efecto del silenciamiento de LEAP-2 in vitro en hepatocitos humanos HepG2 sobre el metabolismo. a) Niveles de LEAP-2 en extracto de células HepG2 medido mediante ELISA (ng/mL), b) niveles de LEAP-2 en el medio de cultivo de las células HepG2 medido mediante ELISA (ng/mL), c) imágenes de la tinción histológica Oil red O y cuantificación en células HepG2 con silenciamiento de LEAP-2 y tratamiento 24h con ácido oleico 1 mM, d) análisis de la expresión de ARNm de FAS y PCK1. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. INFLUENCIA DE LEAP-2 EN EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento se caracteriza por diversos cambios neuroendocrinos, así como toda una serie de modificaciones en el balance energético y metabólico. Ha sido descrito que, en individuos envejecidos, tanto ghrelina como GH se encuentran disminuidos a nivel plasmático. Así mismo, algunos de los cambios más obvios en el envejecimiento son debidos a alteraciones en el eje somatotropo, así como cambios en la composición corporal, pudiendo estar relacionado esto último con la anorexia en el envejecimiento, patología que cursa con una disminución de la masa magra, de la masa corporal y un menor apetito. Algunos de esos cambios se han relacionado con el sistema de ghrelina.

Por tanto, consideramos de gran interés el esclarecer si existen cambios relevantes debido a la acción de LEAP-2 en el envejecimiento y/o cambios en su acción biológica con relación al balance energético.

Lo primero que hicimos fue evaluar los niveles circulantes y de expresión de LEAP-2 en los ratones envejecidos C57BL/6 de 29 meses de edad. Lo que observamos es que, en estos ratones, tanto los niveles circulantes (Fig. 35 a) como la expresión hepática de LEAP-2 (Fig. 35 b), se ve significativamente incrementados en los ratones envejecidos respecto a los ratones jóvenes.

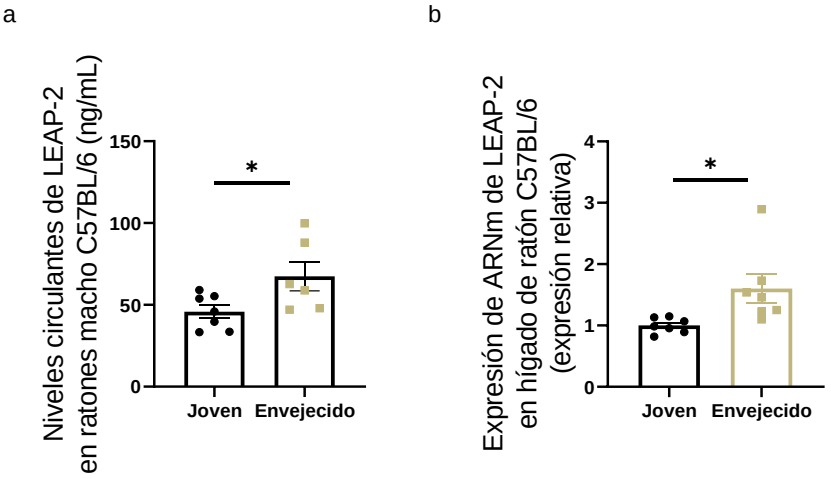


Figura 35. La expresión de LEAP-2 se encuentra incrementada en los ratones envejecidos. a) Niveles circulantes de LEAP-2 en ratones macho C57BL/6, b) Niveles de ARNm de LEAP-2 en hígado de ratones macho C57BL/6. Los datos se expresan como media±SEM. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm. Tras aplicar el t-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos.

5.1 EFECTO DE LEAP-2 CENTRAL SOBRE METABOLISMO ENERGÉTICO EN ANIMALES ENVEJECIDOS

En ratones envejecidos, el tratamiento central con ghrelina genera un incremento de masa corporal, aunque no es dependiente de ingesta dado que no hay cambios en la misma. El tratamiento con LEAP-2 antagoniza el efecto de ghrelina en la ganancia de masa corporal cuando son coadministrados, pero tampoco afecta a la ingesta de alimentos (Fig. 36 a, b).

Al analizar los niveles de leptina, vimos que se correlacionaba con el incremento de masa corporal de los ratones tratados con ghrelina, los cuales tenían unos mayores niveles de leptina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

circulante. Por otra parte, los ratones tratados con LEAP-2, presentaban menores niveles de leptina comparados con los controles y un mejor perfil lipídico con bajos niveles de colesterol y de triglicéridos circulantes. (Fig. 36 c, d, e, f).

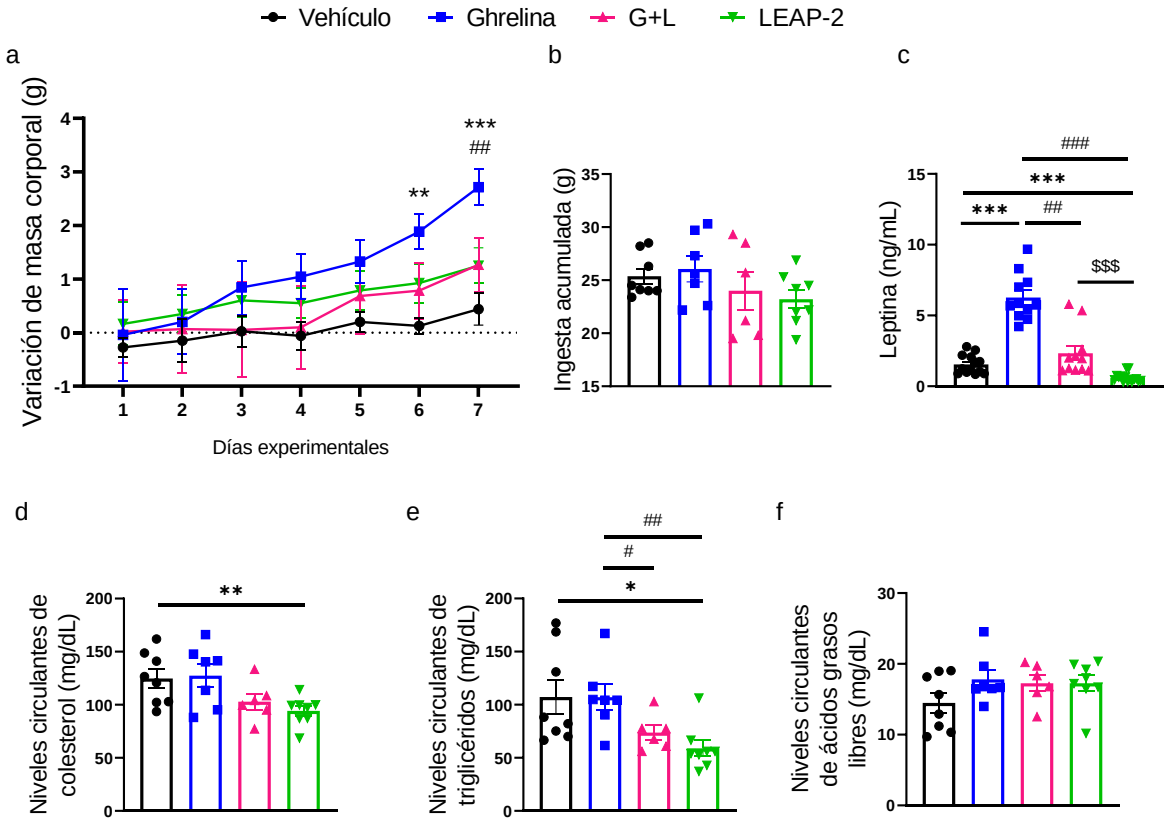


Figura 36. Efecto de la administración crónica de LEAP-2, en ratones C57BL/6 envejecidos sobre: a) variación de masa corporal (g), b) ingesta acumulada (g) y sobre los niveles circulantes de c) leptina (ng/mL), d) colesterol (mg/dL), e) triglicéridos (mg/dL), f) ácidos grasos libres (mg/dL). Los datos se expresan como media±SEM de un n de 6-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 y ghrelina+LEAP-2.

5.2 EFECTOS SOBRE LA TERMOGÉNESIS Y EL AMARRONAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO

Debido al efecto sobre la termogénesis de LEAP-2 observado en apartados anteriores quisimos analizar si estas acciones se podían ver alteradas por el envejecimiento.

El análisis histomorfológico del TAM reveló unas gotas lipídicas más pequeñas en los ratones tratados con LEAP-2 (Fig. 37 a). Además, la masa del depósito de TAM en el momento del sacrificio es estadísticamente menor en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control (Fig. 37 b).

Para confirmar si el efecto en el tamaño de las gotas se correlacionaba con una mayor activación del TAM realizamos una inmunohistoquímica para UCP1 (Fig. 37 c) donde se observa un incremento de su expresión en los ratones tratados con LEAP-2. Además, ghrelina parecía seguir ejerciendo su efecto en animales envejecidos dado que había una disminución de UCP-1 en los tratados con ghrelina (Fig. 37 d).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

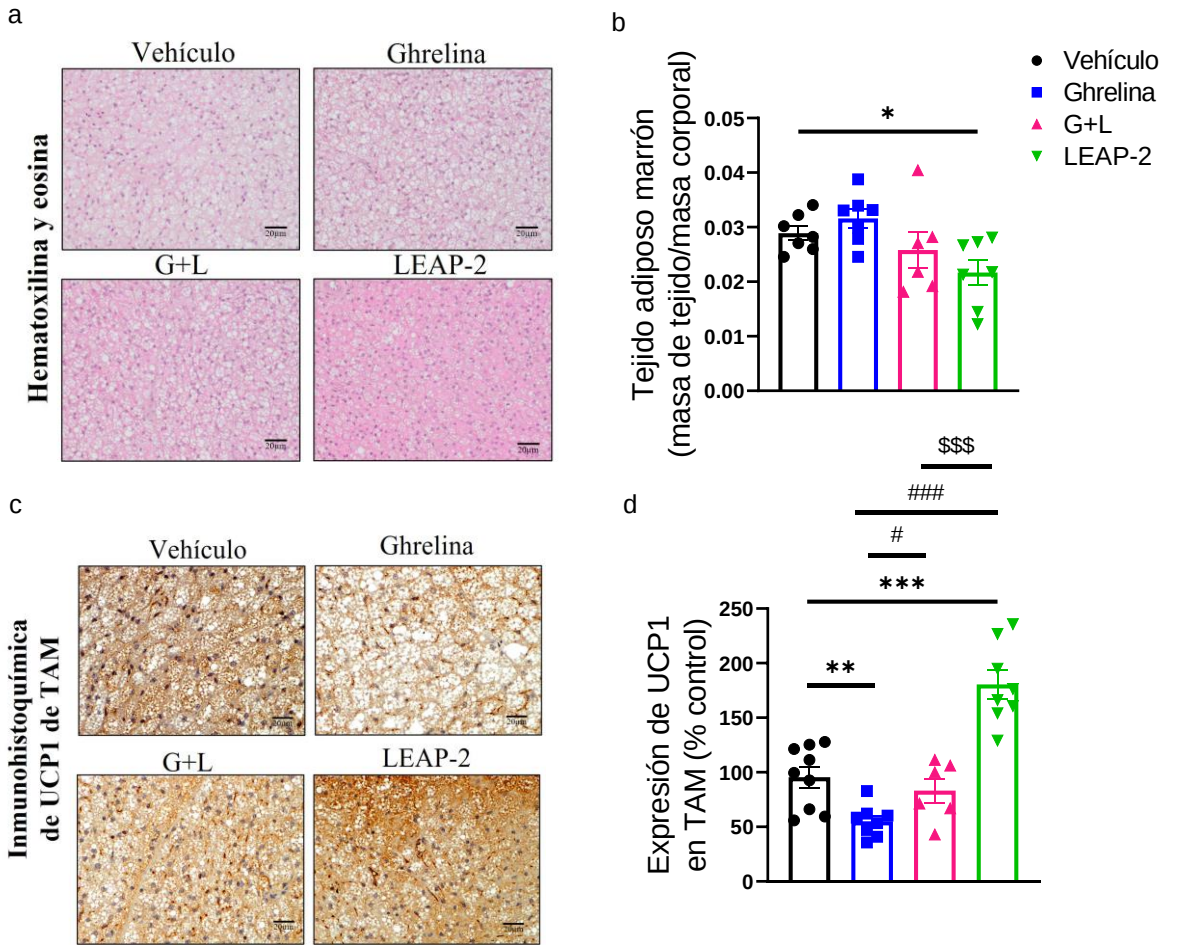


Figura 37. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina o co-tratamiento sobre el programa termogénico en el TAM en los ratones envejecidos. a) Tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del TAM en el momento del sacrificio, c) análisis inmunohistoquímico de UCP1 en TAM, d) semi cuantificación de la inmunohistoquímica de UCP1. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 6-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

Para ahondar en el posible mecanismo decidimos medir la expresión proteica de diferentes proteínas implicadas en el proceso de termogénesis. Tanto UCP1 como el receptor adrenérgico β3 estaban incrementados en los ratones tratados con LEAP-2, indicando una mayor actividad termogénica. Así mismo, también se genera un incremento de FGF21 que se sabe que promueve la activación de la actividad termogénica, junto con un incremento de Prdm16 y de PPARγ (Fig. 38 a). Corroborando este incremento mediante ARNm donde se confirma el incremento de expresión de *β3Adr* y de *PPARα* (Fig. 38 b).

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

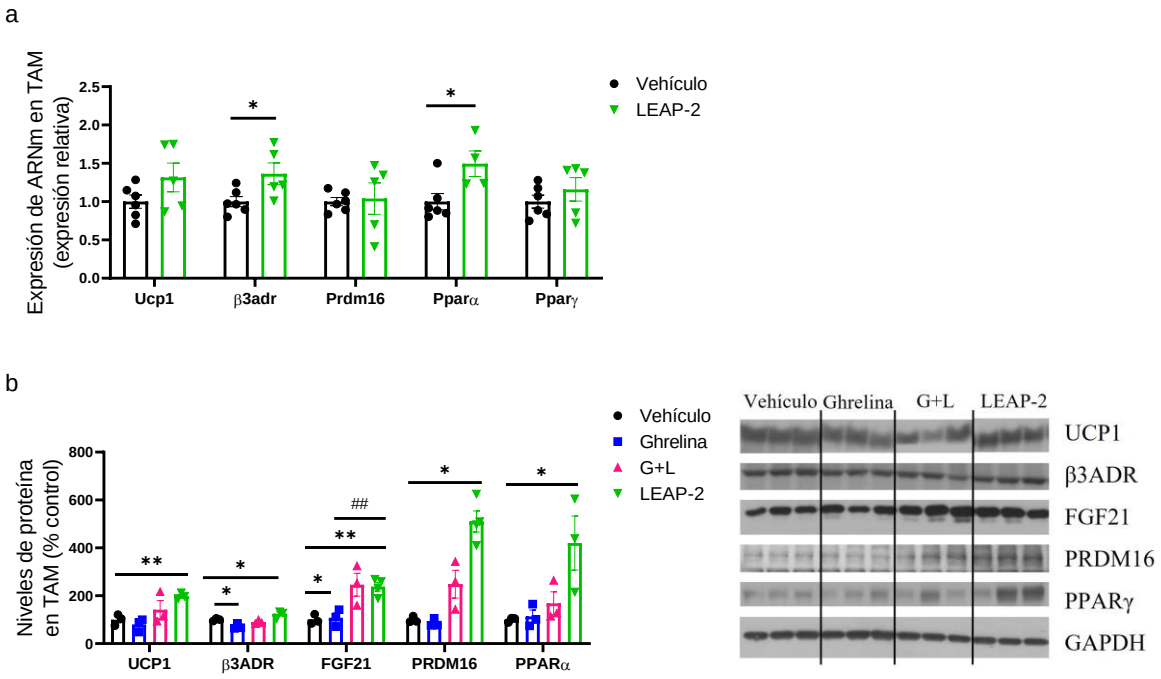


Figura 38. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina o co-tratamiento sobre el metabolismo del TAM de los ratones envejecidos. a) Expresión de ARNm de UCP1, ß3Adr, PRMD16, PPARα, PPARγ). b) cuantificación relativa de proteínas mediante western blot de proteínas relacionadas con la termogénesis (UCP1, ß3Adr, FGF21, PRMD16, PPARα, CIDEA) y las imágenes representativas, Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm, de un n 5-7 ratones por grupo. Los datos se expresan como media±SEM. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

La tinción hematoxilina y eosina de la sección adiposa reveló tamaños más grandes de adipocitos en los ratones tratados con ghrelina, mientras el tratamiento con LEAP-2 genera una disminución de su tamaño, además, los ratones en co-tratamiento con ghrelina y LEAP-2 disminuyen el tamaño del adipocito respecto a los tratados solo con ghrelina, asemejándose más los adipocitos a los de los ratones control (Fig. 39 a). Además, en cuanto a la masa del depósito graso en el momento del sacrificio, los ratones tratados con ghrelina presentan un incremento del depósito de TABsc respecto al control, mientras que los ratones tratados con LEAP-2 la masa del tejido no varía respecto al control, aunque si se aprecia que el contratamiento con ambos péptidos reduce la masa del tejido respecto a los ratones solo tratados con ghrelina (Fig. 39 b).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

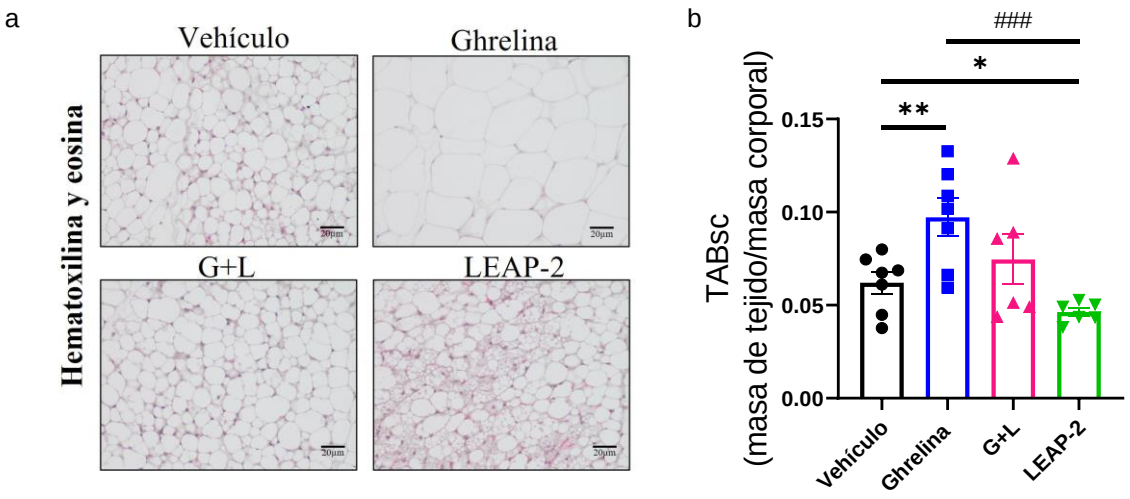


Figura 39. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina o co-tratamiento sobre el TABsc de los ratones envejecidos. Los cambios en los niveles de proteína están expresados en relación con el control de carga GAPDH. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

5.3 EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

En los ratones ancianos quisimos también explorar el efecto de LEAP-2 sobre la esteatosis hepática, para ello realizamos una primera comprobación con un análisis histológico del hígado, no encontrando una gran diferencia entre grupos (Fig. 40 a), no viendo tampoco grandes diferencias en la masa del órgano en el momento del sacrificio (Fig. 40 b).

Aun así, y dado a que si se observaban cambios en los lípidos circulantes en los ratones ancianos tratados con LEAP-2 decidimos analizar la cantidad de TG hepáticos y AG libres, así como la deposición de lípidos en el hígado medido mediante la tinción Oil red O (Fig. 40 c, d, e, f), y vimos que, el tratamiento con ghrelina genera un incremento de los TG hepáticos, junto con un incremento de los depósitos lipídicos en comparación con el grupo control, mientras que los ratones tratados con LEAP-2 mantienen sus niveles iguales al grupo control.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

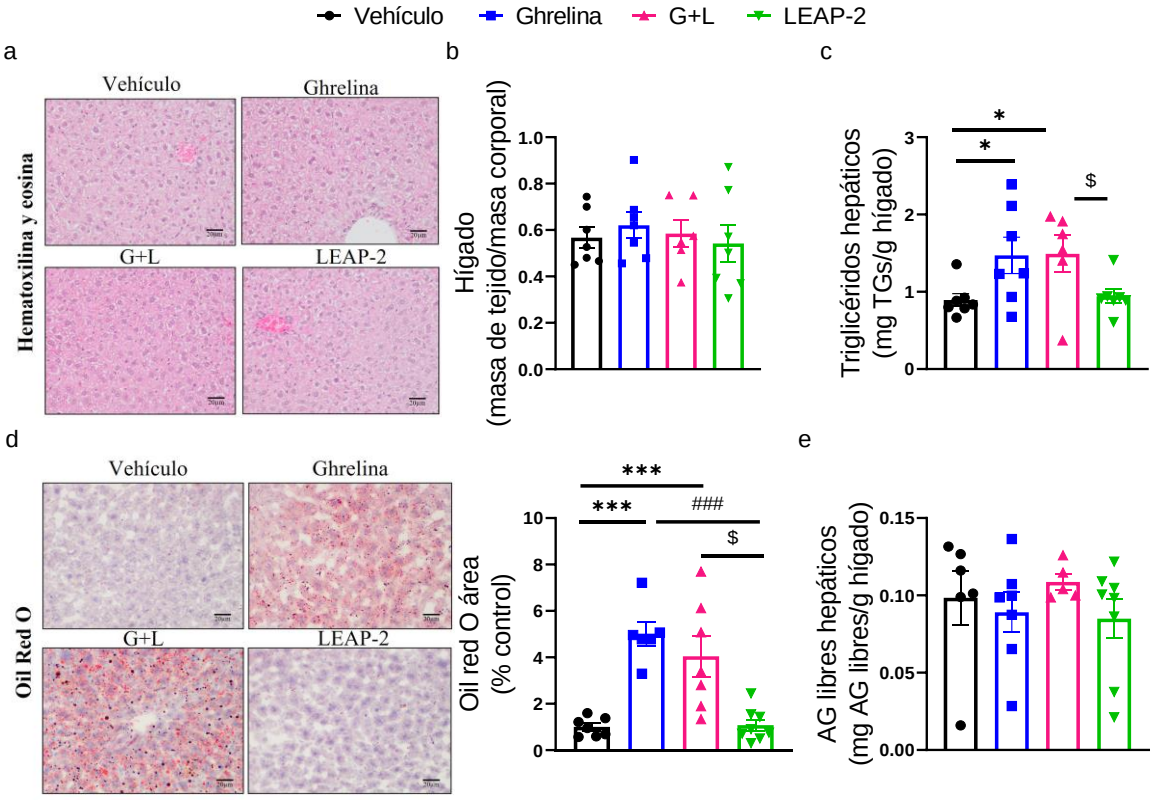


Figura 40. Efecto de la administración crónica ICV de LEAP-2 en el hígado sobre la acumulación de lípidos de ratones C57BL/6 envejecidos: a) tinción representativa de hematoxilina y eosina, b) masa del hígado en el sacrificio c) niveles de triglicéridos hepáticos d) tinción de Oil red O de secciones de hígado e) cuantificación de la tinción Oil red O, f) niveles de ácidos grasos libres hepáticos. Los datos se expresan como media±SEM de un n de 5-8 ratones por grupo. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y ghrelina; #p<0.05, ## p<0.01, ### p ≤ 0.001 entre ghrelina y ghrelina+LEAP-2; y $p<0.05, $$p<0.01, $$$p ≤ 0.001 entre LEAP-2 and ghrelina+LEAP-2.

Para ver si LEAP-2 en el envejecimiento podría tener alguna acción directa en el metabolismo lipídico hepático, se ha analizado a nivel transcripcional la expresión de los niveles de ARNm de factores implicados en la lipogénesis de novo, encontrando un claro descenso en la expresión de FAS en los ratones tratados con LEAP-2 respecto al control, sin cambios en los demás marcadores (Fig. 41).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

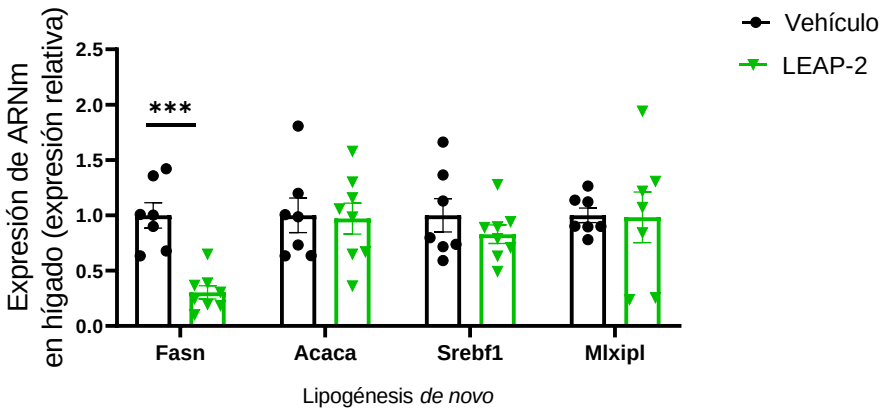


Figura 41. Efecto del tratamiento central con LEAP-2, ghrelina o co-tratamiento sobre el metabolismo lipídico hepático en los ratones envejecidos. Expresión de ARNm de: Fasn, Acaca, Srebf1, Mxipl. Se empleó HPRT para normalizar los niveles de ARNm, de un n 7-8 ratones por grupo. Los datos se expresan como media±SEM. Tras aplicar el T-test: * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001 entre los grupos vehículo y LEAP-2.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El descubrimiento de ghrelina en 1999 como ligando endógeno del receptor GHSR1a fue un hito, sentando las bases sobre las cuales se trató de buscar un sentido fisiológico al sistema ghrelina-GHSR1a. Ghrelina juega un papel clave en la ingesta de alimentos, está bien documentado su acción como hormona orexigénica y sus efectos están mediados por neuronas que expresan los neuropéptidos NPY/AgRP y POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo (160). Además, la administración tanto central como periférica de esta tiene efectos sobre el metabolismo lipídico, generando un aumento de la adipogénesis y la lipogénesis, y disminuyendo la lipólisis (40). Así mismo, ghrelina tiene también efectos sobre la regulación de la termogénesis (184), el metabolismo de la glucosa (221) y la liberación de GH (181) entre otros. En términos generales es ampliamente aceptado que no solo ghrelina es importante, sino que todos los componentes del sistema de ghrelina (GHS-R, GOAT…) juegan un papel fisiológico en la homeostasis energética, y que todos ellos son clave en su efecto fisiológico.

Aunque todos estos aspectos son sin duda relevantes ninguno supuso un cambio de paradigma tan importante como el descubrimiento de la actividad de LEAP-2 como un antagonista endógeno no competitivo del receptor GHSR1a por Ge y colaboradores en 2018 (193). Este hallazgo hizo que el sistema clásico de ligando receptor se transformara en una triada (ghrelina-GHSR1a-LEAP-2) (194–196,222). Esto generó muchas expectativas y ha fomentado la investigación emergente sobre el potencial de LEAP-2 como una posible diana terapéutica anti-obesidad, pero también han surgido muchas preguntas sin respuesta. Hasta el momento, los datos in vivo disponibles son bastante escasos (193,195,196,203), por lo tanto, nuestro propósito en esta tesis fue tratar de esclarecer algunos efectos de LEAP-2, tanto a nivel fisiológico como en circunstancias patológicas.

Los niveles circulantes y la expresión hepática de LEAP-2 está regulada por el estado nutricional.

Debido a que LEAP-2 se describe como un antagonista de ghrelina, es importante poner de manifiesto la regulación de ghrelina por el estado nutricional para poder caracterizar los niveles de LEAP-2 como potencial biomarcador en distintas situaciones fisiopatológicas. Son varios los factores metabólicos que controlan la secreción de ghrelina en el estómago y ha sido descrito que los niveles circulantes de ghrelina se ven regulados por el estado nutricional, incrementándose con el ayuno tanto los niveles circulantes como la expresión de ARNm de ghrelina gástrica en ratones y ratas (125,223,224) y descendiendo después de una comida en varios animales de experimentación y humanos (125,127) lo que indica una mayor síntesis y liberación del péptido a la circulación regulado mediante la alimentación (223,224). Recientes publicaciones científicas describen una relación opuesta de LEAP-2 respecto a ghrelina en cuanto a los niveles circulantes, ya que los niveles de LEAP-2 disminuyen en ayunas tanto en roedores como en humanos (193,195,196), disminuyendo también los niveles circulantes tras cirugía de bypass gástrico o gastrectomía de manga vertical (196).

Debido a que el hígado es el lugar donde se sintetiza en mayor medida LEAP-2 nos ha parecido relevante estudiar si la expresión de ARNm de LEAP-2 hepática se veía también regulada por el estado nutricional. En este trabajo se demuestra que, la expresión de LEAP-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

hepática se regula en el ayuno en diferentes modelos de roedores, disminuyendo respecto a los controles, corroborando lo que hay actualmente descrito en la literatura en cuanto a los nivel es circulantes (195,196). Por otro lado, y dado que la expresión de LEAP-2 se ve afectada por el déficit energético nos preguntamos qué ocurriría en un modelo de exceso energético como es el caso de ratones alimentados con HFD. En este contexto nuestros hallazgos muestran que, tanto los niveles circulantes de LEAP-2 como la expresión hepática se ve incrementada, concordando con la información publicada hasta el momento sobre los niveles plasmáticos de LEAP-2 en ratones DIO y en personas con obesidad, en los cuales los niveles de LEAP-2 se ven incrementados (196,225), al revés de lo que ocurre con los niveles circulantes de ghrelina en estos modelos (126,127).

Debido a que LEAP-2 es generado en hígado, quisimos investigar si el estado nutricional podría condicionar también la expresión de LEAP-2 directamente en hepatocitos, empleando para ello las líneas celulares humanas HepG2 y THLE-2. En ambas líneas celulares, en un contexto de restricción energética, observamos una disminución de la expresión de ARNm de LEAP-2. Así mismo, imitando un exceso energético mediante la adicción al medio de ácido oleico se observa un incremento de la expresión hepática de ARNm de LEAP-2. Esto indica que, ambos estados nutricionales afectan directamente a las células hepáticas, sin que medie ningún tipo de acción hipotalámica central.

Por lo tanto, el primer hallazgo relevante fue que, los efectos vistos en los niveles circulantes tanto en modelos de déficit energético como de superávit se correlacionan con los niveles de expresión hepática en el hígado. Podemos, por tanto, extraer de nuestra investigación que el estado nutricional modula tanto la expresión hepática como la secreción de LEAP-2.

Por otro lado, se conoce que, no solo las dietas ricas en grasa son causantes de MAFLD, sino que las dietas ricas en fructosa también generan esteatosis en el hígado (226). En esta línea, nuestros hallazgos muestran que, con una dieta rica en fructosa (60 %), los niveles circulantes y la expresión hepática de LEAP-2 se ven incrementados, pero esto solo ocurre en los ratones macho, sin encontrar en las hembras ninguna diferencia entre las alimentadas con dieta estándar y las alimentadas con dieta en fructosa, ni en los niveles circulantes ni en la expresión hepática. Se sabe que existe un dimorfismo sexual en la respuesta a la acumulación hepática de lípidos y que, las proteínas hepáticas implicadas, tanto en el metabolismo de la glucosa, como en el metabolismo los lípidos, se regulan de forma diferente entre sexos (227–229). Así mismo, en las hembras, el control del metabolismo energético es complejo e implica la interacción entre las hormonas ováricas, como el estrógeno y la progesterona, y las hormonas metabólicas. Se sabe que los estrógenos poseen un efecto protector frente a la obesidad y el desarrollo de MAFLD (226). Para evaluar si la diferencia hallada en las hembras alimentadas con la dieta rica en fructosa podría deberse a los estrógenos, se realizó un experimento con ratones hembra ovarectomizadas para generar un modelo carente de estrógenos. Sin embargo, no vimos ninguna diferencia en los niveles circulantes ni en la expresión hepática de LEAP-2 en las hembras sometidas a OVX frente al grupo control "*Sham"*, ni en el grupo con una alimentación estándar, ni en el grupo alimentado con fructosa, por lo tanto, la síntesis y liberación de LEAP-2 no se ve afectada por las hormonas sexuales ováricas.

No es de extrañar que exista un dimorfismo sexual en los niveles circulantes de LEAP-2. Ya se conocía que los niveles de ghrelina sufren dimorfismo sexual, con niveles basales más elevados en hembras que en machos (230). Además, un estudio reciente en niños y adolescentes reporta la existencia de dimorfismo sexual en los niveles plasmáticos de LEAP-2 (199); sin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

olvidar que el hígado presenta un notable dimorfismo sexual en la expresión de distintos genes. Sin embargo, más estudios serían necesarios para poder esclarecer esta diferencia en cuanto a la dieta rica en fructosa y los niveles circulantes de LEAP-2.

En resumen, estos datos indican que los efectos vistos en los niveles circulantes tanto en modelos de déficit energético como de superávit, así como los estudios de la influencia de distintos tipos de dietas, se correlacionan con los niveles de expresión hepática en el hígado. El hecho de que los cambios observados in vivo sean replicables en modelos in vitro, aún con todas las limitaciones inherentes, indica que los cambios observados en los niveles circulantes de LEAP-2 muy posiblemente reflejan cambios hepáticos. Estudios futuros con silenciamiento génico de la expresión hepática de LEAP-2 son necesarios para confirmar esta hipótesis.

En ratones, el tratamiento central con LEAP-2 incrementa el gasto energético y activa el programa termogénico/la termogénesis adaptativa en el TAM.

Debido a que el hipotálamo es la región más destacada en el control del metabolismo energético (5,6), y dada la relevancia de la comunicación entre los principales órganos implicados en el balance energético, el presente estudio se llevó a cabo mediante una combinación de análisis fenotípicos en términos de ingesta de alimentos y gasto energético combinados con análisis moleculares e histológicos de diferentes tejidos involucrados en la homeostasis energética.

Lo que se conoce sobre el efecto de LEAP-2, se centra en estudios de tratamiento de administración periférica o central (ICV), pero solo de forma aguda. En estos estudios se muestra que el tratamiento con LEAP-2 disminuye la ingesta en roedores y humanos (193,195,196,200,204), pero sus efectos en experimentos a más largo plazo aún no han sido descritos.

En esta tesis se demuestra que, la administración central crónica de LEAP-2 en el ventrículo lateral no solo disminuye la ingesta, sino que disminuye la masa corporal, así como la adiposidad, reflejada por un descenso en los niveles plasmáticos de leptina. Así mismo, mejora el perfil lipídico plasmático, disminuyendo los niveles circulantes de colesterol, TG y AG libres. Además, cuando se coadministran LEAP-2 y ghrelina, LEAP-2 mejora los efectos orexigénicos y obesogénicos de ghrelina. Estos efecto metabólicos de LEAP-2 son debidos en parte a un incremento en el gasto energético, sin modificación de la actividad locomotora.

Para explorar si ese incremento en el gasto energético podría ser dependiente de un incremento en la termogénesis, decidimos realizar un análisis histomorfológico y molecular de distintos biomarcadores de activación del TAM el cual es el principal tejido donde se lleva a cabo el proceso de la termogénesis, disipando el exceso de energía en forma de calor. Se sabe que tanto la activación de la termogénesis en TAM como la inducción de adipocitos “beige” en el TAB, proceso conocido como amarronamiento, tienen un impacto relevante en el balance energético total tanto en roedores como en humanos (90,101,231,232).

El primer hallazgo relevante fue que, en los ratones tratados con LEAP-2 veíamos una menor masa del TAM respecto al control e incremento de la expresión de *UCP1* cuantificado mediante inmunohistoquímica, y de los niveles de ARNm como *UCP1, β3Adr, PPARγ*, y marcadores proteicos del programa termogénico en TAM, como UCP1, Prdm16 y PPARγ. Así mismo, se han visto incrementados cuatro de los cinco complejos mitocondriales, junto con un incremento de la expresión de *PPARα*, factor de transcripción implicado en la activación de la β-oxidación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Si tenemos en cuenta que LEAP-2 es un antagonista del receptor GHSR1a, los resultados hasta ahora descritos sobre activación de marcadores termogénicos concuerdan con lo mencionado por la bibliografía. Se conoce que el tratamiento crónico con ghrelina genera una disminución de la expresión del ARNm de *UCP1* en el TAM en ratones (182–184) y que suprime la liberación de NE mediada por vía vagal en el TAM (185,186). Además, la ablación del receptor GHSR1a posee efectos beneficiosos sobre la termogénesis, aumenta el gasto de energía y la tasa metabólica, incrementa la expresión de β3Adr en TAM, todo ello independientemente de la ingesta de alimentos o la actividad física (182,187).

El estudio de fenotipado metabólico en condiciones de termoneutralidad no mostró cambios en el gasto energético, aunque si se mantuvo la disminución de la ingesta y la pérdida de masa corporal de los ratones tratados con LEAP-2, lo que sería compatible con la propuesta de que el incremento del gasto energético producido por LEAP-2 se debe al efecto de la termogénesis.

Para seguir ahondando en el efecto de LEAP-2 sobre el gasto energético, exploramos que ocurría con el TAB. Los adipocitos "beige" comparten algunas características comunes con los adipocitos marrones, como el alto contenido de mitocondrias y la expresión de la proteína UCP1, que pueden inducirse en el TAB (90,92). Este amarronamiento del TAB se ha relacionado con una disminución de la adiposidad en roedores y humanos (45). Además, se ha demostrado en roedores que la estimulación termogénica promueve la reducción del colesterol en ratones (233).

Nuestros hallazgos muestran que el metabolismo del tejido adiposo blanco se ve influenciado por la administración crónica ICV de LEAP-2, generando esta una disminución de la masa de los depósitos de grasa del TABsc, junto con una disminución del tamaño de los adipocitos, y con un incremento en la expresión de UCP1 por inmunohistoquímica junto con el incremento de la expresión de varias proteínas termogénicas como UCP1, β3Adr, FGF21 y PPARγ. Observándose el efecto opuesto en los ratones tratados con ghrelina, esto es, promoviendo la acumulación de lípidos, como ya ha sido descrito numerosas veces en diversos estudios (163,164,167). Continuando con la evaluación de la importancia del efecto de LEAP-2 sobre el TAM vemos que el tratamiento con LEAP-2 es capaz de ayudar a mantener la temperatura corporal bajo el estrés por frío agudo, lo que indica una mayor activación termogénica para la adaptación a cambios relacionados con disminución de la temperatura.

El efecto de ghrelina sobre el tejido adiposo (TAM y TAB) actuando a través del SNC (182–186) está bien descrito, así como el efecto opuesto cuando se realizan estudios de ablación del receptor GHSR1a, en los que aumenta el gasto de energía y la tasa metabólica, con un incremento de la expresión del receptor β3 adrenérgico (β3Adr) en TAM, todo ello independientemente de la ingesta de alimentos o la actividad física (182,187). Sin embargo, hasta ahora, no se había descrito el posible efecto directo del sistema de ghrelina sobre este tejido in vitro.

Para ver si LEAP-2 podría actuar directamente sobre los adipocitos, se realizó un cultivo primario de adipocitos de ratón, que reveló que, además del efecto central, el tratamiento con LEAP-2 afecta directamente sobre el TABsc, fomentando un amarronamiento del tejido con incremento en la proteína termogénica UCP1, tanto cuando se realiza el tratamiento durante la diferenciación, como con el tejido ya totalmente diferenciado, en el cual se incrementa también la expresión de CPT1α, enzima clave en el transporte de AG a la mitocondria para su β-oxidación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estos efectos que aquí describimos de LEAP-2 sobre un cultivo de TAB podrían estar directamente mediados por acción directa sobre el receptor GHSR1a, inhibiendo la actividad constitutiva del receptor, y por ello generando un efecto similar a lo que se observa en los estudios en los que realizan una ablación del receptor (182,185,187,188) Además, esta hipótesis concuerda con los estudios que existen en ratones, en los que se observa que la presencia del receptor GHS-R es necesaria para la acción de LEAP-2 (204). Por tanto, con la salvedad de que estos experimentos se realizan sobre un sistema completo y complejo como es un animal y no sobre un cultivo celular, podríamos concluir que el efecto observado sobre los adipocitos se debería a la acción de LEAP-2 sobre el receptor GHSR1a, aunque, claramente, esta teoría debería ser probada mediante experimentos complementarios en los que se replicase el experimento empleando adipocitos de ratones KO para el receptor de GHS-R.

Por otro lado, hemos decidido explorar el tratamiento con LEAP-2 como diana terapéutica en un modelo de obesidad inducida por la dieta, ya que se ha demostrado que el aumento de la termogénesis y la actividad del TAM protege a los roedores de padecer obesidad cuando son alimentados con dietas hipercalóricas (234,235) Así mismo, en ratones obesos, se ha visto que la ablación del receptor GHSR1a protege a los ratones de la obesidad inducida por la dieta (166,188).

Como ya ha sido mencionado anteriormente, el efecto orexigénico de ghrelina se ve afectado en animales obesos, sin embargo, su efecto adipogénico persiste (158,167,169). No se conoce con claridad cual es el motivo por el cual se genera la resistencia central al efecto de ghrelina en ratones con obesidad, pero los ratones tratados con LEAP-2 parecen sufrir también cierta resistencia al efecto central en cuanto a la masa corporal, aunque en nuestro modelo existe un muy modesto descenso en la ingesta, pero este no va acompañado de cambios ni en los niveles de leptina ni en los niveles plasmáticos de lípidos circulantes. Y tampoco somos capaces de observar ningún cambio en el gasto energético ni en la actividad locomotora. Si bien es cierto que en este estudio falta la medición de la composición corporal mediante resonancia magnética, debido a que los elementos que se emplean en este procedimiento ICV son incompatibles con el funcionamiento del aparato de resonancia, y por ello los datos de gasto energético y actividad locomotora se corrigen por la masa corporal total y no por la masa magra, lo cual podría estar generando alguna distorsión en el proceso de análisis de los datos, sobre todo en el análisis de los datos de los ratones obesos.

Debido a que el factor común de ghrelina y LEAP-2 es el receptor GHSR1a, estos datos nos hacen plantearnos que esta resistencia existente en modelos de obesidad pueda ser debida a una reducción de la expresión del receptor GHS-R en el hipotálamo, lo que generaría una menor sensibilidad al efecto de ambos péptidos, como ya se había postulado en algún estudio (158,236). Además ya se ha descrito que el correcto funcionamiento del receptor es clave para las acciones de ambas hormonas (204). Aunque esta es una posible explicación tampoco se puede descartar que pueda estar también influenciado por otros factores como un menor transporte a través de la BHE o una reducción de la expresión de AgRP y NPY, así como una inflamación hipotalámica durante la obesidad (237,238), sin embargo, el verdadero mecanismo molecular aún no ha sido esclarecido.

Al igual que el efecto adipogénico de ghrelina se mantiene en la obesidad, nosotros observamos que con el tratamiento de LEAP-2 se mantiene el efecto sobre TAM, con una menor masa de ese tejido, y un incremento de la expresión de *UCP1* en este tejido, acompañado de un incremento en la expresión de ARNm junto con un incremento en la expresión proteica de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

marcadores termogénicos como UCP1 y β3Adr. Vemos también un incremento en la expresión de ARNm de *PPARα*, sin ver cambios significativos en los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Sin embargo, en este modelo de obesidad, no se observa que LEAP-2 genere amarronamiento del TABsc, no vimos cambios ni en la masa del tejido ni en el tamaño de los adipocitos, por lo que no se continuó con otro tipo de estudios más en profundidad.

Las acciones descritas hasta el momento en la bibliografía para la LEAP-2 sobre el metabolismo estaban sobre todo relacionadas con su efecto sobre la ingesta. Nuestro trabajo demuestra por primera vez que la administración central de LEAP-2 puede tener implicaciones terapéuticas, al disminuir la masa corporal como consecuencia de un incremento en el gasto energético y de la actividad termogénica del TAM, todo ello mediado a través de su acción sobre el receptor GHSR1a en el hipotálamo, aunque habría que resolver la posible resistencia que existe a su efecto en la obesidad.

Por tanto, ésta es la primera vez que se describe el efecto de la hormona LEAP-2 sobre el gasto energético y la termogénesis mostrando la importancia de su acción a través de mecanismos centrales, pero también de forma periférica, regulando la cascada de señalización termogénica en TAM y el amarronamiento del TABsc. Sin embargo, somos conscientes que el valor traslacional de este hallazgo a la obesidad humana es en cierto modo dependiente de que se mantuviese en condiciones de termoneutralidad. El estudio de fenotipado metabólico en condiciones de termoneutralidad no mostró cambios en el gasto energético, aunque si se mantuvo la disminución de la ingesta y la pérdida de masa corporal de los ratones tratados con LEAP-2, indicando que el incremento del gasto energético producido por LEAP-2 es temperatura-dependiente. Esto es relevante dado que se asume que en la mayoría de las sociedades desarrolladas los sujetos suelen estar en situaciones de termoneutralidad.

LEAP-2 disminuye la acumulación hepática de lípidos

Alguna publicación ya había postulado la posibilidad de la implicación de LEAP-2 en el metabolismo lipídico periférico (197). Además, se sabe que el tratamiento central con ghrelina afecta al metabolismo lipídico hepático, incrementando la LDN e induciendo la esteatosis hepática mediante el incremento del número de gotas lipídicas, y aumentando la captación y por tanto el contenido de TG hepáticos de una forma GHSR1a dependiente (162,164).

El proceso mediante el cual se produce la acumulación de lípidos en los hepatocitos es inducida por la alteración del equilibrio entre la lipogénesis de novo (LDN) y la lipólisis de TG/oxidación de ácidos grasos (239). Como ya se ha mencionado en la introducción, se conoce que ghrelina en estados fisiológicos genera un incremento en la acumulación de lípidos hepáticos incrementando la LDN (Fas, ACC…) mientras que la expresión de CPT1α, gen que controla el paso limitante en la velocidad en la β-oxidación, se reduce, generando el incremento del número de gotas lipídicas y el contenido de TG hepáticos de una forma GHSR1a dependiente (162).

En este contexto, encontramos que la administración crónica de LEAP-2 en el ventrículo lateral (ICV) durante 7 días, es capaz de disminuir la acumulación de gotas lipídicas en el hígado, efecto contrario al observado con la administración central de ghrelina. Además, la coadministración de ghrelina+LEAP-2 también genera una disminución de esta acumulación en comparación con el grupo solo tratado con ghrelina. A nivel molecular, el tratamiento con LEAP-2 disminuye la expresión de ARNm de enzimas que promueven el almacenamiento de

grasa mediante la LDN, como *Fasn, Mlxipl* y *Scd1*, sin encontrar diferencias en los transportadores lipídicos hepáticos (*Nr1h2* (Lxr*), Ldlr, Mttp*). A su vez, el tratamiento con LEAP-2 incrementa la expresión de proteínas implicadas en la lipólisis de TG y la β-oxidación de ácidos grasos como PGC1α, PRDM16, PPARα y CPT1α. Por lo tanto, una disminución de la generación de lípidos, acompañada de un incremento en su oxidación pueden ser el mecanismo por el cual LEAP-2 favorece la disminución de la acumulación lipídica hepática. Estas observaciones muestran un claro efecto antagónico de LEAP-2 a nivel hepático respecto a las acciones de ghrelina sobre este tejido, en cuanto al metabolismo lipídico.

A menudo la esteatosis hepática se acompaña de procesos inflamatorios, en este contexto nuestro hallazgos muestran que el tratamiento central ICV con LEAP-2 genera una reducción de marcadores de inflamación hepática como *TNFα*, y una reducción también en dos marcadores de activación/infiltración de macrófagos *Mac2* y *Adgre1* (*F4/80)*, lo que indica una disminución de la inflamación en el hígado,

En cuanto al modelo de ratones con obesidad inducida por la dieta, sabemos que la obesidad provoca dislipidemia en el organismo, generando la activación de la LDN, un aumento de la gluconeogénesis y la reducción de la exportación de TG, eventos que finalmente terminan en el desarrollo de esteatosis hepática e incluso estadios más avanzados de MAFLD. Como ya se ha mencionado antes, ghrelina induce a la acumulación de lípidos favoreciendo la adiposidad, y en el hígado, fomenta la LDN disminuyendo a su vez la lipólisis (162,164,240) incremento del número de gotas lipídicas y el contenido de TG hepáticos de una forma GHSR1a dependiente (162). Sin embargo, pese a que, si favorece la aparición de la esteatosis hepática, varios artículos postulan que ghrelina podría tener un papel hepato-protector frente al avance de la enfermedad de MAFLD hacia una fibrosis, previniendo el proceso inflamatorio hepático, mejorando la función hepática, el estrés oxidativo, e incluso la apoptosis y muerte celular (241–243).

El efecto del tratamiento crónico central ICV de LEAP-2 en los ratones DIO sobre el hígado no es del todo claro. En estos ratones obesos, no vemos ningún cambio en el colesterol plasmático, aunque si se aprecia una leve reducción estadísticamente significativa en la acumulación de gotas lipídicas en el hígado, pero no va acompañada de reducción del contenido en TG hepáticos, y se incrementan los AG libres en los ratones tratados con LEAP-2. A nivel metabólico, valorando la expresión de ARNm de enzimas claves en la LDN lo que observamos es un incremento de *Acaca, Mlxipl* y *Srebf1* sin observar cambios en marcadores de β oxidación hepáticos (*PGC1a, Prdm16, PPARα, CPT1a*). Aunque si se mantiene cierto efecto beneficioso sobre la inflamación hepática, disminuyendo los marcadores de infiltración de macrófagos *Mac2* y *Adgre1* (*F4/80)*. Como ya se ha mencionado más arriba, en el modelo de obesidad existe cierta resistencia al efecto de LEAP-2 al igual que ocurre con ghrelina, por ello no es de sorprender que no se observen cambios a nivel metabólico hepático. Esto puede ser debido a que el metabolismo lipídico hepático este ya saturado, es decir, haya una acumulación tan grande de lípidos debido al efecto de la dieta, que un tratamiento de solo una semana no es capaz de revertir un daño tan fuerte.

Sin embargo, referente a este tema, existe ya un reciente estudio que postula lo contrario a lo que se expone en este trabajo, si bien, el enfoque metodológico es distinto. Ma y colaboradores generan un ratón KO para LEAP-2 mediante la inyección de un lentivirus shRNA por la vena de la cola en ratones DIO, pero emplean exclusivamente hembras. Ellos demostraron que el ratón KO para LEAP-2 mejoraba la esteatosis inducida por la dieta,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

disminuyendo la acumulación de TG hepáticos, atenuando la LDN, e incrementando la oxidación de AG. Sus resultados sugieren que LEAP-2 podría agravar la esteatosis al desequilibrar la lipogénesis de novo y la lipólisis de TG/oxidación de ácidos grasos. Este estudio, propone a LEAP-2 como un marcador de MAFLD y que habría que bloquear a esta hormona para mejorar estadios de esteatosis hepática (225).

A pesar de esta discrepancia, nuestros resultados obtenidos en nuestro modelo de ratón se relacionan en gran parte con los datos obtenidos en aquellos estudios donde se inhibe ghrelina o antagoniza el receptor GHSR1a, proponiendo que LEAP-2 central posee un claro efecto sobre el metabolismo lipídico hepático, promoviendo una disminución de la acumulación de lípidos hepáticos, mediante la disminución de la LDN junto con un incremento en la oxidación de AG. Dado que en su conjunto estos datos apuntaban a una potencial discrepancia entre los efectos de LEAP-2 a nivel central y directamente en el hígado sobre el proceso de esteatosis decidimos llevar a cabo un estudio in vitro.

El tratamiento con LEAP-2 en células hepáticas humanas reduce la acumulación lipídica.

Para confirmar los datos obtenidos en el modelo preclínico de ratón, y dado que LEAP-2 se genera en el hígado, decidimos explorar el papel de LEAP-2 directamente sobre el metabolismo lipídico en una línea celular hepática humana HepG2. Esta línea celular ya ha sido empleada en otros estudios con ghrelina (242) y aunque hay controversia sobre si expresan o no el receptor GHSR1a (244,245), nuestros datos demostraron que las células HepG2 no solo expresan LEAP-2 sino que son capaces de liberarlo al medio de cultivo y que su concentración en el medio se incrementa de manera exponencial con el tiempo.

Se sabe que el tratamiento con ghrelina genera en el hígado el incremento del número de gotas lipídicas y el contenido de TG hepáticos de una forma GHSR1a dependiente (162). Al explorar que ocurría con la acumulación de lípidos en esta línea celular, hemos visto que el tratamiento con LEAP-2 (0,1 nM) durante 3 h de tratamiento, genera una menor acumulación de lípidos citoplasmáticos, que había sido previamente inducida mediante la adicción de ácido oleico (1 mM, 24 h). Al explorar el mecanismo molecular que podría estar involucrado en este efecto lipolítico a nivel hepático, se observó que, el tratamiento con LEAP-2 es capaz de reducir la expresión marcadores de expresión génica implicados en la lipogénesis de novo (*FASn y MLXIPL*) así como en la gluconeogénesis o producción de glucosa hepática (*PCK-1 y G6PC*), así como el gen del transportador de glucosa, *SLC2A2,* en condiciones estándar. Además, se produce un incremento de la expresión proteica en las células hepáticas de las principales moléculas implicadas en procesos de β-oxidación de ácidos grasos (CPT1a, Prdm16 y PPARα). Así, el tratamiento con LEAP-2 parece generar una disminución de la acumulación lipídica hepática. mediante la disminución en la LDN, junto con una menor gluconeogénesis y captación de glucosa como sustrato metabólico, lo cual favorece que se emplee la oxidación de lípidos como forma de generar energía,

Seguidamente, en la misma línea celular, se generó una condición que mimetizaba la esteatosis hepática, empleando ácido oleico (1 mM, 24 h), que induce una acumulación de lípidos citoplasmáticos en los hepatocitos. En este modelo, donde ya se observaba mediante la tinción Oil red O la disminución de gotas hepáticas con el tratamiento de LEAP-2, se observa a nivel molecular que esta reducción va acompañada de una, disminución de marcadores clave de la LDN como (*FASn, ACACA, SREBF1, MLXIPL*), así como de la gluconeogénesis y la captación de glucosa (*PCK-1, G6PC*, *SLC2A2*).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Para ver si estos efectos podían ser revertidos, se realizó un silenciamiento de LEAP-2 empleando si-ARN. Este silenciamiento causa un incremento en la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en los hepatocitos, efectos opuesto a aquello que vemos cuando las células son tratadas con LEAP-2.

Nuestros resultados obtenidos en la línea celular de hepatocitos humanos HepG2 se relacionan en gran parte con los datos obtenidos en el modelo de tratamiento central ICV en ratones, y demuestran por primera vez la implicación directa de LEAP-2 sobre el hígado. Los hallazgos nos hacen pensar que LEAP-2 si pueda ejercer una acción directa sobre el hígado, jugando un papel importante como posible diana terapéutica en el desarrollo de la esteatosis hepática/MAFLD, al menos en estadios iniciales de la enfermedad.

LEAP-2 en el envejecimiento

El envejecimiento se asocia con una pérdida de masa magra que, a menudo, se acompaña de un aumento de la masa grasa corporal (246). El sistema de ghrelina también está implicado en gran medida en el envejecimiento, y tanto ghrelina como GHSR1a tienen funciones importantes en la obesidad asociada con la edad, la RI y la DM2. Por todo ello, como estudio complementario a lo que ya se había explorado en esta tesis doctoral, hemos decidido analizado las posibles implicaciones de LEAP-2 en el envejecimiento en relación con el metabolismo energético en tejidos y órganos metabólicos clave.

En cuanto a niveles plasmáticos, en ancianos sanos normopeso los valores de ghrelina son tan bajos como los de los jóvenes obesos, y significativamente inferiores a los de los jóvenes no obesos (130). Nuestros hallazgos muestran que, en ratones envejecidos tanto los niveles plasmáticos de LEAP-2 como los niveles de expresión hepática se encuentran incrementados en comparación con individuos jóvenes.

El tratamiento crónico de LEAP-2 en el ventrículo lateral disminuyo la masa corporal sin modificar la ingesta, así como la adiposidad, reflejada por un descenso en los niveles plasmáticos de leptina. Además, el tratamiento con LEAP-2 mejora el perfil lipídico plasmático, con niveles circulantes más bajos de colesterol y TG. Además, también se observa una mejora de los efectos orexigénicos y obesogénicos de ghrelina cuando se coadministran LEAP-2 y ghrelina.

Debido al efecto de LEAP-2 tan claro sobre la termogénesis observado hasta ahora, quisimos analizar si estas acciones se podían ver alteradas por el envejecimiento. El envejecimiento se asocia con una función termogénica atenuada (115,247), que contribuye a la obesidad asociada a la edad y al desequilibrio energético. Se conoce que, en ratones ancianos la supresión de la señalización de ghrelina mejora la capacidad termogénica. Además, la ablación del receptor de ghrelina activa la cascada de señalización termogénica y mejora la dinámica mitocondrial en el TAM de ratones de edad avanzada (189).

Al analizar la masa del depósito de grasa del TAM vimos que, en los ratones tratados con LEAP-2, existía una disminución de masa del depósito graso, junto con un incremento en la expresión de *UCP1*. A nivel molecular, se observa que el tratamiento con LEAP-2 genera un incremento de los niveles de ARNm del receptor *β3 adrenérgico*, así como de *PPARα*. A nivel proteico hay un incremento de la expresión de UCP1, junto con otras proteínas relacionadas con la termogénesis como β3Adr, FGF21, Prdm16 y PPARα.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ahondando sobre un posible efecto de amarronamiento, los ratones tratados con LEAP-2 presentan una reducción de la masa del depósito adiposo el TABsc, y además las histologías muestran un tamaño de adipocito menor en los ratones tratados con LEAP-2.

En cuanto a los efectos hepáticos, se sabe que la ablación del receptor GHSR1a atenúa la esteatohepatitis en ratones envejecidos, con un contenido lipídico menor, (248). Sin embargo, nuestros ratones envejecidos tratados con LEAP-2 no presentan diferencias respecto al control en cuanto a acumulación de lípidos en el hígado, aunque si hay una disminución de *FASn*, marcador clave de la LDN, sin encontrar variación en el resto de los genes estudiados relacionados con la LDN.

En conjunto, nuestra investigación amplia hallazgos previos con respecto a la relevancia de LEAP-2 como señal anorexigénica, proporcionando pruebas sólidas de que la administración central ICV crónica de LEAP-2 ejerce un marcado efecto anorexigénico en tres modelos animales de roedores diferentes (delgados, obesos y ancianos). Este efecto central impacta además sobre el metabolismo lipídico en órganos periféricos como el tejido adiposo o el hígado. Este efecto es claramente opuesto al efecto orexigénico y adipogénico de ghrelina. Además, la coadministración de LEAP-2 y ghrelina mejora el efecto sobre el metabolismo energético que genera el tratamiento con ghrelina sola.

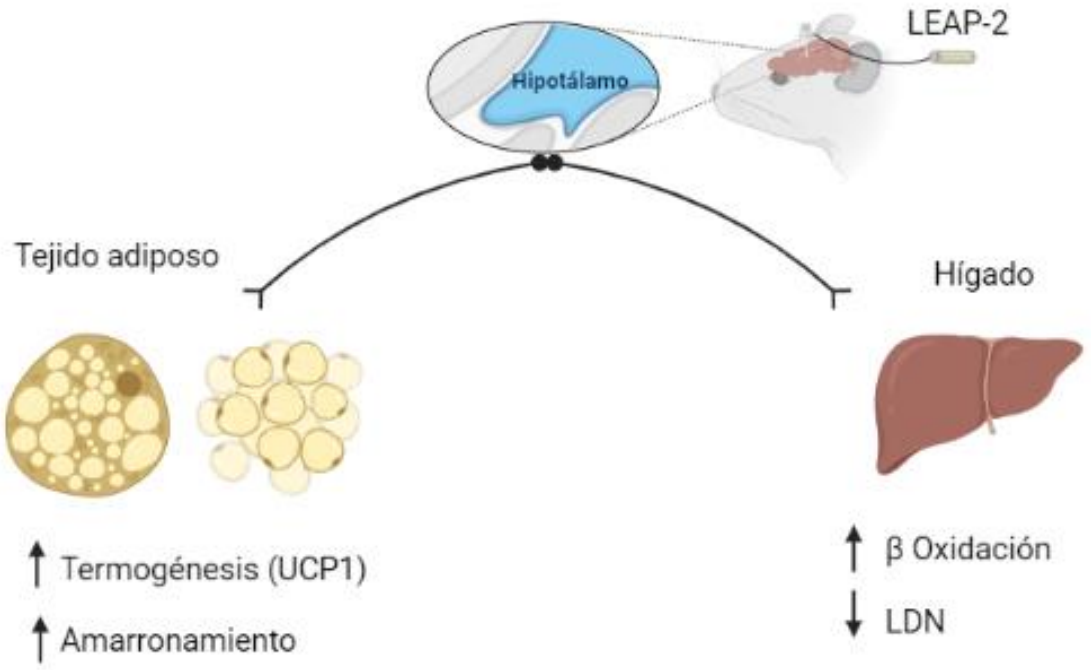


Imagen 7. Acciones fisiológicas de LEAP-2, mediadas por el SNC (elaboración propia, mediante BioRender).

Estos nuevos resultados sitúan a LEAP-2 como una hormona contrarreguladora, desempeñando un papel fundamental en el sistema de ghrelina.

Aquí se demuestra también por vez primera, que LEAP-2 no solo posee una acción central, sino que su administración sobre cultivos de tejido adiposo y de hígado genera también una mejora del metabolismo lipídico en ambos tejidos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

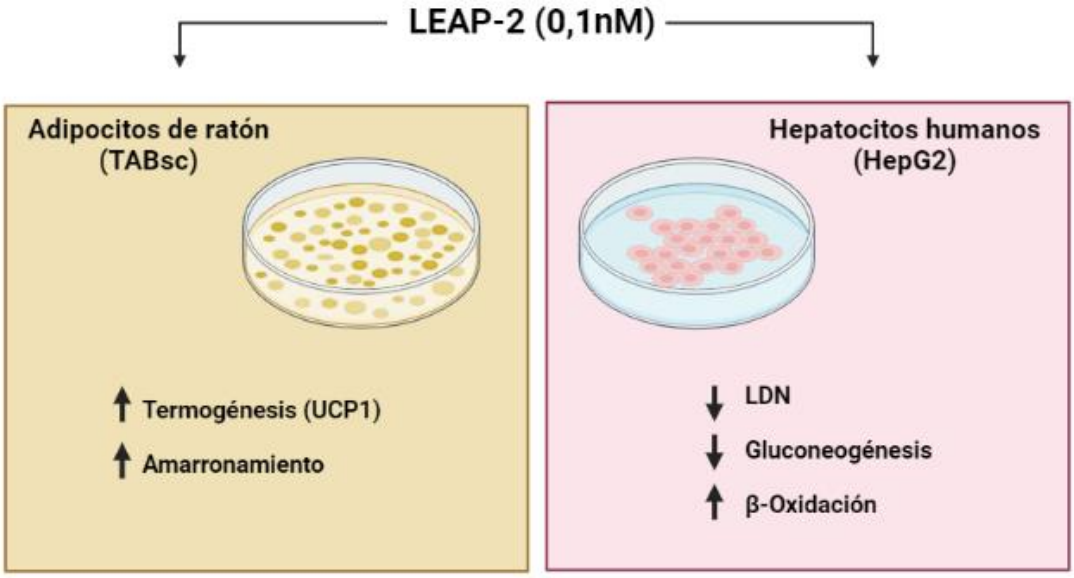


Imagen 8. Acciones fisiológicas de LEAP-2 directamente sobre los tejidos (elaboración propia, mediante BioRender).

Algunos autores ya habían sugerido que los antagonistas de GHSR1a, hasta ahora sintéticos, podrían representar un enfoque novedoso para combatir la obesidad, sin embargo, estos habían demostrado una eficacia en humanos muy baja en comparación a las nuevas terapias generadas a partir de las incretinas GLP-1 y GIP.

El descubrimiento de LEAP-2 como antagonista endógeno no competitivo de GHSR1a abre una ventana de posibilidades. El que sea una molécula endógena supone una ventaja terapéutica muy grande lo que motiva aún más si cabe su estudio como diana terapéutica. En este contexto, nuestros datos resultan de especial interés para poder llevar a cabo futuros experimentos y estudios, encaminados a un uso terapéutico, en los que poder estudiar en profundidad los efectos beneficiosos de LEAP-2 sobre el metabolismo energético y poder ser considerada como una diana terapéutica prometedora en el tratamiento de la obesidad, MAFLD y otras enfermedades metabólicas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. La expresión hepática de LEAP-2, así como los niveles circulantes están regulados por el estado nutricional.
2. La administración ICV crónica de LEAP-2 en ratones estándar antagoniza las principales acciones biológicas de ghrelina. En situaciones de obesidad inducida por dieta, se desarrolla un estado de resistencia a la acción a nivel central de LEAP-2.
3. LEAP-2 aumenta los marcadores termogénicos de tejido adiposo marrón in vivo; así como de amarronamiento de tejido adiposo blanco in vivo e in vitro
4. LEAP-2 disminuye la acumulación de lípidos en el hígado de los ratones. Estudios empleando una línea celular hepática humana nos han permitido demostrar un papel similar en humanos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. N Engl J Med. 1995 Mar;332(10):621–8.
2. Lund J, Gerhart-Hines Z, Clemmensen C. Role of Energy Excretion in Human Body Weight Regulation. Trends Endocrinol Metab. 2020 Oct;31(10):705–8.
3. Frayn N. Metabolic Regulation: A Human Perspective. 2013.
4. Westerterp KR. Control of energy expenditure in humans. Eur J Clin Nutr. 2017 Mar;71(3):340–4.
5. Brooks CM. The history of thought concerning the hypothalamus and its functions. Brain Res Bull. 1988 Jun;20(6):657–67.
6. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. Nature. 2006 Sep;443(7109):289–95.
7. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2004 Mar;24(11):2797–805.
8. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science. 1997 Oct;278(5335):135–138.
9. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. Nat Med. 1999 Sep;5(9):1066–70.
10. Mercer AJ, Hentges ST, Meshul CK, Low MJ. Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. Front Neurosci. 2013;7:19.
11. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang J-E, Lin S, Bao J, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. J Neurosci. 2013 Feb;33(8):3624–32.
12. Quarta C, Claret M, Zeltser LM, Williams KW, Yeo GSH, Tschöp MH, et al. POMC neuronal heterogeneity in energy balance and beyond: an integrated view. Nat Metab. 2021 Mar;3(3):299–308.
13. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995 Dec;83(7):1263–71.
14. Marks JL, Porte DJ, Stahl WL, Baskin DG. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. Endocrinology. 1990 Dec;127(6):3234–6.
15. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 1999 Dec;402(6762):656–60.
16. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. Neuron. 1999 Aug;23(4):775–86.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

17. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes. 2001 Feb;50(2):227–32.

18. Brown JA, Woodworth HL, Leinninger GM. To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. Front Syst Neurosci. 2015;9:9.

19. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell. 1998 Feb;92(4):573–85.

20. Tupone D, Madden CJ, Cano G, Morrison SF. An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2011 Nov;31(44):15944–55.

21. Fernø J, Señarís R, Diéguez C, Tena-Sempere M, López M. Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding. Mol Cell Endocrinol. 2015 Dec;418 Pt 1:17–26.

22. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature. 1996 Mar;380(6571):243–7.

23. Imbernon M, Beiroa D, Vázquez MJ, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Porteiro B, et al. Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. Gastroenterology. 2013 Mar;144(3):636-649.e6.

24. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature. 1998 Dec;396(6712):670–4.

25. Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LH, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. Neuroreport. 1998 Oct;9(15):3415–9.

26. Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, et al. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2009 Jan;29(1):179–90.

27. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, et al. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. Endocrinology. 2002 Oct;143(10):3846–53.

28. Shimogawa Y, Sakuma Y, Yamanouchi K. Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: implications for lordosis regulation in female rats. Neurosci Res. 2015 Feb;91:19–33.

29. López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. Nat Med. 2010 Sep;16(9):1001–8.

30. Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, et al. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. Endocrinology. 2002 Feb;143(2):607–14.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

31. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. Nat Neurosci. 2003 Jul;6(7):736–42.

32. López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. Proc Nutr Soc. 2007 Feb;66(1):131–55.

33. Nogueiras R, López M, Diéguez C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. Obes Rev an Off J Int Assoc Study Obes. 2010 Mar;11(3):185–201.

34. Bamshad M, Song CK, Bartness TJ. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. Am J Physiol. 1999 Jun;276(6):R1569-78.

35. KENNEDY GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proc R Soc London Ser B, Biol Sci. 1953 Jan;140(901):578–96.

36. López M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. Bioessays. 2007 Mar;29(3):248–61.

37. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. J Physiol Pharmacol an Off J Polish Physiol Soc. 2004 Mar;55(1 Pt 2):137–54.

38. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. Science. 2005 Mar;307(5717):1909–14.

39. Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. Gastroenterology. 2005 Jan;128(1):175–91.

40. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature. 2000 Oct;407(6806):908–13.

41. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology. 2007 May;132(6):2131–57.

42. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006 Mar;3(3):153–65.

43. NamKoong C, Kim MS, Jang B-T, Lee YH, Cho Y-M, Choi HJ. Central administration of GLP-1 and GIP decreases feeding in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug;490(2):247–52.

44. Nogueiras R, Pérez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Morgan DA, Varela L, Haynes WG, et al. Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 2009 May;29(18):5916–25.

45. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. Diabetes. 2014 Oct;63(10):3346–58.

46. Holst JJ, Albrechtsen NJW, Gabe MBN, Rosenkilde MM. Oxyntomodulin: Actions and role in diabetes. Peptides. 2018 Feb;100:48–53.

47. Smith GP, Gibbs J, Jerome C, Pi-Sunyer FX, Kissileff HR, Thornton J. The satiety effect of cholecystokinin: a progress report. Peptides. 1981;2 Suppl 2:57–9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

48. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. Nature. 2002 Aug;418(6898):650–4.

49. Folgueira C, Barja-Fernandez S, Gonzalez-Saenz P, Pena-Leon V, Castelao C, Ruiz-Piñon M, et al. Uroguanylin: a new actor in the energy balance movie. J Mol Endocrinol. 2018 Feb;60(2):R31–8.

50. Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte DJ, et al. Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. Appetite. 1986 Dec;7(4):381–6.

51. Zeigerer A, Sekar R, Kleinert M, Nason S, Habegger KM, Müller TD. Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease. Compr Physiol. 2021 Apr;11(2):1759–83.

52. Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, et al. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. Gastroenterology. 2003 May;124(5):1325–36.

53. Bruinstroop E, Fliers E, Kalsbeek A. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2014 Oct;28(5):673–84.

54. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. J Hepatol. 2012 Apr;56(4):952–64.

55. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jun;296(6):E1183-94.

56. Frayn KN, Arner P, Yki-Järvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. Essays Biochem. 2006;42:89–103.

57. Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. Biochem J. 1990 May;268(1):1–13.

58. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb;107(8):3441–6.

59. Sanders FWB, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. Biol Rev Camb Philos Soc. 2016 May;91(2):452–68.

60. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. Cell Metab. 2006 Aug;4(2):107–10.

61. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2005 May;115(5):1343–51.

62. Cherkaoui-Malki M, Surapureddi S, El-Hajj HI, Vamecq J, Andreoletti P. Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation. Curr Drug Metab. 2012 Dec;13(10):1412–21.

63. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. Biochim Biophys Acta. 2001 Mar;1546(1):21–43.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

64. Bellanti F, Villani R, Facciorusso A, Vendemiale G, Serviddio G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Free Radic Biol Med. 2017 Oct;111:173–85.

65. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. Eur J Biochem. 1997 Feb;244(1):1–14.

66. Han H-S, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo S-H. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. Exp Mol Med. 2016 Mar;48(3):e218.

67. Lin H V, Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. Cell Metab. 2011 Jul;14(1):9–19.

68. Ducheix S, Vegliante MC, Villani G, Napoli N, Sabbà C, Moschetta A. Is hepatic lipogenesis fundamental for NAFLD/NASH? A focus on the nuclear receptor coactivator PGC-1β. Cell Mol Life Sci. 2016 Oct;73(20):3809–22.

69. Chambers KT, Chen Z, Lai L, Leone TC, Towle HC, Kralli A, et al. PGC-1β and ChREBP partner to cooperatively regulate hepatic lipogenesis in a glucose concentration-dependent manner. Mol Metab. 2013;2(3):194–204.

70. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu P-H, Handschin C, Li S, et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. Cell. 2005 Jan;120(2):261–73.

71. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. Nature. 2008 Aug;454(7207):961–7.

72. Lepper C, Fan C-M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. Genesis. 2010 Jul;48(7):424–36.

73. Hirsch J, Batchelor B. Adipose tissue cellularity in human obesity. Clin Endocrinol Metab. 1976 Jul;5(2):299–311.

74. Thompson BR, Lobo S, Bernlohr DA. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. Mol Cell Endocrinol. 2010 Apr;318(1–2):24–33.

75. Wallace M, Metallo CM. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. Semin Cell Dev Biol. 2020 Dec;108:65–71.

76. Smith GI, Shankaran M, Yoshino M, Schweitzer GG, Chondronikola M, Beals JW, et al. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest. 2020 Mar;130(3):1453–60.

77. Carpéné C, Bousquet-Mélou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. Ann N Y Acad Sci. 1998 May;839:186–9.

78. Bartness TJ, Kay Song C, Shi H, Bowers RR, Foster MT. Brain-adipose tissue cross talk. Proc Nutr Soc. 2005 Feb;64(1):53–64.

79. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2548–56.

80. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994 Dec;372(6505):425–32.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

81. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Dec;297(6):E1247-59.

82. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem. 1995 Nov;270(45):26746–9.

83. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. J Biol Chem. 1996 May;271(18):10697–703.

84. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med. 2002 Nov;8(11):1288–95.

85. Nogueiras R, Novelle MG, Vazquez MJ, Lopez M, Dieguez C. Resistin: regulation of food intake, glucose homeostasis and lipid metabolism. Endocr Dev. 2010;17:175–84.

86. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. Clin Sci (Lond). 2005 Sep;109(3):243–56.

87. Tovar S, Nogueiras R, Tung LYC, Castañeda TR, Vázquez MJ, Morris A, et al. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. Eur J Endocrinol. 2005 Sep;153(3):R1-5.

88. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue thermogenesis in neonatal and cold-adapted animals. Biochem Soc Trans. 1986 Apr;14(2):233–6.

89. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev. 2004 Jan;84(1):277–359.

90. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, Kalinovich A V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. Cell Rep. 2013 Dec;5(5):1196–203.

91. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. Nat Med. 2013 Oct;19(10):1252–63.

92. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell. 2012 Jul;150(2):366–76.

93. Barlow JC, Sellers EA. Effect of exposure to cold on response of the rat to whole body radiation. Am J Physiol. 1953 Jan;172(1):147–51.

94. Townsend KL, Tseng Y-H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. Trends Endocrinol Metab. 2014 Apr;25(4):168–77.

95. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol Rev. 1984 Jan;64(1):1–64.

96. Yau WW, Yen PM. Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. Int J Mol Sci. 2020 Apr;21(8).

97. Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmos Y, Monsalve M, Iglesias R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) induces PPARγ coactivator 1α (PGC-1α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. J Biol Chem. 2011 Dec;286(50):43112–22.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

98. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARγ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. Cell Metab. 2012 Mar;15(3):395–404.

99. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. Genes Dev. 2012 Feb;26(3):271–81.

100. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:498.

101. Whittle AJ, López M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. Trends Mol Med. 2011 Aug;17(8):405–11.

102. Organización Mundial de la Salud (OMS) . Obesidad y sobrepeso. [Internet]. 2016. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

103. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. Am J Manag Care. 2016 Jun;22(7 Suppl):s176-85.

104. National Institutes of Health (NIH). Metabolic Syndrome. [Internet]. Available from: https://www.nhlbi.nih.gov/health/metabolic-syndrome

105. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis. 2001;21(1):27–41.

106. Kuchay MS, Choudhary NS, Mishra SK. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. Diabetes Metab Syndr. 2020;14(6):1875–87.

107. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest. 2004 Jul;114(2):147–52.

108. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AWJ. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003 Dec;112(12):1796–808.

109. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Oct;14(5):447–55.

110. Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. Nat Med. 2002 Jan;8(1):75–9.

111. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. Hepatology. 2002 Feb;35(2):367–72.

112. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Prog Lipid Res. 2013 Jan;52(1):175–91.

113. Desa, U. United nations department of economic and social affairs population division. World population prospects: The 2015 revision, key findings and advance tables. [Internet]. New York; 2015. Available from: https://www.un.org/es/global-issues/ageing

114. Chumlea WC, Rhyne RL, Garry PJ, Hunt WC. Changes in anthropometric indices of body composition with age in a healthy elderly population. Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc. 1989;1(4):457–62.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

115. Pfannenberg C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, et al. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. Diabetes. 2010 Jul;59(7):1789–93.

116. Sellayah D, Sikder D. Orexin restores aging-related brown adipose tissue dysfunction in male mice. Endocrinology. 2014 Feb;155(2):485–501.

117. Frutos MGS, Cacicedo L, Méndez CF, Vicent D, González M, Sánchez-Franco F. Pituitary alterations involved in the decline of growth hormone gene expression in the pituitary of aging rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2007 Jun;62(6):585–97.

118. Maggio M, Ble A, Ceda GP, Metter EJ. Decline in insulin-like growth factor-I levels across adult life span in two large population studies. Vol. 61, The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences. United States; 2006. p. 182–3.

119. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology. 2000 Nov;141(11):4255–61.

120. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. Physiol Rev. 2005 Apr;85(2):495–522.

121. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr;105(17):6320–5.

122. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin N V, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. Cell. 2008 Feb;132(3):387–96.

123. Chen VP, Gao Y, Geng L, Brimijoin S. Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. Int J Obes (Lond). 2017 Sep;41(9):1413–9.

124. Zhang J V, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, Luo C-W, Rauch R, Klein C, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. Science. 2005 Nov;310(5750):996–9.

125. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes. 2001 Aug;50(8):1714–9.

126. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes. 2001 Apr;50(4):707–9.

127. Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. J Endocrinol Invest. 2001 Jun;24(6):RC19-21.

128. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1319–24.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

129. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, et al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. Nat Med. 2002 Jul;8(7):643–4.

130. Rigamonti AE, Pincelli AI, Corrà B, Viarengo R, Bonomo SM, Galimberti D, et al. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. J Endocrinol. 2002 Oct;175(1):R1-5.

131. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science. 1996 Aug;273(5277):974–7.

132. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, et al. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. Mol Endocrinol. 1997 Apr;11(4):415–23.

133. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. Brain Res Mol Brain Res. 1997 Aug;48(1):23–9.

134. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Jun;87(6):2988.

135. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcìa-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology. 2001 Feb;142(2):788–94.

136. Camiña JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. Endocrinology. 2004 Feb;145(2):930–40.

137. Holliday ND, Holst B, Rodionova EA, Schwartz TW, Cox HM. Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. Mol Endocrinol. 2007 Dec;21(12):3100–12.

138. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. Mol Endocrinol. 2003 Nov;17(11):2201–10.

139. Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. J Biol Chem. 2004 Dec;279(51):53806–17.

140. Chow KBS, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CHK, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. Mol Cell Endocrinol. 2012 Jan;348(1):247–54.

141. Hedegaard MA, Holst B. The Complex Signaling Pathways of the Ghrelin Receptor. Endocrinology. 2020 Apr;161(4).

142. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature. 2001 Jan;409(6817):194–8.

143. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron. 2003 Feb;37(4):649–61.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

144. Uriarte M, De Francesco PN, Fernandez G, Cabral A, Castrogiovanni D, Lalonde T, et al. Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. Mol Neurobiol. 2019 Jun;56(6):4120–34.

145. Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Aug;302(2):822–7.

146. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. J Comp Neurol. 2006 Jan;494(3):528–48.

147. Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. Trends Mol Med. 2008 Dec;14(12):539–49.

148. López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, et al. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. Cell Metab. 2008 May;7(5):389–99.

149. Kohno D, Gao H-Z, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca2+ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. Diabetes. 2003 Apr;52(4):948–56.

150. Martins L, Fernández-Mallo D, Novelle MG, Vázquez MJ, Tena-Sempere M, Nogueiras R, et al. Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. PLoS One. 2012;7(10):e46923.

151. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. Endocrinology. 2003 Apr;144(4):1506–12.

152. Romero-Picó A, Novelle MG, Folgueira C, López M, Nogueiras R, Diéguez C. Central manipulation of dopamine receptors attenuates the orexigenic action of ghrelin. Psychopharmacology (Berl). 2013 Sep;229(2):275–83.

153. Romero-Picó A, Vázquez MJ, González-Touceda D, Folgueira C, Skibicka KP, Alvarez-Crespo M, et al. Hypothalamic κ-opioid receptor modulates the orexigenic effect of ghrelin. Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol. 2013 Jun;38(7):1296–307.

154. Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. PLoS One. 2008 Mar;3(3):e1797.

155. Currie PJ, John CS, Nicholson ML, Chapman CD, Loera KE. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. Pharmacol Biochem Behav. 2010 Nov;97(1):152–5.

156. Brunetti L, Recinella L, Orlando G, Michelotto B, Di Nisio C, Vacca M. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. Eur J Pharmacol. 2002 Nov;454(2–3):189–92.

157. Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y. A negative feedback system between brain serotonin systems and plasma active ghrelin levels in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar;341(3):703–7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

158. Briggs DI, Enriori PJ, Lemus MB, Cowley MA, Andrews ZB. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. Endocrinology. 2010 Oct;151(10):4745–55.

159. Al Massadi O, López M, Tschöp M, Diéguez C, Nogueiras R. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. Trends Neurosci. 2017 Mar;40(3):167–80.

160. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. Mol Metab. 2015 Jun;4(6):437–60.

161. Diéguez C, Vazquez MJ, Romero A, López M, Nogueiras R. Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. Neuroendocrinology. 2011;94(1):1–11.

162. Porteiro B, Díaz-Ruíz A, Martínez G, Senra A, Vidal A, Serrano M, et al. Ghrelin requires p53 to stimulate lipid storage in fat and liver. Endocrinology. 2013 Oct;154(10):3671–9.

163. Sangiao-Alvarellos S, Vázquez MJ, Varela L, Nogueiras R, Saha AK, Cordido F, et al. Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. Endocrinology. 2009 Oct;150(10):4562–74.

164. Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1983–93.

165. Perez-Tilve D, Hofmann SM, Basford J, Nogueiras R, Pfluger PT, Patterson JT, et al. Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol. Nat Neurosci. 2010 Jul;13(7):877–82.

166. Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. J Clin Invest. 2005 Dec;115(12):3564–72.

167. Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, Woods SC, Smiley DL, et al. Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2011 Aug;25(8):2814–22.

168. Perreault M, Istrate N, Wang L, Nichols AJ, Tozzo E, Stricker-Krongrad A. Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. 2004 Jul;28(7):879–85.

169. Zigman JM, Bouret SG, Andrews ZB. Obesity Impairs the Action of the Neuroendocrine Ghrelin System. Trends Endocrinol Metab. 2016 Jan;27(1):54–63.

170. Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, et al. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. Mol Endocrinol. 2011 Sep;25(9):1600–11.

171. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Oct;86(10):5083–6.

172. Reimer MK, Pacini G, Ahrén B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. Endocrinology. 2003 Mar;144(3):916–21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

173. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. Cell Metab. 2006 May;3(5):379–86.

174. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca2+ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. Diabetes. 2004 Dec;53(12):3142–51.

175. Zhao T-J, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Apr;107(16):7467–72.

176. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, et al. Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. Regul Pept. 2008 Oct;150(1–3):55–61.

177. Briggs DI, Andrews ZB. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. Neuroendocrinology. 2011;93(1):48–57.

178. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. Endocr Rev. 2009 Apr;30(2):152–77.

179. Casanueva FF, Dieguez C. Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. Trends Endocrinol Metab. 1999 Dec;10(1):30–8.

180. Egecioglu E, Bjursell M, Ljungberg A, Dickson SL, Kopchick JJ, Bergström G, et al. Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Feb;290(2):E317-25.

181. Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. Exp Biol Med (Maywood). 2004 Apr;229(4):291–302.

182. Lin L, Saha PK, Ma X, Henshaw IO, Shao L, Chang BHJ, et al. Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. Aging Cell. 2011 Dec;10(6):996–1010.

183. Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. Neurosci Lett. 2003 Oct;349(2):75–8.

184. Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. Regul Pept. 2005 Aug;130(1–2):97–103.

185. Mano-Otagiri A, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Ohata H, Shuto Y, Nakabayashi H, et al. Genetic suppression of ghrelin receptors activates brown adipocyte function and decreases fat storage in rats. Regul Pept. 2010 Feb;160(1–3):81–90.

186. Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. J Endocrinol. 2009 Jun;201(3):341–9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

187. Ma X, Lin L, Qin G, Lu X, Fiorotto M, Dixit VD, et al. Ablations of ghrelin and ghrelin receptor exhibit differential metabolic phenotypes and thermogenic capacity during aging. PLoS One. 2011 Jan;6(1):e16391.

188. Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG. Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. Endocrinology. 2008 Feb;149(2):843–50.

189. Lin L, Lee JH, Bongmba OYN, Ma X, Zhu X, Sheikh-Hamad D, et al. The suppression of ghrelin signaling mitigates age-associated thermogenic impairment. Aging (Albany NY). 2014 Dec;6(12):1019–32.

190. Krause A, Sillard R, Kleemeier B, Klüver E, Maronde E, Conejo-García JR, et al. Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver. Protein Sci. 2003 Jan;12(1):143–52.

191. Henriques ST, Tan CC, Craik DJ, Clark RJ. Structural and functional analysis of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. Chembiochem. 2010 Oct;11(15):2148–57.

192. Howard A, Townes C, Milona P, Nile CJ, Michailidis G, Hall J. Expression and functional analyses of liver expressed antimicrobial peptide-2 (LEAP-2) variant forms in human tissues. Cell Immunol. 2010;261(2):128–33.

193. Ge X, Yang H, Bednarek MA, Galon-Tilleman H, Chen P, Chen M, et al. LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. Cell Metab. 2018 Feb;27(2):461-469.e6.

194. M'Kadmi C, Cabral A, Barrile F, Giribaldi J, Cantel S, Damian M, et al. N-Terminal Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 2 (LEAP2) Region Exhibits Inverse Agonist Activity toward the Ghrelin Receptor. J Med Chem. 2019 Jan;62(2):965–73.

195. Islam MN, Mita Y, Maruyama K, Tanida R, Zhang W, Sakoda H, et al. Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents. J Endocrinol. 2020 Jan;244(1):13–23.

196. Mani BK, Puzziferri N, He Z, Rodriguez JA, Osborne-Lawrence S, Metzger NP, et al. LEAP2 changes with body mass and food intake in humans and mice. J Clin Invest. 2019 Sep;129(9):3909–23.

197. Al-Massadi O, Müller T, Tschöp M, Diéguez C, Nogueiras R. Ghrelin and LEAP-2: Rivals in Energy Metabolism. Trends Pharmacol Sci. 2018 Aug;39(8):685–94.

198. Gupta D, Ogden SB, Shankar K, Varshney S, Zigman JM. "A LEAP 2 conclusions? Targeting the ghrelin system to treat obesity and diabetes". Mol Metab. 2021 Apr;46:101128.

199. Barja-Fernández S, Lugilde J, Castelao C, Vázquez-Cobela R, Seoane LM, Diéguez C, et al. Circulating LEAP-2 is associated with puberty in girls. Int J Obes (Lond). 2021 Mar;45(3):502–14.

200. Lugilde J, Casado S, Beiroa D, Cuñarro J, Garcia-Lavandeira M, Álvarez C V, et al. LEAP-2 Counteracts Ghrelin-Induced Food Intake in a Nutrient, Growth Hormone and Age Independent Manner. Cells. 2022 Jan;11(3).

201. Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(22):7973–81.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

202. McFarlane MR, Brown MS, Goldstein JL, Zhao T-J. Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. Cell Metab. 2014 Jul;20(1):54–60.

203. Shankar K, Metzger NP, Singh O, Mani BK, Osborne-Lawrence S, Varshney S, et al. LEAP2 deletion in mice enhances ghrelin's actions as an orexigen and growth hormone secretagogue. Mol Metab. 2021 Nov;53:101327.

204. Hagemann CA, Jensen MS, Holm S, Gasbjerg LS, Byberg S, Skov-Jeppesen K, et al. LEAP2 reduces postprandial glucose excursions and ad libitum food intake in healthy men. Cell reports Med. 2022 Apr;3(4):100582.

205. Keith F; Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 5ª ed. Academic Press; 2019.

206. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012 Jul;9(7):671–5.

207. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012 Jun;9(7):676–82.

208. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. J Lipid Res. 2012 Dec;53(12):2791–6.

209. Porteiro B, Fondevila MF, Delgado TC, Iglesias C, Imbernon M, Iruzubieta P, et al. Hepatic p63 regulates steatosis via IKKβ/ER stress. Nat Commun. 2017 May;8:15111.

210. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May;72:248–54.

211. Miller J. Reaction time analysis with outlier exclusion: bias varies with sample size. Q J Exp Psychol A, Hum Exp Psychol. 1991 Nov;43(4):907–12.

212. Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling tests. In 2011.

213. Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). Biometrika. 1965 Feb 7;52(3/4):591–611.

214. de Winter J. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. Pract Assessment, Res Eval. 2013 Aug 8;18.

215. Student. The Probable Error of a Mean. Biometrika. 1908 Feb 7;6(1):1–25.

216. Milton JS. Estadística para biología y ciencias de la salud. MCGRAW-HILL, Interamericana de Espana S.L; 2007.

217. Kao LS, Green CE. Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean? J Surg Res. 2008 Jan;144(1):158–70.

218. Bridge PD, Sawilowsky SS. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: comparative power of the t-test and and Wilcoxon Rank-Sum test in small samples applied research. J Clin Epidemiol. 1999 Mar;52(3):229–35.

219. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics. 1964 Feb 7;6(3):241–52.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

220. Campbell G, Skillings JH. Nonparametric stepwise multiple comparison procedures. J Am Stat Assoc. 1985;80(392):998–1003.

221. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, et al. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Sep;88(9):4268–72.

222. Cornejo MP, Castrogiovanni D, Schiöth HB, Reynaldo M, Marie J, Fehrentz J-A, et al. Growth hormone secretagogue receptor signalling affects high-fat intake independently of plasma levels of ghrelin and LEAP2, in a 4-day binge eating model. J Neuroendocrinol. 2019 Oct;31(10):e12785.

223. Kim M-S, Yoon C-Y, Park K-H, Shin C-S, Park K-S, Kim S-Y, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. Neuroreport. 2003 Jul;14(10):1317–20.

224. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Mar;281(5):1220–5.

225. Ma X, Xue X, Zhang J, Liang S, Xu C, Wang Y, et al. Liver Expressed Antimicrobial Peptide 2 is Associated with Steatosis in Mice and Humans. Exp Clin Endocrinol diabetes Off journal, Ger Soc Endocrinol [and] Ger Diabetes Assoc. 2021 Aug;129(8):601–10.

226. Chukijrungroat N, Khamphaya T, Weerachayaphorn J, Songserm T, Saengsirisuwan V. Hepatic FGF21 mediates sex differences in high-fat high-fructose diet-induced fatty liver. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2017 Aug;313(2):E203–12.

227. DiStefano JK. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. Endocrinology. 2020 Oct;161(10).

228. Du T, Sun X, Yuan G, Zhou X, Lu H, Lin X, et al. Sex differences in the impact of nonalcoholic fatty liver disease on cardiovascular risk factors. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2017 Jan;27(1):63–9.

229. Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, Fairweather D, Win S, Than TA, et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. Hepatology. 2019 Oct;70(4):1457–69.

230. Smith A, Woodside B, Abizaid A. Ghrelin and the Control of Energy Balance in Females. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:904754.

231. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol. 2017 Jan;13(1):26–35.

232. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Saraf MK, Annamalai P, et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. Cell Metab. 2016 Jun;23(6):1200–6.

233. Bartelt A, John C, Schaltenberg N, Berbée JFP, Worthmann A, Cherradi ML, et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. Nat Commun. 2017 Apr;8:15010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

234. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. Cell Metab. 2009 Feb;9(2):203–9.

235. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. Nature. 1993 Dec;366(6457):740–2.

236. Banks WA, Burney BO, Robinson SM. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. Peptides. 2008 Nov;29(11):2061–5.

237. Naznin F, Toshinai K, Waise TMZ, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, et al. Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation. J Endocrinol. 2015 Jul;226(1):81–92.

238. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest. 2012 Jan;122(1):153–62.

239. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. Compr Physiol. 2017 Dec;8(1):1–8.

240. Li Z, Xu G, Qin Y, Zhang C, Tang H, Yin Y, et al. Ghrelin promotes hepatic lipogenesis by activation of mTOR-PPARγ signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep;111(36):13163–8.

241. Ezquerro S, Frühbeck G, Rodríguez A. Ghrelin and autophagy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017 Sep;20(5):402–8.

242. Ezquerro S, Mocha F, Frühbeck G, Guzmán-Ruiz R, Valentí V, Mugueta C, et al. Ghrelin Reduces TNF-α-Induced Human Hepatocyte Apoptosis, Autophagy, and Pyroptosis: Role in Obesity-Associated NAFLD. J Clin Endocrinol Metab. 2019 Jan;104(1):21–37.

243. Yin Y, Wang Q, Qi M, Zhang C, Li Z, Zhang W. Ghrelin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by chronic low-grade inflammation via blockade of Kupffer cell M1 polarization. J Cell Physiol. 2021 Jul;236(7):5121–33.

244. Thielemans L, Peeters PJ, Jonckheere H, Luyten W, de Hoogt R, Coulie B, et al. The hepatocarcinoma cell line HepG2 does not express a GHS-R1a-type ghrelin receptor. J Recept Signal Transduct Res. 2007;27(4):309–22.

245. Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. J Biol Chem. 2002 Feb;277(7):5667–74.

246. St-Onge M-P, Gallagher D. Body composition changes with aging: the cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? Nutrition. 2010 Feb;26(2):152–5.

247. Mattson MP. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? Ageing Res Rev. 2010 Jan;9(1):69–76.

248. Ma X, Lin L, Yue J, Pradhan G, Qin G, Minze LJ, et al. Ghrelin receptor regulates HFCS-induced adipose inflammation and insulin resistance. Nutr Diabetes. 2013 Dec;3(12):e99.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE A CORUÑA
A CORUÑA

SAÍDA 18181 / RX 264122 Data 21/02/2018 10:09:53

José Manuel Cifuentes
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/17/002
Persoa interesada: Sulay Tovar Carro
Procedemento: resolución de autorización

Data de inicio: 19.02.2018
Forma de inicio: solicitude da interesada

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 29.06.2017 e rexistro de entrada 72838/RX 1687426, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudo de clásicos e novos candidatos na regulación a nivel hipotalámico e periférico da homeostase da glucosa
Nome do centro usuario: CIMUS
Persoa responsable do proxecto: Sulay Tovar Carro
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Facultade de Medicina do CIMUS
Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2. O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

CVE: nlSdpu1q1
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 30 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia (DOG 84, do 1 de maio de 2009) e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que se aproba a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural (DOG 220, do 18 de novembro de 2015).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.
2 O mencionado proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva aos tres anos.
3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos, transcorrido este tempo, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle ao CIMUS da USC esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

A Coruña, 19 de febreiro de 2018
O xefe territorial

Manuel Rodríguez Vázquez

Asinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ, MANUEL
Cargo: XEFE TERRITORIAL
Data e hora: 20/02/2018 12:17:02

CVE: nkSdpu1q1
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ADMINISTRACIÓN LOCAL
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Ref.: CAP-1725-18

REGISTRO DE SALIDA
Ref:10/342914.9/18 Fecha:08/11/2018 12:34
Cons. Medio Amb., Admon. Local y O. T.
Reg C.Medio Amb. y Ord.T.(ALC)
Destino: SABELA CASADO MASA

D/Dª SABELA CASADO MASA
AVENIDA BARCELONA, S/N, 0 LAB 3
15706 SANTIAGO DE COMPOSTELA
(CORUÑA, A)

Notifico a Vd. que el Sr. Director General de Agricultura, Ganadería y Alimentación, ha dictado la siguiente Resolución:

"Vista la solicitud formulada por D./DÑA. SABELA CASADO MASA, con DNI/NIE 45952358Z para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, en ROEDORES .

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple los requisitos para estimar su solicitud, por lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./ DÑA. SABELA CASADO MASA, con DNI/NIE 45952358Z, para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, en ROEDORES .

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas."

Se adjunta Certificado de Capacitación.

Madrid, 05 de noviembre de 2018
ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL
La Técnico Veterinaria

Fdo. María Josefa Moreno Mellado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ADMINISTRACIÓN LOCAL
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Ref.: CAP-1725-18

RESOLUCIÓN DE RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN E INCLUSIÓN EN EL REGISTRO DE PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)

Vista la solicitud formulada por D./DÑA. SABELA CASADO MASA, con DNI/NIE 45952358Z, para obtener el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, en ROEDORES .

Visto el informe favorable del Área de Protección Animal.

Considerando que el solicitante cumple los requisitos para estimar su solicitud, por lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: reconocer la capacitación a D./ DÑA. SABELA CASADO MASA, con DNI/NIE 45952358Z, para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES, REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS, en ROEDORES .

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Madrid, 5 de noviembre de 2018
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION
(P.D.F. Resolución de 15 de junio de 2018)
Subdirector General de Producción Agroalimentaria y Bienestar Animal

Fdo: Jesús Carpintero Hervás

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ADMINISTRACIÓN LOCAL
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO
Comunidad de Madrid

Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

D./Dña. SABELA CASADO MASA, con DNI/NIE 45952358Z ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:

EUTANASIA DE LOS ANIMALES

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

en los siguientes grupos de especies animales:

ROEDORES

Nº de certificado: CAP-1725-18

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha, 5 de noviembre de 2018	**Sello**

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN

(P.D.F Resolución de 15 de junio de 2018)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL.

Fdo: Jesús Carpintero Hervás

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NOTE: Please save this file locally before filling in the table, DO NOT work on the file within your internet browser as changes will not be saved. Adobe Acrobat Reader (available free here) is recommended for completion.

The ARRIVE guidelines 2.0: author checklist

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Item		Recommendation	Section/line number, or reason for not reporting
Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including:	
		a. The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated.	Material y métodos
		b. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).	Material y métodos
Sample size	2	a. Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used.	Material y métodos
		b. Explain how the sample size was decided. Provide details of any *a priori* sample size calculation, if done.	Material y métodos
Inclusion and exclusion criteria	3	a. Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established *a priori*. If no criteria were set, state this explicitly.	Material y métodos
		b. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so.	Material y métodos
		c. For each analysis, report the exact value of *n* in each experimental group.	Material y métodos
Randomisation	4	a. State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence.	Material y métodos
		b. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.	Material y métodos
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).	No necesario
Outcome measures	6	a. Clearly define all outcome measures assessed (e.g. cell death, molecular markers, or behavioural changes).	Material y métodos
		b. For hypothesis-testing studies, specify the primary outcome measure, i.e. the outcome measure that was used to determine the sample size.	Material y métodos
Statistical methods	7	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis, including software used.	Material y métodos
		b. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach, and what was done if the assumptions were not met.	Material y métodos
Experimental animals	8	a. Provide species-appropriate details of the animals used, including species, strain and substrain, sex, age or developmental stage, and, if relevant, weight.	Material y métodos
		b. Provide further relevant information on the provenance of animals, health/immune status, genetic modification status, genotype, and any previous procedures.	Material y métodos
Experimental procedures	9	For each experimental group, including controls, describe the procedures in enough detail to allow others to replicate them, including:	Material y métodos
		a. What was done, how it was done and what was used.	Material y métodos
		b. When and how often.	Material y métodos
		c. Where (including detail of any acclimatisation periods).	Material y métodos
		d. Why (provide rationale for procedures).	Material y métodos
Results	10	For each experiment conducted, including independent replications, report:	Resultados
		a. Summary/descriptive statistics for each experimental group, with a measure of variability where applicable (e.g. mean and SD, or median and range).	Resultados
		b. If applicable, the effect size with a confidence interval.	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta andanza científica comenzó en 2016, cuando llegué al laboratorio a realizar mi trabajo de fin de grado. Acabé aquí de una forma un tanto peculiar que se resume en una cena de carnaval con jugadores del Obradoiro CAB y unos cuantos profesores del departamento de fisiología humana. Sin esa cena, quizás ahora no estaría aquí sentada, escribiendo el broche final de mi tesis.

Tengo que comenzar agradeciendo a todos aquellos profesores que, durante mi vida académica, me han inculcado su pasión por la ciencia, pues ellos sentaron las bases de mi conocimiento científico que me ha acompañado hasta este momento, y también me han guiado a lo largo del camino.

Si a alguien tengo que agradecer en esta tesis, sin duda es a mis directores Sulay Tovar y Carlos Diéguez, pues ellos además de abrirme las puertas de su laboratorio me han permitido desarrollar mi pasión durante ya siete años, me han blindado conocimiento, apoyo, confianza y la no menos importante financiación económica.

Siguiendo en esta línea, sólo aquellas personas que realizan su tesis en un laboratorio saben que la gente que allí trabaja pasa a formar una parte muy importante de tu vida, casi como una familia, y yo así os siento, mi gran familia científica. A todas las personas que han compartido conmigo tiempo, risas, llantos, desesperación y alegría entre las paredes del laboratorio a lo largo de todos estos años. Sobre todo, tengo que agradecer el apoyo, dedicación, e inestimable ayuda a los que han sido mis compañeros de grupo durante estos años: Juan, Tadeu, Marta, sin vosotros este trabajo no habría sido posible. A toda nuestra gran familia de P0LES (Rubenes, Migueles, Clarisos...), los que están, y los que ya han volado del nido, gracias por hacerme un hueco en el grupo de investigación, acogerme y tratarme como a uno más. Y también a todos los que están por el IDIS, pero de una forma u otra también han estado presentes estos años, entre charlas, congresos y colaboraciones. Y, por supuesto a mis queridos “pollitos”, todos nuestros alumnos de prácticas, TFG y TFM que han pasado por nuestro laboratorio y a los que he tenido la gran suerte de transmitir conocimiento, y espero que un pedacito de pasión.

A todos los técnicos y personal de apoyo, personal administrativo, conserjes, y personal de limpieza, toda la gente que de una forma u otra forma parte del CIMUS, y del CEBEGA, y que hace que nuestro trabajo sea un poquito más fácil.

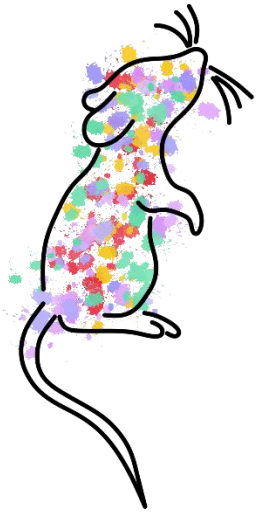
También tengo que agradecer a todos los que estaban fuera de las paredes del laboratorio, y que, con su amor, cariño y sobre todo comprensión han hecho este “viaje” más sencillo.

A todos los amigos que me han sacado de casa y aireado mis neuronas cuando más necesitaba, gracias por ser mi evasión del mundo científico. Sobre todo, a Sara, por ser o meu salvavidas cando non podía mais, por sacarme sempre un sorriso, ser a familia que un escolle, sempre o meu caron.

A toda mi familia, en especial a mi tía y madrina Maca. Y, por último, pero no menos importante, a mis padres, por haberme inculcado pasión por la ciencia desde niña, pero sobre todo por guiarme y educarme para llegar a ser quien soy hoy, por confiar siempre en mí, por darme alas, por enseñarme a no rendirme y a luchar por mis sueños, por levantarme y apoyarme todas las veces que me he caído en este camino. No hay tiempo suficiente en una vida para agradeceros todo lo que hacéis por mí.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, me gustaría hacer una especial mención a los animales de experimentación empleados para el desarrollo de esta tesis, ya que sin ellos este trabajo sí que no sería posible. A todos mis Gus y Jaq presentes en este trabajo.



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El descubrimiento de LEAP-2 como ligando endógeno del receptor de ghrelina ha abierto un nuevo campo de estudio. En esta tesis doctoral se intentan dilucidar las acciones de LEAP-2 en la regulación de la homeostasis energética. Nuestros resultados indican que LEAP-2 es regulado por el estado nutricional de forma inversa a ghrelina, y que su administración central ejerce importantes acciones en la homeostasis energética actuando sobre la termogénesis y el metabolismo de ácidos grasos en hígado. A nivel periférico actúa de manera directa sobre hígado y tejido adiposo. En conclusión, LEAP-2 se posiciona como una hormona contrarreguladora, jugando un papel fundamental en el sistema de ghrelina pudiendo ser considerada como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades metabólicas.