

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO (CEINDO)

PROGRAMA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD

UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y DE LA SALUD



TESIS DOCTORAL

**CLUSTERINA: UN BIOMARCADOR POTENCIAL DE LAS ALTERACIONES DEL
SISTEMA CEREBRAL DE REFUERZO Y RECOMPENSA**

PRESENTADA POR

CARMEN RODRÍGUEZ-RIVERA

DIRECTORES

DRA. CARMEN GONZÁLEZ-MARTÍN

DR. LUIS FERNANDO ALGUACIL MERINO

MADRID 2018

Estimado/a Director/a de la CEU Escuela Internacional de Doctorado (CEINDO),

Por la presente le comunico que, como Director/es de la Tesis Doctoral realizada por D/D^a Carmen Rodríguez Rivera, titulada “Clusterina: un biomarcador potencial de las alteraciones del sistema cerebral de refuerzo y recompensa”, considero que el trabajo realizado ha sido satisfactorio y solicito que se proceda a tramitar su presentación, lectura y defensa siguiendo las normas establecidas para el caso.

Madrid, 2018

Fdo. D^a. Carmen González-Martín

Fdo. D. Luis Fernando Alguacil Merino

Director/es de la Tesis

AGRADECIMIENTOS

“Es de bien nacidos ser agradecidos”, es algo que me enseñó esa persona tan especial, mi madre, pues bien, para mí, una de las partes más importantes de una tesis son los agradecimientos, y es que sin aquellas personas que nos han ayudado en una u otra forma durante este largo camino, conseguirlo habría sido imposible. Y es que no ha sido un camino fácil pero como dijo Vincent Van Gogh “Un camino pavimentado es cómodo para caminar, pero nunca crecerán flores en él” y si hay algo que a mi me gusta es ver flores en mi camino.

Pues bien, aquí estoy, frente a una hoja en blanco pensando en todo lo que tengo que agradecer.

En primer lugar, debo agradecer a la Universidad CEU San Pablo por haberme permitido realizar este proyecto en sus instalaciones, y por haberme concedido la Beca FPI. También debo agradecer al IMMA, CEMBIO, Animalario, y Unidad de Cultivos por haber podido contar con su soporte y equipos para la realización de algunos de los experimentos recogidos en esta Tesis.

Así mismo debo agradecer al grupo de investigación de Fernando Escrivá de la Universidad Complutense de Madrid por incluirme y valorarme desde aquel primer día en que me desmayé, en especial a Fernando porque no sólo eso, sino que siempre me ha acogido con los brazos abiertos.

A la Unidad de Investigación Translacional del HGUCR y en particular a Jose Ramón, y Jose Manuel por haberme acogido como una más dentro de esa pequeña gran familia que forman.

Al departamento de Ciencias de la Salud la Universidad Rey Juan Carlos, a Maica por su insuperable e incansable ayuda, igual que a Nancy, Miguel, Antonio, Raquel, Eva, Ana y Paco, a los que fui a conocer con miedo, pero pronto me envolvieron como una más y me hicieron sentir como en casa, pero sobre todo a Maribel por acogerme desde el primer día, y a Carlos por adoptarme, y haberse portado de forma tan increíble. Y por supuesto, a mis amigos, Espe, Eva, David y Rocío, porque en eso se convirtieron, en amigos, desde que llegué ahí asustada se preocuparon por mí como los que más y por incluirme en vuestra pequeña gran familia. Muchísimas gracias Espe y David por todas esas comidas, esas risas y por contar siempre conmigo. Eva, muchísimas gracias por todos esos ratos de ligaduras y de charlas, de risas y de cariño. Millones de gracias a Rocío porque me tocó la lotería, empezaste siendo mi supervisora y acabamos hablando largas horas en una habitación en Mallorca, gracias por enseñarme tanto, por preocuparte y quererme, y sí, así acabamos siendo amigas de las de verdad.

Muchísimas gracias a Carmen por llenar la planta de alegría, y por supuestísimo a Guillermo por todos esos consejos sinceros pero sobre todo por las risas, porque este lugar es mejor si estás aquí.

Muchísimas gracias al grupo Farma-Toxi, a Bea Somoza, Marta Gil, Nuria, Lidia, Marivi, Bea Merino, Mariano, Antonio Aguilar, Consuelo por haberme enseñado tanto, y por todos los momentos de risas, y como no a Carmen Pérez porque haces que no todo sea trabajo.

Gracias a Gonzalo porque de no ser por su aceptación en esa entrevista ni siquiera estaría aquí, pero también gracias por tantos años, y por esas risas en San Diego con Marti, por compartir conmigo tu nostalgia de la Joya, y gracias por tu sinceridad siempre.

Gracias a Estherci, porque siempre está ahí para escuchar y para dar consejos, para reír y para lo que haga falta, porque saber que ella siempre te entiende y sabe qué hacer hace que cualquier situación sea más fácil.

Gracias a mi súper familia científica, gracias a Iñigo porque sus historias siempre son únicas y porque jamás tendré tan cerca a Chuwaka como lo tuve en aquella cena. Gracias a Mari por estar siempre disponible y lista para ayudarme. A Dori y Vicky. Gracias a M José por su constante ayuda, por plantearme siempre un reto y hacer que me supere, porque me haces crecer.

Gracias a mis compañeros del labo que hacen que cada día sea un poco mejor, gracias a los que están Raquel, Javi, Elena, Rosalía y ese viaje a Berlín y su viento incluido, y los recién llegados María, Lola y a Jesús por sus risas y apoyo, y los que ya no están Paco, Miri, Dani y Monchi.

Gracias a Victor, porque ya son muchos años, en la farma, uni, aquí, siempre estás dispuesto a escuchar y sueles haber desayunado payaso así que las risas están aseguradas. Gracias a Belí, porque, aunque tu paso por el labo fue rápido te convertiste en una de nosotros y así seguiréis siempre, tu, tus frases cebolletas y tu constante apoyo.

Gracias a todos los que fuera de farma han estado ahí para mí, a mis bioquímicas Monica y los chinchorros, María Limones, Henar, y mi María Gracia porque nos parecíamos más de lo que nos hubiese gustado y a partir de ese momento nos unimos, y como no a Julio por todos esos consejos, charlas y risas, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por ser un verdadero amigo. Gracias a Sergio, a Luci por las risas aseguradas, y a Carolina que siempre me pareció que merecía la pena pero ahora lo tengo clarísimo. Gracias a Toñi por estar siempre disponible para resolver cualquier duda y dar ánimos.

Gracias a mi Marti, porque fuiste mi primer apoyo y así has seguido, porque siempre has estado y estás ahí para mí. Porque los kilómetros jamás harán que una amistad como la nuestra cambie. Porque tu dulzura y cariño hacen que la vida sea mejor y los problemas se van.

Gracias a Ana, porque día a día me has demostrado que no importa lo que ocurra que siempre estarás allá en *la ontanza (y mucho más cerca)* para mí, para darme tu ayuda de forma incondicional, para animarme, para ser sincera y hacerme reír, y eso hace que todo sea mucho más fácil, me has demostrado que eres una amiga de las de verdad que se quedan para siempre.

Gracias a Adri, porque no ha habido momento en que no estuvieses dispuesto a lo que hiciese falta por mí, porque desde el primer día has estado a mi lado, riendo y pensando en lo mejor para mí, porque día a día me has demostrado que no eras un compañero de laboratorio sino un amigo, de los grandes y de los de verdad, porque tu respuesta siempre ha sido ser así.

Gracias a Silvia, porque, aunque no estábamos destinadas a estar juntas, nosotras decidimos que iba a ser así y siempre lo será. Porque siempre estas dispuesta a decirme que sonría y ponerte el traje para rescatarme y es que contigo no habrá balas que no reboten ni los malos serán más fuertes, y si volar no se vuelve tan fácil tu harás que lo sea.

Gracias a todos vosotros que no sabéis muy bien que hago, pero os suena muy friki y aun así me seguís queriendo. Gracias a mi Ani, porque no puedo contar cuantas primaveras hace desde que te miraba con cara de susto al entrar por la puerta del cole, pero no importa lo que pase, que siempre, siempre, siempre estarás a mi lado, aunque sólo sea para abrazarme. Gracias a Davide porque la amistad que tenemos es algo que parecía imposible pero cuando una amistad es de verdad da igual los kilómetros que la separen. A Dani porque ya son tantos años apoyándonos que eres familia. A Eu porque sé lo que duele estar sin ti y sé que nunca nada lo conseguirá, porque haces que cualquier problema desaparezca o por lo menos sea menos malo, gracias por ser siempre una fireflie. A Ángeles por estar siempre. A Lau por tantos años de estar tan cerca, por preocuparse siempre y apoyarme. A Mamen por valorarme, por tu apoyo y por tu sinceridad porque eso es lo que hacen las amigas de verdad. A Ana y Pablo y mis niños, Rafa y Palmi, porque los amigos son la familia que elegimos.

Gracias a Teresa y Gabriel, porque desde el primer día me habéis querido como si fuese vuestra hija y me habéis dado tanto cariño, por ser tan increíbles conmigo que no tengo palabras ni jamás las tendré para agradecerélos. A mi Blanqui por estar siempre ahí, por tu apoyo y por hacerme sentir valorada. Y a mi Gabi porque eres mi hermano, el que nunca tuve pero que la suerte trajo a mi vida, porque no necesitamos palabras para saber que así nos sentimos.

Gracias a mis padres científicos. Gracias a ti Luisfer porque hiciste que me enamorase de la Farmacología, luego fui tan afortunada de que me eligieses como hija científica y me enseñaste tanto, porque sabes que te admiro como científico y sobre todo como persona, honesta, fiel, y que lo da todo por los suyos, sabes que para mí siempre serás un referente y un modelo a seguir, porque como dijo

Paulo Coelho “el amor no necesita ser entendido sino demostrado” y tú con tus actos demuestras la grandísima persona que eres, por todo ello te estoy tan agradecida.

Gracias a mi Carmen, porque no sólo has sido la mejor directora que se puede tener, si no que has sido muchísimo más, eres especial, increíble. Gracias por tantos momentos juntas, haciendo histología, dando clases, o simplemente riendo, gracias por enseñarme tanto y por hacerme parte de tu familia, gracias aquí o en cualquier lugar del mundo, por nuestras interminables e inmejorables charlas, por entenderme siempre, y sobre todo por siempre estar pendiente de mí, porque a tu lado todo es genial. Porque tu sólo puedes recoger margaritas.

Gracias a los abuelitos y tía Lola porque me habéis querido tanto que no cabe en mí, y ante todo me habéis enseñado que no hay golpe que te haga quedarte en el suelo, porque si tienes a alguien a tu lado que merezca la pena siempre te tenderá la mano para levantar de nuevo y seguir luchando.

Gracias a mis padres porque os lo debo todo.

Gracias Papá, porque no salen las palabras, porque te fuiste y no se si fui capaz de darte suficientemente las gracias, porque todo siempre se quedará corto, porque eres mi ejemplo a seguir, porque sólo deseo ser un pequeño reflejo de ti, porque siempre fuiste mi héroe y siempre lo serás.

Gracias Mamá, porque no puedo imaginar a una mejor, porque eres una luchadora incansable con un abrazo siempre preparado capaz de hacer que cualquier cosa se vuelva mejor, porque harías lo que fuese por mí, porque siempre me has dado mucho más amor del que nadie puede imaginar.

Gracias a ti, mi compañero de aventuras, el mejor que se puede tener, gracias Nacho, porque en esta aventura en la que me embarqué siempre has estado a mi lado, como siempre lo haces, tendiéndome esa mano para levantarme, porque me escuchas interminables horas, me comprendes y aguantas hasta cuando estoy demasiado difícil. Porque como siempre, has sido mi bote salvavidas, gracias por esta aventura y por todas las que vienen, porque teniéndote a mi lado no hay nada que no podamos superar, porque juntos somos mucho más que dos.

Y como le ocurrió al Principito, que “llegó a la tierra y se hizo amigo de un zorro que le enseñó que lo más importante es el tiempo que pasamos con las personas que amamos” yo sólo quiero compartir estas cosas con vosotros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	21
1. LA OBESIDAD COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA	23
2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD: EL PAPEL DE LA DIETA SOBRE LA CONDUCTA INGESTIVA.....	24
3. ADICCIÓN A LA COMIDA.....	25
4. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ADICCIÓN A LA COMIDA.....	29
5. VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES DE ADICCIÓN A LA COMIDA.....	31
OBJETIVOS	33
CAPÍTULO 1.....	35
BIOMARCADORES POTENCIALES DE ADICCIÓN A LA COMIDA EN PACIENTES DE OBESIDAD MÓRBIDA: ESTUDIO CONFIRMATIVO.....	35
1. INTRODUCCIÓN	36
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
2.1. Muestras del estudio.....	38
2.2. Análisis de clusterina y SAP	41
2.3. Análisis estadístico	42
3. RESULTADOS.....	42
4. DISCUSIÓN.....	44
CAPÍTULO 2.....	47
ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES MOTIVACIONALES DE LA COMIDA Y LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN EL RATON.....	47
1. INTRODUCCIÓN	49
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
2.1. Animales	50
2.2. Adquisición y extinción de preferencia condicionada de lugar (<i>conditioned place preference, CPP</i>)	51
2.3. Muestras biológicas.....	53
2.4. Determinación de CLU plasmática	53
2.5. Expresión de CLU y FH en cerebro	54
2.6. Análisis estadístico	58
3. RESULTADOS.....	58
4. DISCUSIÓN.....	64
CAPÍTULO 3 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SUBNUTRICIÓN PERINATAL Y POSNATAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN LA RATA	67
1. INTRODUCCIÓN	69

2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
2.1.	Animales	71
2.2.	Determinación de la expresión de CLU y FH en fracciones celulares de NAC y CPF	72
2.3.	Determinación de la actividad FH	75
2.4.	Análisis estadístico	76
3.	RESULTADOS.....	76
4.	DISCUSIÓN.....	81
CAPÍTULO 4 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBRENUTRICIÓN Y LA SUBNUTRICIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN CULTIVOS CELULARES.....		85
1.	INTRODUCCIÓN	87
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
2.1.	Células	92
2.2.	Condiciones de sub y sobrenutrición en cultivos celulares.....	93
2.3.	Condiciones <i>in vitro</i> y obtención de muestras para la determinación de concentración de biomarcadores.....	98
2.4.	Inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas: Western Blot	99
2.5.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas: ELISA	100
2.6.	Estudio de la morfología celular.....	100
2.7.	Estudio de la expresión génica mediante PCR cuantitativa	100
2.8.	Estudio de la funcionalidad mitocondrial: Mitotracker	103
2.9.	Análisis estadístico	104
3.	RESULTADOS.....	104
3.1.	Establecimiento del modelo de sub y sobrenutrición según concentración de FBS en el medio de cultivo	104
3.2.	Resultados del modelo de sub y sobrenutrición según concentración de glucosa en el medio de cultivo	114
4.	DISCUSIÓN.....	123
CAPÍTULO 5 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA CONSTRICCIÓN CRÓNICA DEL NERVIIO CIÁTICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN LA RATA		129
1.	INTRODUCCIÓN	131
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	133
2.1.	Animales	133
2.2.	Inducción de la neuropatía periférica por ligadura parcial del nervio ciático.....	133
2.3.	Evaluación de la alodinia mecánica: Test de Von Frey.....	134
2.4.	Evaluación de la hiperalgesia térmica: <i>Plantar Test</i>	136
2.5.	Evaluación de la ansiedad: laberinto elevado en cruz	137
2.6.	Determinación de clusterina en cerebro.....	137

2.7.	Determinación de clusterina plasmática.....	139
2.8.	Esquema general del procedimiento y grupos experimentales.....	139
2.9.	Análisis estadístico	140
3.	RESULTADOS.....	140
4.	DISCUSIÓN.....	145
	DISCUSIÓN GENERAL.....	149
	CONCLUSIONES	156
	BIBLIOGRAFÍA.....	159

ABREVIATURAS

Ad Lib: Ad Libitum

AgRP: Proteína R-Agouti

ALT: Alanina transaminasa

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosín trifosfato

ATP5A: Enzima ATPasa subunidad 5 α

ATV: Área Tegmental Ventral

A.U: Unidades arbitrarias

BC: Buen control (de la ingesta)

C: Control

C-: Control negativo

CART: Transcrito regulado por cocaína y amfetamina

CCI: Ligadura parcial del nervio ciático

C-CPF: Fracción citosólica Corteza Prefrontal

CHOW: Pienso control

CLU: Clusterina

C-NAC: Fracción citosólica Núcleo Accumbens

COF: Corteza Órbita-frontal

COND: Condicionamiento

CPF: Corteza Prefrontal

CPP: Condicionamiento preferencial al sitio

DAB: Diaminobencidina

ECL: Enhanced Chemoluminescence Luminol

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ESM: Error estadístico medio

EXT: Extinción

FBS: Suero Fetal Bovino

FCQT_PC: Cuestionario *Food Craving Questionnaire Trait* (dimension pérdida de control sobre la ingesta)

FH: Fumarato Hidratasa

For: Forwards

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GGT: Gamma glutamil transferasa

GSK3: Kinasa sintetasa de glucógeno 3
H: Horas
HDL: *High density Lipoprotein*
HF: *High Fat*
HGUCR: Hospital General Universitario de Ciudad Real
HRP: *Horseraddish Peroxidase*
IG: Introducción general
IL-6: Interleukina 6
IMC: Índice de Masa Corporal
MC: Mal Control (de la ingesta)
M-CPF: Fracción mitocondrial Corteza Prefrontal
Min: Minutos
M-NAC: Fracción mitocondrial Núcleo Accumbens
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAC: Núcleo Accumbens
nCLU: Clusterina nuclear
NPY: Neuropeptido Y
OF: *Overfed* / Sobrealimentado
OMS: Organización Mundial de la Salud
PI3K: Fosfoinositol 3 kinasa
pnCLU: Clusterina prenuclear
POMC: Proopiomelacortina
POST-1: Postcondicionamiento 1
POST-2: Postcondicionamiento 2
POST-3: Postcondicionamiento 3
PRE: Precondicionamiento
psCLU: Clusterina presecretada
Rev: *Reverse*
Rpm: Revoluciones por minuto
RT: Retrotranscripción
SAP: Amiloide Sérico P
sCLU: Clusterina secretada
Seg: Segundos
SHAM: Control
SUB: Subnutrición

TDAH: Trastorno de déficit de atención con hiperactividad

TKT: Transketolasa

TMB:3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TTO: Tratamiento

U: Subnutrición

UIT: Unidad de Investigación Traslacional

YFAS: Yale Food Addiction Scale

RESUMEN

La clusterina es una proteína multifuncional con numerosas isoformas y localizaciones que está presente en todos los fluidos del organismo, así como en el interior celular. Estudios previos de proteómica de expresión diferencial habían sugerido una posible relación entre niveles plasmáticos de clusterina y adicción a la comida, lo que nos ha llevado a profundizar en el estudio de clusterina como posible biomarcador asociado a alteraciones del sistema cerebral de refuerzo y recompensa. En un primer estudio confirmamos mediante inmunoensayos la existencia de una correlación positiva entre niveles plasmáticos de clusterina y pérdida de control sobre la ingesta en pacientes con obesidad mórbida, lo que nos aconsejó progresar utilizando modelos animales en los que las propiedades motivacionales de la comida estuvieran alterados. De esta forma, en un modelo de sobrealimentación con una dieta rica en grasa en el ratón obtuvimos una correlación entre las propiedades motivacionales de la sacarosa y los niveles plasmáticos de clusterina, junto con una sobre-expresión de esta proteína en el núcleo accumbens de los animales sobrealimentados. De la misma forma, la subnutrición crónica durante la vida perinatal y adulta provoca en la rata una sobre-expresión de clusterina en la fracción mitocondrial de núcleo accumbens, sin embargo, cuando la subnutrición se circunscribe a la vida perinatal, los adultos exhiben una reducción significativa de la expresión de clusterina en este mismo núcleo. Desarrollamos también modelos in vitro de sub- y sobre-alimentación en cultivos de neuroblastoma para avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos de clusterina, observando que la proteína trasloca su posición y cambia su función para preservar la supervivencia celular de forma adaptativa y no permanente. En un último estudio observamos que la ligadura del nervio ciático, una condición que se sabe conlleva anhedonia, provoca alodinia mecánica, estrés y una marcada disminución de la expresión de clusterina en la corteza prefrontal, lo que sugiere la implicación de esta proteína en los cambios funcionales que acompañan al dolor neuropático en este área cerebral. Todos estos resultados refuerzan la idea de que clusterina estaría implicada en las alteraciones del sistema de refuerzo y recompensa, ejerciendo posiblemente un papel neuroprotector al igual que en otras patologías del sistema nervioso.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA OBESIDAD COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

La obesidad es una patología cada vez más prevalente que incluso ha llegado a ser calificada como la pandemia del siglo XXI por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que la padece más de un tercio de la población mundial (Stevens et al., 2012; Hruby y Hu, 2015) y un 10% de la población infantil (Haslam y James, 2005). Al margen de esta elevada prevalencia la obesidad conlleva un elevado número de comorbilidades (Knight, 2011) y un acortamiento significativo de la esperanza de vida, siendo la principal causante de aproximadamente 3,4 millones de muertes en 2010 (Ng *et al.*, 2014). El principal criterio diagnóstico de obesidad se basa en el Índice de Masa Corporal (IMC), que se calcula como el peso corporal en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado. La OMS establece distintos rangos para clasificar a las personas según su IMC, tal y como se recoge en la tabla IG-1.

CLASIFICACIÓN	IMC
BAJO PESO	<18,5
NORMOPESO	18,5-24,9
SOBREPESO	25-29,9
OBESIDAD GRADO I	30-34,9
OBESIDAD GRADO II	35-39,9
OBESIDAD MÓRBIDA	≥40

Tabla IG-1. Clasificación de la OMS según el Índice de Masa Corporal

Los individuos obesos comparten una serie de riesgos independientemente de la etiología de su enfermedad. Así, en la obesidad se produce una acumulación elevada de grasa en el organismo que resulta perjudicial por el estado de inflamación crónica que se mantiene a lo largo del tiempo. En este sentido, el tejido adiposo tiene capacidad de expansibilidad para poder aumentar la cantidad de triglicéridos que acumula, pero cuando la cantidad de ácidos grasos excede dicha capacidad hiperplásica e hipertrófica del tejido se produce un fenómeno conocido como lipotoxicidad en el que los triglicéridos que no pueden acumularse se distribuyen por el resto de los tejidos a través de la circulación, provocando así acumulaciones ectópicas de grasa y comorbilidad (Virtue y Vidal-Puig, 2008). A su vez, el tejido adiposo tiene funciones endocrinas y metabólicas que se ven modificadas por la enfermedad: de esta forma, mientras que los adipocitos pequeños de un individuo normopeso

promueven la homeostasis metabólica, los adipocitos engrosados de los individuos obesos son capaces de reclutar macrófagos promoviendo el proceso inflamatorio y la liberación de adipocinas como IL-6 o TNF α ; estas últimas participan a su vez en la progresión de la resistencia insulínica y en otro tipo de alteraciones que afectan a diversos órganos y sistemas, incluido el sistema nervioso central (Weisberg et al., 2003; Daws et al., 2011).

Al margen de estas circunstancias comunes al conjunto de los pacientes de obesidad, las diferentes causas que pueden dar lugar a la enfermedad deben tenerse en cuenta para diseñar aproximaciones terapéuticas personalizadas. Hoy sabemos que los condicionantes genéticos, nutricionales y comportamentales (entre estos últimos el sedentarismo y la conducta ingestiva) contribuyen conjuntamente a la génesis del problema aunque de una forma desigual en cada caso. La terapéutica debe considerar esta etiología multifactorial para ser efectiva (Christakis y Fowler, 2007; Varela-Moreiras et al., 2013), y de esta forma autores como Field et al. (2013) consideran que el progreso en los tratamientos personalizados de la obesidad pasa por un mejor diagnóstico de la misma mediante la identificación de subtipos bien definidos.

2. ETIOLOGÍA DE LA OBESIDAD: EL PAPEL DE LA DIETA SOBRE LA CONDUCTA INGESTIVA

Desde un punto de vista nutricional, se atribuye con frecuencia a la ingesta calórica neta la responsabilidad última del aumento de peso en los individuos obesos, quienes exhiben básicamente un balance energético positivo entre lo consumido y lo gastado. Al margen de esto, la naturaleza de aquello ingerido puede jugar también un papel extremadamente relevante. Así, en las últimas tres décadas muchas sociedades han sufrido cambios substanciales en sus formas de vida y en su alimentación, virando desde una dieta sana y equilibrada al consumo exacerbado de alimentos con un elevado contenido en azúcares y grasas procesadas capaces de generar por sí mismos cambios en la fisiología cerebral. Este hecho engarza con los factores comportamentales implicados en la obesidad, ya que el consumo de determinados alimentos podría ser la causa de alteraciones centrales que a su vez favoreciesen la impulsividad y la hiperfagia, perpetuando así el problema.

El incremento de la impulsividad en la toma de decisiones parece estar presente en una proporción cada vez mayor de la población obesa. Tanto es así que está en auge la discusión en cuanto a si la

obesidad es causa de impulsividad, o si es justo lo contrario, o si existe una causalidad común a ambas: la dieta. Estudios recientes realizados en animales de experimentación y en humanos han relacionado un consumo elevado de dietas ricas en grasas con un mayor desarrollo de conductas impulsivas. Así, Steele et al. (2017) encontraron que ratas alimentadas con una dieta rica en grasa mostraban una tendencia a la elección de recompensas más cortas pero más rápidas frente a recompensas más largas y más lentas, resultado que demuestra un aumento de la impulsividad de estos animales frente a los alimentados con dieta control. Por su parte Lumley *et al.* (2016) valoraron la impulsividad en humanos por medio de un cuestionario y observaron una correlación significativa con el consumo de alimentos y bebidas ricas en azúcares y grasas procesadas, valorado en una escala de ingesta de tales alimentos.

En general se considera que en los trastornos impulsivos/compulsivos, la impulsividad es un factor de riesgo inicial y la compulsividad un estadio posterior en que la falta de control sobre los impulsos desencadena conductas patológicas en relación con determinados estímulos (Alguacil y González-Martín, 2015). Este es un patrón conductual muy reconocible en el caso de los trastornos por uso de sustancias, en los que es fácilmente observable que la búsqueda y el consumo de una droga va adquiriendo cada vez más importancia para el consumidor, que desarrolla así lo que conocemos como una adicción. En los últimos años se ha subrayado el paralelismo entre este tipo de adicción y el patrón de consumo de determinados alimentos tanto en animales como en humanos, lo que ha llevado a formular el concepto de “adicción a la comida” y a postular que una proporción de individuos obesos se verían afectados por este problema (Davis *et al.*, 2011). De la misma forma que lo anteriormente comentado en cuanto a impulsividad, el consumo de dietas apetitosas de alto contenido calórico podría ser uno de los desencadenantes de este tipo de conductas adictivas hacia la comida (Alsiö *et al.*, 2012). Aunque el concepto de adicción a la comida continúa actualmente en discusión (Gordon *et al.*, 2018), las importantes derivadas del mismo están conduciendo a numerosos estudios que tratan de caracterizarlo mejor desde un punto de vista diagnóstico y terapéutico.

3. ADICCIÓN A LA COMIDA

La ingesta es una conducta muy compleja que resulta de una interacción entre señales metabólicas y mecanismos cognitivos y emocionales fuertemente influidos por el ambiente (Zheng y Berthoud, 2007). Para que se produzca una adecuada homeostasis energética, varias hormonas como la insulina, grelina, y otros péptidos como NPY, AgRP, POMC y CART, controlan las señales de saciedad o hambre

a nivel hipotalámico. Esencialmente, en situaciones de déficit energético se produce una secreción de grelina desde el estómago que da lugar a la estimulación de receptores en las neuronas del núcleo arcuado hipotalámico, donde a su vez aumenta la liberación de NPY y AgRP, neuropéptidos que promueven la ingesta. Por el contrario, en situaciones de exceso energético aumentan los niveles de leptina e insulina, hormonas que inhiben la liberación de NPY y AgRP y promueven la liberación de los péptidos saciantes POMC y CART que inhibirán la ingesta (Matafome y Seiça, 2017). Se podría así decir que la necesidad homeostática de ingerir alimentos estaría regulada por esta ruta prominentemente hipotalámica. Sin embargo, el deseo de ingerir comidas apetecibles, regulado por el sistema hedónico, puede desencadenar la ingesta independientemente del estado energético. El sistema hedónico comprendería el circuito de recompensa cerebral, o circuito dopaminérgico mesolímbico (Figura IG-1), en el que el sabor apetecible de ciertos alimentos desencadena la liberación de dopamina desde las neuronas del área tegmental ventral (VTA) hacia sus zonas de proyección en el Núcleo Accumbens (NAc). Desde este último núcleo la señal se propaga hacia la corteza prefrontal (CPF), responsable por una parte del control cognitivo de la actividad de las neuronas del ATV y NAc a través de la liberación de GABA y glutamato, y por otra parte de la comunicación con la corteza órbito-frontal (COF), que en última instancia determina la ingesta (Nestler, 2004).

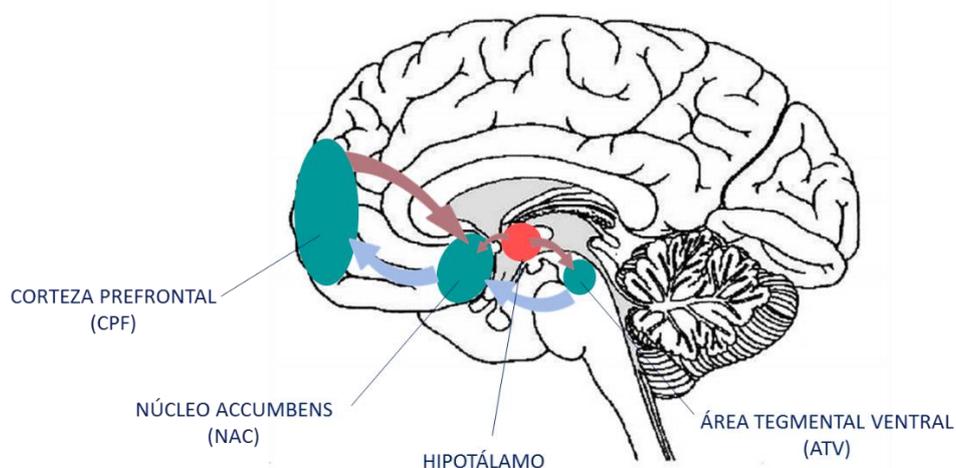


Figura IG-1. Esquema del circuito cerebral de recompensa y señalización dopaminérgica. En azul se representan las áreas del circuito cerebral de recompensa, Área Tegmental Ventral, Núcleo Accumbens (recompensa y adicción), y Corteza Prefrontal (toma de decisiones y funciones ejecutivas), y las proyecciones de tal circuito, en rojo se representa el hipotálamo que integra la información homeostática y hedónica, siendo capaz de inhibir tal circuito en condiciones fisiológicas con sus prolongaciones al Área Tegmental Ventral y Núcleo Accumbens, inhibición que también puede realizar la corteza prefrontal.

En situaciones fisiológicas, ambos sistemas, el sistema homeostático y el hedónico, suelen estar muy integrados y se interregulan estrechamente (Figura IG-2); así, por ejemplo, una ingesta iniciada por

estímulo de la vía hedónica puede verse limitada por la influencia del sistema homeostático a través de la activación de neuronas del hipotálamo lateral, que proyectan sobre el área tegmental ventral y el núcleo accumbens para reprimir su influencia positiva sobre la ingesta. Estos mecanismos de interregulación podrían verse afectados en situaciones patológicas, de forma que una regulación inapropiada de la conducta desembocaría en aumentos o disminuciones anormales del peso corporal.

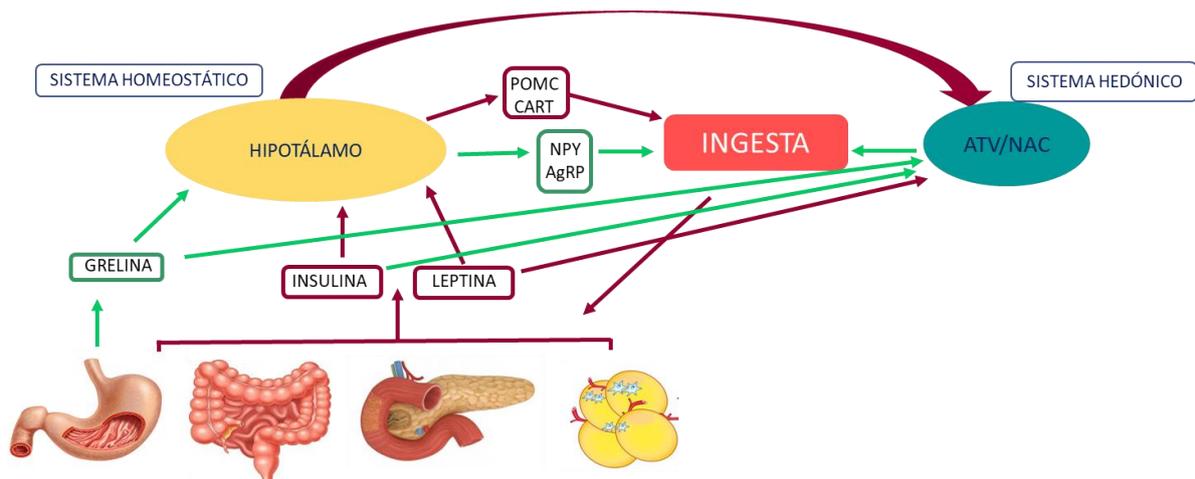


Figura IG-2. Integración de los sistemas hedónico y homeostático para la regulación de la ingesta. Las líneas verdes representan las vías excitatorias y las líneas granates las inhibitorias de los sistemas homeostático (hipotálamo mediando por la liberación de POMC y CART, y NPY y AgRP) y hedónico (ATV- Área Tegmental Ventral; y NAC- Núcleo Accumbens) para el control de la ingesta.

Numerosos autores han puesto de manifiesto que una función deficiente del sistema de refuerzo y recompensa puede estar en el origen de las conductas impulsivo/compulsivas que aparecen en diversas enfermedades psiquiátricas, entre ellas en las adicciones, aunque también en otro tipo de enfermedades como el síndrome de Tourette o el Síndrome de Hiperactividad con Déficit de Atención; estos síntomas serían así manifestaciones de lo que ha venido a denominarse “Síndrome de Deficiencia de Recompensa” (Blum *et al.*, 2017). De acuerdo a esta hipótesis, las alteraciones neuroquímicas subyacentes a dicho síndrome (entre las que destacaría una hipofunción dopaminérgica mesolímbica) podrían ser comunes para diversas patologías psiquiátricas como las anteriormente mencionadas, y determinarían así un espectro de síntomas estrechamente relacionado. Este contexto explicaría los numerosos paralelismos conductuales que se han encontrado entre los fenómenos de adicción a la comida y a las drogas de abuso, tanto en humanos (Volkow y O’Brien, 2007) como en modelos experimentales (Alsiö *et al.*, 2012); ya que alimentos y drogas influyen de forma análoga sobre la actividad del sistema de refuerzo y recompensa, podría esperarse que desencadenasen efectos

semejantes tras estimularlo de forma aguda o crónica, pudiendo desembocar la estimulación excesiva del mismo en un trastorno de tipo adictivo en ambos casos. De esta forma se ha observado que al igual que las drogas de abuso, los alimentos apetitosos provocan un aumento de la liberación de dopamina en núcleo accumbens y una sensación placentera (Small et al., 2003; Beaulieu y Gainetdinov, 2011), pero cuando el acceso a dietas ricas en azúcares y grasas se prolonga en el tiempo los cambios neuroquímicos consecuentes (entre ellos una disminución de receptores D_1 en núcleo accumbens) alteran la capacidad de respuesta del circuito cerebral de recompensa (Alsiö et al., 2012; de Melo Martimiano et al., 2015). Podría así hablarse de una dimensión adictiva de la obesidad estrechamente relacionada (aunque no totalmente superponible) con la adicción a las drogas de abuso (Volkow et al., 2013; Figura IG-3).

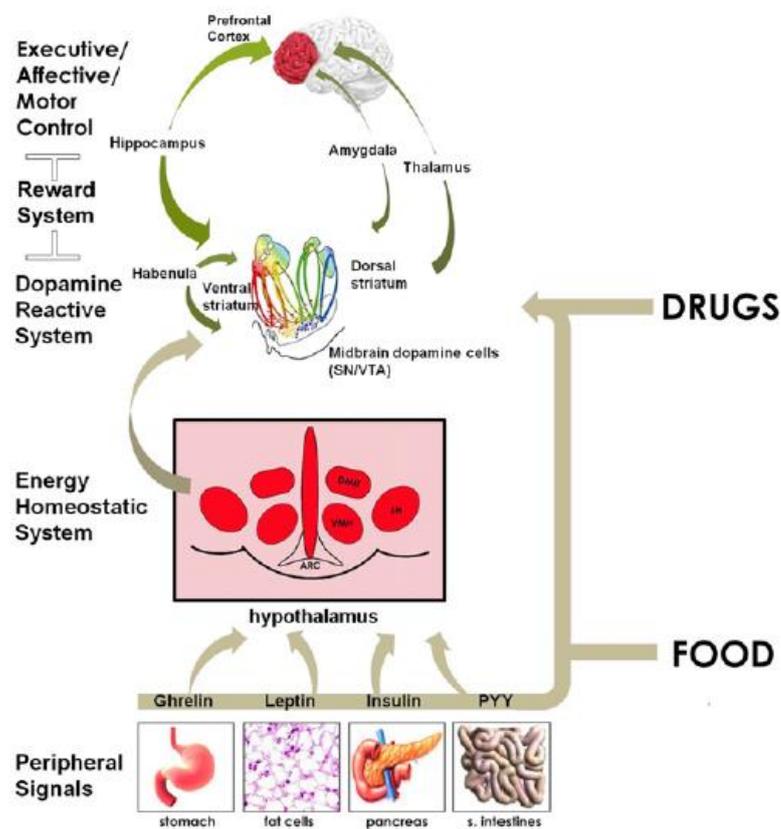


Figura IG-3. Analogías y diferencias entre los efectos moduladores de las drogas de abuso y de los alimentos sobre los mecanismos cerebrales implicados en el control de la ingesta y en el desarrollo de adicciones. Mientras que las drogas de abuso ejercen un efecto modulador directo sobre las vías dopaminérgicas del sistema de refuerzo, los alimentos actúan sobre las mismas vías tanto directa como indirectamente, en este último caso a través de proyecciones activadas desde el hipotálamo. Tomado de Volkow et al. (2013).

En definitiva, la “adicción a la comida” (o más bien “adicción a comer” según prefieren otros autores) (Hebebrand *et al.*, 2014) consistiría en un trastorno de tipo adictivo que se acompañaría de una disregulación del sistema cerebral de refuerzo y recompensa (Berthoud, 2011) y/o un procesamiento cognitivo alterado de las claves contextuales asociadas a la comida (Higgs, 2015), entre otras disfunciones, y que podría presentarse hasta en un 20% de los pacientes obesos (Pursey *et al.*, 2014). En el caso concreto de los obesos mórbidos, se ha estimado que los criterios de “adicción a la comida” se cumplirían en un 16-54% de los pacientes (Opolski *et al.*, 2015; Brunault *et al.*, 2016). Es importante señalar que estos últimos individuos podrían estar en mayor riesgo de experimentar la denominada “transferencia de adicción” tras una intervención de cirugía bariátrica, fenómeno por el cual su adicción previa a la comida se transformaría en una adicción a drogas de abuso (principalmente alcohol) o incluso al juego (Steffen *et al.*, 2015); en este sentido, se ha estimado que la proporción de nuevos consumidores de drogas entre los pacientes sometidos a cirugía bariátrica podría ser muy elevada (entre el 34 y el 89% de los individuos, según Li y Wu, (2016)). Por todo lo anterior resulta evidente la necesidad de progresar en la identificación y caracterización biológica del fenotipo adictivo de obesidad, ya que esto podría permitir el diseño de aproximaciones terapéuticas más adecuadas y, en el caso de la cirugía de la obesidad, podría disminuir los fracasos y ayudar a prevenir las graves complicaciones postquirúrgicas anteriormente mencionadas. En los últimos años, diversos autores han utilizado la *Yale Food Addiction Scale* (YFAS) para “diagnosticar” la adicción a la comida y establecer su relación con diversas variables fisiológicas, conductuales, genéticas o psicopatológicas (Meule y Gearhardt, 2014). Sin embargo, no se dispone aún de marcadores biológicos cuya asociación con un posible fenotipo adictivo de la obesidad esté suficientemente contrastada.

4. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE ADICCIÓN A LA COMIDA

Las tecnologías ómicas constituyen herramientas muy útiles para la búsqueda de biomarcadores novedosos (y también de dianas terapéuticas) potencialmente asociados a una patología, y se vienen aplicando así de forma creciente en Psicofarmacología (Alguacil *et al.*, 2014). Mediante su uso se pretenden identificar polimorfismos genéticos, perfiles de expresión génica, modificaciones epigenéticas, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados en tejidos de individuos afectados y controles sanos (biomarcadores diagnósticos), en individuos afectados en mayor o menor medida por la enfermedad (biomarcadores pronósticos) o en individuos afectados que responden en mayor o menor medida a una determinada terapia (biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento). Las muestras biológicas para estos estudios comparativos pueden proceder de modelos animales de

la enfermedad o directamente de pacientes; la ventaja de la primera opción estriba en la accesibilidad a diversos tipos de tejidos, algo limitado en pacientes por motivos éticos, mientras que la ventaja de la segunda estrategia es la mayor proximidad a la patología en estudio ya que implica el uso de material biológico específicamente humano. Cuando los estudios comparativos se circunscriben a individuos afectados por la patología pero que difieren en algún rasgo concreto de la misma, pueden proporcionar biomarcadores con valor diagnóstico que contribuyan a definir fenotipos concretos de la enfermedad, lo que puede resultar ventajoso para el establecimiento de terapias más personalizadas.

Siguiendo esta última estrategia, nuestro equipo aplicó un protocolo de proteómica de expresión diferencial para tratar de identificar biomarcadores plasmáticos de pérdida de control sobre la ingesta en pacientes obesos mórbidos, con el fin de contribuir a una mejor definición del fenotipo de adicción a la comida en la obesidad. La pérdida de control sobre la ingesta es un factor clave del *craving* o ansia por comer en los obesos mórbidos (Crowley *et al.*, 2014), que a su vez es uno de los principales componentes de la adicción a la comida. El principal motivo de optar por un factor simple para el fenotipado de los pacientes en vez de un parámetro multidimensional (por ejemplo, la puntuación en el test YFAS) responde a la necesidad de reducir la variabilidad que es intrínseca a este último tipo de parámetros, lo que resulta muy conveniente cuando el tamaño de la muestra se prevé limitado. De esta forma llegamos a encontrar dos proteínas diferencialmente expresadas en el plasma de los obesos mórbidos con mayor o menor pérdida de control sobre la ingesta (Pérez-García *et al.*, 2014). La espectrometría de masas identificó posteriormente estas proteínas como clusterina y péptido amiloide sérico P, que propusimos en consecuencia como biomarcadores potenciales de adicción a la comida en pacientes obesos.

Otra estrategia aplicada por nuestro equipo ha sido la aplicación de protocolos de proteómica de expresión diferencial para identificar biomarcadores de vulnerabilidad adictiva partiendo de modelos animales de adicción. Si bien estos estudios se realizaron con drogas de abuso (cocaína y morfina, concretamente), la semejanza etiopatológica entre distintos tipos de adicción anteriormente reseñada presupone que los biomarcadores de adicción a las drogas podrían serlo también de adicción a la comida; de hecho, hemos argumentado que los modelos animales de adicción a las drogas tienen mayor valor traslacional que los modelos animales de trastornos de la conducta alimentaria, y que por tanto son incluso preferibles a estos últimos a la hora de buscar biomarcadores de adicción a la comida (Alguacil y González-Martín, 2015). La realización de estos estudios permitió identificar cinco proteínas diferencialmente expresadas en el núcleo accumbens de los animales con distinta persistencia en su

conducta de búsqueda de drogas, que pasamos así a proponer como biomarcadores de adicción (del Castillo *et al.*, 2009).

5. VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES DE ADICCIÓN A LA COMIDA

Tras una primera identificación de biomarcadores potenciales mediante tecnologías masivas de detección como las previamente descritas, resulta necesario validar los resultados en estudios más específicos ya enfocados a los biomarcadores identificados, bien utilizando modelos animales o muestras humanas. Por otra parte, puede también plantearse la realización de estudios aún más detallados en los mismos modelos o incluso en modelos *in vitro* para investigar la posible relación causal del biomarcador con la génesis, el desarrollo o las manifestaciones biológicas de la patología en estudio, lo que puede hacer que dicho biomarcador (u otras moléculas estrechamente relacionadas con el mismo) se convierta además en una diana para el desarrollo de nuevos fármacos.

En nuestro laboratorio nos hemos planteado seguir esta estrategia con los biomarcadores de adicción identificados en los estudios de proteómica de expresión diferencial que se han comentado en el epígrafe anterior. Así, hemos comprobado que tres de las proteínas propuestas como biomarcadores de adicción a partir de los experimentos de búsqueda de cocaína anteriormente mencionados están también diferencialmente expresadas en el núcleo accumbens de ratones alimentados con una dieta grasa, existiendo además una correlación significativa con el comportamiento de búsqueda de una comida apetitosa que exhiben los animales (Pérez-Ortiz *et al.*, 2016; Figura IG-4). Estos resultados apoyan la idea de que dichas proteínas se comportan efectivamente como biomarcadores de adicción a la comida en núcleo accumbens. Se observó además que las tres proteínas evolucionaban de forma paralela y que, teniendo en cuenta su conocida participación en distintos procesos metabólicos, la sobre-expresión de su conjunto probablemente refleja un mismo fenómeno de activación celular.

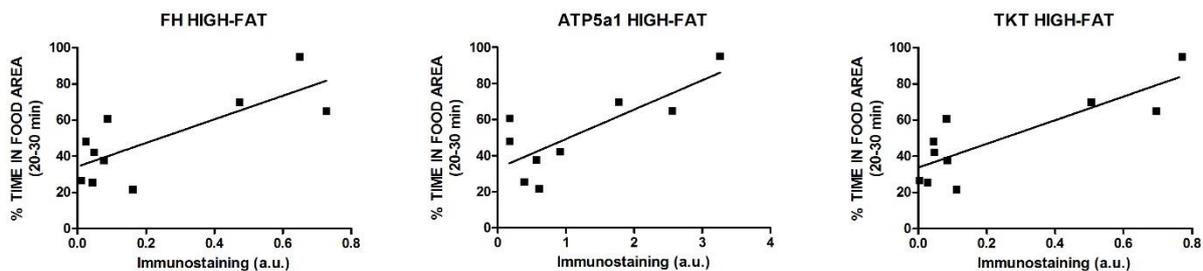


Figura IG-4. Correlación positiva entre los valores de un parámetro proporcional al grado de adicción a la comida (% TIME IN FOOD AREA) y la expresión de tres proteínas en el cerebro de animales alimentados con una dieta rica en grasa (HIGH-FAT). La expresión proteica se midió en núcleo accumbens mediante una técnica inmunohistoquímica (a.u.=unidades arbitrarias). Estas tres proteínas (fumarato hidratasa, FH; ATP sintetasa, ATP5a1 y transketolasa, TKT) habían sido previamente identificadas como marcadores de vulnerabilidad a los efectos adictivos de cocaína (Del Castillo et al., 2009). Figura tomada de Pérez-Ortiz et al. (2017).

Hemos observado además que una de estas proteínas, en concreto fumarato hidratasa (FH), está también sobre-expresada e hiperactiva en la fracción mitocondrial de núcleo accumbens de animales subnutridos, que se sabe exhiben una activación anormal del sistema de refuerzo y recompensa; este resultado refuerza el interés de FH como marcador cerebral de diversas alteraciones de la conducta alimentaria que conllevan disfunción del sistema de refuerzo y recompensa (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2013).

Si bien la identificación de marcadores cerebrales como FH puede resultar de gran interés como herramienta para estudiar la adicción a la comida, es indudable que cuando un biomarcador puede cuantificarse en muestras biológicas más accesibles (como por ejemplo en plasma) tiene mucho mayor interés clínico. Es por eso que nuestra principal atención se centró en clusterina y péptido amiloide sérico P como proteínas diferencialmente expresadas en el plasma de los pacientes obesos con distinto control sobre la ingesta. En este sentido, la presente tesis doctoral ha tratado de progresar en la validación de estos biomarcadores, en la comprensión de su papel regulador sobre la ingesta y en el establecimiento de nuevos modelos experimentales que permitan profundizar en el mecanismo biológico subyacente a esta regulación.

OBJETIVOS

- a) Confirmar mediante inmunoensayos y análisis de correlaciones la asociación previamente observada en obesos mórbidos entre control sobre la ingesta, por un lado, y concentración plasmática de clusterina y péptido amiloide sérico P, por otro.
- b) Estudiar los efectos de la sobrealimentación con una dieta rica en grasa sobre las propiedades motivacionales de la comida, los niveles plasmáticos de clusterina y la expresión cerebral de esta proteína en un nuevo modelo en el ratón.
- c) Estudiar los efectos de la subnutrición perinatal y postnatal sobre la expresión cerebral de clusterina en la rata.
- d) Estudiar los efectos de la sobrealimentación con una dieta rica en grasa y la constricción crónica del nervio ciático sobre la nocicepción, la ansiedad, los niveles plasmáticos de clusterina y la expresión cerebral de esta proteína en la rata.
- e) Diseñar nuevos modelos in vitro en cultivos celulares que permitan estudiar la implicación de clusterina en la regulación de los procesos asociados a la sobrenutrición y la subnutrición, así como los mecanismos biológicos implicados en dicha regulación.

CAPÍTULO 1

BIOMARCADORES POTENCIALES DE ADICCIÓN A LA COMIDA EN PACIENTES DE OBESIDAD MÓRBIDA: ESTUDIO CONFIRMATIVO

1. INTRODUCCIÓN

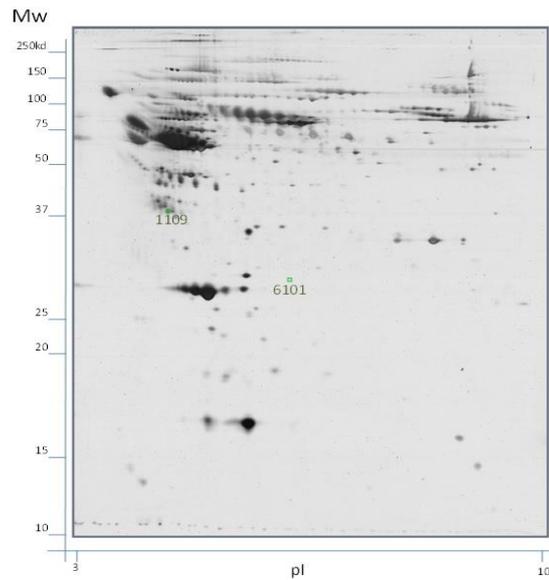
Se ha sugerido que la adicción a la comida podría constituir un fenotipo específico de obesidad en el que se presentarían deficiencias patológicas en el sistema cerebral de refuerzo y recompensa semejantes a las producidas por las drogas de abuso (Volkow y O'Brien, 2007; Volkow *et al.*, 2013). Se ha estimado que al menos un 20% de los obesos cumpliría criterios de adicción a la comida (Pursey *et al.*, 2014), porcentaje que sería ligeramente inferior (en torno a un 16) en el caso específico de los obesos candidatos a cirugía bariátrica (Brunault *et al.*, 2016). Teóricamente estos pacientes requerirían una atención psiquiátrica especial, ya que podrían estar en mayor riesgo de desarrollar complicaciones como la denominada “transferencia de adicción” (Steffen *et al.*, 2015). Según algunos autores, este último fenómeno, responsable de que los pacientes desarrollen adicción al alcohol, a las drogas o al juego tras la cirugía bariátrica, podría afectar a un porcentaje superior al 30% de los pacientes intervenidos (Li y Wu, 2016). A pesar de estos hallazgos, no se dispone de biomarcadores que puedan complementar las evaluaciones psiquiátricas conducentes al diagnóstico de la adicción a la comida.

Con el fin de progresar en la obtención de biomarcadores diagnósticos de adicción a la comida en la obesidad mórbida, nuestro grupo aplicó una aproximación proteómica que permitiese identificar proteínas séricas diferencialmente expresadas en los pacientes de acuerdo a su grado de control sobre la ingesta de alimentos (Pérez-García *et al.*, 2014). Este estudio fue parte del proyecto BARIFIS de identificación de biomarcadores asociados a obesidad, a partir del cual se seleccionaron los candidatos a cirugía bariátrica que habían cumplimentado la versión española del *State y Trait Food Cravings Questionnaire, trait scale*(FCQT;(Cepeda-Benito *et al.*, 2000)) junto con un grupo de controles normopesos apareado en sexo y edad con dichos pacientes. El cuestionario FCQ-T había mostrado una consistencia excelente en estudios previos con pacientes de obesidad mórbida (Crowley *et al.*, 2012) y su estructura factorial permitió dividir a los pacientes en dos grupos según la variable “pérdida de control” sobre la ingesta (FCQT_PC): un grupo con buen control (BC) y otro con mal control (MC). Aunque ambos grupos diferían entre sí en este parámetro, resultaban relativamente homogéneos en otras variables funcionales (Tabla 1.1.).

Variable	Unidad	Controles (n = 23)	Pacientes MC (n = 13)	Pacientes BC (n = 10)
Peso	Kg	61,3 ± 1,8	130,4 ± 4,3*	133,0 ± 4,8*
IMC	Kg/m ²	22,5 ± 0,4	47,5 ± 1,6*	48,1 ± 1,9*
Leucocitos	miles/μL	6,7 ± 0,2	7,8 ± 0,5*	8,1 ± 0,6*
Hemoglobina	g/dL	14,2 ± 0,2	13,9 ± 0,3	13,9 ± 0,4
Creatinina	mg/dL	0,89 ± 0,28	0,81 ± 0,04	0,75 ± 0,05
Prot. totales	g/dL	7,2 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1
GGT	UI/L	13,7 ± 1,1	39,3 ± 12,5*	48,8 ± 14,2*
AST	UI/L	21,2 ± 0,7	23,7 ± 2,3	24,9 ± 2,6
ALT	UI/L	16,8 ± 1,0	32,2 ± 3,2*	28,0 ± 3,7*

Tabla 1.1. Datos antropométricos, hematológicos, hepáticos y renales (media ± ESM) representativos de los controles normopesos y los pacientes incluidos en el estudio de Pérez-García et al. (2014), subdivididos estos últimos según su control sobre la ingesta (MC, mal control; BC, buen control). IMC, índice de masa corporal; GGT, gamma-glutamyl transferasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina transaminasa. * p < 0,05 vs controles (ANOVA y Bonferroni posthoc).

Una vez distribuidos en dos grupos, se compararon los proteomas séricos de los pacientes observándose la existencia de diferencias significativas en la densidad de dos puntos concretos (Figura 1.1.). La identificación de las proteínas correspondientes a estos puntos por espectrometría de masas reveló que se trataba de clusterina (1109) y del péptido sérico amiloide P (*serum amyloid P*, SAP; 6101). Si bien este resultado permitía ya sugerir que estas dos proteínas se comportaban como biomarcadores de control de la ingesta, la distribución de los pacientes de acuerdo a un determinado valor de FCQT-PC representaba una limitación del análisis. Este criterio se había adoptado como una primera aproximación para reducir el número de identificaciones a las de los puntos que mostrasen las diferencias más relevantes, pero los resultados requieren comprobaciones adicionales para sustentar convenientemente la hipótesis de que las proteínas identificadas están efectivamente relacionadas con el control sobre la ingesta. El trabajo que se recoge en este primer capítulo de la tesis doctoral ha tratado de profundizar en esta cuestión mediante análisis adicionales de los proteomas obtenidos por Pérez-García *et al.* (2014), así como con un estudio adicional de los niveles séricos reales de clusterina y SAP en alícuotas de los mismos pacientes y controles.



	MC (n = 12)	BC (n = 10)
Punto	Densidad (u.a.)	Densidad (u.a.)
1109	2439 ± 704	1450 ± 458*
6101	148 ± 32	57 ± 24*

Figura 1.1. Gel representativo de los proteomas obtenidos en el estudio de Pérez-García et al. (2014), en el que se localizan los dos puntos diferencialmente expresados entre pacientes con buen control (BC) y mal control (MC) sobre la ingesta. * $p < 0,05$ vs MC (t de Student).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Muestras del estudio

En este estudio se han utilizado alícuotas de suero de los mismos sujetos incluidos en el trabajo previamente mencionado de Pérez-García *et al.* (2014), pertenecientes a su vez al proyecto BARIFIS llevado a cabo en el Hospital General Universitario de Ciudad Real. El proyecto BARIFIS incluyó pacientes de obesidad mórbida candidatos a cirugía bariátrica y controles normopesos (voluntarios del personal sanitario y estudiantes de Medicina del Hospital) que satisficieran los siguientes criterios generales de inclusión: 5 años de obesidad mantenida e índice de masa corporal (IMC) $> 40 \text{ kg/m}^2$ para los pacientes, $\text{IMC} < 25$ para los controles, y estabilidad psicológica para todos los participantes. Los criterios de exclusión fueron: obesidad secundaria a endocrinopatías o tratamientos farmacológicos

en el caso de los pacientes; enfermedad psiquiátrica grave, retraso mental, trastorno grave de la conducta alimentaria y abuso de drogas o alcohol para todos los participantes. Se obtuvo una muestra de suero de los controles y dos de los pacientes, la primera antes de la cirugía bariátrica (bypass gástrico) y la segunda un año después de la misma. Las muestras se alicuotaron y mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis.

Del total de alícuotas disponibles, Pérez-García *et al.* (2014) seleccionaron las de aquellos pacientes que habían cumplimentado un cuestionario FCQT, del cual se capturó la variable de pérdida de control FCQT_PC a partir de las respuestas a 6 cuestiones seleccionadas; dichas respuestas se puntuaron entre 1 y 6 y se sumaron para obtener un único valor de FCQT_PC por cada paciente (Tabla 1.2.).

1	Cuando tengo deseos intensos de comer, una vez que me pongo a comer no puedo parar
2	A veces, cuando como lo que se me antoja, pierdo el control y como demasiado
3	Si tengo la comida que deseo, no puedo resistir la tentación de comerla
4	No tengo la fuerza de voluntad de resistir mis deseos de comer las comidas que se me antojan
5	Una vez que me pongo a comer tengo problemas para dejar de comer
6	Si me dejo llevar por la tentación de comer pierdo todo mi control

Tabla 1.2. Cuestiones del test FCQT seleccionadas para el cálculo de la pérdida de control sobre la comida (FCQT_PC). Las respuestas a cada ítem se puntuaron de la siguiente manera: nunca = 1; raramente = 2; algunas veces = 3; a menudo = 4; casi siempre = 5 y siempre = 6.

En total se dispuso de alícuotas de suero de 23 pacientes, a las que se sumaron las de otros tantos controles normopesos apareados en sexo y edad (Tabla 1.3.).

	Controles	Pacientes
Varones : Mujeres	7:16	7:16
Edad (años)	39 ± 3	44 ± 3
Altura (cm)	164 ± 1	166 ± 2
Peso (kg)	61 ± 2	131 ± 3*
Índice de Masa Corporal (kg/m ²)	22,6 ± 0,4	47,8 ± 1,2*

Tabla 1.3. Sujetos incluidos en el estudio (se indican valores medios y ESM). *p<0,05 vs controles (t de Student).

A partir de estas alícuotas Pérez-García *et al.* (2014) obtuvieron los proteomas séricos que permitieron identificar clusterina y SAP como candidatos a biomarcadores de adicción a la comida. En el presente trabajo se han utilizado las imágenes de estos mismos proteomas y se han medido las concentraciones de ambas proteínas en alícuotas adicionales de suero de los mismos pacientes y controles. El esquema general del estudio se recoge en la Figura 1.2.

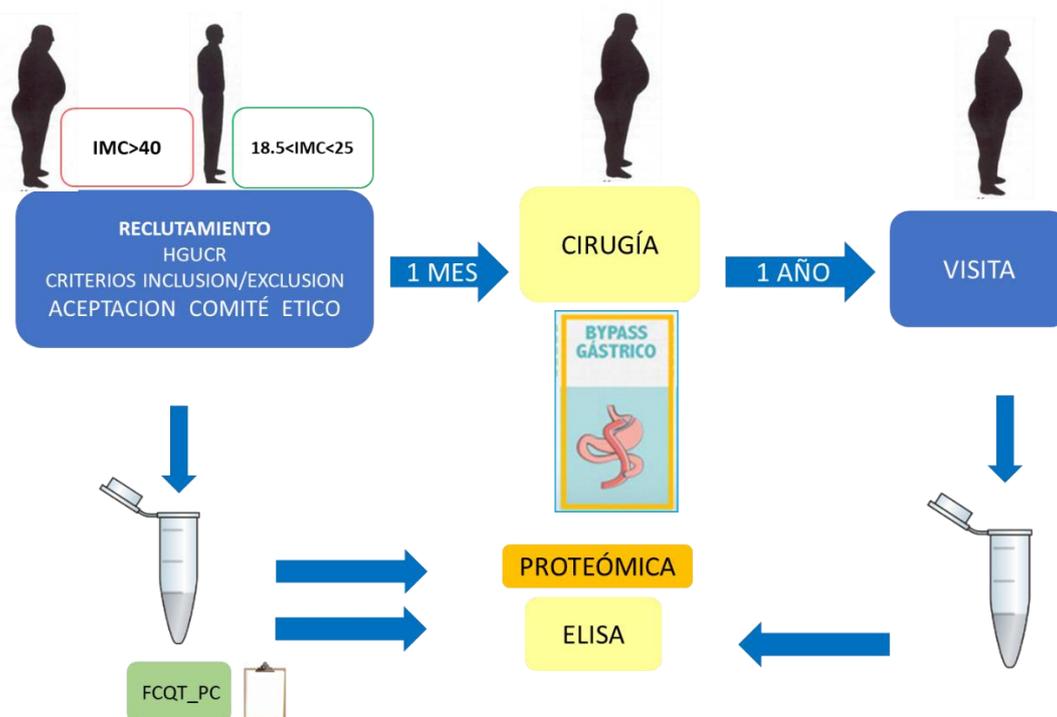


Figura 1.2. Esquema del diseño del estudio.

2.2. Análisis de clusterina y SAP

La primera parte del presente trabajo consistió en analizar las posibles correlaciones entre los valores de PC de cada uno de los pacientes y las densidades ópticas de los puntos 1109 (clusterina) y 6101 (SAP) de sus proteomas séricos prequirúrgicos. Para ello se utilizó el programa PD-Quest v8 (Bio-Rad, Barcelona). Posteriormente, se comprobaron las correlaciones anteriores utilizando los niveles séricos reales de las dos proteínas en estudio, que se determinaron mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) a partir de alícuotas disponibles de los mismos pacientes. Además, se determinó la concentración sérica de las proteínas en estudio en las alícuotas postquirúrgicas de los mismos pacientes y en las alícuotas de los controles normopesos apareados.

Para la determinación de los niveles de clusterina se utilizó un kit de ELISA de tipo sándwich (E-EL-H0038, Elabscience, Wuhan, Hubei, China; Figura 1.3.). Se descongelaron las alícuotas añadiéndose 100 µl de cada una a los pocillos de las placas del kit, que estaban tapizados con anticuerpo anti-clusterina, y se realizó paralelamente una curva estándar añadiendo 100 µl de concentraciones conocidas de clusterina (0–200 ng/ml). Las muestras y los estándares se ensayaron por duplicado. Tras 90 min de incubación a 37°C con agitación, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 100 µl de anticuerpo biotinilado anti-clusterina. Trascorrida 1 h de incubación a 37°C con agitación, se lavaron los pocillos con el tampón de lavado suministrado por el kit y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP). Tras incubar 30 min para permitir la unión de este complejo a la biotina del anticuerpo añadido previamente, se volvió a lavar y se añadió el sustrato de la HRP (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMB) durante 15 min, lo que produjo un viraje al azul en los pocillos de las muestras que contenían clusterina. Se añadieron entonces 50 µl de una solución de parada (H₂SO₄) que provocó un viraje al amarillo, midiéndose la correspondiente absorbancia a 450 nm.

La determinación de SAP se realizó también con un kit de ELISA de tipo sandwich (kit KA1841, Abnova, Taoyuan, Taiwan). Brevemente, se añadieron a cada uno de los pocillos de las placas del kit 50µl de cada alícuota previamente descongelada y diluida (1:20000) con el diluyente proporcionado por el fabricante. Paralelamente, se realizó una curva estándar añadiendo 50 µl de concentraciones

conocidas de SAP (0–100 ng/ml). Las muestras y los estándares se ensayaron por duplicado. Trascorridas 2 h de incubación a temperatura ambiente con agitación, se lavaron los pocillos con el tampón de lavado suministrado por el kit y se añadieron 50µl de anticuerpo biotinilado anti-SAP. Se incubó la placa 1 h a temperatura ambiente con agitación, tras lo cual se lavaron de nuevo los pocillos y se añadieron 50µl de estreptavidina-HRP. Tras incubar 30 min, se volvió a lavar y se añadieron 50µl de TMB durante 15 min. Se añadieron entonces 50µl de solución de parada (H_2SO_4), midiéndose las absorbancias a 450 nm.

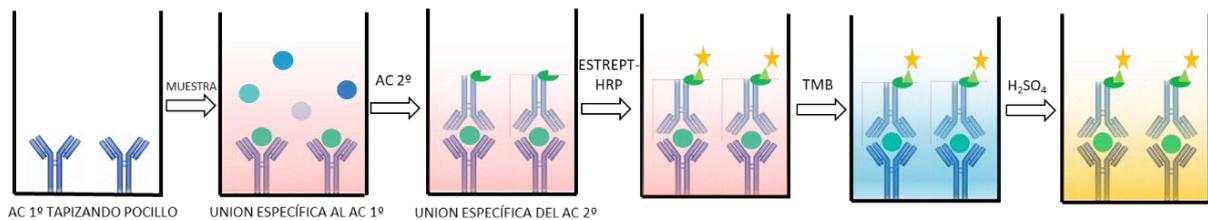


Figura 1.3. Esquema de un ELISA tipo *sandwich*. La clusterina y/o SAP de las muestras (circunferencias verdes) se une específicamente al anticuerpo primario que tapiza el pocillo. Seguidamente, al añadir el anticuerpo secundario biotinilado, éste reconoce a la proteína de interés unida al primario. La estreptavidina-HRP se une a su vez a la biotina y al añadir el sustrato de la peroxidasa (TMB) la reacción provoca un color azulado. Para parar la reacción se añade ácido sulfúrico que también vira el color a amarillo.

2.3. Análisis estadístico

Se utilizó el coeficiente rho de Spearman para analizar las correlaciones entre la variable conductual seleccionada (PC) y los niveles prequirúrgicos de clusterina y SAP de los pacientes, cuantificados mediante unidades arbitrarias de densidad óptica (en el caso de los proteomas) o en unidades de concentración. La comparación entre las concentraciones séricas de las proteínas en estudio entre controles y pacientes (antes y después de la cirugía) se realizó mediante ANOVA y test de Bonferroni para comparaciones múltiples. El umbral de significación estadística se situó en una $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

El análisis de los proteomas prequirúrgicos de los pacientes reveló una correlación positiva y estadísticamente significativa entre pérdida de control sobre la ingesta y densidad óptica del punto correspondiente a clusterina (coeficiente de Spearman=0,5311, $p=0.0132$; Figura 1.4.). En el caso de

SAP, sin embargo, no se obtuvo una correlación significativa (coeficiente de Spearman = 0,3977). Estos resultados se corroboraron cuando se analizaron las correlaciones entre pérdida de control y concentración sérica de ambas proteínas medida mediante ELISA: de nuevo, se obtuvo una correlación significativa en el caso de clusterina (coeficiente de Spearman= 0,6244, $p=0,0097$; Figura 1.4.) pero no de SAP (coeficiente de Spearman=-0,1233).

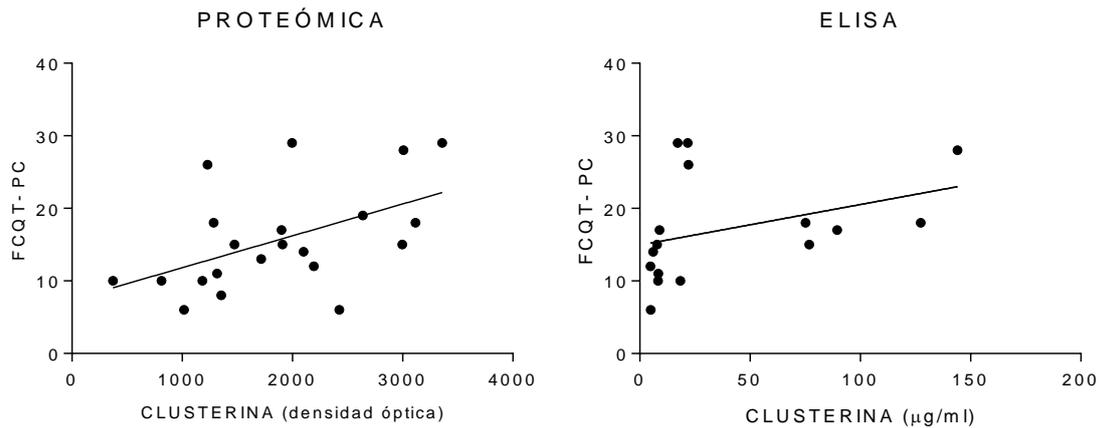


Figura 1.4. Correlaciones entre clusterina sérica y pérdida de control sobre la ingesta (FCQT_PC) en los obesos mórbidos antes de la cirugía. Se representan los datos obtenidos en los experimentos de proteómica y ELISA.

No se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles séricos de clusterina de los pacientes y de los controles, ni tampoco en los pacientes antes y después de la intervención (Figura 1.5.).

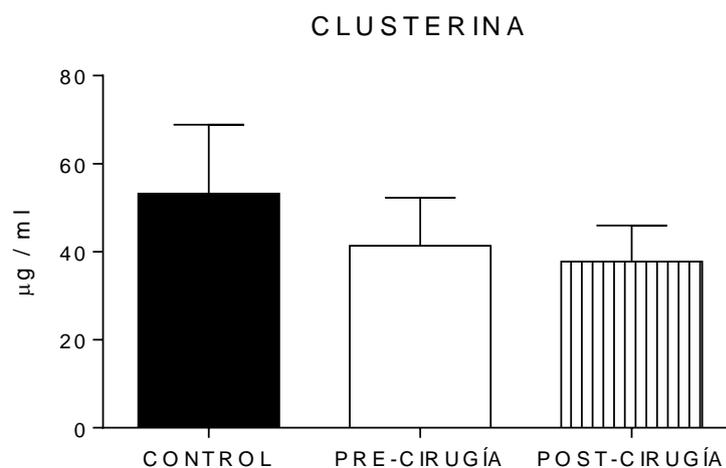


Figura 1.5. Concentración plasmática de clusterina en los controles normopesos y en los pacientes antes (PRE) y después (POST) de la cirugía (media \pm ESM).

En el caso de SAP, se observó que los pacientes presentaban niveles significativamente elevados con respecto a los controles antes de la cirugía, aumento que se corrigió un año después de la intervención (Figura 1.6).

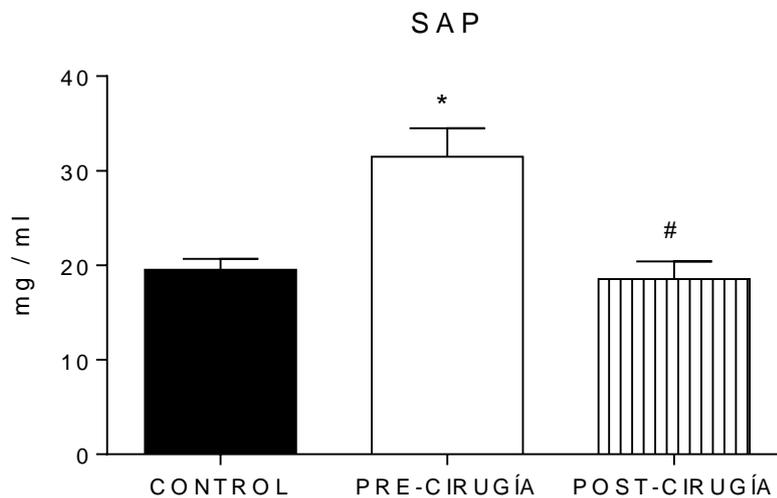


Figura 1.6. Concentración plasmática de SAP en los controles normopesos y en los pacientes antes (PRE) y después (POST) de la cirugía (media \pm ESM). * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs pre-cirugía.

4. DISCUSIÓN

Hoy en día parece clara la existencia de una población dentro de los obesos mórbidos en la que se produce un desajuste en el circuito cerebral de recompensa que conlleva una pérdida de control sobre la ingesta (Volkow *et al.*, 2013; Potenza, 2014). En este contexto, la disponibilidad de biomarcadores que se sumen a la evaluación psiquiátrica mediante tests comportamentales puede ayudar a la detección de estos individuos y a complementar convenientemente su tratamiento quirúrgico (Alguacil y Gonzalez-Martin, 2011). Nuestra primera aproximación en este sentido por medio de una técnica ciega como es la proteómica (Pérez-García *et al.*, 2014) fue capaz de proporcionar dos potenciales biomarcadores novedosos para llevar a cabo este diagnóstico, uno de los cuales ha sido corroborado en el presente trabajo. Así, hemos podido constatar una correlación positiva entre clusterina y pérdida de control sobre la ingesta de los pacientes por dos métodos diferentes: proteómica de expresión diferencial y ELISA.

La Clusterina o apolipoproteína J es una proteína multifuncional presente en prácticamente todos los fluidos del organismo, así como dentro de las células (ya sea en el núcleo, citosol o mitocondrias); a la clusterina se le ha atribuido un papel regulador importante sobre la homeostasis proteica, la muerte celular o la regulación de señales de supervivencia (ver revisión de Wilson y Zoubeidi, 2017). Estudios proteómicos anteriores habían puesto de manifiesto una regulación diferencial de los niveles plasmáticos de clusterina en individuos obesos (Oberbach *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2014), y se había sugerido una relación directa de esta proteína con la adiposidad, la inflamación sistémica y el riesgo cardiovascular de los pacientes ya que forma parte, junto a la apolipoproteína E, de las J-HDL, consideradas un factor negativo de riesgo cardiovascular; en este sentido, las J-HDL transportan el colesterol desde los tejidos (entre ellos el adiposo) al hígado para su eliminación, por lo que cambios en la concentración de clusterina y J-HDL pueden afectar a los niveles de colesterol y al riesgo ateroesclerótico (Gelissen *et al.*, 1998; Hoofnagle *et al.*, 2010). Nuestros resultados no permiten confirmar esta relación, ya que no hemos encontrado cambios significativos en los niveles de clusterina de nuestros pacientes, quienes por otra parte exhiben un elevado riesgo cardiovascular como hemos publicado recientemente (Muñoz-Rodríguez *et al.*, 2018). Sin embargo, nuestros resultados sí están en la línea de los trabajos que atribuyen a clusterina un papel crítico en la regulación de la ingesta; así, Gil *et al.* (2013) habían observado en modelos animales que la administración central de esta proteína provoca anorexia y pérdida de peso, mientras que su inhibición funcional se traduce en un incremento de la ingesta, el peso corporal y la adiposidad. Por tanto, es posible pensar que clusterina podría jugar algún papel en las diferencias de la conducta alimentaria que exhiben los pacientes obesos, y por tanto en su mayor o menor adicción a la comida. En nuestra opinión, la relevancia de esta hipótesis justifica la realización de nuevos estudios en esta misma dirección.

Contrariamente a lo observado en el caso de clusterina, no hemos podido confirmar una correlación entre pérdida de control sobre la ingesta y niveles de SAP, la segunda proteína identificada en el estudio de Pérez-García *et al.* (2014). El hecho de que la concentración de SAP estuviera elevada en los pacientes pero retornara a valores cercanos a los de los controles tras la cirugía resulta consistente con otros estudios (Oberbach *et al.*, 2011) y podría ser un reflejo de la evolución del estado inflamatorio asociado a la obesidad que sería independiente de la conducta alimentaria.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREALIMENTACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES MOTIVACIONALES DE LA COMIDA Y LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN EL RATON

1. INTRODUCCIÓN

La etiología multifactorial de la obesidad, ya mencionada con anterioridad, hace muy complejo el abordaje de la fisiopatología con que cursa este trastorno, así como su terapéutica (Varela-Moreiras, 2013). Por ejemplo, un 16% de pacientes obesos mórbidos candidatos a ser tratados por medio de una cirugía bariátrica presentan lo que se ha venido a denominar adicción a la comida (Brunault *et al.*, 2016), un fenómeno aún no del todo reconocido, pero que de aceptarse requeriría teóricamente una intervención psiquiátrica adicional (Alguacil *et al.*, 2011). En este contexto, la disponibilidad de biomarcadores y dianas asociados a la adicción a la comida ayudaría a afinar el diagnóstico y mejorar la terapéutica, lo que justifica su búsqueda en modelos animales apropiados.

Como ya se ha comentado, cuando consideramos los factores nutricionales de la obesidad la naturaleza de aquello ingerido adquiere un papel extremadamente relevante, y en este sentido existen dos variables importantes a considerar: en primer lugar, los efectos derivados de la ingesta crónica y elevada de determinados nutrientes (entre ellos, de forma singular, las grasas), y la segunda, las posibles consecuencias de que la comida sea apetitosa en sí. De esta forma, una dieta rica en grasa es capaz de generar cambios biológicos significativos en áreas del cerebro implicadas en la ingesta, como ocurre por ejemplo con la enzima fumarato hidratasa (FH) en núcleo accumbens (NAC), un área clave del sistema de refuerzo y recompensa. Esta enzima había sido relacionada por primera vez con las adicciones a raíz de un estudio de nuestro grupo que reveló una expresión diferencial de la misma en el NAC de ratas que extinguían con distinta velocidad su preferencia condicionada por entornos asociados a cocaína (del Castillo *et al.*, 2009); posteriormente, Pérez-Ortiz *et al.*, (2016) demostraron en ratones alimentados con una dieta rica en grasa una correlación positiva entre la expresión de FH en NAC y la persistencia de los animales en la búsqueda de alimentos apetitosos. Así, quedó evidenciada la relación de FH con los procesos adictivos y la influencia que la dieta rica en grasa puede ejercer sobre ambos.

Clusterina (CLU) es otra proteína de interés en este sentido ya que en los estudios previos que se recogen en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral se ha visto correlacionada de forma positiva con la pérdida de control sobre la ingesta en pacientes con obesidad mórbida. Gil *et al.* (2013) ya habían mostrado en modelos animales que esta proteína es clave en la regulación de la ingesta: sus niveles hipotalámicos se ven así aumentados tras un ayuno prolongado, y al realimentar a los animales

ayunados este incremento se corrige. Además, la administración intracerebral de CLU tiene efectos anorexígenos y provoca una pérdida de peso corporal, mientras que su silenciamiento con un desoxinucleótido antisentido resulta en hiperfagia, aumento en la adiposidad y ganancia de peso corporal. En consecuencia, CLU tiene el perfil de un biomarcador potencial cuyo estudio parece necesario para profundizar en el conocimiento de la adicción a la comida, sus causas y sus posibles tratamientos. En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido conocer la evolución de los niveles plasmáticos y cerebrales de CLU en animales alimentados con una dieta rica en grasa, así como su posible relación con los comportamientos de búsqueda de comida en un modelo de condicionamiento preferencial de lugar. Paralelamente, se ha estudiado la expresión cerebral de FH como proteína de referencia.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales

Se utilizaron 30 ratones C57BL6 macho de 4 semanas de edad (Charles River). Los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta control y se mantuvieron en un ambiente controlado en el Animalario de la Universidad CEU San Pablo (20–22°C, 12h/12h luz/oscuridad). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y la Legislación Española para las buenas prácticas, cuidado y uso de animales de laboratorio (RD 1205/2005 y RD 53/2013).

Tras un periodo de aclimatación de una semana, se pesaron los animales y se separaron en dos grupos del mismo tamaño (n=15) con un peso medio semejante. El primero de los grupos continuó teniendo libre acceso a la dieta normal (CONTROL) durante la totalidad del estudio de conducta, mientras que la del segundo grupo fue sustituida por una dieta rica en grasa (*high fat*, HF). Esta alimentación diferencial se mantuvo durante los 43 días posteriores del estudio de conducta, controlándose regularmente la ingesta y el peso de los animales.

2.2. Adquisición y extinción de preferencia condicionada de lugar (*conditioned place preference, CPP*)

Tras dos semanas de alimentación diferencial, se sometió a los animales a un estudio de conducta que consistió en una primera fase de condicionamiento espacial seguido de una fase de extinción de la preferencia condicionada. El diseño experimental se basó en protocolos previamente utilizados por nuestro grupo (Morales *et al.*, 2007; Pérez-Ortiz *et al.*, 2016) en los que se utilizó una caja abierta por el lado superior, compuesta por un compartimento blanco iluminado y otro negro del mismo material y tamaño (40 x 35 x 35 cm) separados por una puerta de guillotina; en la esquina derecha del compartimento blanco más alejada de la puerta se fijó al suelo una placa Petri en la que se colocaron los *pellets* del reforzador (sacarosa) durante las sesiones de condicionamiento (Figura 2.1.).

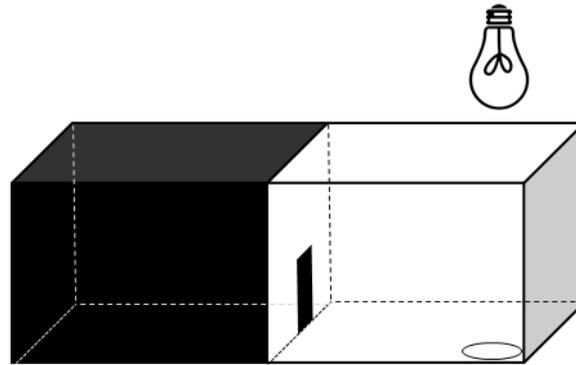


Figura 2.1. Esquema de la caja utilizada para los estudios de condicionamiento (ver descripción en el texto).

En la figura 2.2. se presenta un esquema resumido del protocolo utilizado. En el día 20, se realizó una prueba de libre elección previa al condicionamiento (**precondicionamiento, PRE**) en la que se colocaron los animales en la caja con la puerta de guillotina levantada y se les dejó explorar libremente la misma durante un periodo de 30 min. Se observó la conducta de los animales desde una sala contigua por medio de una cámara de vídeo, registrándose el tiempo de estancia en el compartimento blanco iluminado. Esta prueba permitió establecer la preferencia basal espontánea de los animales por los dos entornos de la caja.

El día 21 comenzó la fase de **condicionamiento (COND)**, que consistió en sesiones diarias dobles mañana/tarde, separadas al menos 3 horas, en cada una de las cuales los animales se confinaron durante 30 minutos en uno de los dos compartimentos de forma alternativa (esto es, con la puerta de guillotina cerrada). El orden de estas sesiones se cambió además en días consecutivos, para evitar así posibles sesgos inducidos por los ciclos circadianos. En las sesiones en las que se confinaba al animal en el compartimento blanco, se colocaron 16 pellets de sacarosa (64,37% sacarosa; 1811555-5TUT-Test Diet, Richmond, Indiana, USA) en la placa Petri de dicho compartimento, contabilizándose el número de pellets ingerido durante la sesión. Por el contrario, cuando se alojaban los animales en el compartimento negro estos no tenían acceso al reforzador. Estas sesiones dobles se repitieron los días 22, 23, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 36 y 37. Para comprobar el desarrollo de preferencia espacial por el compartimento blanco, se realizaron pruebas de libre elección post-condicionamiento (POST) los días 24 (POST-1), 31 (POST-2) y 38 (POST-3), comparándose el tiempo de estancia en el compartimento blanco con el tiempo de estancia en ese mismo compartimento antes del condicionamiento (PRE).

El día 41 comenzó la fase de **extinción (EXT)** de la preferencia condicionada, que consistió en sesiones dobles diarias idénticas a las del condicionamiento a excepción de que en las que se confinó a los animales durante 30 minutos en el compartimento blanco la placa Petri estaba vacía. Estas sesiones se repitieron los días 41, 42 y 44. Para comprobar la extinción de la preferencia por el compartimento blanco, se realizaron pruebas de libre elección los días 43 (EXT-1) y 45 (EXT-2), en las que se comparó el tiempo de estancia en dicho compartimento con el de la última prueba de libre elección previa a la fase de extinción (POST 3).

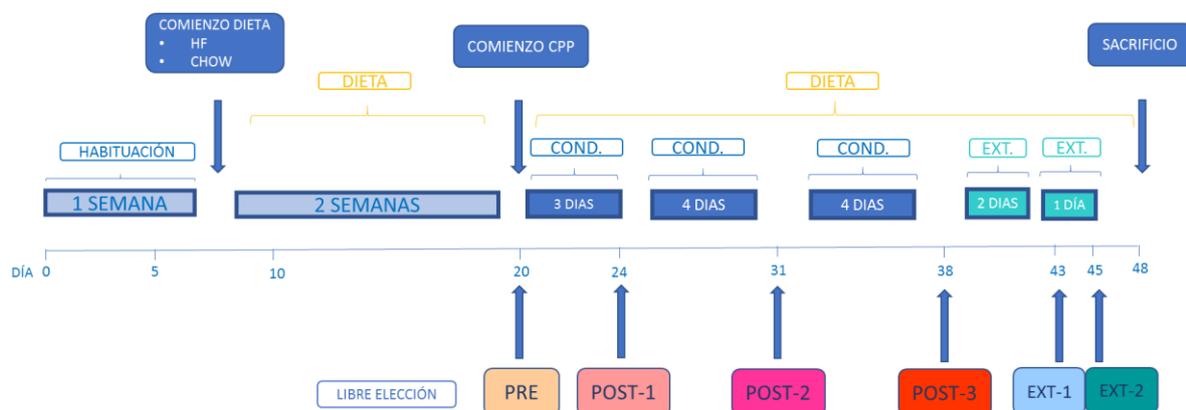


Figura 2.2. Diseño del estudio (ver descripción en el texto).

2.3. Muestras biológicas

El día 48 del experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación, recogiendo la sangre total en tubos con EDTA. Los tubos se centrifugaron (10 min, 1200 rpm) y el plasma sobrenadante fue alicuotado y congelado a -80°C hasta el día de su análisis. Los cerebros fueron extraídos y fijados en formaldehído al 10% durante 48 h, tiempo tras el cual fueron traspasados a etanol de 70° para su conservación hasta el procesado.

2.4. Determinación de CLU plasmática

Las muestras de plasma fueron descongeladas para la determinación de los niveles de CLU mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) de tipo sandwich (kit ERCLU, Thermo-Fischer Scientific, Frederick, MD, USA; Figura 2.3.). Brevemente, se añadieron 100 µl de cada muestra de plasma diluida 1:1000 a cada uno de los pocillos de las placas del kit, que estaban tapizados con anticuerpo anti-CLU, y se realizó paralelamente una curva estándar añadiendo 100 µl de concentraciones conocidas de CLU (1.3–320 ng/ml). Las muestras y los estándares se ensayaron por duplicado. Tras 2,5 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación, se lavaron todos los pocillos con tampón de lavado para eliminar uniones no específicas y se añadieron 100 µl de anticuerpo biotinilado anti-CLU. Trascorrida 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación, los pocillos fueron lavados de nuevo utilizando el mismo tampón que se empleó previamente y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP). Tras incubar 45 min para permitir la unión de este complejo a la biotina del anticuerpo añadido previamente, se volvió a lavar y se añadió el sustrato de la HRP (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMB) durante 30 min, lo que produjo un viraje al azul en los pocillos de las muestras que contenían CLU. Se añadió entonces una solución de parada que provocó un viraje al amarillo, midiéndose la correspondiente absorbancia a 450 nm.

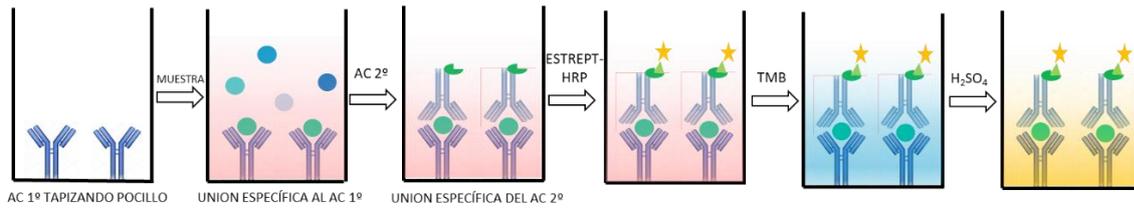


Figura 2.3. Esquema de un ELISA tipo *sandwich*. La CLU de las muestras (circunferencias verdes) se une específicamente al anticuerpo primario que tapiza el pocillo. Seguidamente, al añadir el anticuerpo secundario biotinilado, este reconoce a la CLU unida al primario. La estreptavidina-HRP se une a su vez a la biotina y al añadir el sustrato de la peroxidasa (TMB) la reacción provoca un color azulado. Para parar la reacción se añade ácido sulfúrico que también vira el color a amarillo.

2.5. Expresión de CLU y FH en cerebro

La deshidratación, procesamiento, inclusión en parafina y corte de los cerebros se realizó en la Unidad de Investigación Traslacional (UIT) del Hospital General Universitario de Ciudad Real (HGUCR) según el protocolo de rutina previamente descrito (Pérez-Ortiz *et al.*, 2016). Brevemente, los tejidos se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de etanol y finalmente xilol. Posteriormente se sumergieron en parafina líquida, formándose así bloques que se cortaron con un microtomo de rotación. Se realizaron cortes transversales de un grosor de 4 μm , que se colocaron en un baño histológico de agua destilada a 40°C para su despliegue, y posteriormente en portaobjetos gelatinizados que se introdujeron en una estufa a 60°C para su correcta adherencia. Se seleccionaron cortes que presentaban estriado dorsal, estriado ventral (incluyendo NAC), y corteza cingulada utilizando como referencia el atlas de Paxinos y Franklin (2012).

Para la realización de la técnica inmunohistoquímica se utilizó el kit comercial EnVision™ FLEX (K8024). El kit emplea un protocolo de inmunohistoquímica indirecta, mediante la cual se localiza el antígeno y se cuantifica su concentración, mediante el uso de un anticuerpo específico para dicho antígeno y un anticuerpo secundario. Este último puede dar lugar a una reacción cromógena por llevar conjugada una peroxidasa (HRP) de la que es sustrato un compuesto que cambia de color (diaminobencidina, DAB)(Figura 2.4.).

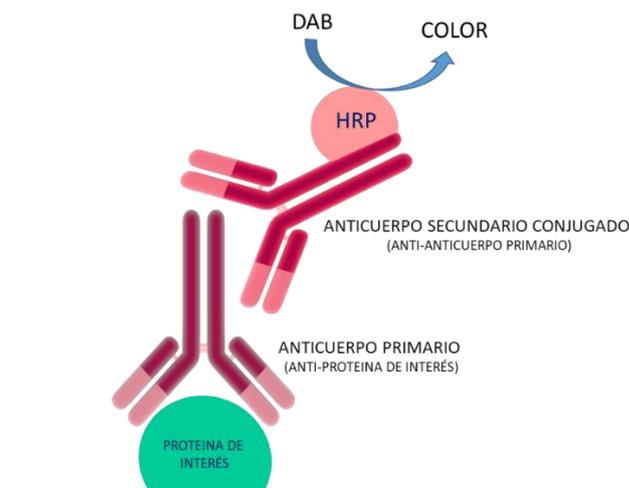


Figura 2.4. Esquema de una inmunohistoquímica clásica.

Previamente a la adición del anticuerpo, se desparafinizaron las muestras colocándolas 1 h en la estufa a 37°C. Tras ello, se desenmascararon los antígenos, utilizando un tampón Tris/EDTA pH=9 incluido en el kit, dejándolo 30 min a 97°C en contacto con la muestra, lo que permite la exposición de los antígenos que por la inclusión en parafina pueden haber quedado enmascarados. Posteriormente, se hidrataron los cortes, y se trataron con un tampón fosfato rico en peróxido de hidrógeno, NaN_3 y detergente (reactivo proporcionado por el kit) para saturar la peroxidasa endógena. Con este bloqueo se evita la inmunorreactividad de fondo o resultados falsamente positivos, pues es una peroxidasa la enzima conjugada con el anticuerpo secundario que hace virar el tono del reactivo DAB. A continuación, el tejido fue incubado con el anticuerpo primario (clusterina- 12289-1-AP, Proteintech, USA; FH-11375-1-AP, Proteintech, USA), y tras la incubación y los lavados necesarios para eliminar las uniones no específicas, se incubó con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa específico contra la especie a partir de la cual se había obtenido el anticuerpo primario (Anti-Rabbit-HRP, incluido en el kit). Finalmente, se añadió un sustrato cromógeno de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario, con lo que se produjo un color en función de la cantidad de antígeno presente en la muestra, permitiendo así su cuantificación (Figura 2.4.). Una vez transcurrido el tiempo de esta reacción, se tiñeron los tejidos con hematoxilina para diferenciar las áreas tisulares inmuno-teñidas de las que no lo fueron, además de permitir la identificación de los núcleos celulares. Las secciones fueron digitalizadas en el Instituto de Medicina Molecular Aplicada de la Universidad San Pablo CEU con un escáner LEICA SCN 400. Posteriormente se utilizó el programa Aperio ImageScope (Leica, Barcelona) para cuantificar la inmunotinción utilizándose los parámetros especificados en la tabla 2.1. que permitieron distinguir la expresión de la proteína del color de fondo.

TIPO DE PARÁMETRO	VALOR
View width (<i>visión del ancho</i>)	1000
View height (<i>visión de la altura</i>)	1000
Overlap size (<i>tamaño de la superposición</i>)	0
Image zoom (<i>zoom</i>)	1
Markup compression (<i>marcado</i>)	0 – mismo proceso
Compression quality (<i>calidad de compresión</i>)	30
Classifier neighborhood (<i>clasificador</i>)	0
Classifier (<i>clasificador</i>)	0
Class list (<i>lista de clases</i>)	-
Hue value (<i>valor del tono</i>)	0,5
Hue width (<i>ancho del tono</i>)	0,55
Color saturation (<i> saturación del color</i>)	0,3
lwp (high) (<i>intensidad positivos débiles</i>)	220
lwp (low)=lp(high) (<i>intensidad positivos – alta</i>)	165
lwp (low)=isp(high) (<i>intensidad altamente positiva - alta</i>)	100
isp (low) (<i>intensidad altamente positivos – más leve</i>)	18
lnp (high) (<i>intensidad no positivos</i>)	-1

Tabla 2.1. Algoritmo para la cuantificación con ImageScope de CLU y FH. Tales parámetros son introducidos en el programa para realizar el análisis de las zonas seleccionadas. Con estos valores se desarrolla el algoritmo que llevará a cabo el análisis de los píxeles y lo relacionará con cada uno de los parámetros para obtener un atributo.

Se analizaron dos cortes por ratón, y se cuantificaron como se muestra en la Figura 2.5. Cuatro áreas de estriado dorsal, dos áreas de NAC y dos áreas de corteza cingulada por cada corte (esta última zona se incluyó como control al no estar directamente relacionada con el circuito cerebral de recompensa).

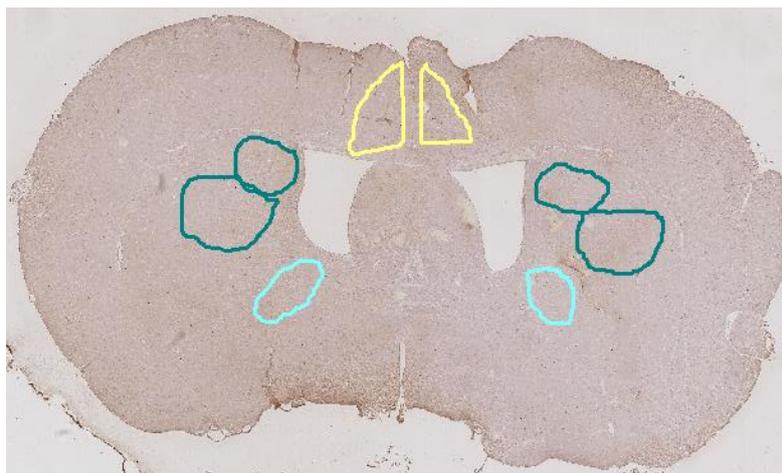


Figura 2.5. Áreas analizadas en estriado dorsal (marcadas en verde), NAC (azul claro) y corteza cingulada (amarillo).

El programa de análisis proporcionó para cada área los valores que se recogen en la tabla 2.2.

	Attribute
Nwp	Number of weak Positive
Np	Number of Positive
Nsp	Number of Strong Positive
Iwp	Total Intensity of Weak Positive
Ip	Total Intensity of Positive
Isp	Total Intensity of Strong Positive
Lavg	$(Iwp+Ip+Isp)/(Nwp+Np+Nsp)$
Nsr	$Nsp/(Nwp+Np+Nsp)$
Iwavg	$(Iwp+Ip)/Nwp+Np)$
Nn	Number of Negative
In	Total Intensity of Negative
Ntotal	Total Number (Positive+Negative)
Atotal	Total Area (Millimeter-squared)

Tabla 2.2. Atributos disponibles en ImageScope. Cada atributo proporciona información diferente sobre la imagen y un compendio de los mismos se utilizó para obtener la información deseada.

A partir de los atributos anteriores se calculó un único valor medio por cada animal y zona cerebral de las siguientes tres variables:

$$\text{NUMERO DE CÉLULAS POSITIVAS} = (Np + Nsp) / \text{Área}$$

Esta variable indica el número de células que expresan la proteína de interés en el área considerada, información relevante ya que la expresión en un bajo número de células sugiere una elevada especificidad de la proteína misma para ciertos procesos.

$$\text{INTENSIDAD TOTAL DEL MARCAJE} = (Ip + Isp) / \text{Área}$$

Esta variable es proporcional a la concentración de la proteína de interés en la zona a estudiar.

$$\text{INTENSIDAD DEL MARCAJE POR CÉLULA} = (Ip + Isp) / (Np + Nsp)$$

Esta variable indica la distribución de la expresión de la proteína entre las células del tejido.

2.6. Análisis estadístico

En el caso de las variables con medidas repetidas (peso, ingesta, pellets consumidos y tiempos de estancia), el análisis estadístico de las mismas se realizó mediante ANOVA de 2 vías seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples. La comparación de los niveles plasmáticos y de los inmunomarcajes en cada área cerebral entre los grupos control y FH o CLU se realizó mediante la t de Student. La posible correlación entre niveles de CLU y las variables conductuales se analizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias cuando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

La dieta HF provocó un incremento del peso corporal que fue significativo frente al basal desde el primer día, y frente al peso del grupo control a partir del día 30 del procedimiento (Figura 2.6.).

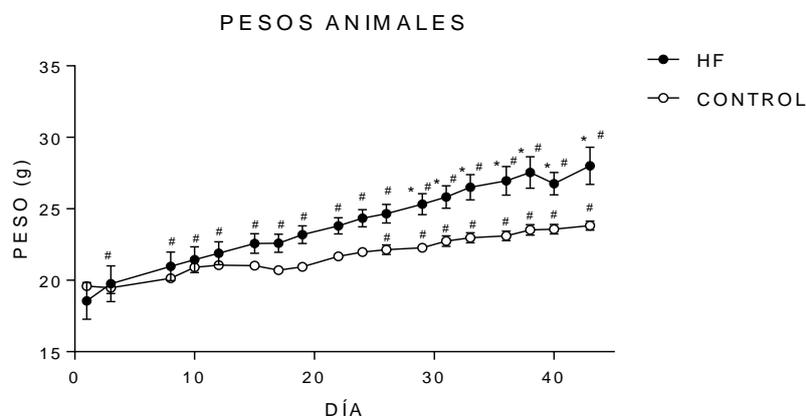


Figura 2.6. Peso de los animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control (media \pm ESM). * $p < 0,05$ vs CONTROL; # $p < 0,05$ vs basal (día 1).

La ingesta calórica de los animales alimentados con la dieta HF fue significativamente mayor que la de los controles a lo largo de todo el estudio, y alcanzó su máximo al comienzo del procedimiento, normalizándose después en niveles más o menos constantes (Figura 2.7.).

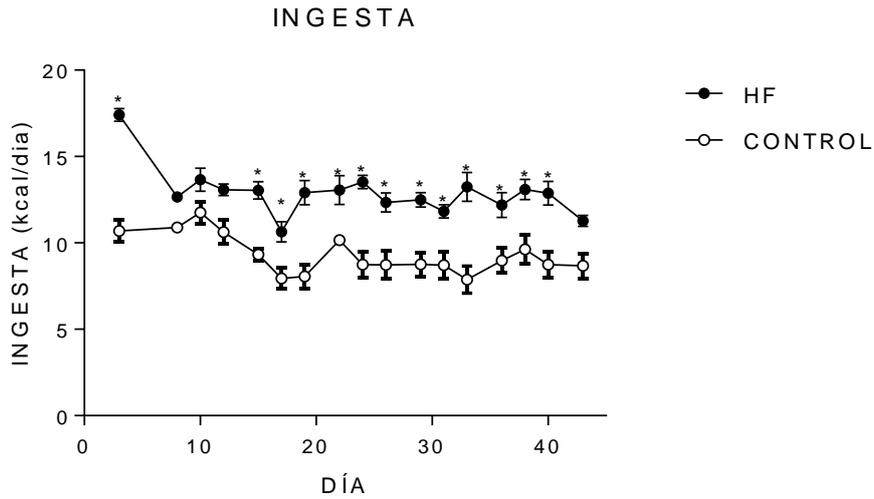


Figura 2.7. Ingesta calórica diaria de los animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control. Los puntos representan valores medios de ingesta diaria en los días transcurridos desde la medición anterior (\pm ESM). * $p < 0,05$ vs CONTROL.

Durante las sesiones de condicionamiento, el consumo de *pellets* de sacarosa fue significativamente menor en los animales alimentados con dieta HF (Figura 2.8.).

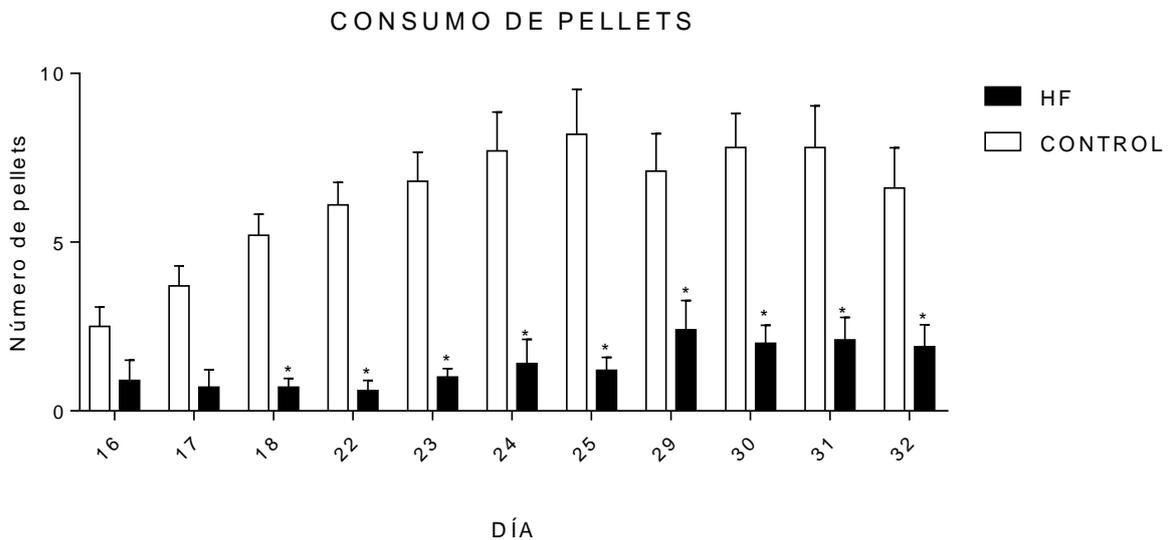


Figura 2.8. Consumo de *pellets* de sacarosa durante las sesiones de condicionamiento de los animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control (media \pm ESM, $n = 10$ en los dos grupos experimentales). * $p < 0,05$ vs CONTROL.

En la figura 2.9. se recogen los resultados obtenidos en las pruebas de libre elección efectuadas antes de las sesiones de condicionamiento (PRE), durante el protocolo de condicionamiento (POST-1, 2 y 3) y después del periodo de extinción (EXT-1 y 2). Las sesiones de condicionamiento provocaron un incremento del tiempo de estancia en el compartimento asociado al reforzador (blanco) tanto en los animales HF como en los controles; sin embargo, el curso temporal de adquisición de esta preferencia condicionada difirió entre los dos grupos. De esta forma, la estancia de los animales HF en el comportamiento blanco después de las 3 primeras sesiones (cuantificada en POST-1) fue significativamente mayor que la estancia basal en este compartimento (cuantificada en PRE), mientras que los animales del grupo control necesitaron un periodo adicional de sesiones de condicionamiento antes de alcanzar diferencias significativas en la prueba POST-2. La extinción de la preferencia condicionada fue también más rápida en el grupo HF: de hecho, los animales de este grupo mostraron una extinción completa y espontánea de la preferencia por el compartimento blanco en la prueba POST-3, cuando aún no había comenzado el periodo en que se retiraban los *pellets* durante las sesiones. Por el contrario, los animales control necesitaron dos periodos de sesiones de extinción para que desapareciera la preferencia condicionada en la prueba EXT-2.

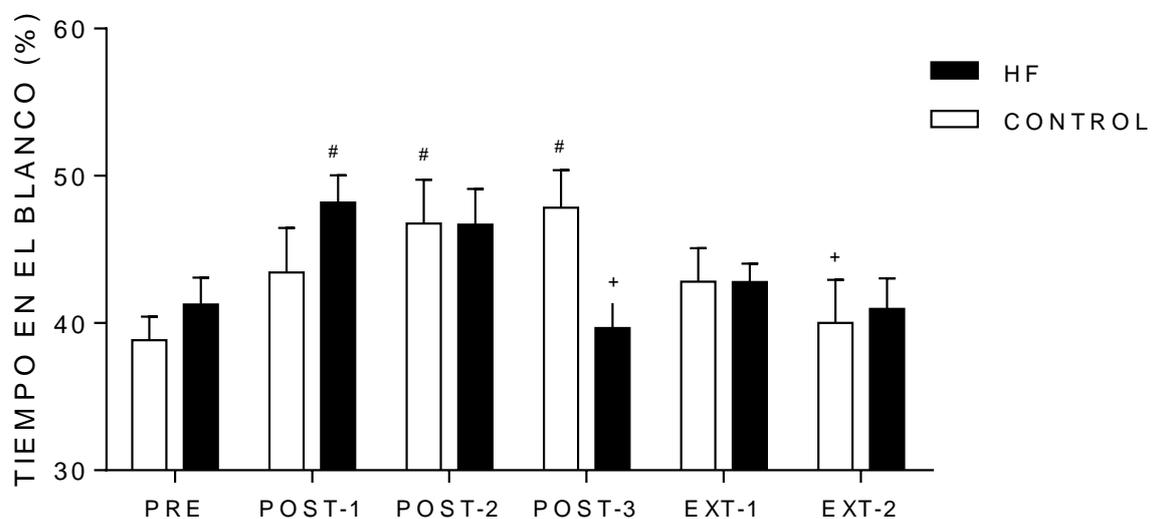


Figura 2.9. Tiempo de estancia de los animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control en el compartimento asociado a sacarosa (blanco) durante las pruebas de libre elección (media \pm ESM, en los dos grupos experimentales). PRE: prueba de libre elección anterior al condicionamiento; POST-1, 2 y 3: pruebas de libre elección realizadas durante la fase de condicionamiento; EXT-1 y 2: pruebas de libre elección realizadas durante el periodo de extinción de la preferencia condicionada. # $p < 0,05$ vs PRE; + $p < 0,05$ vs última prueba en que se evidenció preferencia condicionada (POST-1 en el grupo HF, POST-3 en el grupo control).

Una vez finalizada la última prueba de libre elección (EXT-2) se estudió la expresión de FH y CLU en el cerebro de los animales, así como los niveles de esta última proteína en plasma. La expresión de FH fue similar en la corteza cingulada y el estriado dorsal de los animales HF y los controles; por el contrario, se observó una disminución estadísticamente significativa del número de células marcadas y de la intensidad total del marcaje en el NAC de los animales HF (Figura 2.10.). Tampoco se observó ninguna diferencia entre la expresión de CLU de los animales HF y los controles en la corteza cingulada o el estriado dorsal, sin embargo, el número de células marcadas y la intensidad total del marcaje fueron significativamente mayores en el NAC de los animales HF (Figura 2.11.).

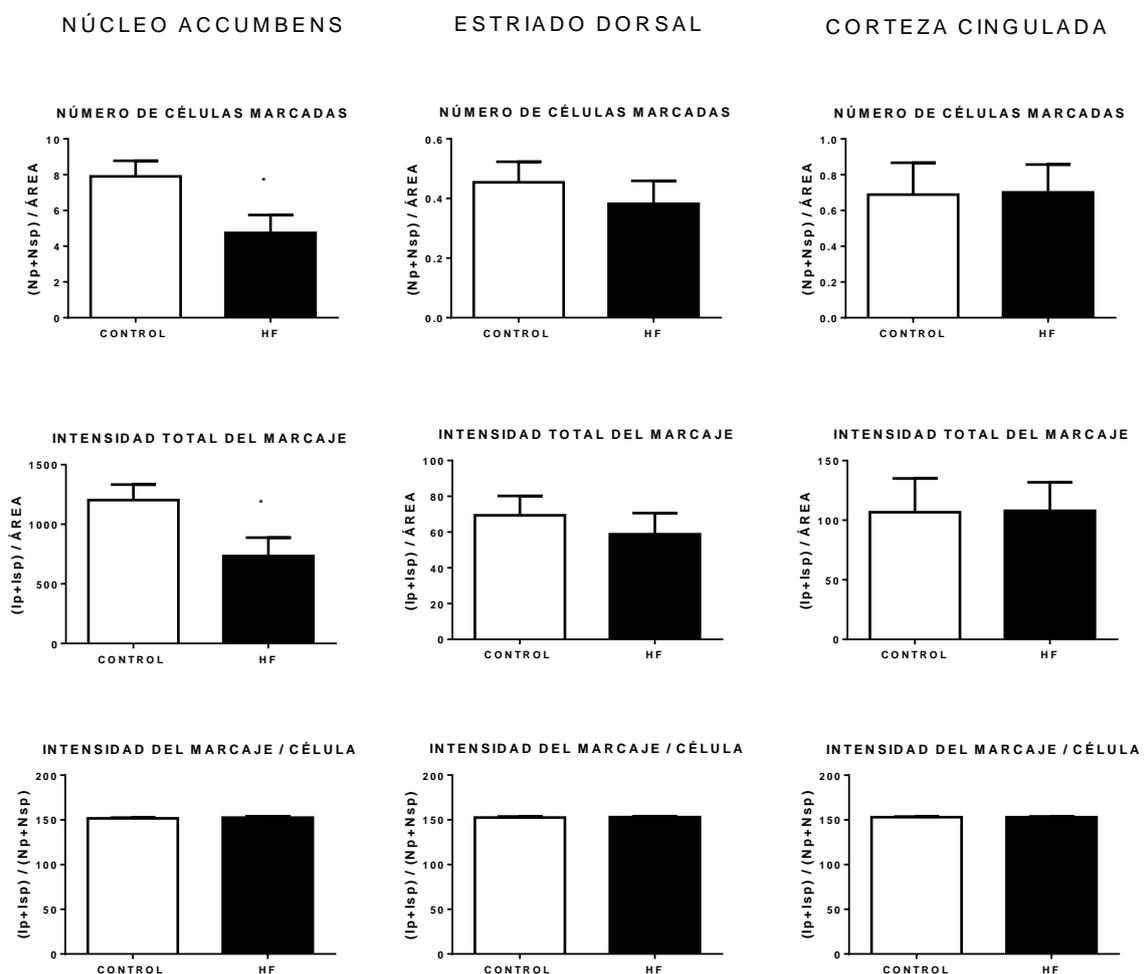


Figura 2.10. Expresión de FH en áreas cerebrales de animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control (media ± ESM). * $p < 0,05$ vs control

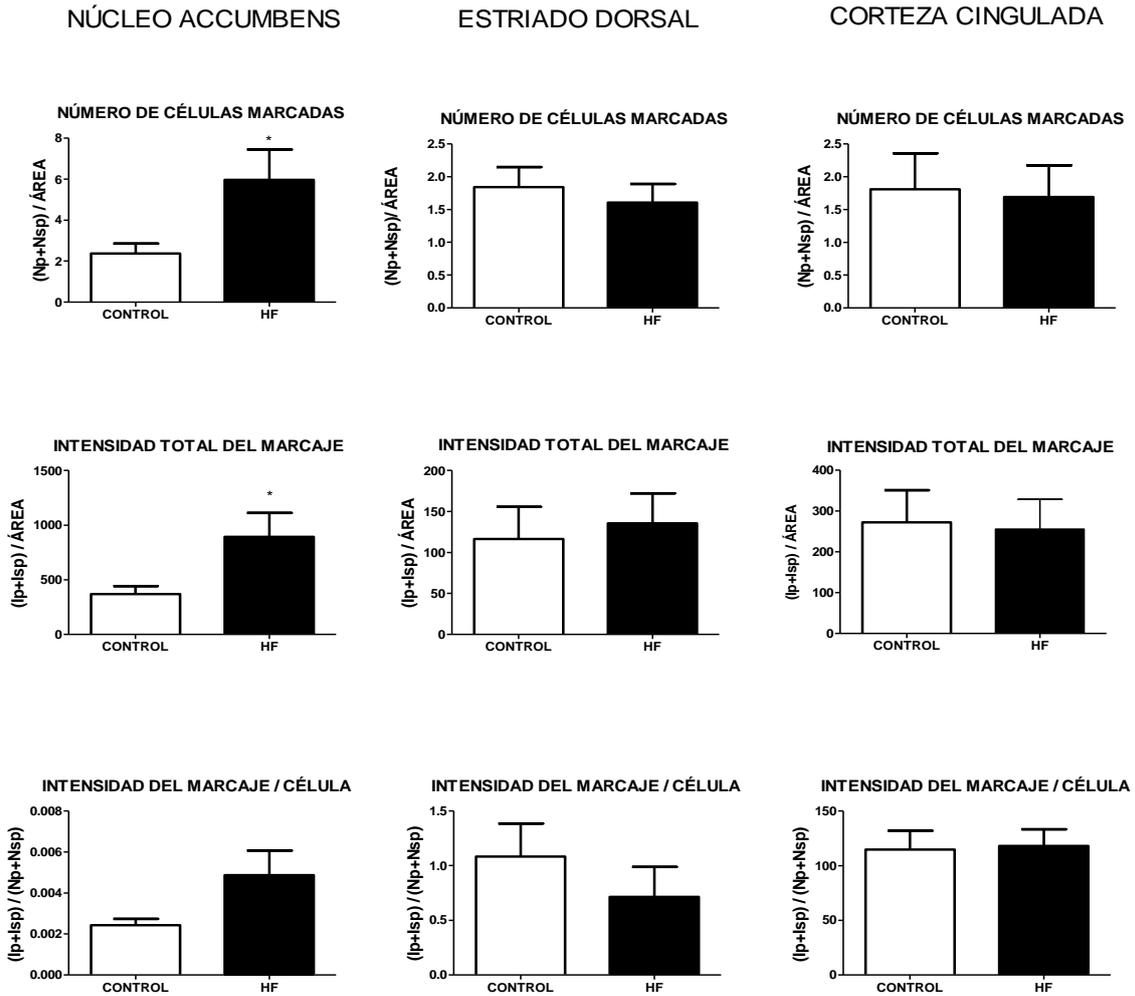


Figura 2.11. Expresión de CLU en áreas cerebrales de animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control (media \pm ESM). * $p < 0,05$ vs control.

Se observó una tendencia a que los niveles plasmáticos de CLU estuvieran incrementados en los animales HF, aunque no se alcanzaron diferencias significativas con respecto al control (Figura 2.12.). Cuando se analizaron las posibles correlaciones entre CLU plasmática y preferencia por entornos asociados a sacarosa en las pruebas de libre elección, no se observó correlación alguna en los animales del grupo control; sin embargo, en los animales tratados con una dieta rica en grasa se observaron correlaciones positivas en POST-1, POST-3 y EXT-2 (Tabla 2.3.; Figura 2.13.).

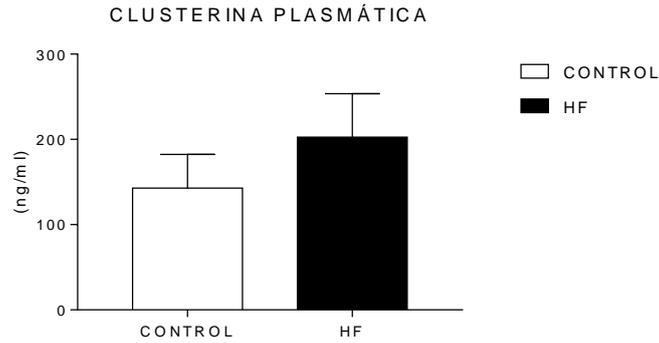


Figura 2.12. Niveles de CLU en el plasma de animales alimentados con dieta rica en grasa (HF) o dieta control (media \pm ESM).

Prueba de libre elección	CONTROL		HF	
	COEF. CORRELACIÓN PEARSON	p	COEF. CORRELACIÓN PEARSON	p
PRE	0,2555	0,1362	0,01927	0,7431
POST-1	0,3008	0,1007	0,7231	0,0075
POST-2	0,04782	0,5439	0,4525	0,0675
POST-3	0,04453	0,5584	0,6048	0,0231
EXT-1	0,3004	0,1009	0,1458	0,3505
EXT-2	0,1516	0,2661	0,6339	0,0181

Tabla 2.3. Correlación entre niveles plasmáticos de CLU (ng/ml) y tiempo de estancia en el entorno asociado a sacarosa (%) en cada una de las pruebas de libre elección realizadas en animales alimentados con una dieta rica en grasa (HF) o dieta control. Se destacan en negrita las correlaciones significativas.

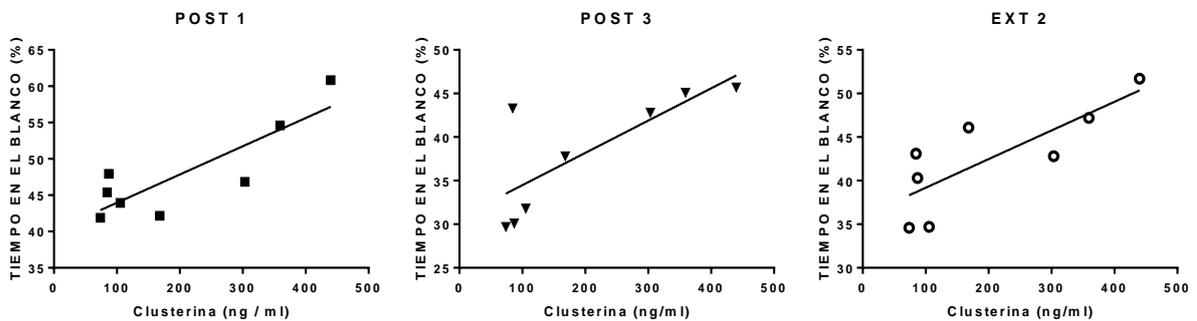


Figura 2.13. Correlaciones entre CLU plasmática y preferencia condicionada por el entorno asociado a sacarosa en animales alimentados con dieta rica en grasa. Se representan las rectas de regresión correspondientes a las tres pruebas de libre elección en que el análisis previo de correlaciones había detectado diferencias significativas.

4. DISCUSIÓN

La instauración de una dieta rica en grasa en los animales de nuestro modelo provocó un incremento muy marcado de la ingesta que se estabilizó posteriormente, lo que de acuerdo a otros autores podría interpretarse como un efecto inicial de la novedad, que se pierde cuando el acceso a la dieta es regular (la Fleur *et al.*, 2010). El mayor contenido calórico de esta dieta condicionó un incremento significativo del peso de los animales y aceleró el desarrollo de preferencia condicionada por los entornos asociados a sacarosa, resultado este último que concuerda con otros trabajos en que se había mostrado que el consumo de una dieta grasa incrementa la motivación por soluciones de sacarosa en protocolos de conducta operante (Figlewicz *et al.*, 2013). Este incremento aparente de las propiedades hedónicas de la sacarosa se hace aún más patente si tenemos en cuenta que los animales con acceso a la dieta grasa de nuestro modelo alcanzaron elevados niveles de preferencia condicionada ingiriendo una cantidad de pellets de sacarosa muy inferior a la de los controles durante las sesiones de condicionamiento.

Una vez adquirida, la preferencia condicionada inducida por sacarosa se extinguió también de forma muy acelerada en los animales alimentados con la dieta rica en grasa de nuestro modelo, ya que de hecho desapareció espontáneamente, antes incluso de realizar ninguna sesión de extinción. Estos hallazgos pueden ser el reflejo de una menor activación del sistema cerebral de recompensa como consecuencia de la exposición crónica a la dieta, tal y como se ha observado en el NAC de animales expuestos crónicamente a dietas ricas en grasas y azúcares (Alsiö *et al.*, 2012), lo que a su vez podría ser consecuencia de una disminución de receptores dopaminérgicos D₁, que están estrechamente involucrados con la motivación hacia los estímulos reforzantes (Volkow *et al.*, 2013; de Melo Martimiano *et al.*, 2015), y/o de una disminución del *turnover* de dopamina (Davis *et al.*, 2008). De acuerdo con esta hipótesis, estos últimos autores han descrito que ratas alimentadas con una dieta rica en grasa exhiben una reducción de las tareas recompensadas con la presentación de sacarosa, de forma aparentemente contradictoria con los resultados anteriormente comentados de Figlewicz *et al.*, (2013). Davis *et al.* (2008) observaron además que esta dieta disminuía el condicionamiento preferencial al sitio inducido por amfetamina, lo que concuerda con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en los que se observó que ratones alimentados con la misma dieta grasa del presente trabajo exhibieron un menor condicionamiento de lugar inducido por cocaína (del Castillo *et al.*, 2009). Nuestros resultados ofrecen una posible explicación a las aparentes contradicciones encontradas en la literatura sobre la base del tiempo de exposición a la dieta, de forma que a tiempos cortos la dieta grasa tendería a incrementar la motivación por los reforzadores, pero a tiempos más

largos podría ocurrir lo contrario. Además, y más allá de las posibles alteraciones en el circuito cerebral de recompensa, la disminución espontánea del valor reforzador de la comida en animales alimentados con dieta grasa podría ser tan sólo un resultado aparente, determinado por la aparición de déficits cognitivos asociados a la obesidad que podrían interferir en mayor o menor medida con las pruebas conductuales. De acuerdo con esta idea, Farr *et al.*, (2008) han descrito que los ratones obesos con hipertrigliceridemia presentan este tipo de problemas, y también en humanos se han descrito alteraciones cognitivas ligadas a la obesidad (Bruce-Keller *et al.*, 2009). En cualquier caso, la dieta rica en grasa causa cambios comportamentales llamativos y complejos, que probablemente tengan mucho que ver con cambios profundos en el circuito mesolímbico dopaminérgico y en sus conexiones con los ganglios basales, la corteza y el hipotálamo (Berthoud, 2011).

Los ratones obesos mostraron una tendencia a presentar concentraciones plasmáticas más elevadas de CLU que los controles, aunque no se alcanzaron diferencias significativas. La inexistencia de diferencias entre obesos y controles concuerda con los resultados mostrados en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral, que tampoco encontraron diferencias entre pacientes obesos mórbidos y controles normopesos, pero difieren de lo observado en algunos estudios previos en que sí se observaron cambios en los niveles plasmáticos de CLU asociados a la obesidad (Oberbach *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2014). Al margen de la relación entre niveles de CLU y obesidad, nuestro hallazgo de que la concentración plasmática de esta proteína en los ratones obesos correlaciona con su preferencia por el compartimento asociado a sacarosa en tres tests de libre elección indicaría que esta proteína se comporta como un biomarcador de las propiedades hedónicas de la comida en cada individuo en particular, en vez de ser un biomarcador asociado al peso corporal. De nuevo estos hallazgos son consistentes con los resultados del capítulo 1, ya que los niveles de CLU de los obesos mórbidos correlacionaron inversamente con el control sobre la ingesta que presentaban los sujetos. Esta relación específica entre CLU y las propiedades reforzantes de la comida podría explicar por qué en algunos estudios se ha observado una relación estadísticamente significativa entre CLU y obesidad mientras que en otros no: de acuerdo con nuestra hipótesis, sólo cabría esperar que los niveles de CLU estuvieran elevados en aquellos estudios en que la proporción de obesos con “adicción a la comida” estuviera por encima de un determinado umbral. Al margen de los niveles plasmáticos de CLU, en este trabajo describimos por primera vez una sobreexpresión de esta proteína en el NAC de los animales alimentados con dieta rica en grasa que no se observa en otras zonas cerebrales menos relacionadas con el refuerzo y la recompensa, lo que apoya aún más la implicación específica de CLU en los cambios funcionales de este sistema asociados a la obesidad.

En nuestros experimentos hemos encontrado una disminución de FH en el NAC de los animales alimentados con la dieta rica en grasa, un resultado opuesto al incremento que habíamos descrito en un estudio previo en que se alimentaron ratones con la misma dieta aunque con períodos intermedios de privación (Pérez-Ortiz *et al.*, 2016). Al margen de estos últimos periodos, la principal diferencia entre ambos estudios estriba en la situación concreta en que los animales son sacrificados para la determinación de la proteína; en el estudio de Pérez-Ortiz *et al.* (2016) los animales están en una situación de *craving*, como demuestra la persistencia de su comportamiento de búsqueda de comida, mientras que en el presente estudio los animales ya habían pasado por varias sesiones de extinción y no exhibían por tanto preferencia condicionada por el comportamiento asociado a sacarosa. Parece así que la sobreexpresión de FH en NAC podría estar reflejando una activación neuronal causada por el *craving* por la comida, mientras que una expresión disminuida de la enzima podría indicar una hipoactivación inducida por la dieta rica en grasa en NAC en una situación basal, es decir, cuando los animales no presentan *craving*. Este tipo de evolución no sería sorprendente ya que se asemeja a lo observado en las adicciones a las drogas de abuso: en general, estas adicciones conllevan una disminución de la activación basal glutamatérgica del NAC, que se convierte en una hiperactivación en situaciones de *craving* (Nestler, 2005).

En resumen, los resultados de este estudio apoyan la existencia de una relación entre CLU y las propiedades reforzantes de la comida en ratones obesos que resulta consistente con lo previamente descrito en humanos. Así, los niveles plasmáticos de la proteína parecen correlacionar con un mayor valor hedónico de los alimentos apetitosos en los individuos obesos. Por otra parte, la regulación al alza de CLU y la regulación a la baja de FH en NAC podrían estar relacionadas con los fenómenos de adicción a la comida desencadenados por la dieta, mientras que la última enzima estaría sobreexpresada en situaciones específicas de *craving*.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SUBNUTRICIÓN PERINATAL Y POSNATAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN LA RATA

1. INTRODUCCIÓN

Durante las etapas perinatales, incluyendo gestación y lactancia, el sistema nervioso de las crías se encuentra en formación y maduración, por lo que tales periodos se consideran críticos dado que la perturbación de estos procesos puede traducirse en alteraciones y desarrollos aberrantes que originen disfunciones neuronales más o menos prolongadas en el tiempo (Morgane *et al.*, 2002). Así, son numerosos los autores que han descrito como una malnutrición perinatal podría ser responsable de transformaciones neuronales que jugarían un papel desencadenante de patologías como el trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), la esquizofrenia o la personalidad antisocial, además de potenciar distintos riesgos incrementando, por ejemplo, la vulnerabilidad adictiva (Vucetic *et al.*, 2010).

La subnutrición perinatal afecta directamente a los patrones de la ingesta, como describen da Silva *et al.*, (2013, 2016), y conlleva una tendencia a la hiperfagia; de forma compatible con este efecto, se han observado aumentos en la densidad hipotalámica de proteínas que promueven la ingesta e inhiben la saciedad como NPY y AgRP, al tiempo que se produce una inhibición de proteínas saciantes como POMC y CART y una resistencia a las señales saciantes de la insulina y la leptina. Al incremento de la ingesta parece también contribuir un aumento de la motivación y de las propiedades reforzantes de la comida; de esta forma, Martimiano y colaboradores (2015) observaron cómo los animales expuestos a una subnutrición proteica perinatal mostraban una latencia menor para acudir hacia el lugar donde se encontraba el reforzador, así como menos regresiones o distracciones en su trayectoria, lo cual indica una mayor motivación por la comida. Este efecto motivacional se correlaciona con una mayor activación de las áreas cerebrales del circuito de recompensa, señalado por un aumento de la expresión de c-fos, y se acompaña de un incremento de receptores D1 de dopamina en núcleo accumbens (da Silva *et al.*, 2013; de Melo Martimiano *et al.*, 2015). Otros autores han encontrado alteraciones adicionales en el circuito dopaminérgico mesolímbico de animales subnutridos; en este sentido, Vucetic y colaboradores (2010) han descrito aumentos de la enzima de síntesis de dopamina (tirosina hidroxilasa), de la propia dopamina y de su transportador, y han encontrado una disminución en la metilación del gen *Cdkn1c* que codifica para un inhibidor de ciclina kinasa, cuya expresión es crucial para la diferenciación correcta de las neuronas dopaminérgicas. Este último hallazgo es muy relevante pues sugiere que algunos de los cambios inducidos por la subnutrición podrían ser irreversibles. Los cambios funcionales del sistema cerebral de refuerzo y recompensa inducidos por la subnutrición parecen afectar también a las propiedades reforzantes de otros estímulos distintos de la

comida, por ejemplo a las propiedades hedónicas de las drogas de abuso; de esta forma, las ratas subnutridas muestran un desplazamiento hacia la izquierda en la curva de dosis-respuesta de morfina en el test de condicionamiento preferencial al sitio, así como una mayor sobreexpresión de FosB tras la exposición a morfina y cocaína (Valdomero *et al.*, 2007).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado que la subnutrición provoca un incremento de la densidad y actividad de la enzima fumarato hidratasa (FH) en la fracción mitocondrial de las neuronas de NAC, lo que podría representar un correlato bioquímico de la hiperactivación del sistema de refuerzo y recompensa, inducida por la deprivación nutricional (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2015). FH es una proteína multifuncional que se localiza principalmente en la matriz mitocondrial, donde participa en el ciclo del ácido tricarbóxico, y en el citosol, donde juega un papel en el ciclo de la urea y en el metabolismo de los aminoácidos. También puede translocarse al núcleo celular donde participa en la supresión de tumores y la reparación del ADN (Yogev *et al.*, 2011). Los cambios en la densidad y en la traslocación celular de FH afectan por tanto a las funciones de esta proteína, y en este sentido la subnutrición podría provocar alteraciones significativas ya que por ejemplo disminuye la actividad AMPK (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2009), lo que se traduce en una disminución en la fosforilación de FH que es necesaria para su traslocación (Klaus *et al.*, 2012). Con el fin de conocer si las alteraciones inducidas por la subnutrición sobre el sistema de refuerzo y recompensa perduran en el tiempo, en este trabajo hemos comparado la densidad y la distribución celular de FH en NAC y corteza prefrontal (CPF) de ratas crónicamente subnutridas con los mismos parámetros de ratas también subnutridas durante el periodo perinatal, pero posteriormente realimentadas con una dieta control.

De forma paralela a la expresión de FH nos hemos planteado estudiar también la expresión de clusterina en el NAC de los mismos animales. Estudios previos, como los que se recogen en los capítulos anteriores de la presente Tesis Doctoral, han mostrado que los niveles plasmáticos de CLU correlacionan con la falta de control sobre la ingesta en pacientes obesos mórbidos y con la preferencia condicionada por entornos asociados a sacarosa en ratones obesos, resultados ambos que sugieren una relación directa entre adicción a la comida y concentración plasmática de CLU. Además, los ratones obesos exhiben un incremento en la expresión de CLU en NAC. Dado que la subnutrición conlleva alteraciones importantes de la función del sistema de refuerzo y recompensa, cabe esperar que la expresión de CLU se vea también afectada en el núcleo accumbens de los animales de nuestro modelo. Al margen de la densidad de la proteína, el estudio de su distribución celular en nuestro modelo

adquiere sentido dado que CLU puede hallarse en el interior celular con diferentes localizaciones, isoformas y funciones, de forma semejante a lo que ocurre con FH. Así, por ejemplo, una isoforma mitocondrial de CLU exhibe propiedades antiapoptóticas al inhibir la formación del complejo Bax/Bak, lo que podría verse afectado por la subnutrición, ya que en estas condiciones se ha observado una disminución de la concentración de Bax en el cerebro (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2009). En consecuencia, el estudio de la expresión de CLU en NAC y CPF de nuestros animales puede confirmar su relación con las alteraciones del sistema de refuerzo, en este caso inducidas por la subnutrición, y revelar además si estas son permanentes o pueden ser revertidas por una realimentación con dieta control.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales

Para este estudio se utilizaron ratas hembras Wistar procedentes de un modelo de subnutrición severa establecido en el laboratorio de Bioquímica del Dr. Escrivá de la Universidad Complutense de Madrid (Escriva *et al.*, 1992). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y la Legislación Española para las buenas prácticas, cuidado y uso de animales de laboratorio (RD 1205/2005 y RD 53/2013).

En la figura 3.1. se resumen las fases del procedimiento utilizado para la preparación de los tres grupos experimentales del estudio. Tras juntar a ratas hembras y machos adultos de la raza Wistar, y confirmar los cruces mediante frotis vaginal, las hembras gestantes fueron individualizadas y el día 16 se distribuyeron en dos grupos: los animales del grupo control continuarían toda la gestación y la lactancia con una alimentación *ad libitum* de pienso estándar, mientras que los animales con acceso restringido a la comida seguirían un protocolo de subnutrición severa que consistió en su alimentación diaria con 10 g de pienso estándar hasta el momento del parto. Esta restricción supone una ingesta del 40-50% de lo ingerido por los animales control, y evita la ganancia de peso en un 20% con respecto a la de estos últimos animales. Tras el parto, se restringió el número de crías por madre dejando únicamente a las hembras, de manera que no existiese competición para conseguir alimento y eliminando así la ingesta diferencial por tal motivo. Durante la lactancia, las madres subnutridas tuvieron acceso a 15 g diarios de pienso la primera semana, 20 g la segunda y 25 g la tercera; así pues,

durante este periodo recibieron un 35% del pienso que consumían las ratas control. El día 22 se produjo el destete en que las crías fueron separadas de las madres, dando así comienzo a su vida independiente. Las crías del grupo control (C), procedentes de madres con acceso *ad libitum* al pienso estándar (*chow*), continuaron con acceso libre a esta misma dieta durante el resto del experimento. Las crías procedentes de las madres subnutridas fueron divididas en dos grupos; en el primero de ellos los animales continuaron con una alimentación restringida al 35% de la ingesta del grupo control (grupo de ratas crónicamente subnutridas, SUB), mientras que a los animales del segundo grupo se les dio acceso libre al pienso estándar (grupo de ratas subnutridas exclusivamente durante el periodo perinatal, SUB + Ad lib). A los 5,5 meses de vida de los animales, estos se sacrificaron por decapitación. Se diseccionó el cerebro para obtener el NAC y la CPF de acuerdo al procedimiento de Heimer et al. (1991), manteniéndose los tejidos a -80°C hasta su procesado.

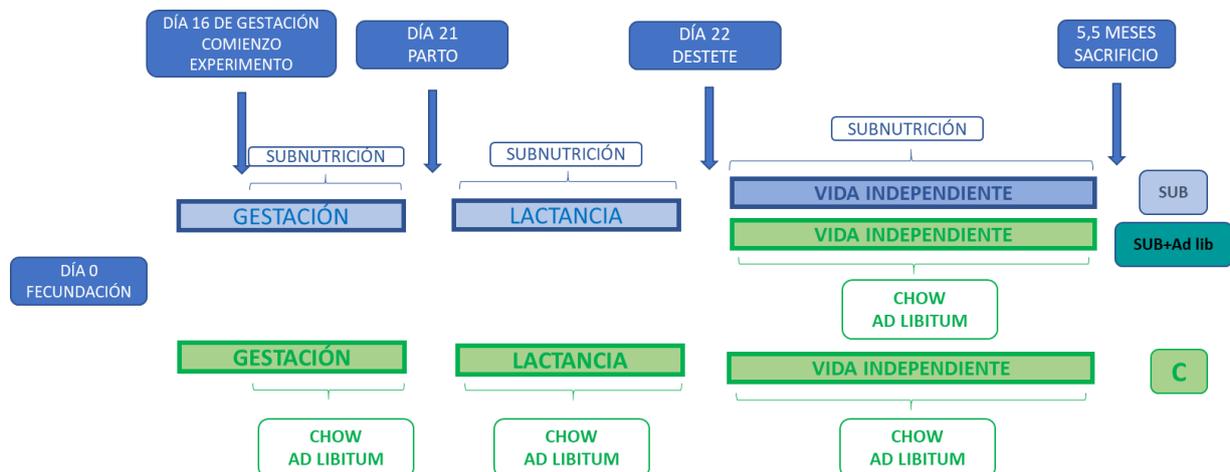


Figura 3.1. Esquema del modelo experimental (ver detalles en el texto).

2.2. Determinación de la expresión de CLU y FH en fracciones celulares de NAC y CPF

Para la separación de las fracciones mitocondrial y citosólica de las áreas cerebrales en estudio se siguió el protocolo descrito por Lizárraga-Mollinedo *et al.* (2013) (Figura 3.2.). Los tejidos fueron descongelados y homogenizados en un Tissuelyser de Quiagen (dos ciclos de 1 minuto a 50 oscilaciones por segundo), utilizando para ello 200 µl de tampón de homogenización compuesto por sacarosa, EDTA y Tris. El homogenizado se centrifugó a 2500 rpm para descartar el *debris* celular, sometiéndose el sobrenadante a una segunda centrifugación a 12700 rpm que separó la fracción mitocondrial (contenida en el pellet) de la citosólica (sobrenadante).

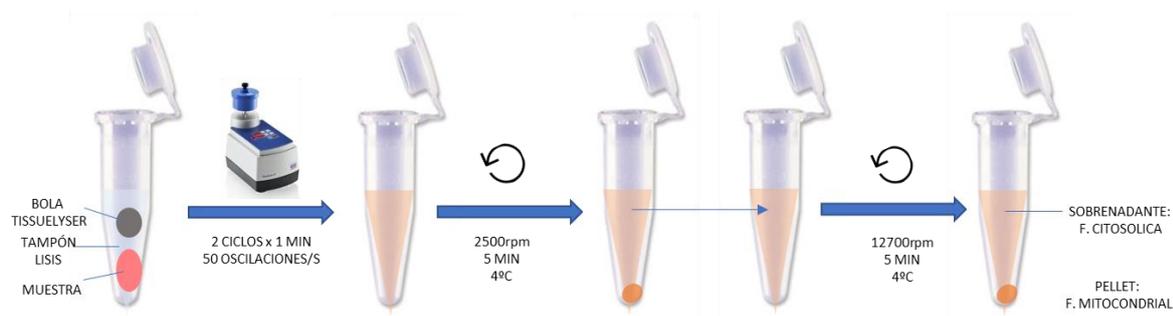


Figura 3.2. Esquema del protocolo de fraccionamiento celular.

Se comprobó el correcto fraccionamiento mediante Western Blot, utilizando anticuerpos frente a proteínas específicas de cada fracción: superóxido dismutasa en el caso de la fracción mitocondrial (anti-SOD2- sc137254, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) y AKT en el caso de la citosólica (anti-AKT 9272, Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands).

Para determinar la concentración de CLU y FH en las distintas fracciones celulares se utilizó la técnica de Western Blot. Previamente se normalizó la concentración de proteínas totales de todas las muestras, para lo cual se determinó la concentración inicial de proteínas mediante el método de Bradford. Este método se basa en la reacción colorimétrica que se produce entre el reactivo Bradford (el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250) y las proteínas de una muestra; el reactivo es inicialmente rojo, pero al unirse a las proteínas vira a azul de forma proporcional a la concentración de estas últimas. La absorbancia que la reacción produce es leída con un lector de placas a 595 nm y de la interpolación de la recta estándar creada con concentraciones conocidas, se obtienen las concentraciones de cada una de las muestras. Dichas concentraciones se emplearon para realizar el ajuste de todas las muestras a la misma concentración, de manera que la determinación de las proteínas específicas partiese de una cantidad igual de proteínas totales en todos los casos.

La técnica de Western Blot consiste en la separación de las proteínas de una muestra según su peso molecular, su transferencia a un soporte adecuado y la posterior detección y cuantificación de una proteína en concreto mediante un procedimiento inmunológico (Figura 3.3.). La separación de las proteínas se realiza a través de un gel de acrilamida/bisacrilamida, que al gelificar deja un tamaño de poro inversamente proporcional a su concentración. Las proteínas de la muestra, cargadas negativamente, se ven atraídas por el polo positivo situado en la parte inferior del gel al establecerse

un dipolo eléctrico (utilizando una cubeta de electroforesis y una fuente de energía), de forma que en su migración quedan retenidas por los poros del gel en función de su tamaño molecular: las más pequeñas tendrán mayor facilidad para migrar, mientras que las proteínas de peso molecular más elevado tendrán más dificultades y por lo tanto viajarán menos. Para conseguir una separación adecuada, los péptidos deben presentar una estructura lineal cargada negativamente, para lo que se hierve la muestra junto con tampón Laemli que contiene Tris para un pH y una molaridad óptima, glicerol para aumentar la viscosidad de la muestra, azul de bromofenol para facilitar el manejo de la muestra, beta-mercaptoetanol para romper los enlaces disulfuro de las proteínas y mantenerlas desnaturalizadas, y SDS como detergente aniónico que tapiza con cargas negativas las proteínas, proporcionando un ratio masa/carga igual en todas ellas y optimizando así su separación únicamente por peso molecular. Una vez que la electroforesis ha separado las proteínas, para poder proceder a su detección y cuantificación es necesario que sean transferidas a una superficie de nitrocelulosa más estable. Para ello se emplea el mismo principio de la atracción de las proteínas cargadas negativamente por el polo positivo, utilizando un sandwich de transferencia (Transblot-Turbo transfer Pack, de 0,2 μm de tamaño de poro, BioRad) y el equipo Transblot-Turbo Transfer System (BioRad). Se utilizó el protocolo de peso molecular mixto dados los pesos moleculares de interés.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó durante 30 min con una solución rica en proteínas (preparada con leche desnatada en polvo, tampón Tris, agua destilada y Tween 20) con el fin de bloquear los poros de la membrana y así evitar falsos positivos. Tras este proceso, se lavó con tampón compuesto por los mismos componentes que la solución de bloqueo, pero con una concentración mucho menor de proteínas (menor cantidad de leche). Las membranas se incubaron a lo largo de la noche a 4°C y con agitación con el anticuerpo primario correspondiente (Clu: NBP1-68308 1:1000; FH: NBP1-47754, 1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Una vez finalizada esta primera incubación se lavaron las membranas cinco veces durante 5 min cada lavado, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (CLU: 1:5000 Anti-Rabbit; FH: 1:5000 Anti-Mouse; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Seguidamente, se lavaron de nuevo las membranas cinco veces durante 5 min cada lavado para eliminar el anticuerpo no unido específicamente y se procedió al revelado incubando con una solución de luminol (ECL Prime Western Blotting Reagent, GE Healthcare, Amersham, UK) durante 5 min, e introduciendo la membrana en un equipo ChemiDoc XRS+ (BioRad).

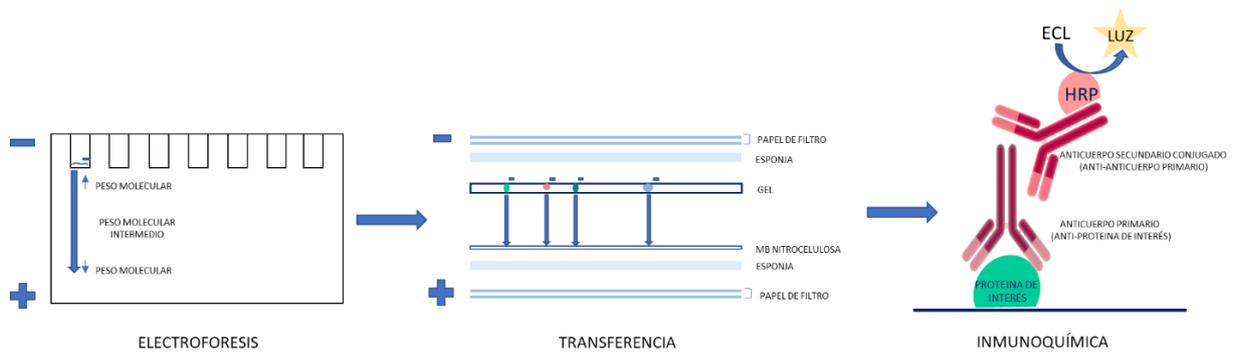


Figura 3.3. Esquema de los pasos fundamentales del Western Blot, comenzando con la electroforesis, continuando con la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, y finalizando con una reacción inmunoquímica.

Una vez obtenidas las bandas específicas de cada anticuerpo, para normalizar los resultados se incubaron de nuevo las membranas con un anticuerpo anti- β -Actina 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) 1 h con agitación a temperatura ambiente, seguido de la realización de cinco lavados de 5 min cada uno, e incubación durante 30 min con anticuerpo secundario anti-mouse 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). La β -Actina se utiliza como control de carga para la normalización de los resultados, ya que es una proteína estructural cuya expresión es constante, por lo que su determinación permite así afinar el ajuste previo de proteínas totales de las muestras realizado mediante el método de Bradford.

2.3. Determinación de la actividad FH

En las células eucariotas, la enzima FH cataliza la transformación de fumarato procedente del ciclo de la urea en malato. El procedimiento para la determinación de la actividad de esta enzima se basa en la reacción inversa a la que sucede en la célula:



El fumarato tiene un máximo de absorbancia a 240 nm, en base a ello su formación se puede cuantificar usando un espectrofotómetro y registrando la absorbancia a dicha longitud de onda. Para ello se añaden 800 μ l de un tampón Tris-acetato 10 mM pH7,5, 200 μ l de L-Malato 250 mM y 20 μ l de la

muestra en una cubeta de cuarzo de 1 ml y 1 cm de paso de luz. Una vez obtenidas las absorbancias estables en un periodo de un minuto, es necesario calcular a partir de ellas la actividad de la enzima basándose en el valor del coeficiente de la absorbancia molar del fumarato, que asume que 1 μmol de fumarato produce 1,45 unidades de absorbancia por minuto. Una vez calculada la actividad enzimática específica de la muestra, esta se refiere finalmente a la concentración total de proteínas de la misma determinada por el método Bradford.

2.4. Análisis estadístico

Tanto la densidad de las dos proteínas estudiadas como la actividad enzimática de FH se compararon entre grupos experimentales en cada área y fracción cerebral mediante ANOVA de 1 vía seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideraron significativas las diferencias cuando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

La subnutrición de los animales durante la gestación, lactancia y vida autónoma (grupo SUB) causó una marcada disminución de su peso corporal con respecto a de los animales del grupo control (C). Los animales subnutridos hasta el destete pero que tuvieron libre acceso al pienso normal desde ese momento (grupo SUB + Ad Lib) exhibieron un peso similar al de los controles al final del experimento (Figura 3.4.).

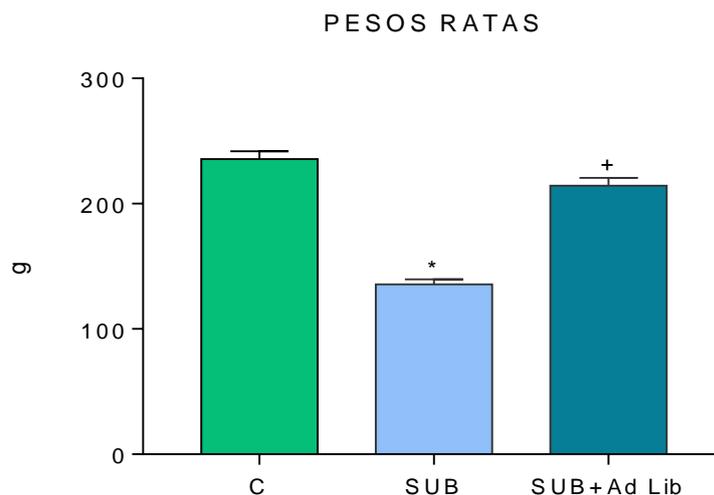


Figura 3.4. Pesos expresados en gramos (g) en el momento del sacrificio de animales control (C, n=6), subnutridos totalmente (SUB, n=9) o parcialmente (SUB + Ad Lib, n=3) (media \pm ESM). *p<0.05 vs C; +p<0.05 vs SUB.

Los animales del grupo SUB exhibieron un aumento significativo de la expresión de FH en la fracción mitocondrial de NAC con respecto a los controles (Figura 3.5.); la distribución relativa entre mitocondria y citosol (Tabla 3.1.) y la actividad del enzima en NAC (Figura 3.6.) siguieron la misma tendencia a estar aumentadas en el grupo SUB respecto al grupo control, aunque en ninguno de estos casos se obtuvieron diferencias significativas. Cuando los animales inicialmente subnutridos tuvieron acceso libre a una dieta normal tras el destete (grupo SUB + Ad Lib) la expresión mitocondrial de FH y su distribución relativa entre mitocondria y citosol cayeron drásticamente por debajo de las del grupo SUB e incluso aún por debajo de las del grupo control (Figura 3.5., Tabla 3.1.). La actividad de la enzima siguió una evolución semejante aunque sin llegar a exhibir diferencias significativas. No se obtuvieron diferencias significativas entre grupos en la expresión de FH en CPF, aunque pudo observarse una tendencia a la sobreexpresión en fracción citosólica de los animales crónicamente subnutridos.

CONCENTRACIONES CEREBRALES DE FH

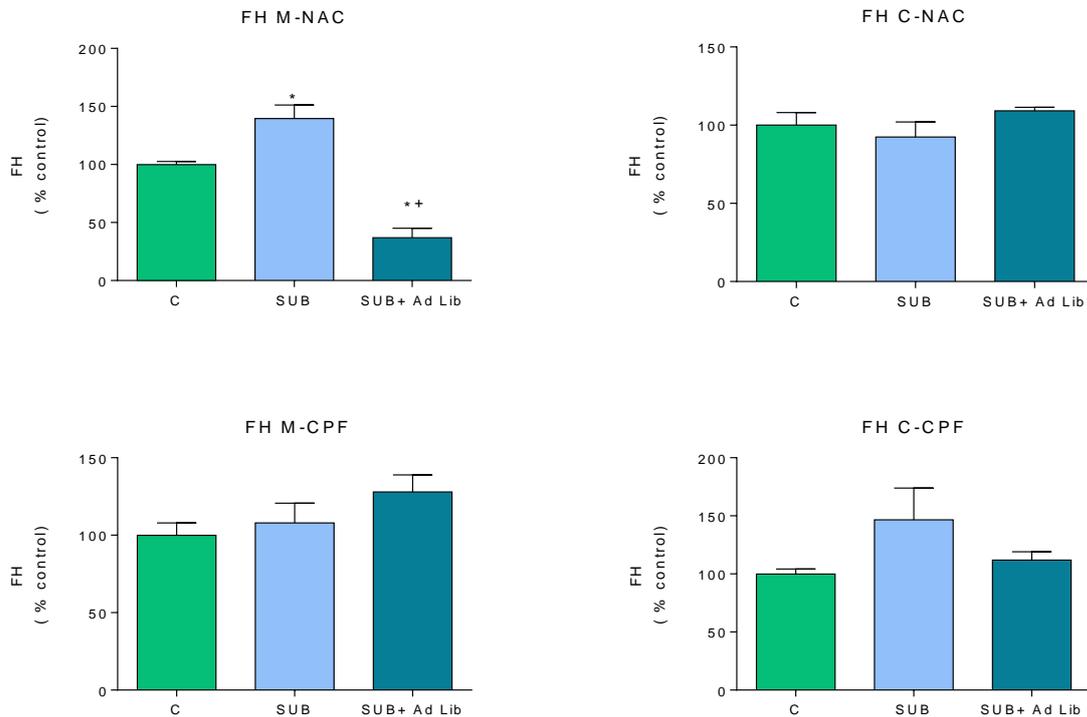


Figura 3.5. Expresión de FH en las fracciones mitocondrial y citosólica de NAC y CPF de animales control (C, n=6), subnutridos totalmente (SUB, n=9) o parcialmente (SUB+Ad Lib, n=3) (media \pm ESM). *p<0.05 vs C; +p<0.05 vs SUB.

DISTRIBUCIÓN CELULAR RELATIVA DE FH (FRACCIÓN MITOCONDRIAL/CITOSÓLICA)			
ÁREA CEREBRAL	GRUPO EXPERIMENTAL		
	C	SUB	SUB + Ad Lib
NAC	1,0 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1* ⁺
CPF	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2

Tabla 3.1. Distribución celular relativa de FH expresada como el ratio entre la fracción mitocondrial y la citosólica, tomando como unidad de referencia el ratio del grupo control (media \pm ESM). C, control; SUB, grupo subnutrido totalmente; SUB + Ad Lib, grupo subnutrido parcialmente. * p < 0,05 vs C; ⁺ p < 0,05 vs SUB.

ACTIVIDAD FH

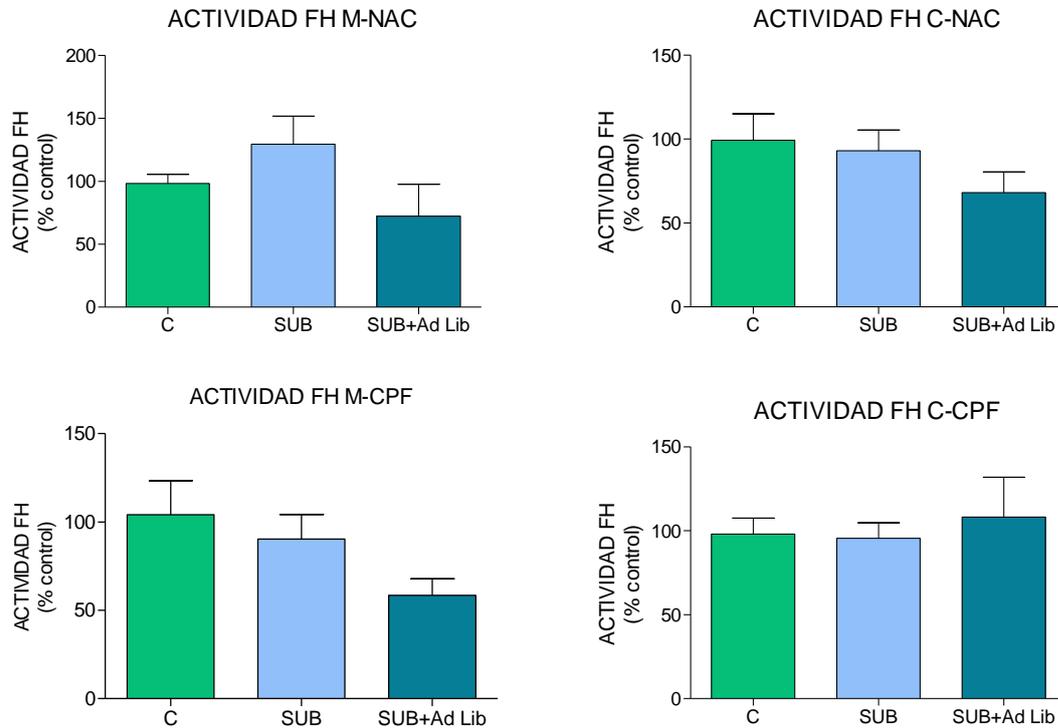


Figura 3.6. Actividad de la enzima fumarato hidratasa en áreas cerebrales en sus fracciones mitocondrial y citosólica de animales control (C, n=6), subnutridos totalmente (SUB, n=9) o parcialmente (SUB+ Ad Lib, n=3) (media \pm ESM).

La subnutrición mantenida en el tiempo provocó un aumento significativo en la expresión absoluta y la distribución relativa de clusterina en la fracción mitocondrial del NAC (Figura 3.7., Tabla 3.2.). Cuando los animales inicialmente subnutridos tuvieron acceso libre a una dieta normal tras el destete (grupo SUB + Ad Lib), la expresión de clusterina disminuyó con respecto al grupo SUB tanto en la fracción mitocondrial como en la citosólica del NAC, llegando a ser incluso inferior a la concentración citosólica del grupo control (Figura 3.3.). Al igual que en el caso de FH, no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos en los niveles de clusterina en CPF, aunque sí una tendencia al incremento en la fracción citosólica de los animales crónicamente subnutridos (Figura 3.7.); no obstante, los animales del grupo SUB + Ad Lib mostraron una distribución preferentemente mitocondrial de la proteína en relación con los otros dos grupos, alcanzándose diferencias significativas con el grupo SUB (Tabla 3.2.).

CONCENTRACIONES CEREBRALES DE CLUSTERINA

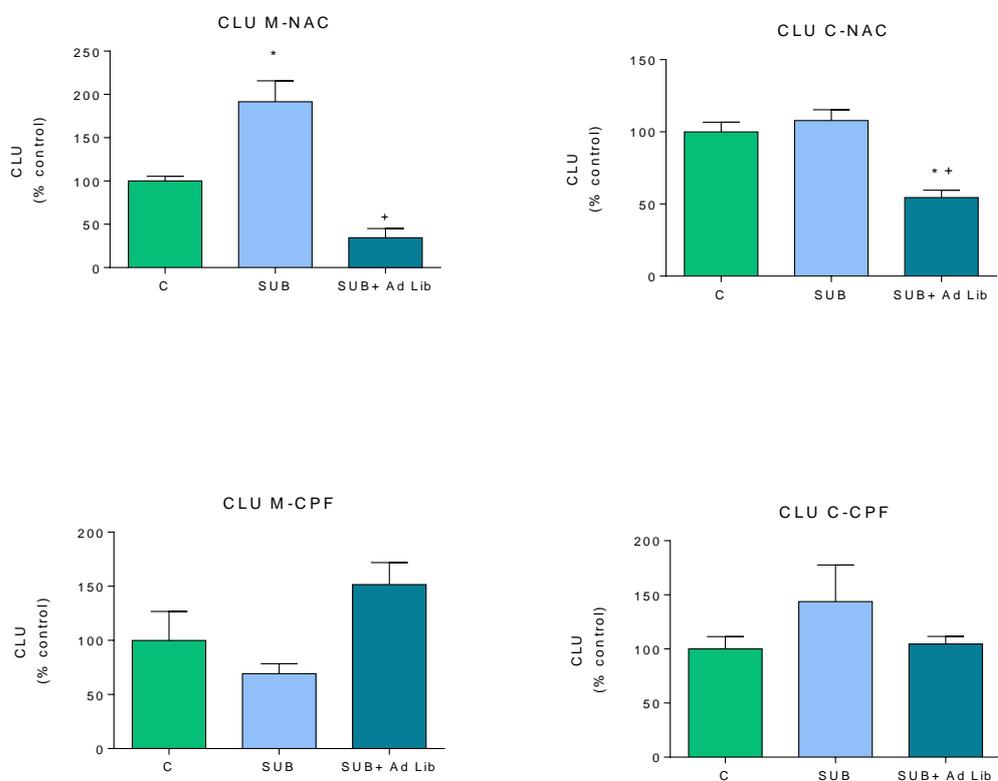


Figura 3.7. Expresión de clusterina en las fracciones mitocondrial y citosólica de NAC y CPF de animales control (C, n=6), subnutridos totalmente (SUB, n=9) o parcialmente (SUB+ Ad Lib, n=3) (media \pm ESM). * $p < 0.05$ vs C; + $p < 0.05$ vs SUB.

DISTRIBUCIÓN CELULAR RELATIVA DE CLUSTERINA (FRACCIÓN MITOCONDRIAL/CITOSÓLICA)			
ÁREA CEREBRAL	GRUPO EXPERIMENTAL		
	C	SUB	SUB + Ad Lib
NAC	1,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,3*	0,6 \pm 0,2 ⁺
CPF	0,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1 ⁺

Tabla 3.2. Distribución celular relativa de clusterina expresada como el ratio entre la fracción mitocondrial y la citosólica, tomando como unidad de referencia el ratio del grupo control (media \pm ESM). C, control; SUB, grupo subnutrido totalmente; SUB + Ad Lib, grupo subnutrido parcialmente. * $p < 0,05$ vs C; ⁺ $p < 0,05$ vs SUB.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos están en la línea de lo descrito previamente por Lizarraga-Mollinedo *et al.* (2013) en ratas crónicamente subnutridas hasta los 70 días de vida, ya que muestran también una sobreexpresión de FH en la fracción mitocondrial del NAC de los animales subnutridos durante la gestación, lactancia y un periodo aún más largo de vida libre que se extiende hasta alrededor de los 5 meses de edad. No obstante, en nuestro estudio encontramos un menor cambio en la actividad enzimática de FH, que no alcanzó niveles significativos, lo que puede deberse a una menor sensibilidad del método puesto a punto en nuestro laboratorio. Esta sobreexpresión de FH mitocondrial podría ser consecuente a cambios en la traslocación de la proteína derivados a su vez de la disminución de AMPK asociada a la subnutrición (Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2009), y podría conllevar una mayor síntesis oxidativa de ATP y activación metabólica de las neuronas del NAC en los animales subnutridos (Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2013); si bien no existe una evidencia experimental que avale esta última suposición, la consideración de las funciones celulares de FH soportan esta hipótesis. Por otra parte, si tenemos en cuenta la relación entre FH en NAC y el *craving* sugerida por Pérez-Ortiz *et al.* (2016) y que se ha comentado en el capítulo anterior de esta tesis doctoral, el incremento mitocondrial de FH y la activación neuronal del NAC podrían estar indicando una situación de *craving* por la comida en los animales crónicamente subnutridos, lo que también resulta plausible.

La hiperactividad mitocondrial de FH en NAC causada por la subnutrición no es una alteración irreversible, ya que no se observó cuando los animales subnutridos tuvieron acceso a una dieta normal desde el destete hasta los 5 meses de vida. Sin embargo, a pesar de que los animales así realimentados recuperaron un peso semejante al de los controles, sus niveles de FH en la fracción mitocondrial de NAC se encontraron reducidos y la proteína mayoritariamente translocada al *pool* citosólico, donde su concentración fue normal. Este resultado indica que la subnutrición durante la gestación y la lactancia evita una normalización completa del sistema de refuerzo y recompensa, incluso cuando han transcurrido muchos meses de acceso libre a la comida. Una hipoactividad mantenida de FH en la fracción mitocondrial del NAC podría así estar relacionada con las alteraciones del sistema de refuerzo que confieren una alta sensibilidad a las propiedades reforzantes de las drogas o la comida en modelos animales de subnutrición perinatal (Tonkiss *et al.*, 1990; Valdomero *et al.*, 2006, 2007) y que parecen incrementar la vulnerabilidad adictiva también en humanos; en este sentido, estudios epidemiológicos sobre la hambruna que se produjo en Holanda el invierno de 1944-1945 han revelado que la desnutrición severa de las madres gestantes durante el primer trimestre del embarazo se asocia

significativamente con una mayor aparición de adicciones en sus hijos, independientemente de que estos tuvieran luego acceso a una alimentación normal (Franzek *et al.*, 2008). Queda por establecer si entre estas adicciones se encontraría también la adicción a la comida, lo que concordaría con la relación entre la misma y la disminución de FH en NAC que hemos sugerido en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral. Son también necesarios estudios específicos que diluciden si la disminución mitocondrial de FH puede ser resultado de cambios en la traslocación y si conlleva una hipoactivación metabólica en el NAC, como podría deducirse de la hipótesis anteriormente mencionada de Lizarraga-Mollinedo *et al.* (2013). En este sentido hay que tener en cuenta que las deficiencias de la actividad FH (y/o la consiguiente acumulación de fumarato) no solamente se han relacionado con alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial, sino también con otro tipo de cambios bioquímicos relevantes como la activación del factor inducible por hipoxia HIF (O'Flaherty *et al.*, 2010) y del factor nuclear Nrf2 (Adam *et al.*, 2011).

Los cambios observados en los niveles de clusterina en NAC fueron en buena parte concordantes con los obtenidos con FH. Así, la subnutrición crónica incrementó los niveles de la proteína en la fracción mitocondrial de NAC, lo que en este caso y a la vista de las funciones descritas para clusterina podría ser compatible con una respuesta de protección ante el daño asociado a la subnutrición, ya que con esta sobreexpresión podría inhibirse la formación del complejo proapoptótico Bax/Bak, la activación de caspasa-3 y la apoptosis que se ponen en marcha en estas situaciones (Lizarraga-Mollinedo *et al.*, 2009). Este posible papel neuroprotector de clusterina concuerda con el previamente descrito para esta proteína en otras muchas situaciones que conllevan daño neuronal, entre ellas la acumulación de β -amiloide (Boggs *et al.*, 2018), la excitotoxicidad (Park *et al.*, 2007), la isquemia cerebral (May *et al.*, 1992) el estrés celular asociado a deficiencias genéticas (Zinkie *et al.*, 2013) o el daño traumático cerebral (Huang *et al.*, 2015). Tanto la subnutrición como la sobreexposición a diversos nutrientes pueden considerarse situaciones agresivas para el sistema nervioso, por lo que la sobreexpresión de clusterina observada en este estudio y la obtenida en los ratones obesos del capítulo anterior de esta Tesis serían compatibles con la literatura y reflejarían en ambos casos una reacción defensiva ante daños diferentes del sistema cerebral de refuerzo y recompensa; estos daños podrían estar en el origen de las alteraciones conductuales asociadas a la subnutrición o la obesidad que se vienen describiendo en esta Tesis, tales como el incremento de la vulnerabilidad adictiva, el *craving* y su dimensión de pérdida de control sobre la ingesta. Cuando los animales subnutridos fueron realimentados con una dieta normal desde el destete se observaron niveles muy inferiores de clusterina en NAC en comparación con la subnutrición crónica, resultado de nuevo compatible con la hipótesis anterior, ya que en este caso la desaparición del daño que implica la subnutrición haría innecesaria la

sobreexpresión protectora de clusterina. No obstante lo anterior, observamos que la realimentación de los animales no conlleva una normalización completa de los niveles de clusterina en NAC, ya que la disminución los llevó por debajo de los del grupo control, fundamentalmente en la fracción citosólica. También se observó un cambio significativo en la distribución celular de clusterina en el CPF de estos últimos animales, lo que indica que las alteraciones inducidas por la subnutrición sobre el sistema de refuerzo y recompensa no serían específicas del NAC, aunque esta área cerebral parece claramente más sensible. En definitiva, los resultados obtenidos con clusterina van de nuevo en la misma línea de los observados con FH, e indican que los cambios bioquímicos inducidos por la subnutrición en el periodo perinatal se traducirían en una disrregulación permanente en el sistema cerebral de refuerzo en la edad adulta. Teniendo en cuenta el papel neuroprotector de clusterina, la disminución anormal de sus niveles en el NAC de los animales subnutridos en el periodo perinatal podría conferir un mayor riesgo de daño neuronal ante estímulos nocivos, aunque esta idea requeriría una comprobación directa.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBRENUTRICIÓN Y LA SUBNUTRICIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN CULTIVOS CELULARES

1. INTRODUCCIÓN

En base a los resultados de los capítulos 2 y 3 de esta Tesis Doctoral, en que se estudian los efectos de las condiciones que promueven la vulnerabilidad adictiva, los trastornos de la conducta alimentaria y la consecuente o causal expresión de clusterina, en el presente capítulo se pretende desarrollar un modelo que permita estudiar a nivel molecular qué sucede en las células cuando se las expone a condiciones de sub y sobrenutrición. Para ello se escogió la línea celular SHSY-5Y dadas sus semejanzas biológicas con las neuronas dopaminérgicas del sistema de recompensa. Se trata de células derivadas de biopsia de tumor óseo metastásico SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) que pertenecen a la sublínea parental SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) subclonada tres veces. Algunas de sus características más destacables son las siguientes:

- Los cultivos de SH-SY5Y incluyen células adherentes y células flotantes (Encinas *et al.*, 2002). Nosotros hemos trabajado con las células de tipo adherente y con morfología similar a neuroblastos, cuya fisiología es similar a la de las células de las áreas cerebrales relacionadas con los procesos adictivos (Ma *et al.*, 2015) (Figura 4.1.).
- Estas células son positivas para tirosina hidroxilasa (TH), lo cual es característico de las neuronas dopaminérgicas, ya que esta enzima es clave para la síntesis de dopamina (Ross *et al.*, 1983).
- Se ha comprobado que las células SH-SY5Y pueden diferenciarse a un fenotipo similar a neuronas maduras que se caracterizan por expresar marcadores neuronales (Kovalevich y Langford, 2013).

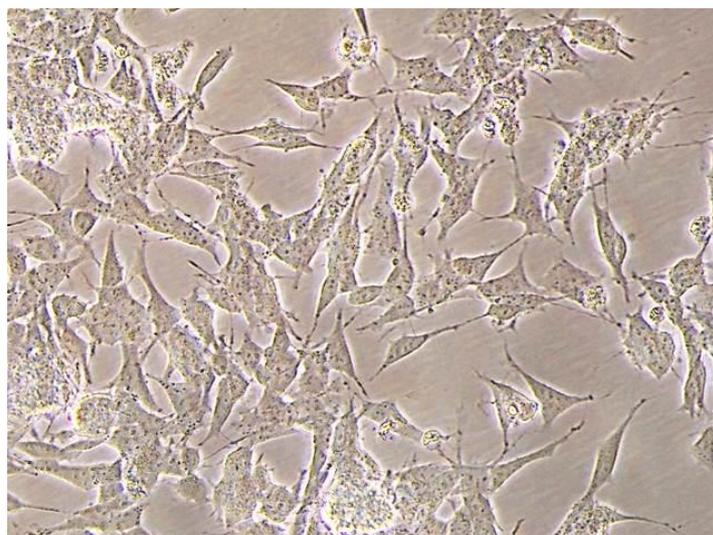


Figura 4.1. Cultivo de SH-SY5Y: células adherentes y con morfología tipo neuroblasto (20X)

Hemos tratado de reproducir en estas células lo que les sucede a las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico dopaminérgico en los animales de experimentación empleados en los anteriores capítulos, y en última instancia a las neuronas de los pacientes que presentan alteraciones en el sistema de refuerzo dopaminérgico, con el fin último de conocer mejor los mecanismos biológicos que implican a la clusterina en los cambios asociados tanto a la subnutrición como a la sobrenutrición.

Sabemos que una de las condiciones desencadenantes o potenciadoras de la adicción a la comida es la sobrealimentación y/o la ingesta de dietas ricas en grasa. Estas dietas, como demostramos en el capítulo 2 y como describen diversos autores (Berthoud *et al.*, 2012), producen cambios comportamentales complejos, que probablemente estén muy relacionados con cambios producidos en el circuito mesolímbico dopaminérgico. Por ello, se decidió sobrealimentar a las células con dos componentes del medio de cultivo fundamentales para su viabilidad. Por una parte, modificamos la concentración de glucosa del medio de cultivo, ya que es el sustento energético de las neuronas “in vivo” (Mergenthaler *et al.*, 2013), de forma que, cuando los animales o seres humanos se sobrealimentan, las neuronas dopaminérgicas estarían potencialmente expuestas a una mayor cantidad de glucosa. Por otro lado, hemos modificado la concentración de suero fetal del medio de cultivo ya que contiene numerosos factores de crecimiento necesarios para el desarrollo, la proliferación y la supervivencia neuronal, y en consecuencia la manipulación de sus niveles, puede modelizar estados asociados a una alimentación inadecuada.

En este sentido, como se ha comentado ampliamente en el capítulo 3, la subnutrición durante la gestación provoca cambios reversibles o no, en las crías de los animales que finalmente causan un aumento de la vulnerabilidad adictiva y del poder reforzador de los alimentos (Vucetic *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2013, 2016; de Melo Martimiano *et al.*, 2015). Los embriones de madres subnutridas pueden sufrir teóricamente una disminución del aporte de glucosa (Singh *et al.*, 1988) y/o de factores de crecimiento, por lo que hemos construido un modelo de subnutrición in vitro modificando las concentraciones de ambos componentes en el medio de cultivo. Este tipo de aproximación ha sido aplicada previamente por Navratilova *et al.*, (2013) en neuroblastos SH-SY5Y, buscando la concentración efectiva del antitumoral tetratiomolibdato. Asimismo, Bhattacharya *et al.*, (2014), para comprobar si la concentración de glucosa afectaba a la resistencia a antitumorales como el carboplatino o el 5-fluorouracilo, emplearon concentraciones bajas (5 mM) y altas (25 mM) de glucosa en el medio de cultivo de células de cáncer gástrico. A su vez, otros autores habían implementado condiciones similares para el estudio de la productividad de la síntesis de anticuerpos recombinantes (Villacres *et al.*, 2015).

Muy interesantes resultan los estudios sobre activación mitocondrial adaptativa en las células β -pancreáticas por modificación de la concentración de glucosa (Hals *et al.*, 2016); en este caso, la necrosis celular provocada por hipoxia se atenuó si las células habían sido cultivadas con la mitad de la concentración de la glucosa estándar. En relación con estos estudios sobre las variaciones de la actividad de orgánulos celulares, como son las mitocondrias, en situaciones que podríamos denominar de estrés celular, en este capítulo se pretende profundizar en el mecanismo de acción y los cambios que se producen a nivel molecular en las proteínas en estudio, clusterina y fumarato hidratasa, y su implicación en los cambios adaptativos que tienen lugar durante los modelos de sub y sobrenutrición *in vitro*.

Tiene especial relevancia en este capítulo el estudio de la clusterina, ya que tiene numerosas isoformas y localizaciones, lo que da como resultado que, en ocasiones, realiza funciones completamente antagónicas. Así, numerosos autores han estudiado su posible papel neuroprotector frente a la agregación del β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Schwochau *et al.*, 1998; Boggs *et al.*, 2018), así como su implicación en la inflamación y la activación de las células gliales (Xie *et al.*, 2005), su implicación en el desarrollo neuronal (Cordero-Llana *et al.*, 2011), o incluso, la regulación de esta proteína al tratar neuroblastos SH-SY5Y con un inhibidor proteasomal como es la lactasina para profundizar en el conocimiento de la enfermedad de Parkinson (Carreras *et al.*, 2005).

El gen que codifica la clusterina se encuentra en humanos en el cromosoma 8p21-p12. Presenta 9 exones y un total de 16kb. La síntesis canónica comienza con la creación de mRNA a partir de un codón de inicio localizado en el exón 2, del que resulta una preproteína de 449 aminoácidos, de los cuales los primeros 22 codifican por una señal de traslocación al retículo endoplásmico. Una vez traslocada la proteína, se secciona dicha secuencia señal y se produce la N-glicosilación de seis residuos de Asn junto con la formación de cuatro o cinco puentes disulfuro, convirtiendo a la proteína en la forma presecretada (psCLU), rica en manosa, que es traslocada al Aparato de Golgi donde continua glicosilándose con carbohidratos complejos y madurando hasta llegar a una proteína de unos 80KDa. Esta última es cortada por una proteína tipo-furina para formar dos subunidades, una α N-terminal, y otra β C-terminal, que finalmente son unidas por un puente disulfuro para conformar la proteína completamente madura, siendo esta la forma secretada (sCLU), un heterodímero de dos subunidades α y β de 40-45KDa (Kadam *et al.*, 2016; Rohne *et al.*, 2016) (Figura 4.2).

Por otro lado, a partir del mismo gen, se produce un *splicing* alternativo entre el exón 1 y el 3, eliminando el exón 2, de manera que se produce una forma truncada de la proteína que carece de la secuencia de traslocación, y por tanto no se transporta al retículo endoplásmico (Kadam y Teni, 2016). De esta traducción, surge una forma prenuclear (pnCLU) afuncional o latente en el citoplasma de unos 49kDa. En situaciones de estrés celular, este precursor inmaduro se convierte en la forma madura o clusterina nuclear (nCLU) de aproximadamente 55kDa, que se trasloca al núcleo celular donde a través de su unión con Ku-70 es capaz de promover la apoptosis probablemente por medio de una vía independiente de caspasa 3 (Leskov *et al.*, 2003; Caccamo *et al.*, 2005) (Figura 4.2.).

Contrariamente a la función que parece tener la isoforma nuclear de la clusterina (nCLU) como proteína proapoptótica, las funciones de las isoformas que surgen de la vía canónica son más complejas. Por un lado, y de forma bastante aceptada, se le atribuye la función chaperona que presenta la isoforma más madura de la proteína, la isoforma secretada (sCLU). Aunque otras teorías sugieren que esta isoforma también podría tener una función inhibidora de la proliferación celular o proapoptótica induciendo y estabilizando la síntesis de p53, proteína que a su vez activa genes capaces de detener el ciclo celular en G1 (Trogakos y Gonos, 2006) (Figura 4.2.).

A su vez, en el proceso completo de maduración surgen numerosas isoformas con diferentes grados de glicosilación cuyas funciones muchas veces son opuestas. Un dato muy importante para la presente Tesis Doctoral, es que existe una isoforma parcialmente glicosilada, casi madura, o presecretada (psCLU) de 53kDa que en determinadas situaciones de estrés celular se une a la chaperona reticular GRP78 (Bip) para su estabilización y traslocación a la mitocondria (Li *et al.*, 2013). Una vez en la mitocondria, psCLU es capaz de secuestrar a Bax activada, modulando la hetero-homologomerización de esta proteína (Zhang *et al.*, 2005) inhibiendo así la formación del complejo Bax-Bak; este complejo induce la cascada de la apoptosis por permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y liberación de citocromo c (Vucetic *et al.*, 2010), por lo tanto en este caso psCLU se comportaría como una proteína anti-apoptótica (Figura 4.2.). Por otra parte, cuando psCLU está localizada en el citoplasma es capaz de estabilizar el complejo Ku70-Bax, inhibiendo la posibilidad de que Bax llegue a la mitocondria (Trogakos y Gonos, 2006), y además podría unirse a sustancias citotóxicas presentes en el citoplasma, colaborando en su degradación proteosomal (Nizard *et al.*, 2007); todos estos mecanismos contribuirían por tanto al perfil anti-apoptótico de psCLU. Por otro lado, Kang y colaboradores (2013) describieron cómo la acumulación de clusterina prematura o inmadura,

deficiente de glicosilaciones, acumulada en el retículo endoplásmico en situaciones de estrés celular es capaz de inducir citotoxicidad (Figura 4.2.).

Así mismo, apoyando el papel antiapoptótico de la clusterina, Pereira y colaboradores (2018) han descrito recientemente que clusterina activa la vía PI3K-Akt, lo que conduce a una fosforilación de GSK3 capaz de inhibir la fosforilación de Bax, fosforilación necesaria para su activación (Pereira *et al.*, 2018). Al inactivar a GSK3 también se inhiben sus múltiples acciones como la inhibición de la liberación de dopamina (Figura 4.2.).

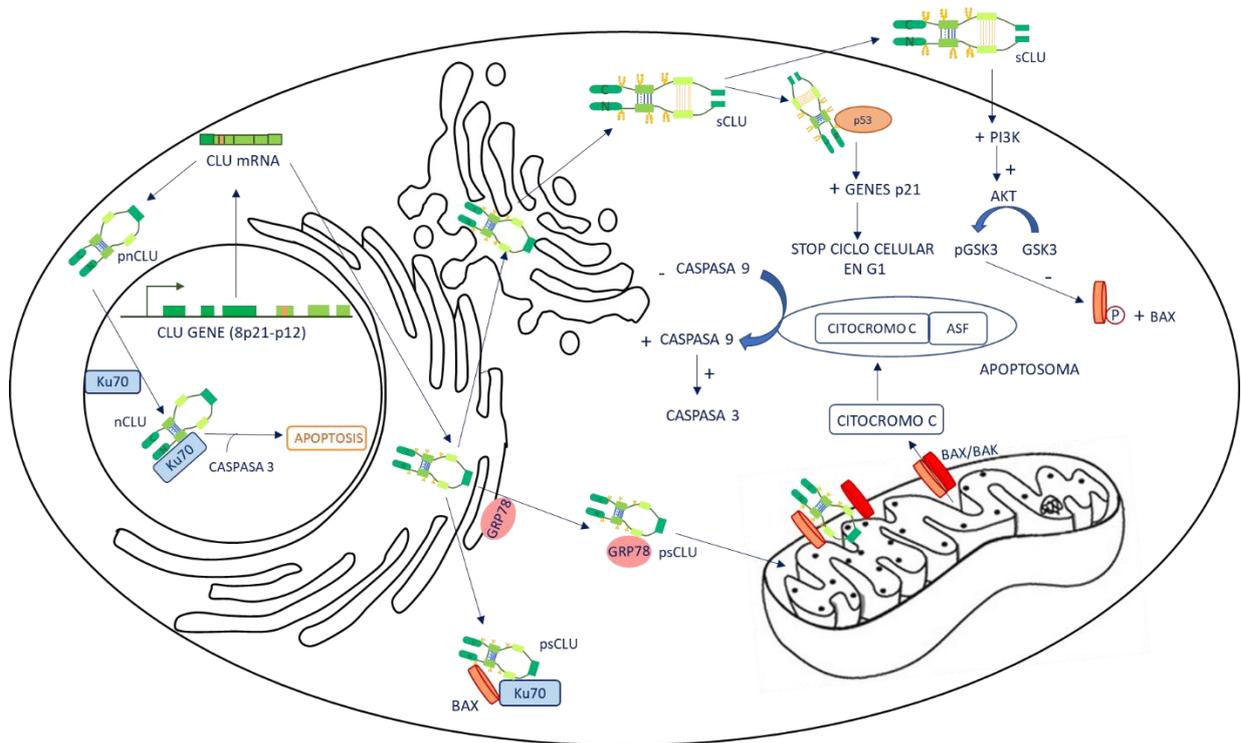


Figura 4.2. Isoformas y funciones de la clusterina (ver detalles en el texto).

De forma paralela a la clusterina, y al igual que en otros capítulos de esta Tesis, hemos estudiado la expresión de fumarato hidratasa, en las mismas condiciones experimentales, como una proteína de referencia que sufre modificaciones en su concentración total, mitocondrial o citosólica en condiciones de sub y sobrenutrición, tal y como han descrito previamente Lizarraga-Mollinedo *et al.* (2013) y Pérez-Ortiz *et al.* (2016).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Células

Se utilizaron células de la línea SHSY-5Y de neuroblastoma humano (Figura 4.3.), sublínea creada mediante 3 clonaciones de la línea celular original SK-N-SH, de biopsia de médula ósea (Biedler, Helson, & Spengler, 1973) y depositada en la ATCC (American Type Culture Collection). Es una línea celular diploide con altos niveles de dopamina β -hidroxilasa, una enzima clave en la síntesis de neurotransmisores adrenérgicos (Ross *et al.*, 1983; Kovalevich y Langford, 2013) y fueron elegidas por su morfología similar a neuroblastos y fisiología similar a las células de las áreas cerebrales relacionadas con los procesos adictivos (Ma *et al.*, 2015). Las células fueron cultivadas siguiendo condiciones estándar de cultivo (37°C, en atmósfera de 40% de humedad y 5% de CO₂) en la Unidad de Cultivos Celulares de la Universidad CEU San Pablo.

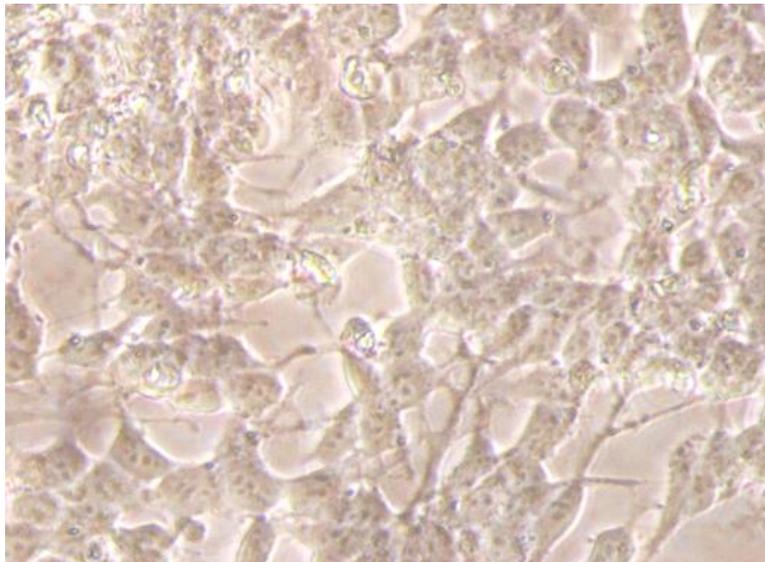


Figura 4.3. Cultivo de células SHSY-5Y (40X).

Tras la descongelación, las células se sembraron en frascos estériles de 75 cm² en medio RPMI (R1383- Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino (FBS- F6178-Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), Glutamina 2 mM (G7513- Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) y penicilina/estreptomicina (100 U/mL, 100 mg/mL respectivamente; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Tras 24h, se les cambió a un medio RPMI suplementado con 10% de FBS, Glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina (100 U/mL, 100 mg/mL) y que denominaremos como medio RPMI completo (RPMIc), hasta conseguir el porcentaje de confluencia adecuado para poder realizar los

experimentos. Se han realizado subcultivos solo hasta el pase 10, para evitar que las células pudieran no poseer las características adecuadas.

2.2. Condiciones de sub y sobrenutrición en cultivos celulares

Nos hemos basado en el modelo experimental *in vivo* realizado en animales (capítulos 2 y 3) para diseñar el modelo experimental de subnutrición y sobrenutrición *in vitro*.

Para la determinación de las condiciones experimentales *in vitro*, realizamos un screening mediante el Test del MTT, ensayo que permite evaluar la viabilidad celular basándose en la actividad mitocondrial, y como se ha descrito previamente en el capítulo 3, sabemos que la sub y sobrenutrición provocan modificaciones en las concentraciones de las proteínas en estudio, en las fracciones celulares.

2.2.1. Ensayo de viabilidad celular: test del MTT

2.2.1.1. Fundamento de la técnica

El test del MTT se encuentra registrado en la base de datos INVITTOX (IP-17) como un test que permite medir la actividad celular, basándose en la actividad mitocondrial. El reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; M5655- Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) añadido a las células se introduce en las mismas y es reducido por las enzimas deshidrogenasas en el interior de las mitocondrias activas, produciéndose formazán (Figura 4.4.). Este producto coloreado, se acumula en el interior celular en forma de cristales, debido a que es incapaz de atravesar la membrana citoplasmática. Al solubilizar las células, el producto es liberado, y es posible su detección y cuantificación por colorimetría. Las células cuyas mitocondrias no son activas no tienen capacidad de reducir el colorante utilizando, así, la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán como indicador de la actividad mitocondrial y, por tanto, de viabilidad celular. El resultado del método se expresa como porcentaje de viabilidad celular respecto al control (Mosmann, 1983).

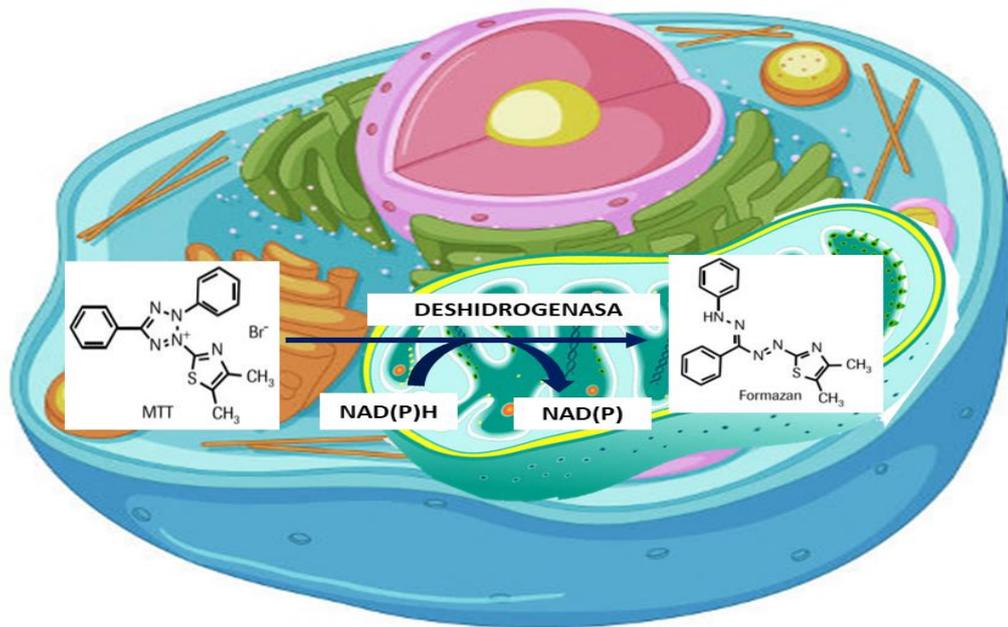


Figura 4.4. Representación celular en que se muestra como el reactivo MTT, por acción de las deshidrogenasas mitocondriales, es convertido en formazán.

2.2.1.2. Descripción del método

Utilizando una cámara de Neubauer para el conteo de las células, y en placas de cultivo estériles de 96 pocillos, se sembraron 5×10^3 células/pocillo en un volumen final de 200 μL de medio RPMIc por pocillo, se esperó a que llegaran a semiconfluencia del 70% y se dispensaron 200 μL /pocillo de diferentes tratamientos con distintas concentraciones de Suero Fetal Bovino (FBS; F6178-Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) y Glucosa (G7021-Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) que se detallan más adelante en los apartados 2.2.2. y 2.2.3.

Al finalizar los tratamientos, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 200 μL de la solución de trabajo de MTT (dilución 1:10 del reactivo MTT en RPMI), volviéndose a introducir la placa en el incubador. A las 4 h, se retiró la solución de MTT, se añadieron a cada pocillo 100 μl de DMSO (D4540-Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) y se agitaron las placas durante 30 seg para disolver completamente los cristales de formazán. Se midieron las absorbancias de los pocillos en un lector de placas (VersaMax, Molecular Devices, San José, California, USA) a 570 nm frente a 630 nm a 37°C (Figura 4.5.).

El resultado del método se expresa como porcentaje de viabilidad celular respecto al control.

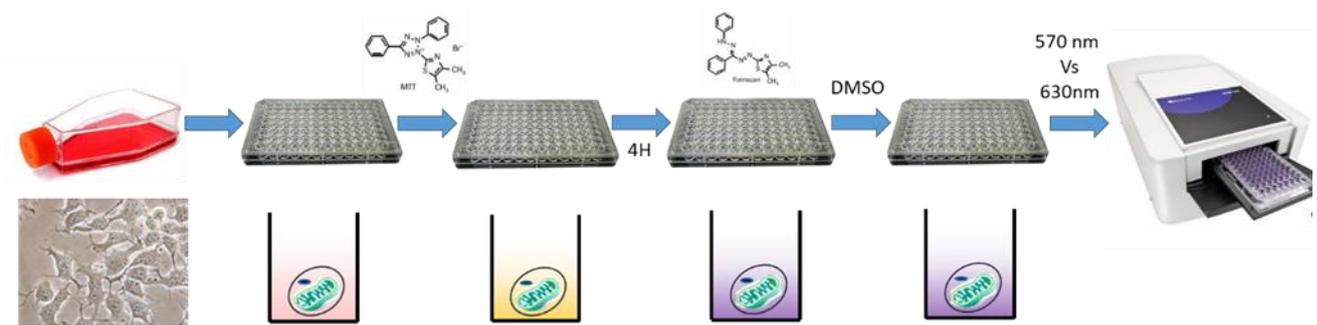


Figura 4.5. Etapas del test del MTT para cuantificación de la actividad mitocondrial/viabilidad celular de las células en condiciones de sub o sobrenutrición.

2.2.2. Determinación de la concentración de suero fetal bovino en el medio de cultivo para el establecimiento de los modelos de sub y sobrenutrición “in vitro”

En condiciones normales, que llamaremos control (C), un medio de cultivo contiene un 10% de Suero Fetal Bovino (FBS). Para conseguir el modelo de subnutrición adecuado por modificación de la concentración de FBS, realizamos en primer lugar un screening de valoración de viabilidad celular mediante 4 test del MTT (dieciséis repeticiones) para los que se prepararon concentraciones de 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, y 5% de FBS. El resultado del screening permitió reducir los grupos de tratamientos.

Por otra parte, para conseguir el modelo de sobrenutrición, se seleccionó un medio de cultivo con una concentración de un 45% de FBS en base al incremento de las calorías provenientes de la grasa que contiene la comida high fat (HF) que se les administra a los animales en el estudio in vivo (ver material y métodos capítulos 2).

En resumen, para valorar el efecto de las distintas condiciones experimentales en la viabilidad celular los tratamientos y tiempos experimentales fueron los siguientes:

Tratamiento 1 (TTO 1): 24h incubación

MEDIO CONTROL (C): 10% FBS

MEDIO DE SUBNUTRICION (U): 0,1-2,5% FBS

Tras 24 h, este medio se retiró y se dispensaron 200 μ L/pocillo del segundo tratamiento.

Tratamiento 2 (TTO 2): 48h incubación

MEDIO CONTROL (C): 10% FBS

MEDIO CONTROL NEGATIVO (C-): 0% FBS

MEDIO DE SUBNUTRICION (U): 0,1-2,5% FBS

MEDIO DE SOBRENUTRICIÓN (OF): 45% FBS

Utilizaremos el término “realimentación” cuando el TTO 2 tenga una concentración de FBS superior a la del TTO 1: (C-OF), (U-C), (U-OF).

Los tratamientos se combinaron para intentar representar *in vitro* las condiciones experimentales llevadas a cabo en los estudios *in vivo* (Tabla 4.1.).

TTO 1 (24h) + TTO 2 (48h)				
4 repeticiones				
U-C	U-U	U-OF	C	C-
0,1%FBS + 10%FBS	0,1%FBS + 0,1%FBS	0,1%FBS + 45 % FBS	10% FBS + 10% FBS	0% FBS + 0% FBS
0,5%FBS + 10%FBS	0,5%FBS + 0,5%FBS	0,5%FBS + 45 % FBS		
2,5%FBS + 10%FBS	2,5%FBS + 2,5%FBS	2,5%FBS + 45 % FBS		

Tabla 4.1. Diseño de las placas para el Test del MTT. TTO 1 (24h incubación): C- (0% FBS), C (10% FBS) y U (0,1-2,5% FBS) + **TTO 2: Resultado en negrita** (48h incubación): (0,1-45% FBS).

2.2.3. Determinación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo para el establecimiento de los modelos de sub y sobrenutrición “in vitro”

Al igual que para el FBS, para determinar las concentraciones de glucosa que permitieran establecer las condiciones experimentales de subnutrición y sobrenutrición, se realizaron Test del MTT y se utilizaron concentraciones de glucosa en base a los estudios previos de Navrátilová et al. (2013) y con los mismos tiempos experimentales que en el caso del FBS.

Tratamiento 1 (TTO 1): 24h incubación

MEDIO CONTROL (C): 11 mM Glucosa.

MEDIO DE SUBNUTRICIÓN (U): 5 mM de Glucosa.

Tras 24h este tratamiento fue retirado, y 200 μ L del tratamiento 2 (TTO 2) fueron a\u00f1adidos en cada pocillo

Tratamiento 2 (TTO 2): 48h incubaci\u00f3n

MEDIO CONTROL (C): 11 mM Glucosa

MEDIO DE SUBNUTRICION (U): 5 mM Glucosa

MEDIO DE SOBRENUTRICI\u00d3N (OF): 16 mM Glucosa

Utilizaremos el t\u00e9rmino “realimentaci\u00f3n” cuando el TTO 2 tenga una concentraci\u00f3n de Glucosa superior a la del TTO 1 y con el siguiente esquema de placa (Tabla 4.2.).

TTO 1 (24h) + TTO 2 (48h)				
4 repeticiones				
U-C	U-U	U-OF	C	C-
5mM GLUCOSA + 11mM GLUCOSA	5mM GLUCOSA + 5mM GLUCOSA	5mM GLUCOSA + 16mM GLUCOSA	11mM GLUCOSA + 11mM GLUCOSA	0mM GLUCOSA + 0mM GLUCOSA

Tabla 4.2. Dise\u00f1o de las placas para Test MTT. TTO 1 (24h incubaci\u00f3n): C (11mM Glucosa) y U (5 mM Glucosa) + **TTO 2 (Resaltado en negrita)** (48h incubaci\u00f3n): U (5 mM Glucosa), C (11 mM Glucosa), OF (16 mM Glucosa).

Con los resultados obtenidos de los test del MTT se establecieron las siguientes condiciones experimentales de subnutrici\u00f3n y sobrenutrici\u00f3n (Tabla 4.3.).

MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO	[FBS]/Medio de Cultivo	[GLUCOSA]/ Medio de Cultivo
- CONTROL (C)	10 %	11 mM
- SUBNUTRICION (U)	0,5 %	5 mM
- SOBRENUTRICION (OF)	45%	16 mM

Tabla 4.3. Concentraciones de sub y sobrenutrici\u00f3n seg\u00fan concentraciones de FBS y Glucosa en el medio de cultivo.

Tras haber seleccionado, mediante este screening de viabilidad, las concentraciones de FBS y Glucosa, se establecieron las condiciones experimentales para los estudios de: a) determinaci\u00f3n de prote\u00ednas

totales y fraccionadas, b) estudio morfológico, c) realización del estudio de la expresión génica y d) estado funcional de las mitocondrias. Para estos estudios, y con el fin de conseguir una mejor correlación con el estudio *in vivo* (ver capítulo 3), se establecieron 48 h de incubación en el TTO 1 y 72h de incubación en el TTO 2. Además, para estas determinaciones, se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos, ya que tienen una superficie mayor y permiten tiempos más largos de incubación sin llegar a confluencia.

La correlación de las condiciones experimentales de los estudios *in vivo -in vitro* se muestra en la Tabla 4.4.

ESTUDIO IN VIVO GRUPOS según nutrición y periodo experimental (GESTACION-LACTANCIA + VIDA ADULTA)	ESTUDIO IN VITRO (células SHSY-5Y) GRUPOS según nutrición [Suero Fetal Bovino] y periodo experimental (TTO1 48h + TTO2 72h)	ESTUDIO IN VITRO (células SHSY-5Y) GRUPOS según nutrición [Glucosa] y periodo experimental (TTO1 48h + TTO2 72h)
SUBNUTRICION (SUB)	(0,5%FBS) + (0,5%FBS) U	(5mM GLUC) + (5mM GLUC) U
CONTROL (C)	(10%FBS) + (10%FBS) C	(11mM GLUC) + (11mM GLUC) C
SUBNUTRICION+SOBRENUTRICION (SUB-HF)	(0,5%FBS) + (45%FBS) U-OF	(5mM GLUC) + (16mM GLUC) U-OF
CONTROL+SOBRENUTRICION (C-HF)	(10%FBS) + (45%FBS) C-OF	(11mM GLUC) + (16mM GLUC) C-OF
SUBNUTRICION+CONTROL (SUB-Ad Lib)	(0,5%FBS) + (10%FBS) U-C	(5mM GLUC) + (11mM GLUC) U-C

Tabla 4.4. Se muestran los grupos experimentales *in vivo* **Control (C)**, **Subnutrición (SUB)**, **Sobrenutrición (HF)** y **sus combinaciones**, y su correlación con los grupos experimentales *in vitro* y las concentraciones de Suero Fetal Bovino y Glucosa que representan las situaciones de Control (C), Subnutrición (U); y Sobrenutrición (OF) ver capítulos 2 y 3.

2.3. Condiciones *in vitro* y obtención de muestras para la determinación de concentración de biomarcadores

Tras contar el número total de células (cámara de Neubauer), se sembraron 310.000 células en 4 mL de medio de cultivo en placas Petri de 35 mm de diámetro (4 replicados por tratamiento). Una vez

alcanzada la confluencia del 70%, se retiró el medio por aspiración y se realizaron los tratamientos. Para el tratamiento 1 se añadieron 4 mL del medio control C (10% FBS o 11 mM Glucosa), control negativo C- (0mM Glucosa) o medio de subnutrición U (0,5% FBS o 5 mM Glucosa). Las placas fueron incubadas durante 48 h, tras las cuales se retiró el medio de tratamiento por aspiración y se añadieron 4 mL del medio de tratamiento 2, pudiendo ser medio control C (10%FBS o 11 mM Glucosa), Control negativo C- (0 mM Glucosa), medio de subnutrición U (0,5% FBS o 5 mM Glucosa) o medio de sobrenutrición OF (45% FBS o 16 mM Glucosa). Las placas se incubaron durante 72 h, tras las cuales se recogió el sobrenadante y se añadieron 200 μ L de buffer de lisis (sacarosa 25 mM; EDTA 0,5 mM; Tris 10 mM, pH=7,4) por placa, se despegaron las células y se recogió el lisado celular.

Los sobrenadantes y lisados celulares fueron congelados a -80°C hasta su utilización. Los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de clusterina en su isoforma secretada(sCLU) por medio de un ELISA tipo sandwich comercial (kit de ELISA ERCLU- Thermo-Fischer Scientific, Frederick, MD, USA - ver material y métodos capítulo 2).

Los lisados celulares fueron fraccionados en fracción citosólica y fracción mitocondrial (isoformas citosólica y mitocondrial-psCLU) por centrifugaciones diferenciales (Lizárraga-Mollinedo *et al.*, 2013), para la posterior determinación de clusterina (CLU) intracelular y fumarato hidratasa (FH) por medio de Western Blot.

2.4. Inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas: Western Blot

Como se explicó en el capítulo 3, este método permite la separación, detección y cuantificación de las proteínas de una muestra. Estas son separadas por medio de una electroforesis a través de un gel de acrilamida/bisacrilamida cuyos poros retienen a las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente por un tampón Laemli (10% glicerol; 2% dodecil sulfato sódico-SDS; 5% β -mercapto-etanol y 0,01% azul de bromofenol en Tris 0,5 M, pH= 6,8), y ajustadas en el mismo a una concentración de 1 mg/ml tras la realización de la técnica del Bradford. La electroforesis se realizó usando unas cubetas para electroforesis de BioRad a un voltaje de 90V 15 min seguido de 150V hasta conseguir la completa separación. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Trasnblot-Turbo transfer Pack, de 0,2 μm de tamaño de poro, BioRad) en un equipo Transblot-Turbo Transfer System (BioRad), utilizando el protocolo de peso molecular mixto (2,5A, 25V, 7 min). Una vez

transferidas a la membrana, se bloquearon los poros de la misma para evitar uniones inespecíficas con una solución de bloqueo (compuesto por leche en polvo desnatada al 5%, en PBS con Tween 20 al 0,5%) durante 30 min, a los que siguieron cinco lavados de 5 min cada uno con la solución de lavado (compuesto por leche en polvo desnatada al 0,1%, en PBS con Tween 20 al 0,5%). Una vez realizados, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios correspondientes overnight a 4°C (anti clusterina-NBP1-68308 1:1000, Novusbio, Littleton, CO, USA; anti-FH-NBP1-47754, 1:1000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Una vez transcurrida esta incubación, se lavaron las membranas y se incubó con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa correspondientes (CLU: 1:5000 Anti-Rabbit; FH: 1:5000 Anti-Mouse; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se lavaron las membranas y se reveló empleando ECL luminol (ECL Prime Western Blotting Reagent, GE Healthcare, Amersham, UK) y el equipo ChemiDoc XRS+ (BioRad). Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-β-Actina 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) de la misma manera que los previamente descritos.

2.5. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas: ELISA

Se empleó la técnica de ELISA tipo Sandwich, descrita en profundidad en el capítulo 2, para la detección de clusterina en el sobrenadante de las células. Para ello se empleó el kit comercial EHCLU ThermoFischer Scientific (Frederick, MD, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.6. Estudio de la morfología celular

Para los estudios de morfología celular, se sembraron las células SH-SY5Y en placas de cultivo de 6 pocillos (300.000 células/pocillo) y se analizaron una vez transcurrido el periodo de tratamiento detallado en la tabla 4.4. Las células se analizaron con un microscopio óptico de campo luminoso (*Nikon Eclipse TS100*) utilizando un objetivo de 10X, y se tomaron fotografías con una cámara digital acoplada al microscopio (*Nikon Digital Sight*).

2.7. Estudio de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

2.7.1. Extracción del ARN

Para los estudios de expresión génica de clusterina y fumarato hidratasa, las células SH-SY5Y se sembraron en placas de cultivo de 35 mm (300.000 células/placa). Después del periodo de incubación con los tratamientos anteriormente descritos en la Tabla 4.4., las células se lavaron con tampón PBS 1X y se procedió a la extracción del ARN usando Trizol. Se añadieron 500 μ L de Trizol a cada placa y las células fueron resuspendidas por pipeteo. El contenido de cada placa se transfirió a un eppendorf estéril (ADNasas- y ARNasas-free) y se añadió a cada uno una quinta parte del volumen de trizol de cloroformo frío (100 μ l). Los eppendorfs se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 15 min, obteniéndose 3 fases. La fase superior, fase acuosa, fue transferida a nuevos eppendorfs y las otras dos fueron eliminadas. Para eliminar las sales quelantes y precipitar el ARN, se añadieron 250 μ L de isopropanol frío y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C 10 min, y el sobrenadante resultante se eliminó. Volvió a realizarse el mismo proceso añadiendo otros 250 μ L de isopropanol y centrifugando los eppendorfs a 12000 rpm a 4°C durante 2 min. De nuevo se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó añadiendo 250 μ L de EtOH al 70% frío y se centrifugó a 12000 rpm a 4°C 10 min. El sobrenadante se eliminó y el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente un máximo de 30 min. Una vez transcurridos, se resuspendió el pellet en 30 μ L de agua estéril libre de nucleasas. La cantidad de ARN de cada muestra se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Schientific) a 260 nm, usando agua estéril libre de nucleasas como blanco. La pureza del ARN se controló mediante la relación de absorbancia a 260/280 y 260/230 nm.

2.7.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción del ARN se realizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 500-750 ng de ARN para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, usando la mezcla de reactivos descrita en la Tabla 4.5. El protocolo para la síntesis de ADNc usando la retrotranscriptasa MultiScribe™ del mencionado kit fue el siguiente: desnaturalización del primer (25°C, 10 min), síntesis del ADNc (37°C, 120 min), inhibición de la retrotranscriptasas (85°C, 5 min), fin de la reacción (4°C, ∞).

Componente	Volumen
10x RT Buffer	2,0 μ L
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 μ L
10x RT Primers	2,0 μ L
Retrotranscriptasa MultiScribe™	1,0 μ L
H ₂ O libre de nucleasas	4,2 μ L
Total por reacción	10 μ L

Tabla 4.5. Master mix para la retrotranscripción.

2.7.3. Amplificación y cuantificación génica

Para llevar a cabo la amplificación y posterior cuantificación de la expresión génica de clusterina y fumarato hidratasa, utilizando β -actina como gen de referencia endógeno, se diseñaron las siguientes sondas:

CLU2 for: 5'-GAT CTT GTC TGT GGA CTG TTC C -3'

CLU2 rev: 5'-GGA CTT TAG CAG CTC GTT GTA T-3'

FH1 for: 5'-CAAG CCA GAG CTC AAA TGA TAC T-3'

FH1 rev: 5'-CAT GTA ACT TCT GTA GTC CTG GTA A-3'

β -Actina for; 5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT G-3'

β -Actina rev: 5'-CTC AGG AGG AGC AAT GAT CTT GAT-3'

Para optimizar esta fase, se utilizaron diferentes concentraciones de cada primer (5 μ M y 10 μ M), junto con una curva estándar de ADNc a distintas concentraciones: 5 ng/ μ L; 2,5 ng/ μ L; 1,25 ng/ μ L; 0,625 ng/ μ L; 0,312 ng/ μ L; 0 ng/ μ L. Finalmente, se seleccionó como concentración óptima de los primers 5 μ M en todos los casos.

Para llevar a cabo la qPCR (proceso de amplificación y detección del cDNA) se empleó la enzima SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, USA). Se cargaron por triplicado 2ng de ADNc, 9 μ L de agua destilada estéril libre de nucleasas, 10 μ L de enzima SYBR green, y 1 μ L de primer mix (forward y reverse, 5 μ M). A su vez se cargó como control negativo una muestra procedente de la retrotranscripción en la que no se había cargado enzima retrotranscriptasa, y como blanco únicamente agua destilada estéril libre de nucleasas. El protocolo utilizado fue el siguiente: desnaturalización y activación de la polimerasa (30 seg a 95°C), seguido de 35 a 40 ciclos alineamiento (5-15 seg a 95°C-98°C) y extensión (15 a 30 seg a 60°C).

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método Ct (Livak y Schmittgen, 2001), en que se emplea el ARNm de la β -actina y el ARN ribosomal 18s como control invariable o referencia endógena. El valor Ct es el ciclo umbral que indica el ciclo al que la mayoría del material amplificado llega a una cantidad de moléculas umbral fijada, calculada y dividida por la reacción endógena mencionada.

2.8. Estudio de la funcionalidad mitocondrial: Mitotracker

El ensayo del mitotracker permite evaluar la funcionalidad de las mitocondrias, analizando la cadena de transporte de electrones. Se basa en la cuantificación de la fluorescencia derivada de la conversión del compuesto JC-1 excitado y reducido. El fluorocromo JC-1 tiene una carga positiva dispersada por toda su estructura, y fluoresce de color verde. Por su solubilidad lipófila es capaz de penetrar a través de la membrana de las células vivas. Cuando penetra dentro de las mitocondrias cargadas negativamente, se acumula, reduce y fluoresce rojo por excitación que la molécula sufre. Así, se produce un viraje de color verde a rojo, de manera que a mayor coloración roja, mayor actividad y funcionalidad mitocondrial (Debure *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo los estudios de funcionalidad mitocondrial, las células fueron sembradas en placas de 35 mm, de igual manera que para la realización de los ensayos del MTT y de análisis de imagen.

Para realizar el ensayo de mitotracker se utilizó el kit MitoPT® JC-1 assay kit (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN, U.S.A.). Tras el período de incubación con los tratamientos correspondientes, las células se transfirieron a eppendorfs y se centrifugaron a <300 g 5 min. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 0,5 mL de la solución de JC-1 previamente diluida siguiendo las instrucciones del fabricante y se resuspendió el pellet. Las células se incubaron con esta solución durante 10-15 min a 37°C protegidas de la luz, tras los cuales se centrifugaron a <300g 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron usando el tampón del kit para eliminar el exceso de solución de trabajo y se volvieron a centrifugar 5 min a <300 g. Se añadieron 0,5 mL de tampón proporcionado por el kit conteniendo un 0,5% de BSA, y se resuspendió el *pellet*. Se dispusieron 50-100 μ L de la solución en un portaobjetos y se observó empleando un microscopio de fluorescencia (Leica) a 490nm y 570nm.

Además, 100 µL de la suspensión de las células fueron añadidos a unas placas de cultivos de 96 pocillos, empleando 7 repeticiones. Se leyó la placa usando un lector de placas Varioskan Flash (Thermo Scientific) a 488-490 nm como longitud de onda de excitación y a 590-600 nm como longitud de onda de emisión, así como a la inversa.

Se emplearon un control positivo y un control negativo en ambos ensayos, tanto el de microscopía como el de cuantificación de la excitabilidad y potencial de membrana. El control positivo se realizó induciendo una despolarización en las mitocondrias, reduciendo el potencial de membrana, incubándolas 75 min con el compuesto CCCP ([3-clorofenil)hidrazono]malonitrilo) suministrado por el kit. El control negativo consistió en mitocondrias no expuestas a las condiciones experimentales y a las que se les añadió DMSO.

2.9. Análisis estadístico

En el conjunto de los experimentos, se obtuvo la media y el error estándar de los datos de cada columna de resultados y se expresó como porcentaje con respecto a la media de la columna control (100%), lo que permitió tratarlos conjuntamente.

El análisis estadístico de todas las determinaciones se realizó mediante ANOVA de 1 vía seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples usando el programa estadístico GraphPad Prism 7. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias cuando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Establecimiento del modelo de sub y sobrenutrición según concentración de FBS en el medio de cultivo

Debido a la novedad de este modelo, y con el fin de determinar las concentraciones óptimas para la realización de la sub-sobrenutrición *in vitro* en base a la concentración de Suero Fetal Bovino (FBS) en el medio de cultivo, se realizó un primer test de MTT a modo de *screening* en el que, como se describe

en el apartado de material y métodos de este capítulo, se probaron diferentes concentraciones de FBS teniendo como referencia la del 10% como control (C).

Hemos comprobado (Figura 4.6.) cómo al incubar las células con medio de cultivo sin FBS (C-) se produce una drástica disminución de la actividad mitocondrial y por tanto de la viabilidad celular. Esta disminución, estadísticamente significativa, respecto al control (C), también se observa cuando las células sufren subnutrición continua, TTO1 (24h) + TTO2 (48h) y con las concentraciones (0,5% + 0,5% y 0,1% + 0,1%), es decir solo cuando la concentración de FBS del medio de cultivo era igual o menor al 0,5%, por lo que se descartaron concentraciones superiores para establecer el modelo de subnutrición.

Por otra parte, los tratamientos posteriores en los que las células sometidas a subnutrición de 0,1% y 0,5% de FBS se realimentaron, es decir cuando la concentración de FBS del tratamiento 2 era superior a la del tratamiento 1, (0,1% + C; 0,1% + 45%; 0,5% + C; 0,5% + 45%) revirtieron esta disminución de la viabilidad celular, por lo que se podría deducir que en este modelo, el efecto de una subnutrición de 24h puede ser revertida si hay una realimentación posterior, y que posiblemente sería necesaria una subnutrición previa, más prolongada para producir finalmente un descenso de la viabilidad celular.

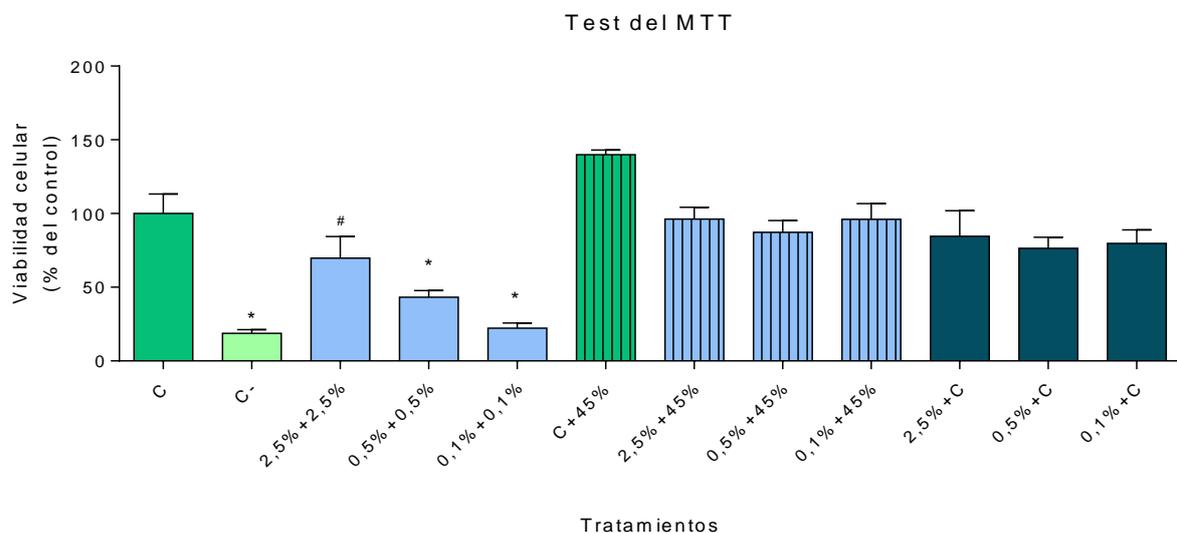


Figura 4.6. Efecto de la sub o sobrenutridas con FBS en la viabilidad celular. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U (0,5% + 0,5%; 0,1% + 0,1%); # $p < 0,05$ vs C-.

A partir de los resultados de este *screening* se decidió seleccionar la concentración de 0,5% FBS como modelo de subnutrición (U), y de 45% FBS como modelo de sobrenutrición (OF), para la realización de los estudios posteriores.

3.1.1. Estudio de la morfología celular

Como se ha descrito con anterioridad, la clusterina es una proteína implicada en numerosas funciones celulares, entre las cuales se incluyen el control de la supervivencia y muerte celular y la interacción célula-célula. Modificaciones de esta proteína podrían implicar alteraciones de estas funciones, y por tanto cambios en el crecimiento y en la morfología celular, y por ello se llevó a cabo un estudio morfológico mediante microscopía óptica de la línea celular SH-SY5Y en respuesta a la modificación de la concentración del FBS en el medio de cultivo. Las células fueron analizadas tras los TTO1 (48h) y TTO2 (72h) con concentraciones control (C) (10% FBS), subnutrición (U) (0,5% FBS) y sobrenutrición (OF) (45% FBS). En todas las condiciones estudiadas, se observó que las células SH-SY5Y mantenían su morfología neuronal y su condición de células adherentes. En aquellas circunstancias en las que se disminuyó hasta el 0,5% el porcentaje de FBS del medio de cultivo de forma continua (TTO1 + TTO2), es destacable señalar que las células mostraron una mayor diferenciación celular, caracterizada por prolongaciones celulares más largas y finas, similares a neuritas (Figura 4.7.-B), apreciándose una disminución de tamaño celular. En aquellas condiciones en las que las células fueron realimentadas con medio de cultivo enriquecido con un 45% de FBS se observó una aparente mayor densidad celular (Figura 4.7.-C y D).

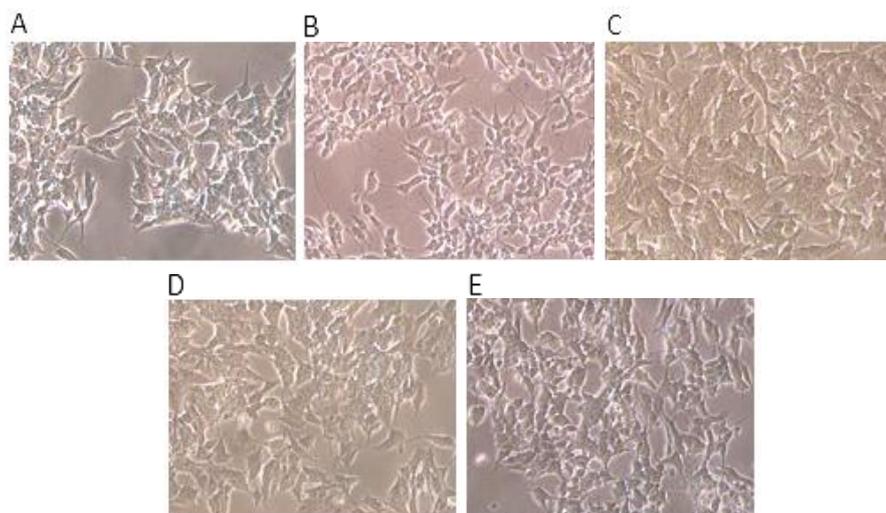


Figura 4.7. Células SH-SY5Y tras incubación con concentraciones variables de FBS: TTO1 (48h) + TTO2 (72h): A) C (10% + 10%); B) U (0,5% + 0,5%); C) C-OF (10% + 45%); D) U-OF (0,5% + 45%); E) U-C (0,5% + 10%). (10X)

3.1.2. Determinación de biomarcadores

3.1.2.1. Clusterina

En cuanto a la concentración intracelular total de clusterina, determinada por medio de Western Blot, se comprobó que no había diferencias significativas entre tratamientos en la expresión de esta proteína en el cultivo celular. Sin embargo, al fraccionar las células se observó un aumento de la clusterina citosólica en el grupo experimental de las células subnutridas (U) frente al control (C), acompañado de una disminución de la clusterina mitocondrial en este mismo grupo, lo cual apunta a una traslocación intracelular de la proteína.

En el resto de los grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas frente al control (C) en ninguna de las dos fracciones.

Por otra parte, se observa una disminución significativa en la clusterina en la fracción citosólica en el grupo U-C frente al grupo de células subnutridas (U) lo que no sucede en la fracción mitocondrial. Respecto al grupo U-OF la clusterina de la fracción mitocondrial se encuentra aumentada en el límite de la significación ($p=0,054$) con respecto al grupo U, mientras que en la fracción citosólica se encuentra disminuida rozando también la significación ($p=0,055$) (Figura 4.8.).

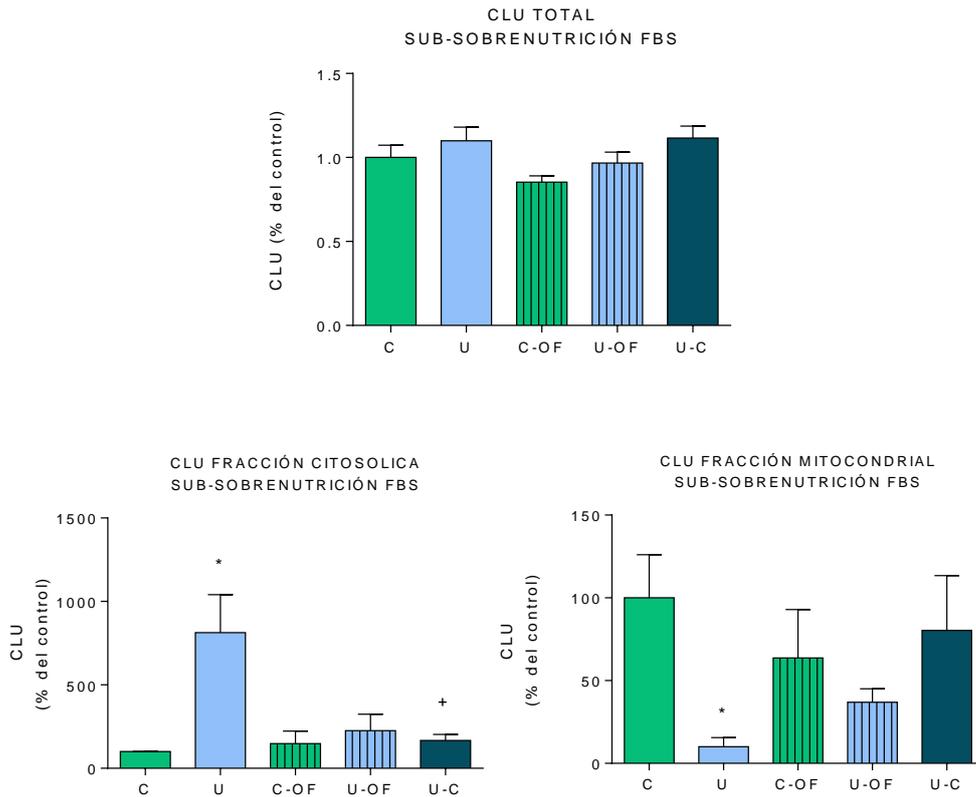


Figura 4.8. Concentración de clusterina total y en las fracciones citosólica y mitocondrial de las células sub o sobrenutridas con FBS. Las barras representan el % de contenido de clusterina con respecto al control. * $p < 0,05$ vs C, + $p < 0,05$ vs U.

En cuanto a la concentración extracelular de clusterina, medida en el sobrenadante del medio de cultivo mediante la técnica ELISA, se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo de las células subnutridas (U) frente al control (C) y a los grupos en los que las células fueron realimentadas tras una subnutrición (U-C y U-OF) (Figura 4.9.).

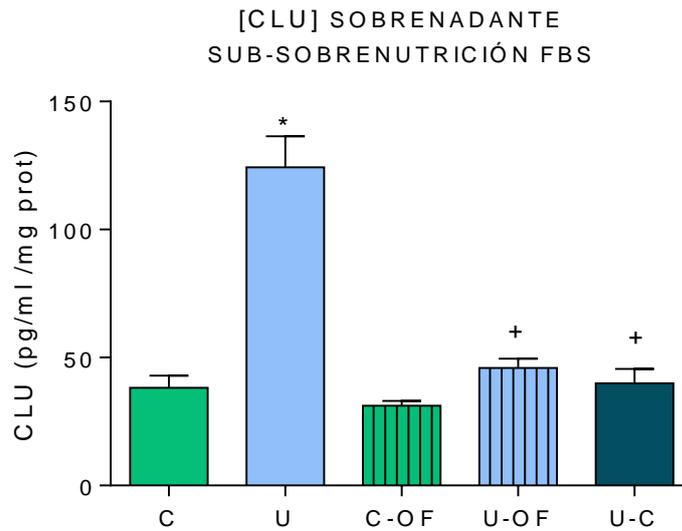


Figura 4.9. Concentración de clusterina en el sobrenadante de las células sub o sobrenutridas con FBS. Las barras representan la concentración de clusterina en pg/ml por mg de proteína total. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U.

3.1.2.2. Modificaciones en la expresión génica de clusterina

La expresión del gen de la clusterina tiende a estar disminuida en las células subnutridas de forma continuada (U), y no parece modificarse al realimentar estas células con un medio control (U-C). Contrariamente, al realimentar las células subnutridas con un medio de sobrenutrición (U-O-F), se produce un aumento significativo de la expresión génica frente al grupo subnutrido (U) y frente al grupo realimentado con medio control (U-C) (Figura 4.10.).

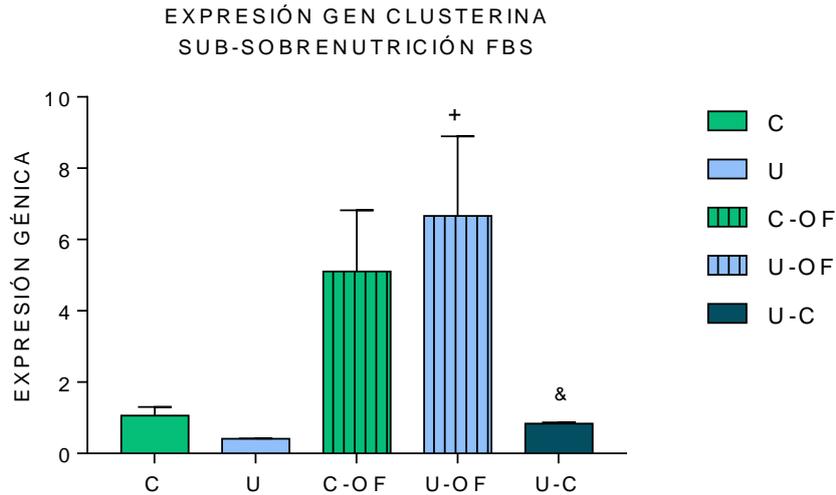


Figura 4.10. Expresión génica de clusterina. Se representa la expresión génica corregida por la expresión del gen de la β -actina. + $p < 0,05$ vs U; & $p < 0,05$ vs U-OF

3.1.2.3. Fumarato hidratasa

La concentración mitocondrial de fumarato hidratasa (FH), no mostró variaciones en los grupos experimentales respecto al grupo control, mientras que la concentración citosólica de FH disminuyó de forma significativa tras el tratamiento de sobrealimentación (OF) tanto en el caso de haber sido tratadas previamente con una dieta control (C-OF) como con una dieta de subnutrición (U-OF) (Figura 4.11.).

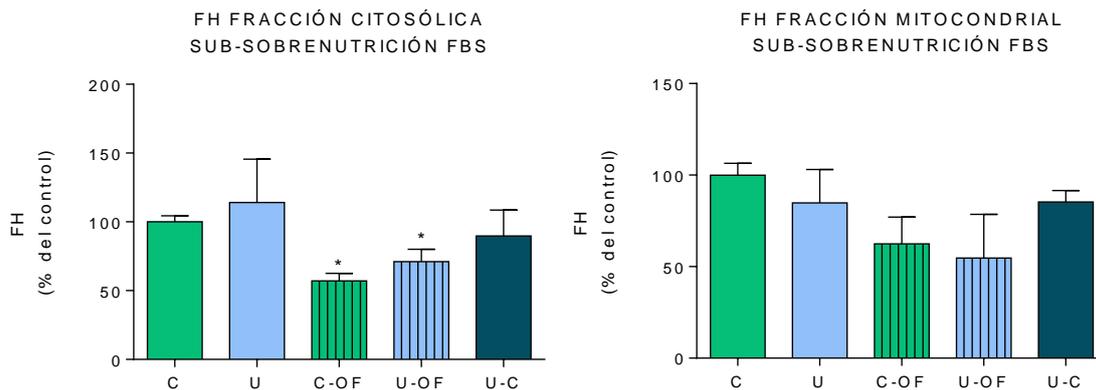


Figura 4.11. Concentración de fumarato hidratasa en las fracciones citosólica y mitocondrial de las células sub o sobrenutridas con FBS. Las barras representan el % de contenido de FH con respecto al control. * $p < 0,05$ vs C.

3.1.2.4. Modificaciones en la expresión génica de fumarato hidratasa

No se observa ninguna modificación en la expresión génica del fumarato hidratasa al sub o sobrenutrir las células con FBS (Figura 4.12.).

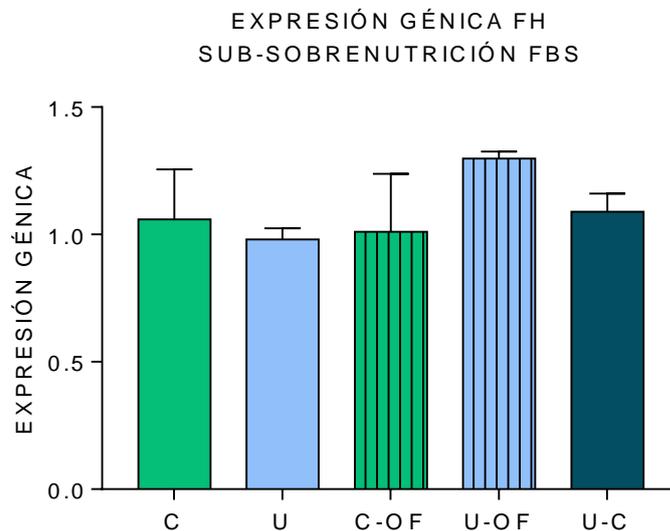


Figura 4.12. Expresión génica de fumarato hidratasa. Se representa la expresión génica corregida por la expresión del gen de la β -actina.

A la vista de los presentes resultados, en que se produce una traslocación de la clusterina desde la fracción mitocondrial hacia el citosol al subnutrir las células (U), y una traslocación opuesta de la proteína al realimentar las células con una sobrenutrición (C-OF y U-OF), así como una tendencia a la disminución de la de la concentración de fumarato hidratasa en la fracción citosólica en estos dos últimos grupos, realizamos el ensayo del MTT a los mismos tiempos (TTO1: 48h y TTO2: 72h) en los que se observaban estas modificaciones en el contenido de estas proteínas, para comprobar si se producían variaciones en la viabilidad celular.

3.1.3. Repercusión de las modificaciones en FH y CLU en la viabilidad celular

Se observa como las traslocaciones de las proteínas mencionadas anteriormente, se reflejan en una disminución significativa de la viabilidad celular (basándonos en la actividad mitocondrial) en el grupo de las células subnutridas continuamente (U). El haber sufrido una subnutrición causa una diferencia significativa frente a su grupo control en las células realimentadas con dieta de sobrenutrición,

produciéndose una disminución significativa en la viabilidad celular en las células del grupo U-OF frente a las del C-OF. Esta sobrenutrición no produce diferencias significativas en la actividad mitocondrial de las células C-OF y las del grupo control (C) (Figura 4.13.).

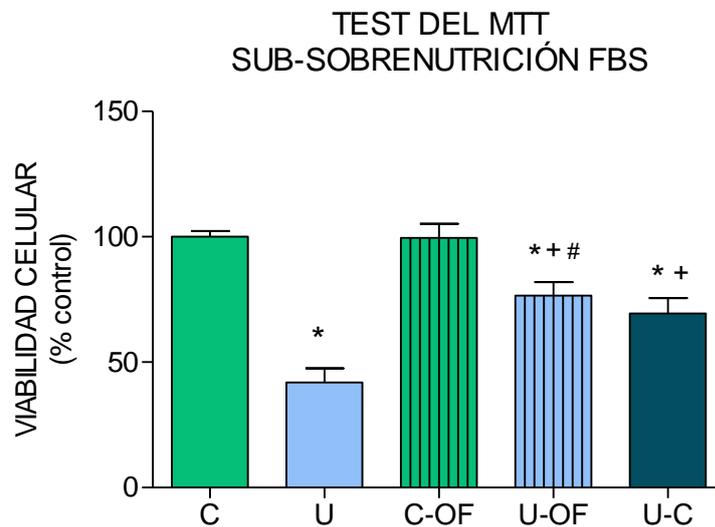


Figura 4.13. Viabilidad celular de las células tratadas con sub o sobrenutrición con FBS. Se representan los resultados como % del control. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U; # $p < 0,05$ vs C-OF.

3.1.4. Estudio de la funcionalidad mitocondrial: Mitotracker

Los resultados revelados por el test del MTT sobre la actividad mitocondrial podrían deberse a una disminución de su función o a una disminución del número de mitocondrias, de manera que realizamos el test el mitotracker para evaluar la funcionalidad de las mitocondrias a través de la medición del potencial de membrana de las mismas (Figura 4.14.).

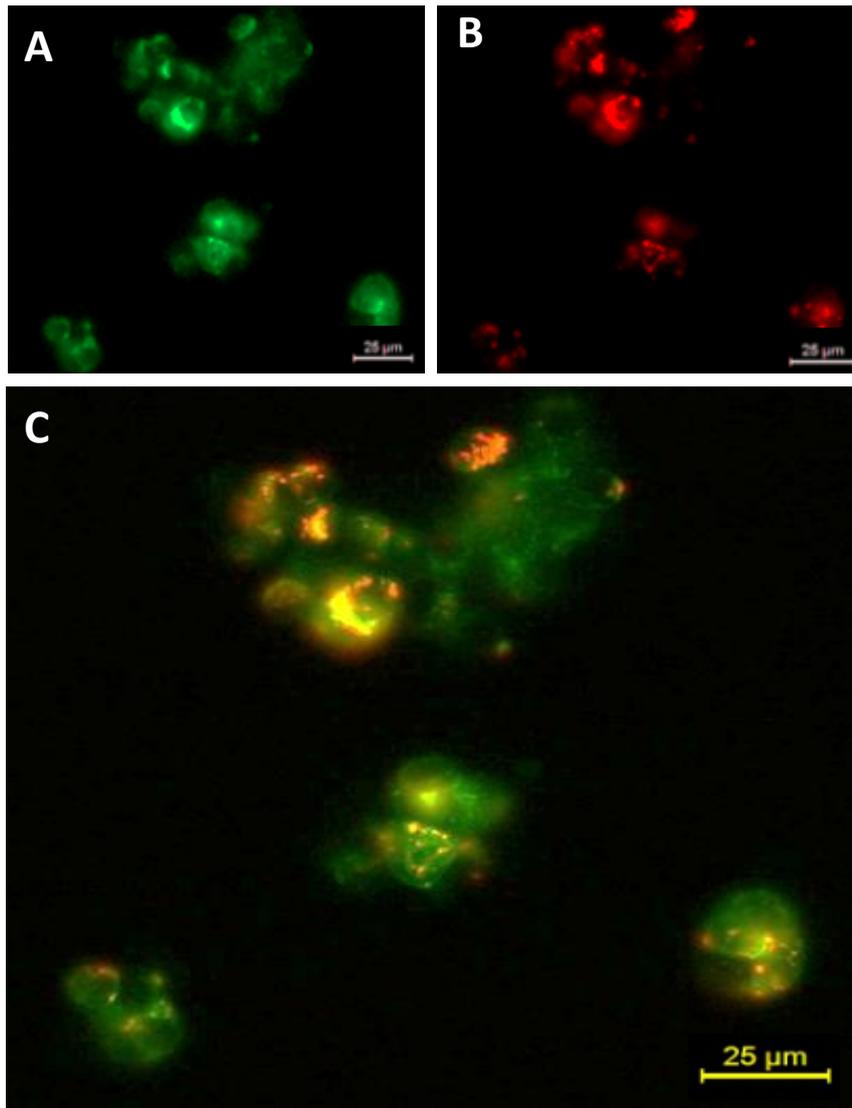


Figura 4.14. Imagen microscopia de fluorescencia de las células SHSY-5Y sub-sobrenutridas con FBS. Tinción de las mitocondrias con Mitotracker. A: $\lambda=527$ nm, mitocondrias totales; B: $\lambda=590$ nm, mitocondrias funcionales; C: fusión de ambas.

Mediante el análisis cuantitativo, comprobamos como la alteración de la nutrición modificando la concentración de FBS en el medio de cultivo, produce una disminución significativa de la funcionalidad mitocondrial, tanto si se trata de una subnutrición continuada (U), como si posteriormente se las realimenta con una dieta control (U-C) o de sobrenutrición (U-OF). Esta disminución de la actividad mitocondrial frente al grupo control también se observa en el grupo experimental C-OF (Figura 4.15.).

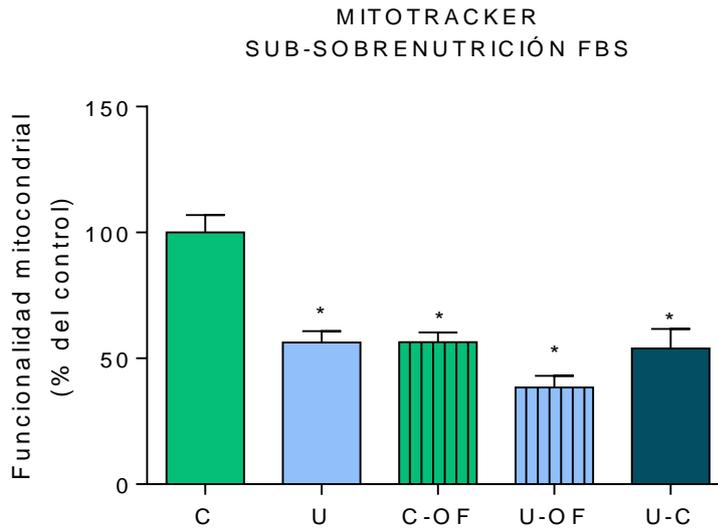


Figura 4.15. Funcionalidad mitocondrial en las células sub y sobrenutridas con FBS. Determinación realizada a través del test del Mitotracker. Se representa la funcionalidad mitocondrial expresada como % del control. * $p < 0,05$ vs C.

3.2. Resultados del modelo de sub y sobrenutrición según concentración de glucosa en el medio de cultivo

Se observa cómo únicamente el tratamiento con 0 mM de Glucosa (C-) produce una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular (Figura 4.16.).

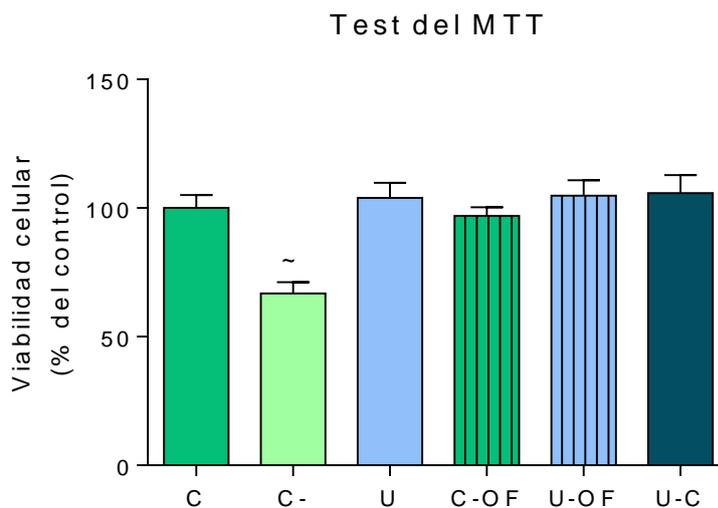


Figura 4.16. Efecto de la sub o sobrenutridas con Glucosa en la viabilidad celular. ~ $p < 0,05$ vs todos los grupos.

3.2.1. Estudio de la morfología celular

Por otra parte, el estudio de la morfología celular en la línea SH-SY5Y después de los tratamientos con distintas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo, demuestra una aparente disminución de la densidad celular en aquellas circunstancias en las que se incrementó la concentración de glucosa (16 mM) en el medio de cultivo (Figura 4.17.-C y D). Sin embargo, la reducción del contenido de glucosa en el medio de cultivo hasta 5mM no produjo diferencias observables en cuanto a la densidad celular, con respecto al grupo control (Figura 4.17.- A y B).

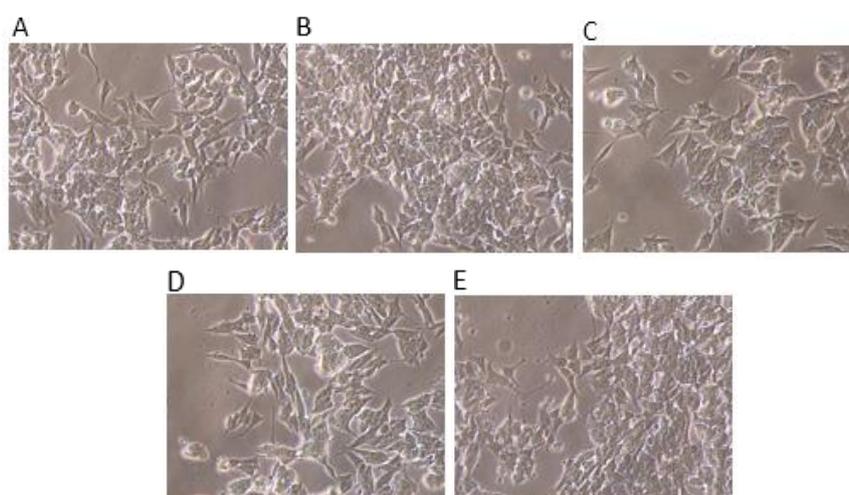


Figura 4.17. Imágenes representativas de Células SH-SY5Y tras incubación en concentraciones variables de Glucosa: TTO1 (48h) + TTO2 (72h): A) C (11 mM+11 mM); B) U (5 mM +5 mM); C) C-OF (11 mM + 16 mM); D) U-OF (5 mM + 16 mM); E) U-C (5 mM + 11 mM). (10X)

3.2.2. Resultados sobre la determinación de biomarcadores

3.2.2.1. Clusterina

Se observa como la concentración de clusterina en el interior celular total no se ve alterado por las condiciones de sub-sobrenutrición con glucosa, mientras que, al fraccionar las células, observamos como en ambas fracciones, mitocondrial y citosólica, se produce un incremento estadísticamente significativo en las células subnutridas de forma permanente (U). Este incremento es revertido en ambas fracciones al realimentar a las células con cualquiera de los dos tratamientos (U-OF o U-C) (Figura 4.18.).

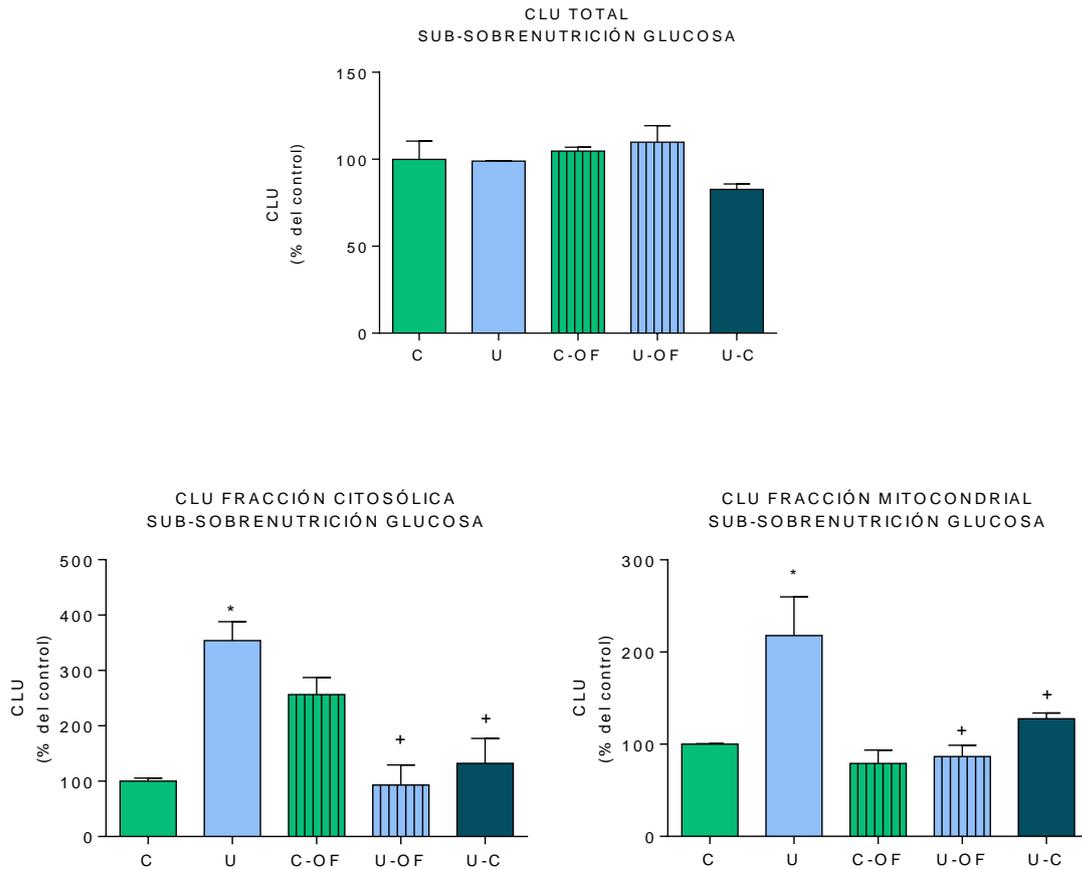


Figura 4.18. Concentración de clusterina total y en las fracciones citosólica y mitocondrial de las células sub o sobrenutridas con glucosa. Las barras representan el % de contenido de clusterina con respecto al control. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U.

En cuanto a la clusterina extracelular, se observa cómo la subnutrición continuada (U) produce una disminución de la concentración de la isoforma secretada, mientras que una realimentación ya sea con dieta control o de subnutrición (U-OF o U-C) produce un aumento estadísticamente significativo no sólo frente a las células subnutridas de forma continuada sino también frente al control. La realimentación con medio de sobrenutrición de las células control (C-OF) no parece modificar la secreción de clusterina al sobrenadante (Figura 4.19.).

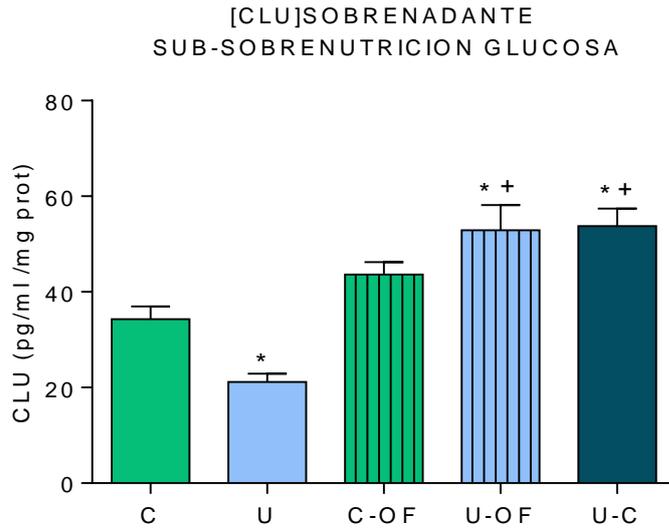


Figura 4.19. Concentración de clusterina en el sobrenadante de las células sub o sobrenutridas con Glucosa. Las barras representan la concentración de clusterina en pg/ml por mg de proteína total. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U.

3.2.2.2. Modificaciones en la expresión génica de clusterina

Al estudiar la expresión génica de clusterina bajo las condiciones experimentales de sub y sobrenutrición con Glucosa, se produce una tendencia al aumento de la expresión en las células subnutridas de forma continuada (U) que parece revertirse al realimentar a dichas células con cualquiera de los medios (U-OF o U-C).

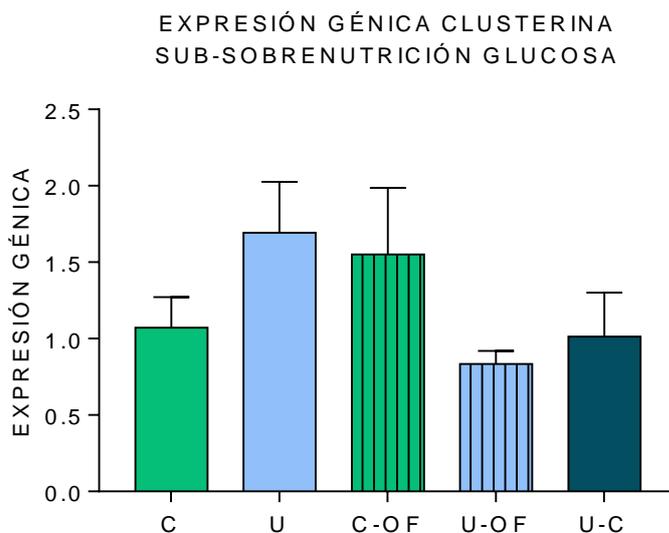


Figura 4.20. Expresión génica de clusterina tras el tratamiento de sub-sobrenutrición con glucosa. Se representa la expresión génica corregida por la expresión del gen de la β -actina.

3.2.2.3. Fumarato hidratasa

La concentración de fumarato hidratasa (FH) mitocondrial no se ve modificada por ninguno de los tratamientos en ninguna de las dos fracciones celulares.

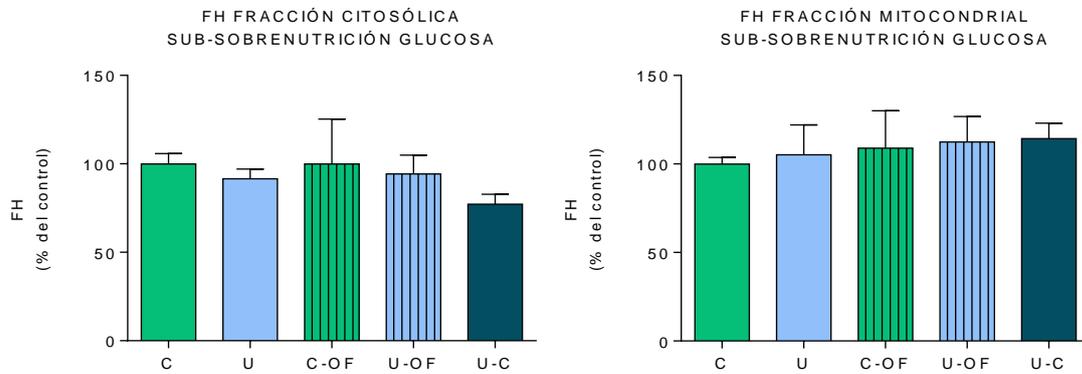


Figura 4.21. Concentración de fumarato hidratasa en las fracciones citosólica y mitocondrial de las células sub o sobrenutridas con Glucosa. Las barras representan el % de contenido de FH con respecto al control.

3.2.2.4. Modificaciones en la expresión génica de Fumarato Hidratasa

El tratamiento de las células con una sub-sobrenutrición de glucosa no produce diferencias significativas en la expresión génica de FH en ninguno de los tratamientos (Figura 4.22.).

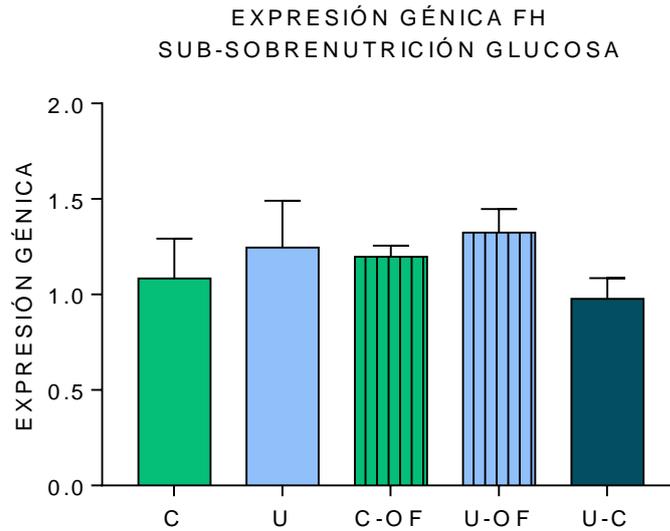


Figura 4.22. Expresión génica de fumarato hidratasa tras la sub-sobrenutrición con glucosa. Se representa la expresión génica corregida por la expresión del gen de la β -actina.

3.2.3. Ensayo de la viabilidad celular

Como ocurría con el tratamiento de sub y sobrenutrición con FBS, para averiguar la relevancia de las variaciones en la expresión proteica, de CLU y FH, en la viabilidad celular se realizó el test del MTT a los mismos tiempos a los que se efectuó la determinación proteica y génica. Como se observa en la Figura 4.23., la subnutrición continuada (U) produce una disminución de la viabilidad celular con respecto al grupo control (C). De igual forma, la subnutrición causa una disminución significativa en la viabilidad celular en las células posteriormente sobrealimentadas (U-OF) con respecto a las que fueron previamente tratadas con medio control (C-OF).

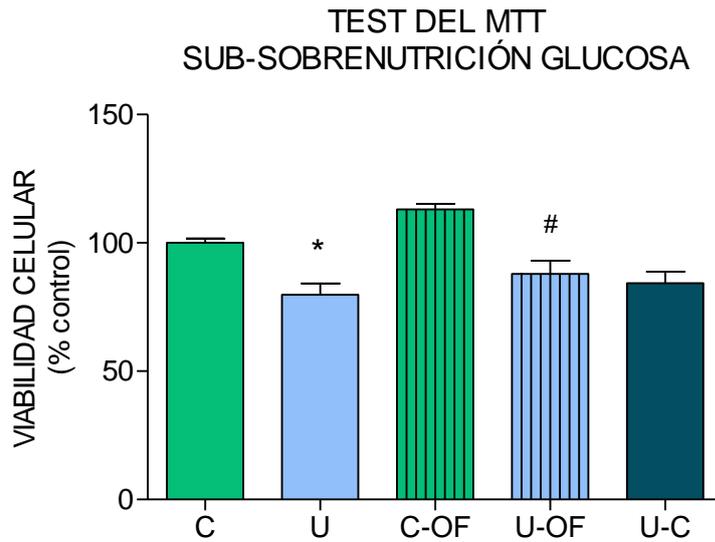


Figura 4.23. Efecto de la sub o sobrenutridas con Glucosa en la viabilidad celular. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs C-OF.

3.2.4. Estudio de la funcionalidad mitocondrial: Mitotracker

El test del mitotracker evalúa, como se ha mencionado previamente, la funcionalidad de las mitocondrias a través de la medición de su poder de reducción a través de la cadena de transporte de electrones.

En la figura 4.24. podemos observar una imagen representativa de las células empleando el microscopio de fluorescencia y el test del mitotracker.

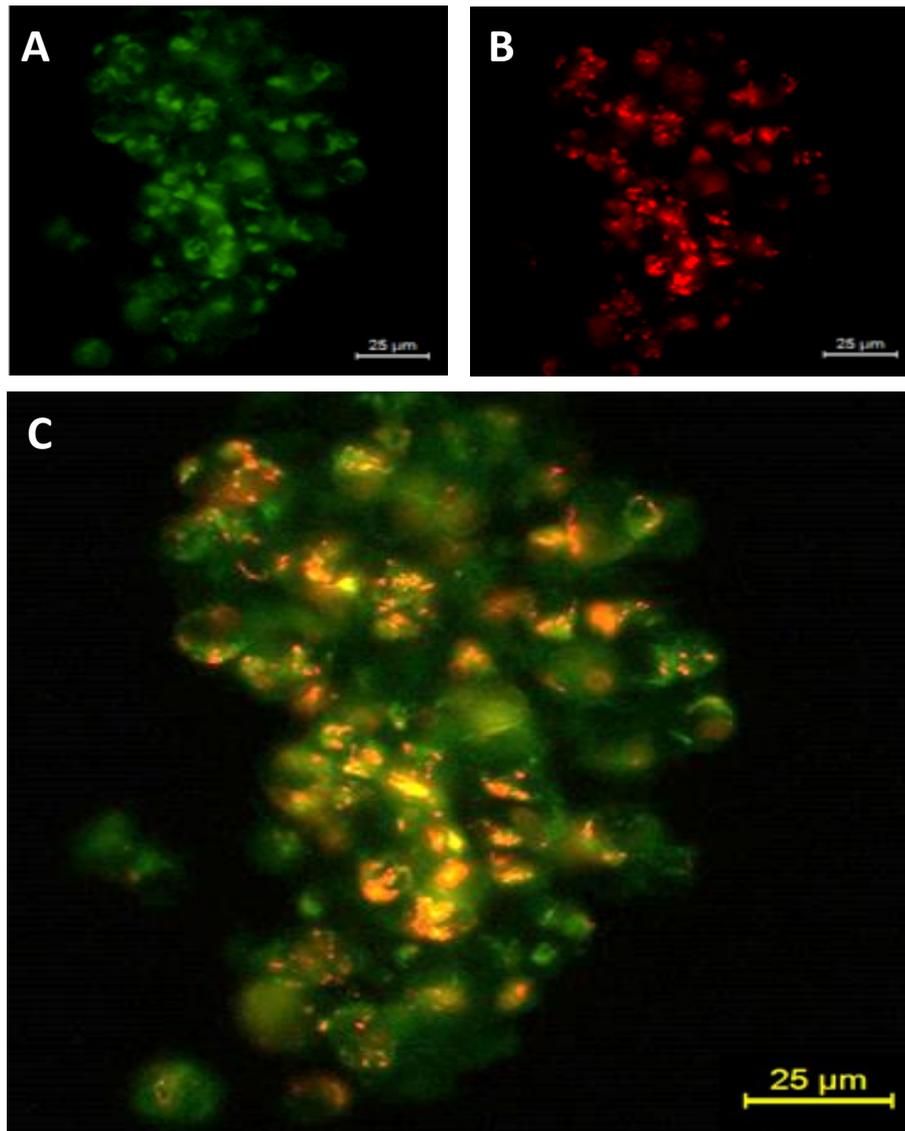


Figura 4.24. Imagen microscopia de fluorescencia de las células SHSY-5Y sub-sobrenutridas con Glucosa. Tinción de las mitocondrias con MitoTracker. A: $\lambda=527$ nm, mitocondrias totales; B: $\lambda=590$ nm, mitocondrias funcionales; C: fusión de ambas.

Así pues, observamos como ninguno de los tratamientos altera la funcionalidad mitocondrial de las células, a excepción del tratamiento de subnutrición seguido de una realimentación sobrenutricional (U-OF) en el que las mitocondrias son significativamente más funcionales, presentando un mayor potencial reductor y de membrana.

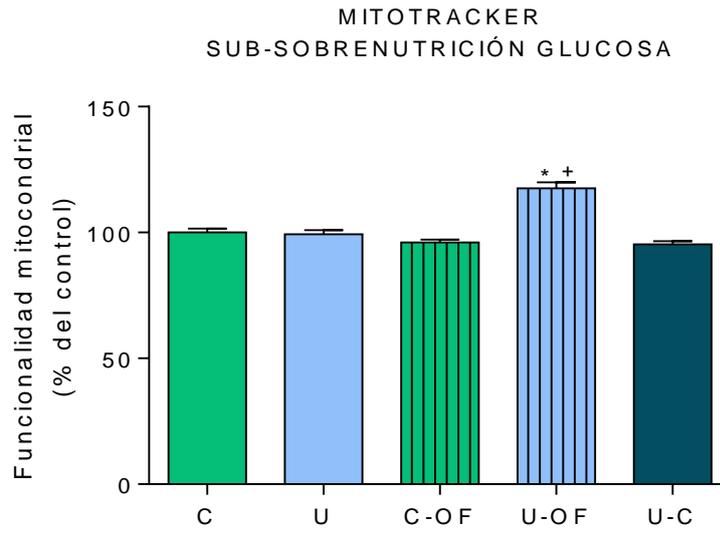


Figura 4.25. Funcionalidad mitocondrial en las células sub y sobrenutridas con glucosa. Estudio realizado con el test del mitotracker. Se representa la funcionalidad mitocondrial expresada como % del control. * $p < 0,05$ vs C; + $p < 0,05$ vs U.

4. DISCUSIÓN

El estudio morfológico de las células, revela cómo la subnutrición con Suero Fetal Bovino (FBS) causa diferenciación celular, lo que concuerda con los hallazgos descritos por Martins Lopes y colaboradores y Cheung y colaboradores en los que observaban, al tratar las células con un medio con menor concentración de FBS y suplementado con ácido retinoico, una mayor diferenciación neuronal caracterizada, como en nuestro estudio, por un crecimiento y adelgazamiento de las neuritas, (Martins Lopes et al., 2010; Cheung *et al.*, 2008). También de forma concordante con la bibliografía, nuestros resultados revelan que la sobrenutrición con FBS, causa un aparente aumento de la densidad celular (Cuétara-Bernal *et al.*, 2012). Contrariamente, la subnutrición con Glucosa no pareció afectar a las células ni en su densidad, ni en su diferenciación, posiblemente por la habilidad que pueden desarrollar las mismas de reducir su consumo de Glucosa para adaptarse a tal carencia (Boyle *et al.*, 1994; Fukui y Imagawa, 2014). Por otra parte, y al contrario que al aumentar la concentración de FBS, la sobrenutrición con glucosa pareció disminuir la densidad celular. De esta manera podemos decir que, en nuestro estudio morfológico, la subnutrición con FBS es la única condición experimental que modifica la morfología celular, mientras que el resto de las condiciones, parecen afectar a la proliferación de las mismas, fenómeno que en todo caso siempre hay que contrastar mediante estudios cuantitativos y funcionales como son los que hemos realizado utilizando el test del MTT y del Mitrotracker.

En cuanto a las variaciones de la expresión de las proteínas en estudio, en el caso de la clusterina, ninguno de los tratamientos de sub y sobrenutrición con FBS o Glucosa, provocan cambios en la expresión intracelular total de la proteína, lo cual puede explicarse por las traslocaciones que se producen de esta proteína entre las distintas fracciones celulares.

Podemos observar como la subnutrición mantenida con Glucosa causa un aumento significativo en la fracción citosólica y la mitocondrial de la clusterina presecretada (psCLU), mientras que se produce una disminución de la clusterina secretada (sCLU), lo cual podría deberse a la capacidad que las neuronas presentan de internalizar la clusterina del medio extracelular en situaciones de estrés celular comprobado *in vivo* (Han et al., 2001). Esta alteración en la concentración proteica también podría ser debida a la reducción que Grp78 sobreexpresado causa en la cantidad de clusterina secretada (sCLU), aumentando la psCLU y traslocandola a la mitocondria ante situaciones de estrés celular, como es la subnutrición (Li *et al.*, 2013). La clusterina traslocada a la mitocondria tendría una función anti-

apoptótica ya que impediría la oligomerización de Bax-Bak, que de producirse formaría poros en la membrana externa mitocondrial liberándose el citocromo c que una vez en el citosol se uniría a Asf para formar el apoptosoma que causaría la activación de caspasa 9, que activaría la caspasa 3 produciendo apoptosis (Zhang *et al.*, 2005; Vucetic *et al.*, 2010). A su vez, en el citoplasma, la psCLU se encontraría estabilizando al complejo Ku70-Bax, actuando nuevamente de forma anti-apoptótica (Trogakos *et al.*, 2009).

El aumento que hemos observado de clusterina en las fracciones mitocondrial y citosólica, son muy similares a lo observado en el capítulo 3, en el que describimos como la subnutrición mantenida en ratas causa un aumento significativo de la clusterina en la fracción mitocondrial, así como una tendencia al aumento en la fracción citosólica, en el núcleo accumbens (NAc), siendo las células de la línea SHSY-5Y muy similares a las neuronas de esta área cerebral. Estas alteraciones en la concentración proteica podrían ser interpretadas como un mecanismo de citoprotección de las células ante situaciones adversas, como es la subnutrición, ya que al realimentar a las células con un tratamiento control, de igual forma que ocurría en los animales al realimentarlos con una dieta estándar, este incremento revierte, es decir, al cesar el estrés, la concentración de la proteína retorna a la normalidad.

Cabe la posibilidad de que, al cesar la carencia de glucosa en el medio, la clusterina que parecía necesaria en el interior celular para garantizar la supervivencia ante la subnutrición, sea secretada para evitar la acumulación excesiva de la misma que podría producir citotoxicidad (Kang *et al.* 2013).

A su vez, no se observa ninguna diferencia en la clusterina secretada de las células sobrenutridas, resultado concordante con lo observado en los capítulos 1 y 2 de la presente Tesis Doctoral, en que la concentración de clusterina plasmática de los pacientes obesos mórbidos y de los ratones alimentados con dieta rica en grasa no mostraba diferencias frente al control.

Contrariamente a lo que describieron Navratilova y colaboradores (2013) y Halls y colaboradores (2016), nosotros observamos una disminución de la viabilidad celular en las células subnutridas (U) en el test del MTT, pero que no se ve reflejado en una disminución de la actividad mitocondrial de acuerdo con los resultados del test del Mitotracker, lo cual contradice los hallazgos de Debure y colaboradores

(2013). Teniendo en cuenta que en nuestras células subnutridas (U) se produce un aumento de clusterina en la fracción mitocondrial, podríamos decir que la acumulación de clusterina causaría una disminución del potencial de membrana de las mitocondrias, lo cual sería posible por la presencia de clusterina en tal orgánulo secuestrando a Bax.

Por otro lado, una sobrenutrición con glucosa no parece modificar las concentraciones de clusterina en las fracciones celulares ni de la proteína secretada. La viabilidad celular disminuye cuando se lleva a cabo la sobrenutrición tras una subnutrición previa (U-OF), observándose una disminución de la viabilidad en el test del MTT y un aumento de la actividad mitocondrial en el Mitotracker. Esto podría explicarse porque, aunque el aumento de la concentración de glucosa en el medio conlleva una disminución de la viabilidad celular, las neuronas que se mantienen vivas no necesitan continuar con los cambios adaptativos (Boyle *et al.*, 1994; Fukui y Imagawa, 2014) e incrementan su actividad mitocondrial, dado que disponen de suficiente nutriente para ello. Por otra parte, serían necesarios más ensayos de Mitotracker para confirmar esta hipótesis.

En lo que respecta a la sub y sobrenutrición con FBS, la disminución del suero en el medio o subnutrición (U), causa una disminución de la clusterina en la fracción mitocondrial, mientras que se produce un aumento de la misma tanto en la fracción citosólica como en la proteína secretada al medio. Esto concuerda con los hallazgos de Petropoulou y colaboradores, que mantienen que las células senescentes incrementan la clusterina secretada al medio (sCLU) que podría ser endocitada por las células supervivientes vecinas (Petropoulou *et al.*, 2001). Además, como mantienen, el estrés oxidativo causado por H₂O₂ también causaría un aumento significativo de la acumulación citosólica de clusterina. Las neuronas subnutridas durante todo el experimento (U), podrían estar experimentando procesos tanto de senescencia como de estrés celular por la ausencia del FBS, lo cual estaría reflejado en la disminución de la viabilidad celular observada en el test del MTT en tales células. Estas modificaciones de las concentraciones de clusterina podrían suponer un intento de las mismas de controlar las proteínas con plegamientos aberrantes a causa del estrés oxidativo, así como de establecer un sistema de control y limpieza de restos celulares (Petropoulou *et al.*, 2001).

Estos cambios producidos por una subnutrición en la expresión de clusterina son cambios reversibles, es decir, que es necesario que la subnutrición se mantenga para que las alteraciones proteicas lo hagan, puesto que al realimentar con cualquiera de las dietas estas alteraciones revierten al nivel del

control, de igual forma que sucede con los cambios observados en cuanto a la expresión proteica de esta proteína, en el núcleo accumbens, de las ratas realimentadas en el capítulo 3.

En lo que a la expresión génica se refiere, al haberse cuantificado tal expresión a los mismos tiempos que la determinación de las proteínas, no es posible establecer que los cambios inducidos por la sub o sobrenutrición en la expresión del material genético conlleve la modificación proteica observada. Para poder establecer tal relación sería necesario realizar la determinación proteica a un tiempo posterior. En cualquier caso, nuestras determinaciones indican que la expresión génica de la *clusterina* no presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se modifican la glucosa del medio de cultivo, aunque sí que se puede observar una tendencia a producirse un aumento en el grupo subnutrido (U) que revierte al realimentar con dieta control o de sobrenutrición (U-C o U-OF).

En cuanto a la expresión génica de *clusterina* en el modelo de sub y sobrenutrición con FBS, es necesario aclarar que existe controversia en cuanto a los efectos que los factores de crecimiento presentes en el suero fetal bovino pueden ocasionar en tal expresión. Por un lado hay autores que mantienen que el factor transformador de crecimiento beta (TGF- β) es capaz de reprimir la expresión del gen de la *clusterina* (Trogakos y Gonos, 2006), lo cual es contradictorio con nuestros hallazgos en que en las células subnutridas con FBS (U) se produce una tendencia a la disminución de la expresión génica, aunque no llega a ser significativa, mientras que cuando se sobrenutre, sobre todo tras una subnutrición (U-OF), se produce un aumento significativo de la expresión génica, apuntando a que los factores de crecimiento estarían potenciando la expresión de este gen, lo cual estaría apoyado por los hallazgos de Laping y colaboradores, que describen como en situaciones de lesión cerebral o Alzheimer, este factor induciría la expresión de proteínas de soporte como la tubulina y citoprotectoras como la clusterina en un intento de reorganizar el tejido insultado para su supervivencia (Laping et al. 1994).

La expresión proteica y génica de fumarato hidratasa no se ve modificada por la sub y sobrenutrición con glucosa, lo cual podría deberse a las adaptaciones que las células sufren al encontrarse en un medio carente de glucosa (Boyle *et al.*, 1994; Fukui y Imagawa, 2014).

Por otro lado, la subnutrición con FBS no modifica la expresión génica de FH, pero sí que altera la expresión de la proteína, únicamente en la fracción citosólica, donde causa una disminución de la misma cuando se sobrenutre a las células independientemente del tratamiento previo. Estos resultados concuerdan con lo descrito en el Capítulo 2 en que los animales alimentados con una dieta rica en grasa presentan un marcaje y un número de células positivas para FH menor que las células control. Esto podría achacarse a una posible hipoactivación que la dieta rica en grasa o sobrenutrición podría causar en las neuronas.

Así pues, se podría decir que independientemente de la carencia nutricional que las células presenten, la clusterina parece cambiar su localización y función para preservar la supervivencia celular, y que estos cambios son reversibles, de manera que podría decirse que se trata de traslocaciones adaptativas y no permanentes, sino únicamente se dan hasta que las condiciones aseguran la viabilidad celular.

CAPÍTULO 5

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA CONSTRICCIÓN CRÓNICA DEL NERVIO CIÁTICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLUSTERINA EN LA RATA

1. INTRODUCCIÓN

El dolor es un mecanismo de defensa, una señal de alarma al organismo para que se produzca una réplica en respuesta a un estímulo nocivo. En la periferia, este tipo de estímulos activa los nociceptores generando impulsos nociceptivos que llegan hasta el asta dorsal de la médula espinal a través de fibras A δ y C. Desde allí, los impulsos se transmiten por la vía ascendente del dolor hasta el tálamo y otras áreas y centros superiores del sistema nervioso central como la corteza somatosensorial (donde se llega a la comprensión de dónde se encuentra el origen de la nocicepción), el sistema límbico (donde se integra el estímulo y se modulan las emociones que rodean la sensación), o la corteza prefrontal, (donde la información nociceptiva pasa de ser una sensación a convertirse en una experiencia integrada a partir de la cual se generará la correspondiente respuesta). Desde centros superiores como la sustancia gris periacueductal, el núcleo magno de Rafe y el locus coeruleus parten vías descendentes que llegan hasta la médula y ejercen allí una influencia inhibitoria sobre la transmisión de los impulsos nociceptivos. Cuando el dolor se mantiene en el tiempo puede producirse una desproporcionalidad entre la sensación dolorosa y la magnitud de la nocicepción; este proceso resultante de la cronificación del proceso nociceptivo se conoce como sensibilización periférica y conlleva una amplificación del dolor consecuente al aumento de la estimulación de receptores a nivel de la médula espinal. Además, la sensibilización periférica suele ir acompañada de una sensibilización central en la que se produce la activación de receptores NMDA, que normalmente no se activan, lo que a su vez promueve la liberación de otras sustancias como NO que estimulan el nociceptor postsináptico amplificando en mayor medida el estímulo que llega a centros superiores del sistema nervioso central. Por otra parte, en estas circunstancias puede observarse también un mal funcionamiento de las vías descendentes moduladoras del dolor, lo que resulta en un predominio de las vías excitatorias (Goicoechea y Martin 2006).

El dolor neuropático resulta de una lesión o disfunción primaria del sistema nervioso. Existen numerosos procesos patológicos que cursan con este tipo de dolor, cuya fisiopatología y tratamiento están insuficientemente establecidos a pesar del sufrimiento y la incapacidad que frecuentemente padecen quienes lo sufren (Alles y Smith, 2018). Una de las numerosas aproximaciones que se ha venido aplicando para progresar en este conocimiento ha consistido en la búsqueda mediante técnicas ómicas de biomarcadores o dianas terapéuticas potenciales en diversas patologías que cursan con este tipo de dolor, lo que ha conducido en varias ocasiones a la identificación de clusterina como una proteína de interés. Este es el caso del estudio realizado por Zhu *et al.* (2011) en pacientes con

escoliosis degenerativa, una patología de la edad adulta en que aparecen curvas escolióticas en la columna vertebral después de que la maduración ósea haya finalizado y sin ningún debut previo. Se trata de una enfermedad muy incapacitante por el dolor lumbar o de las extremidades inferiores que conlleva, además de las disfunciones espinales y la osteoporosis asociadas. Los autores mencionados aplicaron proteómica de expresión diferencial para comparar los sueros de pacientes y controles, hallando una disminución significativa en la expresión de varias proteínas en el suero de los pacientes entre las que se encontraba clusterina. (Oh *et al.*, 2013) han publicado resultados análogos en un estudio similar sobre el síndrome del túnel carpiano, una afección que cursa con atrapamiento o pinzamiento del nervio mediano por compresión excesiva del ligamento carpiano transversal. El nervio mediano proporciona sensibilidad y movimiento al lado de la mano en que se encuentra el pulgar incluyendo la zona palmar, de forma que resulta en una patología muy dolorosa e incapacitante que puede cursar con hormigueo, inmovilidad y hasta daño muscular. Cuando se compararon los proteomas de los pacientes de este síndrome con los de controles sanos se observaron alteraciones en la expresión de 10 proteínas, entre las que cabe destacar una disminución significativa en la expresión de clusterina. Un tercer estudio realizado en pacientes con dolor neuropático periférico ha mostrado que clusterina podría estar también directamente relacionada con la respuesta terapéutica; en este trabajo se compararon los proteomas del líquido cefalorraquídeo de pacientes tratados mediante neuromodulación eléctrica de la médula espinal y de pacientes no tratados, encontrándose en los primeros un aumento de la concentración de clusterina que acompañaba a la reducción del dolor (Lind *et al.*, 2016).

Aunque los resultados anteriores relacionan claramente a la clusterina con el dolor neuropático, son insuficientes para poder establecer si se trata de una relación directa. En este sentido, si tenemos en cuenta la posible implicación de clusterina en los mecanismos cerebrales que regulan la motivación y la recompensa (sugerida en los capítulos anteriores de esta Tesis) existe la posibilidad de que los cambios en los niveles de clusterina estuviesen específicamente asociados a la disforia o la ansiedad que acompañan al dolor. En este trabajo hemos tratado de profundizar en este conocimiento mediante el estudio de los niveles plasmáticos y cerebrales de clusterina en un modelo experimental de dolor neuropático en el que valoramos no sólo la respuesta nociceptiva, sino también la ansiedad y el dolor de los animales. Además, estudiamos la posible influencia de una dieta rica en grasa sobre estas mismas variables ya que, como hemos demostrado en capítulos anteriores, este tipo de dieta modifica tanto los mecanismos motivacionales como la expresión cerebral de clusterina. Para este estudio escogimos la ligadura parcial del nervio ciático como estímulo que desencadena un dolor de tipo neuropático. Se trata de un procedimiento ampliamente utilizado en el que se produce un dolor

localizado en la extremidad afectada pero que por la inflamación subsecuente conlleva una sensibilización central estrechamente relacionada con la secreción de sustancias proinflamatorias.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (Charles River) con pesos comprendidos entre los 200 y 300 g. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y la legislación española para las buenas prácticas, cuidado y uso de animales de laboratorio (RD 1205/2005 y RD 53/2013).

2.2. Inducción de la neuropatía periférica por ligadura parcial del nervio ciático

La ligadura parcial del nervio ciático (CCI) es un modelo animal de neuropatía periférica limitada al miembro afectado, en la que se liberan mediadores inflamatorios desde las células inmunitarias y de la glía que originan el fenómeno de sensibilización central. Para llevar a cabo el procedimiento, las ratas fueron anestesiadas 30 min antes de la cirugía usando pentobarbital (50 mg/kg i.p.) y se empleó buprenorfina (0,05 mg/kg) en ese mismo momento para aliviar el dolor quirúrgico. Se expuso el nervio ciático izquierdo a la altura de la mitad del muslo, tras la disección entre el bíceps y el fémur. Cerca de la trifurcación del nervio ciático, este fue liberado del tejido adherente realizándose sobre él tres nudos espaciados por 1 mm entre ellos como se muestra en la figura 5.1.:

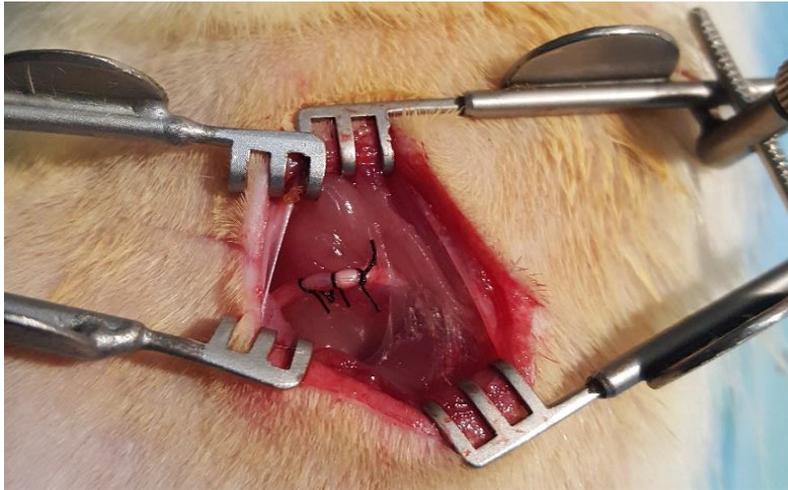


Figura 5.1. Ligadura parcial del nervio ciático.

Para realizar la ligadura, se empleó hilo 6/0 no reabsorbible, suficientemente anudado como para constreñir el nervio ralentizándolo, pero no impidiendo la circulación por los vasos epidurales superficiales. La incisión fue cerrada en capas. A los animales del grupo control se les practicó una cirugía idéntica con la excepción de la ligadura del nervio.

2.3. Evaluación de la alodinia mecánica: Test de Von Frey

Para evaluar la alodinia mecánica provocada por la ligadura del nervio se determinó el tiempo de latencia de retirada de la pata trasera ante la presión en la zona plantar con filamentos de Von Frey (0,9 – 60 g), utilizando la metodología previamente descrita (Fox *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2005, 2010). Los animales fueron colocados sobre un tamiz metálico elevado sobre la poyata del laboratorio como se muestra en la figura 5.2., con una cubeta superpuesta para restringir su deambulación y un espejo sobre la poyata para poder observar su comportamiento.

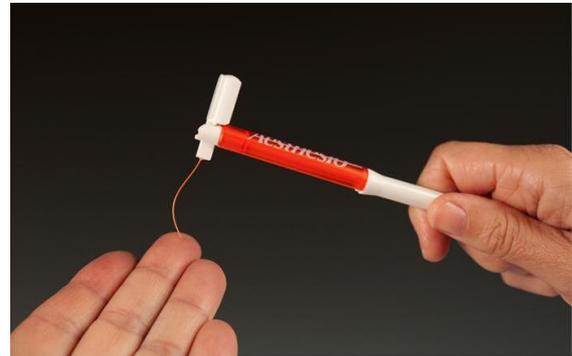


Figura 5.2. Equipo del Test de Von Frey.

Tras 15 min de habituación de los animales, se comenzó a aplicar el filamento de Von Frey de 8 g de manera perpendicular a la zona plantar las patas traseras (Figura 5.3.), utilizando una fuerza suficiente como para causar un leve arqueamiento del filamento que se mantuvo hasta obtener una respuesta positiva (elevación pronunciada de la pata o movimiento al retirar el filamento) o hasta un máximo de 2 seg.



Figura 5.3. Zona de aplicación de los filamentos de Von Frey.

Se repitió el proceso cinco veces con un intervalo de unos 10 seg entre cada aplicación, considerándose que se había alcanzado el umbral de dolor si al menos tres de las cinco aplicaciones se acompañaron de una respuesta positiva. Caso de no alcanzarse dicho umbral, se repetía el procedimiento con un filamento de presión superior, y así sucesivamente hasta alcanzarlo. En los animales sometidos a la ligadura del nervio se observó frecuentemente que el umbral de dolor estaba por debajo de 8 g, de forma que en estos casos se aplicaron filamentos de menor presión para determinar el umbral de respuesta.

2.4. Evaluación de la hiperalgesia térmica: *Plantar Test*

La hiperalgesia térmica provocada por la ligadura del nervio se cuantificó determinando el tiempo que el animal tardaba en retirar la pata trasera de un foco de luz caliente aplicado en la zona plantar media trasera (*plantar test*), siguiendo los métodos descritos previamente (Pascual *et al.*, 2005, 2010). Para ello se utilizó un equipo Ugo Basile. Brevemente, como se ilustra en la figura 5.4., se confinaron las ratas en un habitáculo de plástico con el suelo de cristal, a través del cual recibieron en la zona media plantar de las patas traseras un rayo de luz caliente emitida desde un foco inferior a una intensidad constante de 70 I.R. Cuando el animal elevaba la pata irradiada, se detenían automáticamente la emisión de la luz y el contador de tiempo, mostrando este último la latencia correspondiente. Se midió la latencia de respuesta tres veces con un intervalo de 5 min entre exposiciones, tomándose como tiempo de latencia final el valor medio de las tres medidas.



Figura 5.4. Equipo para la realización del *Plantar test*.

2.5. Evaluación de la ansiedad: laberinto elevado en cruz

El estado de estrés o ansiedad de los animales se evaluó siguiendo un protocolo utilizado habitualmente en nuestro laboratorio, en el que se determina la actividad exploratoria de los animales en los brazos abiertos de un laberinto elevado en cruz (Pérez-García et al., 1999). Para ello se utilizó un laberinto formado por dos brazos abiertos y dos cerrados elevado a un metro del suelo (Figura 5.5.). En esta situación, a mayor ansiedad los animales permanecen más tiempo en los brazos cerrados y exploran menos veces y menos tiempo los brazos abiertos. Para la realización de la prueba se colocaron los animales en el centro del laberinto, orientados siempre en la misma dirección, y se les dejó explorar libremente el mismo durante 5 min, cuantificándose el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en ellos.



Figura 5.5. Laberinto elevado en cruz.

2.6. Determinación de clusterina en cerebro

Para determinar los niveles de clusterina en fracciones subcelulares de distintas áreas cerebrales se utilizó una metodología análoga a la que se ha descrito en detalle en capítulos previos de esta Tesis

Doctoral. Brevemente, los tejidos se descongelaron y se homogeneizaron en 200 μ L de un tampón de lisis (sacarosa 25 mM; EDTA 0,5 mM; Tris 10 mM, pH=7,4) en un homogeneizador TissueLyser LT (Qiagen Iberia, Madrid, Spain; dos ciclos de 1 min a 50 oscilaciones/s). Con el fin de fraccionar el tejido, se centrifugó el homogenado a 2500 rpm (5 minutos a 4°C), el sobrenadante así obtenido, se sometió a una segunda centrifugación a 12700 rpm (5 minutos a 4°C), tras la cual quedaron separadas las fracciones mitocondrial (*pellet*) y citosólica (sobrenadante) (Figura 5.6.).

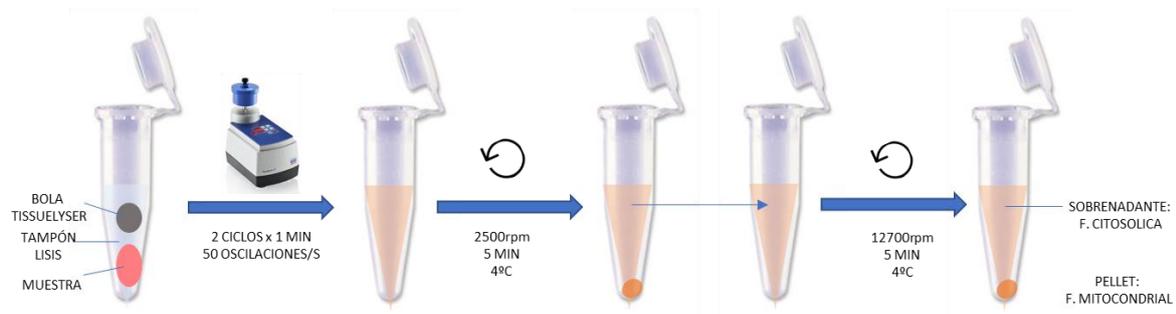


Figura 5.6. Esquema del protocolo de fraccionamiento celular

Se comprobó el correcto fraccionamiento mediante *western blot* incubando con anticuerpos de proteínas específicas de cada fracción (anti-Superóxido dismutasa 2 SOD2- sc137254, Santa Cruz Biotechnology para la fracción mitocondrial; anti-AKT (272, Cell Signaling Technology, para la citosólica).

Se determinó la concentración de proteínas totales de cada fracción mediante el método de Bradford, normalizándose a una concentración de 1 mg/ml en tampón Laemli (10% glicerol; 2% dodecil sulfato sódico-SDS; 5% β -mercapto-etanol y 0,01% azul de bromofenol en Tris 0,5M, pH=6,8) para la determinación de clusterina mediante Western Blot. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 15% y se sometieron a electroforesis usando unas cubetas para electroforesis de BioRad a un voltaje de 90V 15 min seguido de 150V 45 min hasta conseguir la completa separación. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Trasnblot-Turbo transfer Pack, de 0,2 μ m de tamaño de poro, BioRad) en un equipo Transblot-Turbo Transfer System (BioRad) utilizando el protocolo de peso molecular mixto (2,5 A, 25 V, 7 min). Una vez realizada la transferencia, las membranas se lavaron dos veces de 5 minutos con un tampón de lavado (compuesto por leche en polvo desnatada al 0,1%, en PBS con Tween 20 al 0,5%), y se incubaron durante 30 min con un tampón de bloqueo (compuesto por leche en polvo desnatada al 5%, en PBS con Tween 20 al 0,5%), a continuación se lavaron cinco veces de 5 minutos por lavado con el ya

mencionado tampón de lavado y se incubaron a lo largo de la noche a 4°C con agitación con un anticuerpo primario de clusterina (NBP1-68308 1:1000, Novusbio, Littleton, CO, USA) Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las membranas cinco veces de 5 minutos cada lavado, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (sc-2004 Anti-Rabbit 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Seguidamente, se lavaron las membranas cinco veces de 5 minutos de duración con el tampón de lavado mencionado previamente para eliminar el anticuerpo no unido específicamente, y se procedió al revelado incubando con la solución de Luminol con quimioluminiscencia sobreexpresada (ECL Prime Western Blotting Reagent, GE Healthcare, Amersham, UK) durante 5 min, midiéndose la intensidad de la señal en un equipo ChemiDoc XRS+ (BioRad). Una vez obtenidas y cuantificadas las bandas específicas de clusterina, se procedió a cuantificar β -actina en las muestras para normalizar los resultados. Para ello se incubaron las membranas con un anticuerpo anti- β Actina 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) 1 h con agitación a temperatura ambiente, seguido de lavado, incubación con anticuerpo secundario 30 min (sc-2005 anti-mouse 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) y revelado similar al anterior.

2.7. Determinación de clusterina plasmática

Las muestras de plasma fueron descongeladas para la determinación de los niveles de clusterina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) de tipo sandwich (kit ERCLU, Thermo-Fischer Scientific, Frederick, MD, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8. Esquema general del procedimiento y grupos experimentales

En la figura 5.7. se resume el procedimiento utilizado de forma integral. A día 1 del experimento, previamente a la intervención quirúrgica, se realizaron los test de Von Frey y Plantar para la obtención de las medidas basales, y se obtuvo inmediatamente después una muestra de sangre para la evaluación de los niveles plasmáticos de clusterina que se congeló a -80°C hasta el día de la determinación. Las pruebas de nocicepción se repitieron los días 3, 7, 14, 21 y 28, y en este último día se realizó a continuación el test de ansiedad. De forma análoga al día 1, se tomaron muestras de sangre tras las determinaciones conductuales en todos los casos con la excepción del último día del

procedimiento, ya que se consideró que la realización del test del laberinto elevado en cruz y el transporte de los animales desde el animalario hasta el lugar del sacrificio podrían alterar los niveles de clusterina plasmática; por ello, la última determinación de la proteína en plasma se anticipó al día 27. Una vez finalizado el test de ansiedad, se sacrificaron los animales y se extrajo el cerebro para la obtención del núcleo accumbens y la corteza prefrontal de acuerdo al procedimiento de (Heimer *et al.*, 1991), congelándose las a -80°C hasta su procesamiento.

Para evaluar el efecto de la dieta sobre la nocicepción, el estrés y la expresión de clusterina los animales se dividieron en cuatro grupos dos semanas antes del procedimiento quirúrgico. Desde ese momento y a lo largo del resto del experimento, la mitad de los animales que se someterían posteriormente a ligadura del nervio ciático (CCI) tuvieron acceso a una dieta rica en grasa (HF) (grupo CCI HF, $n=12$), mientras que la otra mitad siguió alimentada con el pienso estándar (grupo CCI CHOW, $n=12$). De forma análoga, los animales que serían sometidos a una cirugía sin ligadura (SHAM) fueron divididos en un grupo alimentado con dieta grasa (grupo SHAM HF, $n=12$) y un grupo alimentado con pienso estándar (grupo SHAM CHOW, $n=12$).

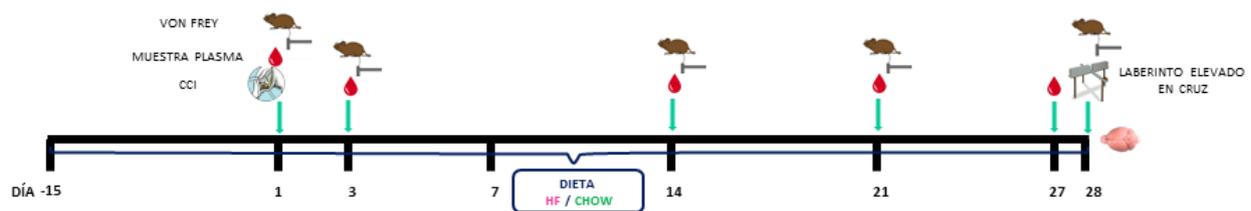


Figura 5.7. Diseño del estudio (ver detalles en el texto).

2.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideraron significativas las diferencias con una $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Los animales alimentados con una dieta rica en grasa mostraron pesos significativamente mayores que los alimentados con dieta estándar a lo largo de todo el experimento; este incremento ponderal inducido por la dieta fue significativamente menor a partir del día 21 en aquellos animales que fueron sometidos a ligadura del nervio ciático (Figura 5.8.).

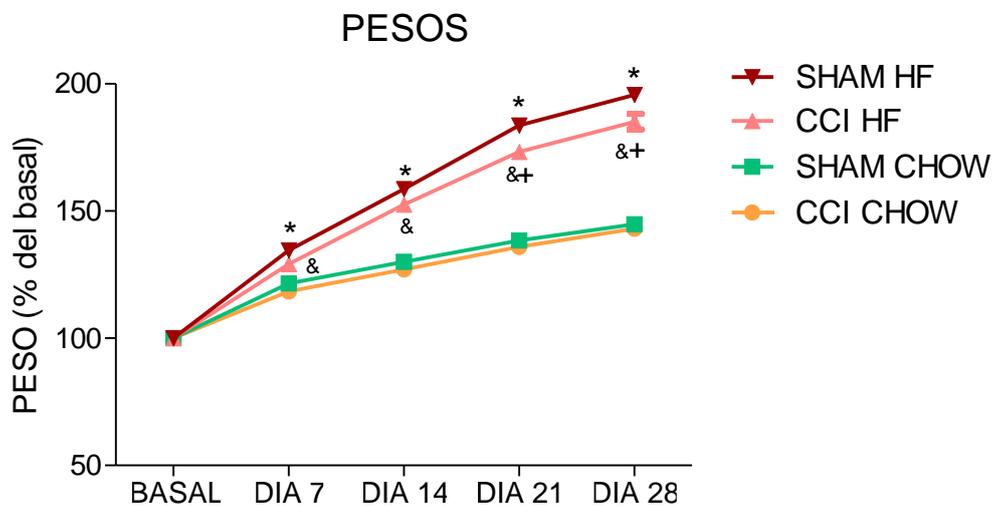


Figura 5.8. Peso corporal de los animales expresado como % del peso basal (media \pm ESM). * $p < 0,05$ vs SHAM CHOW; & $p < 0,05$ vs CCI CHOW; + $p < 0,05$ vs SHAM HF.

La constricción del nervio ciático produjo una marcada alodinia mecánica, como mostraron los resultados del test de Von Frey a los distintos tiempos considerados desde el día 7 del experimento en adelante (Figura 5.9.), y como confirmó el análisis de las áreas bajo la curva obtenidas, que reflejó un efecto significativo de la cirugía en el periodo global de estudio (Tabla 5.1.). La dieta rica en grasa también produjo un leve efecto potenciador de la nocicepción, tanto en los animales sometidos a ligadura como en los sometidos a cirugía sham; esta tendencia se observó todos los días del experimento, si bien sólo alcanzó niveles de significación estadística en el día 3 entre los grupos SHAM CHOW y SHAM HF, ya que estos últimos exhibieron una disminución del umbral muy marcada que revertiría en los días posteriores (Figura 5.9.); en cualquier caso, el análisis de las áreas bajo la curva confirmó un efecto significativo global de la dieta (Tabla 5.1.). Este análisis no reveló interacción entre los efectos de la cirugía y de la dieta sobre la alodinia, por lo que ambos pueden considerarse independientes (Tabla 5.1.).

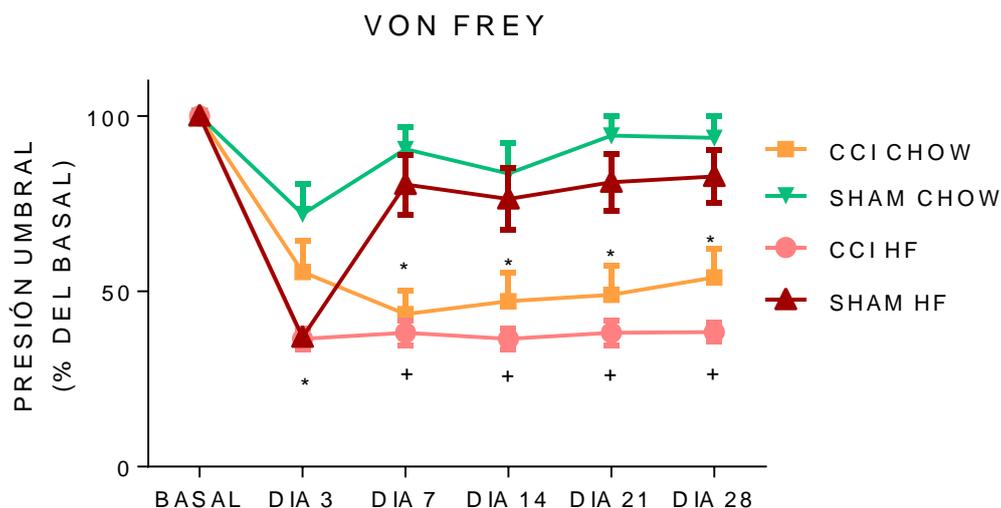


Figura 5.9. Desarrollo de la alodinia mecánica evaluado con el test de Von Frey. Se muestran los resultados del umbral de respuesta como % del basal de cada animal representados como media \pm ESM. * $p < 0,05$ vs SHAM CHOW; + $p < 0,05$ vs SHAM HF.

VON FREY TEST					
AREAS UNDER THE CURVES – 2-ANOVA TABLE					
	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
DIET (HF, CHOW)	971894	1	971894	F (1, 42) = 4,267	P=0.0451
SURGERY (CCI, SHAM)	11159925	1	11159925	F (1, 42) = 49	P<0.0001
Interaction	3563	1	3563	F (1, 42) = 0,01564	P=0.9011
Residual	9565602	42	9565602		

Tabla 5.1. Análisis estadístico (2-ANOVA) de las áreas bajo las curvas de presión umbral (Von Frey) que se recogen en la figura 5.9.

No se observó ningún efecto de la cirugía o de la dieta sobre el desarrollo de la hiperalgesia térmica en el *plantar test* (ni con la realización de la ligadura parcial del nervio ciático ni con la alimentación con la dieta rica en grasa (Figura 5.10.).

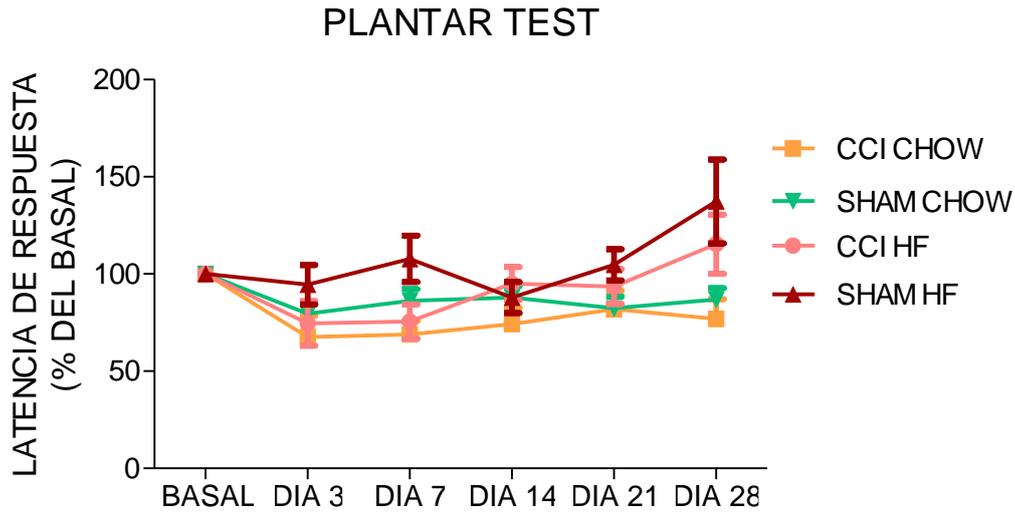


Figura 5.10. Desarrollo de la hiperalgesia térmica evaluado con el *plantar test*. Se muestran los resultados del umbral de respuesta como % del basal de cada animal representados como media \pm ESM.

La ligadura del nervio ciático produjo un aumento de la ansiedad reflejado en una disminución del tiempo en los brazos abiertos, así como en el número de entradas en los mismos en los grupos CCI. La dieta rica en grasa produjo un efecto similar que fue especialmente patente en los animales SHAM. Como en el caso del test de Von Frey, no se observó una interacción significativa entre los efectos de la cirugía y los de la dieta sobre la ansiedad, por lo que también en este caso pueden considerarse independientes (Figura 5.11.).

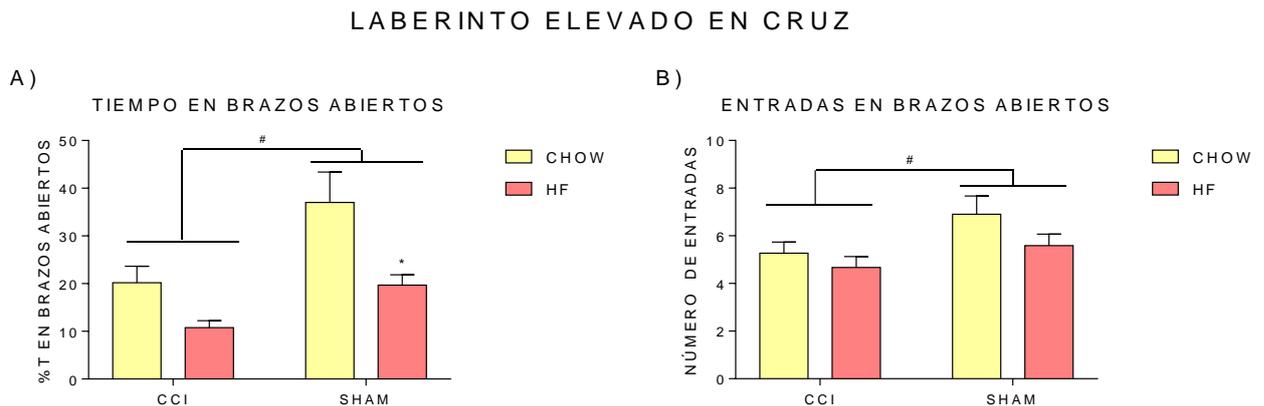


Figura 5.11. Evaluación de la ansiedad en el laberinto elevado en cruz. Se muestran los resultados de A) el porcentaje de tiempo de estancia (T) en los brazos abiertos, y B) el número de entradas en los brazos abiertos (media \pm ESM en ambos casos). * $p < 0,05$ SHAM HF vs SHAM CHOW; # $p < 0,05$ CCI vs SHAM.

La ligadura del nervio ciático no modificó la concentración de clusterina plasmática de los animales; por el contrario, la dieta rica en grasa redujo esta concentración a distintos tiempos, de nuevo de una forma independiente de la cirugía (Figura 5.12.).

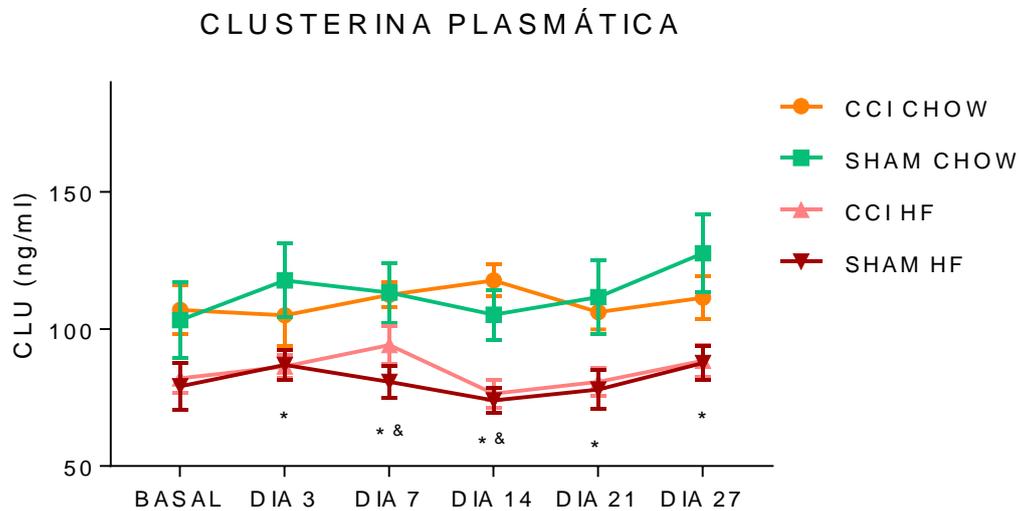


Figura 5.12. Concentraciones plasmáticas de clusterina (media \pm ESM). * $p < 0,05$ SHAM HF vs SHAM CHOW; & $p < 0,05$ CCI HF vs CCI CHOW.

La ligadura del nervio ciático provocó una marcada disminución de la expresión de clusterina en la fracción mitocondrial de la corteza prefrontal de los animales; aunque este efecto tendió a ser más acusado en los animales alimentados con una dieta rica en grasa, no se alcanzaron diferencias significativas. Por otra parte, se observó una tendencia al incremento de la expresión de clusterina en la fracción mitocondrial del núcleo accumbens de los animales alimentados con una dieta rica en grasa, aunque tampoco se alcanzaron diferencias significativas con respecto a los alimentados con una dieta control (Figura 5.13.).

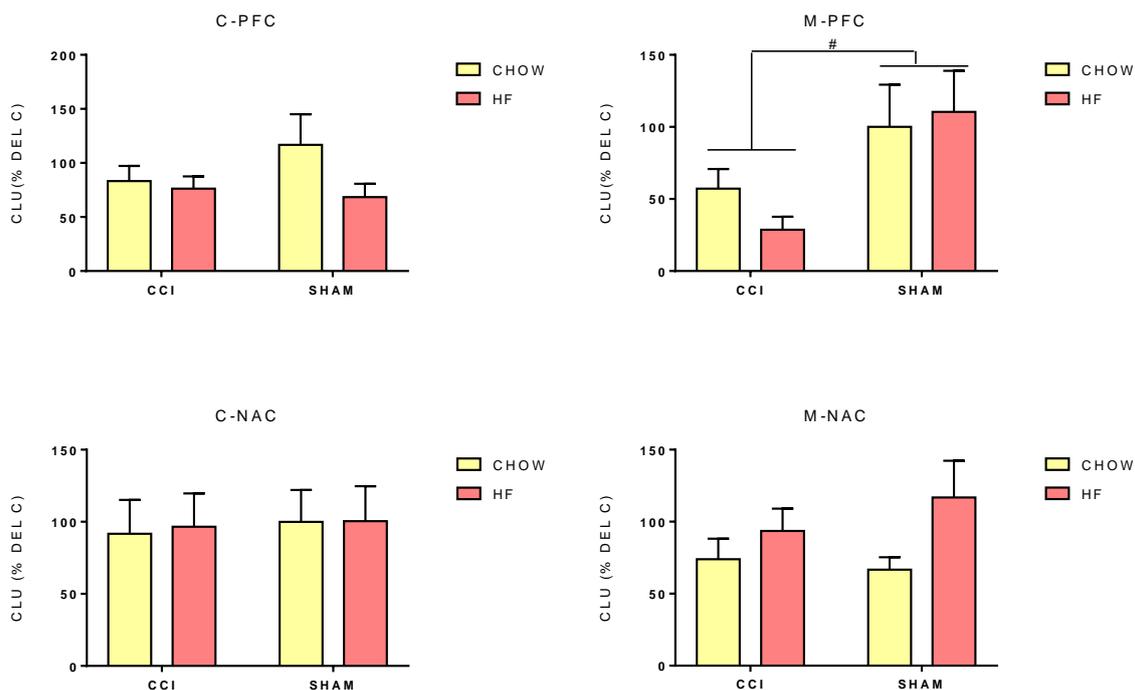


Figura 5.13. Concentraciones cerebrales de clusterina expresadas como % del grupo control (C = SHAM CHOW). en las fracciones citosólica (C-) y mitocondrial (M-) de núcleo accumbens (NAC) y corteza prefrontal (CPF) (media \pm ESM). # $p < 0,05$ CCI vs SHAM.

4. DISCUSIÓN

De forma concordante con la bibliografía y los estudios previos de nuestro grupo (Pascual *et al.*, 2005), la ligadura parcial del nervio ciático provocó un dolor neuropático mantenido en el tiempo, que se puso de manifiesto por la aparición de alodinia mecánica en los animales a partir del día 3. No se observó sin embargo hiperalgesia térmica, evidenciando el hecho de que se trata de dos procesos nociceptivos diferentes. La hiperalgesia térmica es el proceso por el cual un estímulo, en este caso térmico, que en condiciones normales produce dolor, provoca una exacerbación del mismo; la alodinia por su parte se define como el proceso por el cual un estímulo, en este caso mecánico, que en situaciones fisiológicas no produce dolor, pasa a producirlo. Esta diferencia en ambos procesos se debe a los nociceptores y fibras aferentes primarias cutáneas que están implicados en cada caso. Existen así fibras mielinizadas A y δ con velocidades de conducción alta, que sólo responden a estímulos mecánicos, y fibras C amielínicas con velocidades de conducción lenta y que responden a estímulos mecánicos, químicos y térmicos, siendo así posible que al llevar a cabo la ligadura parcial del nervio ciático estas fibras se hubiesen dañado de forma heterogénea (Moreno y Prada, 2004). En cualquier caso las diferencias encontradas en nuestro estudio se suman a las descritas por otros autores al

estudiar comparativamente la nocicepción inducida por estímulos térmicos y mecánicos en modelos de neuropatía diabética (Fuchs *et al.*, 2010), dolor inducido por vincristina (Weng *et al.*, 2003) o dolor inducido por cisplatino (Rahn *et al.*, 2007; Cata *et al.*, 2008; Paniagua *et al.*, 2017).

La alodinia mecánica inducida por la ligadura del nervio ciático se acompañó de una marcada ansiedad en los animales, como pudo evidenciarse en el laberinto elevado en cruz. Este resultado amplía la relación descrita previamente por otros autores entre dolor neuropático, estrés, alodinia y activación de genes y hormonas relacionados con el estado de ánimo (véase por ejemplo Descalzi *et al.*, 2017). Los animales sometidos a ligadura mostraron niveles plasmáticos de clusterina similares a los controles SHAM, un resultado que no permite confirmar la hipótesis de que dichos niveles estén necesariamente relacionados con el dolor neuropático en general o la ansiedad provocada por el mismo, como sugerían los estudios en humanos previamente aludidos en la introducción (Zhu *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2013). Esta aparente discrepancia podría achacarse a multitud de factores, tales como el tipo de dolor neuropático considerado en cada caso, su duración o, de forma importante, el valor traslacional real del modelo animal que hemos adoptado. No obstante lo anterior, se observó que los animales ligados exhibían cambios significativos de la expresión de clusterina en la corteza prefrontal, con una disminución muy marcada de los niveles en la fracción mitocondrial. Es importante señalar que estudios recientes han demostrado que el dolor neuropático conlleva una profunda reorganización del sistema límbico y una desactivación de la corteza prefrontal medial (Kelly y Martina, 2018), por lo que los cambios observados en la expresión de clusterina podrían enmarcarse en este contexto de disregulación, y quizá se relacionen con la puesta en marcha de fenómenos de neuroprotección en los que clusterina parece jugar un papel importante, tal y como se ha descrito en otros capítulos de la presente Tesis Doctoral. Esta hipótesis es no obstante muy tentativa y requiere comprobación directa mediante experimentos específicos.

De forma cualitativamente semejante a la ligadura del nervio ciático, aunque con mucha menor intensidad, la alimentación con una dieta rica en grasa incrementó la sensibilidad nociceptiva y aumentó también el nivel de ansiedad de los animales. En relación con el dolor, los resultados obtenidos refuerzan la asociación entre dolor crónico y obesidad puesta de manifiesto por diversos autores (ver revisión de Narouze y SouzdaInitski, 2015). Tal situación puede ser consecuencia en última instancia, de las alteraciones metabólicas provocadas por una alimentación rica en grasa, como sugieren los estudios de (Obrosova *et al.*, 2007); estos autores describieron que este tipo de dieta causaba un estado prediabético en los animales, así como alodinia mecánica e hipoalgesia térmica,

efectos que se acompañaban de alteraciones en la vía del sorbitol en las fibras del nervio ciático, con acumulación de fructosa y sorbitol. En lo que respecta al efecto ansiogénico de estas dietas, nuestros resultados confirman también los hallazgos previos de Dutheil *et al.* (2016), quienes ya habían observado una menor entrada y porcentaje de tiempo en los brazos abiertos cuando las ratas eran alimentadas con un pienso rico en grasa, además de una tendencia a la potenciación de síntomas asociados a depresión tales como la disminución del tiempo de olfateo de la orina femenina. De forma consistente con estos efectos comportamentales, se ha descrito que la dieta rica en grasa aumenta la secreción de glucocorticoides (Dutheil *et al.*, 2016), posiblemente como consecuencia de una hiperactividad del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, tal y como se ha observado en ratones (Souza *et al.*, 2007; Pratchayasakul *et al.*, 2011; André *et al.*, 2014) y en humanos (Rosmond y Björntorp, 2001; Ghasemi *et al.*, 2012). En cualquier caso, puede afirmarse que los mecanismos biológicos por los cuales la dieta grasa potencia el dolor y la ansiedad están aún muy poco establecidos.

Los animales alimentados con una dieta rica en grasa mostraron en su conjunto una disminución significativa de los niveles plasmáticos de clusterina, resultado que tiende a descartar la idea de que exista una relación directa entre elevación de niveles plasmáticos de clusterina e incremento del peso corporal, como sugerían otros autores que habían estudiado esta relación en humanos (Arnold *et al.*, 2011). Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo tanto en humanos como en animales de experimentación, previamente recogidos en esta Tesis Doctoral (capítulos 1 y 2) no habían encontrado variaciones significativas de los niveles plasmáticos de clusterina en el conjunto de sujetos obesos con respecto a controles normopeso, e incluso se había detectado una tendencia a la disminución en el caso de los pacientes con obesidad mórbida. Como ya se ha comentado en otros apartados, parece que las modificaciones inducidas por la dieta grasa sobre los niveles plasmáticos de clusterina podrían estar más directamente relacionadas con otro tipo de efectos distintos de la modificación del peso corporal, tales como las alteraciones conductuales que afectan a la motivación por la comida (capítulos 2 y 3), el control de la ingesta (capítulo 1), u otros efectos aún por determinar. De esta forma, los niveles plasmáticos de clusterina podrían ser el resultado de un conjunto de circunstancias cuyo peso relativo dependería de cada contexto, y en este sentido desconocemos las causas concretas que determinan una disminución plasmática de clusterina en los animales alimentados con una dieta rica en grasa en el presente estudio en particular. En cuanto a la expresión cerebral de clusterina, la tendencia al incremento en la fracción mitocondrial de núcleo accumbens concuerda con la elevación previamente observada en un modelo de obesidad en el ratón (capítulo 2). Dicha tendencia no llegó sin embargo a alcanzar niveles de significación estadística, lo que puede explicarse por la menor duración del modelo; por otra parte, tampoco cabría establecer una relación necesaria entre esta elevación de clusterina y el estrés o la potenciación del dolor observadas, ya que la ligadura del nervio ciático no modificó la expresión de clusterina en núcleo accumbens mientras que

produjo cambios sustanciales sobre estas mismas variables. En definitiva, nuestros resultados no permiten establecer una relación entre niveles plasmáticos y cerebrales de clusterina, por una parte, y potenciación del dolor y estrés causados por la dieta, por otra.

El análisis estadístico de los resultados reveló que los efectos de la cirugía y los de la dieta sobre el dolor y el estrés fueron en general independientes, aunque el hecho de que las diferencias entre el peso corporal de los animales alimentados con la dieta rica en grasa y los controles sólo fuera significativa en los animales ligados, sugería algún tipo de interacción. Esta última diferencia entre ratones CCI HF y CCI SHAM podría explicarse por una reducción de la ingesta en los animales ligados como consecuencia de una menor motivación por la dieta grasa, lo que apoyaría de nuevo la aparición de anhedonia descrita por Dutheil *et al.* (2016). Esta suposición no se ha podido corroborar en nuestras condiciones experimentales, ya que nuestros animales no estaban individualizados y además en las jaulas convivían ratones SHAM y animales ligados con el fin de asegurar la nivelación intergrupar. En consecuencia, sería recomendable examinar esta posible interacción mediante el diseño de estudios específicos adicionales.

DISCUSIÓN GENERAL

Los conceptos de “adicción a la comida” o de “adicción a comer” siguen siendo controvertidos a día de hoy (Gordon *et al.*, 2018), y de esta forma no se recogen aún como tales en las clasificaciones de enfermedades psiquiátricas como el DSM-5. Sin embargo, son numerosos los trabajos que han ido perfilando la existencia de conductas de tipo adictivo en pacientes con trastornos de la conducta alimentaria (por ejemplo, trastornos por atracón) y en una parte de pacientes obesos, de tal forma que la propuesta de un fenotipo adictivo de obesidad puede considerarse suficientemente fundamentada (Davis *et al.*, 2011; Volkow *et al.*, 2013). Parece así mismo irrefutable la necesidad de progresar en la definición de dicho fenotipo, ya que un mejor conocimiento del mismo podría contribuir a mejorar la terapéutica de la obesidad; así, por ejemplo, un diagnóstico adecuado de adicción a la comida ayudaría a prevenir posibles complicaciones, como la emergencia de consumo de alcohol, de drogas o ludopatía que parece afectar al menos a un 34% de los pacientes de obesidad mórbida intervenidos quirúrgicamente (Li y Wu, 2016).

Uno de los principales avances que podrían favorecer la caracterización del fenotipo de obesidad propuesto, consiste en definirlo con mayor precisión desde un punto de vista biológico. Esto último pasa, entre otras cosas, por la identificación de biomarcadores que contribuyan al diagnóstico diferencial. La presente Tesis Doctoral parte de trabajos preliminares de nuestro equipo en esta dirección, en los que se habían identificado mediante una aproximación proteómica dos biomarcadores séricos potencialmente asociados a la pérdida de control sobre la ingesta, una de las principales dimensiones del *craving* o ansia por la comida, y por tanto de la adicción a la misma. El análisis de correlaciones y la determinación complementaria de niveles protéicos mediante ELISA, primeros trabajos de esta Tesis (capítulo 1), han permitido corroborar el valor diagnóstico de uno de dichos biomarcadores en pacientes de obesidad mórbida, en concreto de los niveles séricos de clusterina; concretamente, la concentración sérica de esta proteína correlaciona positivamente con las puntuaciones de los pacientes de obesidad mórbida en una escala de pérdida de control. Estudios anteriores habían encontrado una relación de clusterina con la obesidad y con la inflamación, adiposidad, hipercolesterolemia y riesgo cardiovascular asociados a la misma (Won *et al.*, 2014); sin embargo, en nuestro estudio los niveles séricos de clusterina no difieren significativamente entre controles y pacientes, tomados estos últimos en su conjunto. Tampoco se han observado este tipo de diferencias en modelos experimentales, ya que los niveles plasmáticos de clusterina son semejantes en ratones obesos alimentados con dieta rica en grasa y ratones control (capítulo 2), mientras que la concentración de la isoforma de clusterina secretada al medio por células sobre-nutridas y células control es también semejante (capítulo 4). Es más, los resultados del capítulo 5 indicarían incluso una correlación opuesta en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa, que llegan a exhibir una

disminución significativa de clusterina plasmática. Estos resultados sugieren que los niveles plasmáticos de clusterina estarían más directamente relacionados con el control sobre la ingesta que con el incremento del peso corporal; así, cuando hemos estudiado la relación entre clusterina plasmática y variables conductuales asociadas a la adicción a la comida en humanos (capítulo 1) y modelos animales (capítulo 2), la correlación ha sido consistente. Las discrepancias aparentes en la relación entre obesidad y clusterina observada en los trabajos anteriormente mencionados podrían explicarse porque en cada situación concreta de obesidad el grado de alteración del control de la ingesta, principal determinante de los niveles de clusterina, podría ser diferente. Esta misma interpretación podría aplicarse a otro tipo de discrepancias semejantes descritas en la literatura cuando se han estudiado posibles correlaciones entre diferentes variables y el índice de masa corporal. Por ejemplo, la densidad de transportadores de dopamina y receptores D₂ en el estriado de humanos correlaciona negativamente con el índice de masa corporal en algunos estudios (Wang *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008) pero no en otros (van de Giessen *et al.*, 2013; Eisenstein *et al.*, 2013); al igual que en el caso de clusterina, esto podría explicarse porque la proporción de obesos con adicción a la comida podría diferir entre estudios, ya que son este tipo de pacientes en concreto (y no otros) los que teóricamente exhibirían alteraciones de la transmisión dopaminérgica mesolímbica de acuerdo a la teoría del Síndrome de Deficiencia de la Recompensa (Blum *et al.*, 2017). Existen antecedentes experimentales que apoyan una estrecha relación entre clusterina e ingesta. Así, Gil *et al.* (2013) observaron que clusterina juega un papel clave en el control de la ingesta en modelos animales y además se comporta como un mediador de los efectos tanto de leptina como de grelina sobre la actividad de neuronas hipotalámicas y el control homeostático del apetito. Estas últimas hormonas modulan también la actividad de las neuronas dopaminérgicas del sistema de refuerzo (Palmiter, 2007), sin embargo, en este caso se desconoce si clusterina juega un papel modulador análogo al descrito en hipotálamo. Dado que los mecanismos hedónicos preponderan frecuentemente sobre los homeostáticos a la hora de determinar la conducta alimentaria (Zheng y Berthoud, 2007), en nuestra opinión resulta muy relevante conocer si clusterina podría estar implicada en las alteraciones del sistema de refuerzo y recompensa subyacentes a las deficiencias en el control de la ingesta. En consecuencia, decidimos avanzar en este conocimiento, e ir más allá de los niveles plasmáticos de clusterina, examinando la evolución de los niveles de la proteína en áreas cerebrales concretas del mencionado sistema de refuerzo (núcleo accumbens y corteza prefrontal), utilizando para ello modelos experimentales de sobre- y subnutrición que sabemos provocan marcadas alteraciones de la conducta alimentaria.

Este tipo de aproximación nos ha permitido verificar que la expresión cerebral de clusterina en núcleo accumbens está efectivamente influida al alza tanto por la ingesta rica en grasa (capítulo 2) como por una subnutrición mantenida durante la gestación y los primeros meses de vida (capítulo 3), que en este último caso afecta específicamente a la fracción mitocondrial de la proteína. Los dos tipos de alteraciones dietéticas, teóricamente opuestas, provocan sin embargo cambios conductuales paralelos indicativos de una mayor sensibilidad a los efectos reforzantes de la comida, verificados en el primer caso en nuestros propios experimentos y reportados en el segundo caso por otros autores (Tonkiss *et al.*, 1990; Valdomero *et al.*, 2006, 2007). El significado de esta sobreexpresión de clusterina no se ha establecido, aunque los numerosos antecedentes que relacionan a esta proteína con procesos neuroprotectores sugieren que podría tratarse de una respuesta homeostática del sistema de refuerzo ante los efectos tanto de su sobre-estimulación como de su sub-estimulación, circunstancias anómalas en cualquier caso. Existen en este sentido evidencias de que la sobre-estimulación del sistema de refuerzo con drogas de abuso como los opiáceos, puede dar lugar a fenómenos neurotóxicos; así, se sabe que la exposición crónica a opiáceos provoca la activación de caspasas y de Fas, aumenta la expresión de Bax y disminuye la de Bcl-2 (Boronat *et al.*, 2001; Cunha-Oliveira *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Polanco *et al.*, 2014; Pu *et al.*, 2016). Hay que recordar que el *ratio* Bax/Bcl-2, incrementado en animales adictos a los opiáceos, es crucial para determinar la apoptosis o inhibición de la misma. Bax oligomeriza con Bak constituyendo el complejo Bax-Bak que forma poros y permeabiliza la membrana mitocondrial externa. Así, se produce la salida del citocromo c que se une con Asf, formando el apoptosoma que activa a la caspasa 9, que a su vez activa a la caspasa 3. Esta caspasa activada induce la deoxiribonucleasa activada por caspasa (CAD) que fracciona el DNA y, finalmente, lleva a la muerte neuronal (Karch y Molkenin, 2015). Opuestamente, Bcl-2 activa proteasas específicas para caspasas e inhibe la liberación de citocromo c. Ante una situación proapoptótica de este tipo, las células podrían activar vías protectoras alternativas con el fin de asegurar su supervivencia, entre las cuales podría estar el incremento y/o la traslocación de clusterina a las mitocondrias. En efecto, se ha descrito que en situaciones de estrés celular se produce una traslocación de la isoforma presecretada de clusterina (psCLU) a las mitocondrias, donde impide la formación del complejo Bax-Bak (Li *et al.*, 2013). A su vez, esta misma isoforma de clusterina es capaz de estabilizar en el citosol el complejo Ku70-Bax, impidiendo la traslocación de Bax a la mitocondria (Trogakos *et al.*, 2009). Todos estos resultados conducen a la hipótesis de que las alteraciones crónicas de la ingesta podrían actuar negativamente sobre la viabilidad de las neuronas del sistema de refuerzo, de una forma análoga a la sobreexposición mantenida a opiáceos, provocando así una respuesta homeostática semejante en la que clusterina podría jugar un papel crucial.

Este posible paralelismo entre adicción a opiáceos, adicción a la comida, neurotoxicidad y alteraciones en la expresión y localización de clusterina vendría apoyado por una serie de datos que subrayan la profunda interrelación entre los mecanismos opioides y los efectos motivacionales y adictivos de la comida apetitosa. Como ya se ha comentado previamente, la adicción a la comida conlleva alteraciones de las mismas vías de refuerzo que son activadas por drogas de abuso como los opiáceos (Volkow *et al.*, 2013); en consecuencia, estas últimas drogas son capaces de aumentar la ingesta hedónica (Zhang y Kelly 2002; Nathan y Bullmore, 2009), mientras que el consumo de comidas apetitosas parece causar cambios en la actividad de las vías opioides (Alsiö *et al.*, 2012): así, el acceso intermitente a alimentos azucarados potencia la unión de morfina a sus receptores en las vías de refuerzo, aumenta la unión de dopamina a receptores D₁ y disminuye su unión a receptores D₂ (Colantuoni *et al.*, 2001). Por el contrario, los antagonistas opiáceos causan anorexia y pérdida de motivación por la comida en humanos (Nathan y Bullmore, 2009). En este contexto, es razonable esperar que las alteraciones nutricionales capaces de desencadenar adicción a la comida puedan también originar fenómenos proapoptóticos en las neuronas sensibles por mecanismos análogos a los desencadenados por los opiáceos crónicos, así como respuestas protectoras entre las que estaría la sobreexpresión y traslocación de clusterina. En apoyo de esta idea, la privación de glucosa o de suero fetal bovino (con el consecuente déficit de factores de crecimiento) provocan un cambio marcado de la expresión y localización de clusterina en cultivos de células de neuroblastoma, cuyo fenotipo dopaminérgico es semejante al de las neuronas del área tegmental ventral (capítulo 4). Por el momento se desconocen los efectos de las drogas de abuso sobre la expresión neuronal de clusterina, dato que resultaría necesario conocer para terminar de configurar nuestra hipótesis.

La presencia de dolor neuropático constituye otra situación en la que trabajos previos de identificación de biomarcadores han encontrado cambios significativos en los niveles plasmáticos de clusterina (Zhu *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2013). Trabajos recientes han puesto de manifiesto que en modelos animales de dolor neuropático existe una marcada anhedonia, que correlaciona con una profunda depresión del funcionalismo opioide en el estriado (Thompson *et al.*, 2018) y un aumento de sensibilidad a los efectos reforzantes de los opiáceos exógenos (Kai *et al.*, 2018), lo que indicaría una sensibilización del sistema de refuerzo y mayor vulnerabilidad adictiva. En vista de estos antecedentes, parece relevante investigar si la expresión de clusterina está también modificada en las áreas cerebrales del sistema de refuerzo en estas circunstancias. Utilizando el mismo modelo experimental de dolor que se aplicó en los trabajos anteriormente mencionados (constricción crónica del nervio ciático), los experimentos que configuran el capítulo 5 de esta Tesis demuestran que la ligadura del nervio ciático provoca alodinia mecánica, ansiedad y una marcada sobreexpresión de clusterina en la fracción mitocondrial

de la corteza prefrontal, pero no en núcleo accumbens. Este resultado es de gran interés ya que recientemente se ha observado que el dolor neuropático provoca una disregulación de la corteza prefrontal medial (Kelly y Martina, 2018), una de cuyas consecuencias parece ser la activación de neuronas productoras de factor liberador de corticotropina (CRF), que proyectan sobre el núcleo accumbens y son al parecer las últimas responsables de la sensibilización del sistema de refuerzo anteriormente mencionada (Kai *et al.*, 2018). El hecho de que clusterina aparezca de nuevo sobreexpresada en un área cerebral cuyo funcionalismo está alterado como consecuencia directa de la patología viene a apoyar la idea de que esta proteína juega un papel regulador crucial en el sistema nervioso central.

La convergencia de los resultados anteriores, procedentes de varios modelos experimentales, recomiendan profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos de la clusterina sobre el funcionalismo neuronal en condiciones patológicas, que pueden terminar provocando conductas de tipo adictivo. Es por esto que en el capítulo 4 de la presente Tesis se ha pretendido establecer un modelo *in vitro* que facilite este tipo de investigación en el futuro. Aunque por el momento los resultados obtenidos pueden considerarse muy preliminares, es importante señalar que en neuronas aisladas y sometidas a diferentes carencias nutricionales clusterina cambia su localización y función de forma reversible, para preservar la supervivencia celular mientras esta se ve comprometida. Estos resultados corroboran de nuevo el papel protector de esta proteína y subrayan la validez inicial del modelo para progresar en la consecución de los objetivos planteados.

CONCLUSIONES

- a) La clusterina se comporta como un biomarcador de adicción a la comida en la obesidad mórbida, ya que sus niveles séricos correlacionan positivamente con las puntuaciones en los cuestionarios de pérdida de control sobre la ingesta. Sin embargo, no se confirma como una proteína directamente asociada a la obesidad, ya que sus niveles no dependen del peso corporal. Exactamente lo contrario se puede afirmar en el caso del péptido sérico amiloide P.
- b) Los resultados obtenidos en ratones alimentados con una dieta rica en grasa apoyan y extienden en su conjunto las evidencias que apuntan a la existencia de una relación entre la clusterina y las propiedades reforzantes de la comida. Así, la motivación por la comida no sólo correlaciona con los niveles plasmáticos de clusterina en los animales obesos, sino que además se acompaña de una sobreexpresión de la proteína en núcleo accumbens.
- c) La subnutrición durante la vida perinatal y adulta provoca en la rata un incremento de la expresión de clusterina en la fracción mitocondrial de núcleo accumbens, que podría estar relacionada con la hipersensibilidad al refuerzo descrita por otros autores en estas condiciones.
- d) La subnutrición durante la vida perinatal de la rata provoca en la vida adulta una expresión reducida de clusterina en núcleo accumbens, que apunta a un mayor riesgo de daño neuronal ante posibles estímulos nocivos, si consideramos el papel neuroprotector que se atribuye a esta proteína.
- e) Se han observado efectos pro-nociceptivos y ansiogénicos de la dieta rica en grasa que están en la línea de los antecedentes disponibles en la literatura científica. El hecho de que esta dieta disminuya la clusterina plasmática en la rata descarta de nuevo la existencia de una correlación entre niveles plasmáticos de la proteína y obesidad en cualquier circunstancia.
- f) La ligadura del nervio ciático provoca una marcada alodinia y ansiedad, y disminuye la expresión de clusterina en la corteza prefrontal de la rata, lo que sugiere que esta proteína podría estar implicada en los cambios funcionales que acompañan al dolor neuropático en esta área cerebral.

- g) Se ha conseguido construir un modelo *in vitro* en células SH-SY5Y, que permite investigar en profundidad el papel de la clusterina en condiciones de sobrenutrición y subnutrición. Los primeros resultados indican que esta proteína trasloca su posición y cambia su función para preservar la supervivencia celular de forma adaptativa y no permanente.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, J., Hatipoglu, E., O'Flaherty, L., Ternette, N., Sahgal, N., Lockstone, H., Baban, D., Nye, E., Stamp, G.W., Wolhuter, K., Stevens, M., Fischer, R., Carmeliet, P., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Frizzell, N., Soga, T., Kessler, B.M., El-Bahrawy, M., Ratcliffe, P.J., Pollard, P.J. (2011) 'Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling', *Cancer Cell*, 20(4), pp. 524–537. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.006>.
- Alguacil, L. F., González-Martín, C. (2015) 'Target identification and validation in brain reward dysfunction', *Drug Discovery Today*, 20(3), pp. 347–352. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.014>.
- Alguacil, L. F., Gonzalez-Martin, C., Salas E. (2011) 'Identification of New Drug Targets and Biomarkers Related to Obesity and Eating Disorders: an Approach Based on Reward Deficit and Addiction', *Current Pharmaceutical Design*, 17(5), pp. 462–470. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138161211795164158>.
- Alguacil, L.F., Pérez-García, C., Bocos, C., Herradón, G., Toda, S. (2014). 'The contribution of genomic and proteomic techniques to the study of the pathogenesis of mental disorders and to the development of Psychopharmacology'. En: *History of Psychopharmacology*, Edward F. Domino (ed.) Vol. 3, pp. 489-522. NPP Books, Arlington, MA, USA.
- Alles, S. R., Smith, P. A. (2018) 'Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain', *Pharmacological Reviews*, 70 (2), p. 315 LP-347. Disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/70/2/315.abstract>.
- Alsiö, J., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schiöth, H. B. (2012) 'Feed-forward mechanisms: Addiction-like behavioral and molecular adaptations in overeating', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(2), pp. 127–139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.01.002>.
- André, C., Dinel, A. L., Ferreira, G., Layé, S., Castanon, N. (2014) 'Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation', *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, pp. 10–21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.012>.
- Arnold, T., Brandlhofer, S., Vrtikapa, K., Stangl, H., Hermann, M., Zwiauer, K., Mangge, H., Karwautz, A., Huemer, J., Koller, D., Schneider, W. J., Strobl, W. (2011) 'Effect of Obesity on Plasma Clusterin: A Proposed Modulator of Leptin Action', *Pediatric Research*, 69(3), pp. 237-242. Disponible en: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31820930cb>.
- Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R. (2011) 'The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors', *Pharmacological Reviews*, 63(1), pp. 182-217. Disponible en: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/63/1/182.abstract>.
- Berthoud, H.-R. (2011) 'Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: Who's the boss?', *Current Opinion in Neurobiology*, 21(6), pp. 888–896. doi: 10.1016/j.conb.2011.09.004.
- Berthoud, H. R., Zheng, H. , Shin, A. C. (2012) 'Food reward in the obese and after weight loss induced by calorie restriction and bariatric surgery', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264(1), pp. 36–48. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06573.x.
- Bhattacharya, B., Low, S.H., Soh, C., Kamal Mustapa, N., Beloueche-Babari, M., Koh, J., Loh, J., Soong, R. (2014) 'Increased drug resistance associated with reduced glucose levels and an enhanced glycolysis phenotype', *British Journal of Pharmacology*, 171(13), pp. 3255-3267. doi: 10.1111/bph.12668.

- Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. (1973) 'Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture.', *Cancer research*, 33(11), pp. 2643–2652.
- Blum, K., Febo, M., Badgaiyan, R. D., Demetrovics, Z., Simpatico, T., Fahlke, C., M, O.-B., Li, M., Dushaj, K., Gold, M. S. (2017) 'Common Neurogenetic Diagnosis and Meso-Limbic Manipulation of Hypodopaminergic Function in Reward Deficiency Syndrome (RDS): Changing the Recovery Landscape', *Current Neuropharmacology*, 15(1), pp. 184–194. doi: 10.2174/1570159X13666160512150918.
- Boggs, L. N., Fuson, K. S., Baez, M., Churgay, L., McClure, D., Becker, G., May, P. C. (2018) 'Clusterin (Apo J) Protects Against In Vitro Amyloid- β (1–40) Neurotoxicity', *Journal of Neurochemistry*, 67(3), pp. 1324–1327. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031324.x.
- Boyle, P. J., Nagy, R. J., O'Connor, A. M., Kempers, S. F., Yeo, R. A., Qualls, C. (1994) 'Adaptation in brain glucose uptake following recurrent hypoglycemia.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), pp. 9352–9356. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44810/>.
- Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., Morrison, C. D. (2009) 'Obesity and Vulnerability of the CNS', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(5), pp. 395–400. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.004.
- Brunault, P., Ducluzeau, P.-H., Bourbao-Tournois, C., Delbachian, I., Couet, C., Reveillere, C., Ballon, N. (2016) 'Food Addiction in Bariatric Surgery Candidates: Prevalence and Risk Factors', *Obesity Surgery*, 26(7), pp. 1650-1653. doi: 10.1007/s11695-016-2189-x.
- Carreras, I., Garrett-Young, R., David Ullman, M., Eisenhauer, P.B., Fine, E.R., Wells, J. M., Conn, K.J. (2005) 'Upregulation of clusterin/apolipoprotein J in lactacystin-treated SH-SY5Y cells', *Journal of Neuroscience Research*, 79(4), pp. 495–502. doi: 10.1002/jnr.20374.
- del Castillo, C., Morales, L., Alguacil, L. F., Salas, E., Garrido, E., Alonso, E., Pérez-García, C. (2009) 'Proteomic analysis of the nucleus accumbens of rats with different vulnerability to cocaine addiction', *Neuropharmacology*, 57(1), pp. 41–48. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.04.005.
- Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Corti A, Corvetta D, Sala A, Bettuzzi S. (2005) 'Ca²⁺ depletion induces nuclear clusterin, a novel effector of apoptosis in immortalized human prostate cells', *Cell Death Differentiation*, 12(1), pp. 101–104. doi: 10.1038/sj.cdd.4401491.
- Cata, J. P., Weng, H. R., Dougherty, P. M. (2008) 'Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin-induced chemoneuropathy', *Brain Research*, 1230, pp. 91–98. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.022.
- Cepeda-Benito, A., Gleaves, D. H., Williams, T. L., Erath, S. A. (2000) 'The development and validation of the state and trait food-cravings questionnaires', *Behavior Therapy*, 31(1), pp. 151–173. doi: [https://doi.org/10.1016/S0005-7894\(00\)80009-X](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(00)80009-X).
- Chen, P. S., Yang, Y. K., Yeh, T. L., Lee, I. H., Yao, W. J., Chiu, N. T., Lu, R. B. (2008) 'Correlation between body mass index and striatal dopamine transporter availability in healthy volunteers—A SPECT study', *NeuroImage*, 40(1), pp. 275–279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.11.007>.
- Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F., Chang, R.C. (2008) 'Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research', *Neurotoxicology*, 30(1), pp. 127–135. doi: 10.1016/j.neuro.2008.11.001.
- Christakis, N. A., Fowler, J. H. (2007) 'The Spread of Obesity in a Large Social Network over 32 Years', *New England Journal of Medicine*, 357(4), pp. 370–379. doi: 10.1056/NEJMsa066082.

- Colantuoni, C., Schwenker, J., McCarthy, J., Rada, P., Ladenheim, B., Cadet, J. L., Schwartz, G., Moran, T. H., Hoebel, B. G. (2001) 'Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain', *Neuroreport*, 12(16), pp. 3549–3552. doi: 10.1097/00001756-200111160-00035.
- Cordero-Llana, O., Scott, S. A., Maslen, S. L., Anderson, J. M., Boyle, J., Chowhdury, R. R., Tyers, P., Barker, R. A., Kelly, C. M., Rosser, A. E., Stephens, E., Chandran, S., Caldwell, M. A. (2011) 'Clusterin secreted by astrocytes enhances neuronal differentiation from human neural precursor cells', *Cell Death and Differentiation*, 18(5), pp. 907–913. doi: 10.1038/cdd.2010.169.
- Crowley, N. M., LePage, M. L., Goldman, R. L., O'Neil, P. M., Borckardt, J. J., Byrne, T. K. (2012) 'The food craving questionnaire-trait in a bariatric surgery seeking population and ability to predict post-surgery weight loss at six months', *Eating Behaviors*, 13(4), pp. 366–370. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2012.07.003>.
- Crowley, N., Madan, A., Wedin, S., Correll, J. A., Delustro, L. M., Borckardt, J. J., Byrne, T. K. (2014) 'Food cravings among bariatric surgery candidates', *Eating and Weight Disorders*, 19(3), pp. 371–376. doi: 10.1007/s40519-013-0095-y.
- Cuétara-Bernal, K., García-Varona, A., Socarrás-Ferrer, B. B. (2012) 'Stromal rat cell culture. Influence of fetal calf serum', *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28(1), pp. 70-76. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsdoj&AN=edsdoj.5c1c8 ea be0843b581cf0003c497ba4d&lang=es&site=eds-live>.
- Davis, C., Curtis, C., Levitan, R. D., Carter, J. C., Kaplan, A. S., Kennedy, J. L. (2011) 'Evidence that "food addiction" is a valid phenotype of obesity', *Appetite*, 57(3), pp. 711–717. doi: 10.1016/j.appet.2011.08.017.
- Davis, J. F., Tracy, A. L., Schurdak, J. D., Tschöp, M. H., Lipton, J. W., Clegg, D. J., Benoit, S. C. (2008) 'Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat', *Behavioral Neuroscience*, 122(6), pp. 1257–1263. doi: 10.1037/a0013111.
- Daws, L. C., Avison, M. J., Robertson, S. D., Niswender, K. D., Galli, A., Saunders, C. (2011) 'Insulin signaling and addiction', *Neuropharmacology*, 61(7), pp. 1123–1128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.02.028>.
- Debure, L., Vayssière, J., Rincheval, V., Loison, F., Le Dréan, Y., Michel, D. (2003) 'Intracellular clusterin causes juxtannuclear aggregate formation and mitochondrial alteration'. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 15), pp. 3109-3121. doi: 10.1242/jcs.00619.
- Dutheil, S., Ota, K. T., Wohleb, E. S., Rasmussen, K., Duman, R. S. (2016) 'High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation', *Neuropsychopharmacology*, 41(7), pp. 1874–1887. doi: 10.1038/npp.2015.357.
- Eisenstein, S. A., Antenor-Dorsey, J. A. V, Gredysa, D. M., Koller, J. M., Bihun, E. C., Ranck, S. A., Arbeláez, A. M., Klein, S., Perlmutter, J. S., Moerlein, S. M., Black, K. J., Hershey, T. (2013) 'A comparison of D2 receptor specific binding in obese and normal-weight individuals using PET with (N-[(11)C]methyl)benperidol', *Synapse*, 67(11), pp. 748–756. doi: 10.1002/syn.21680.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., Comella, J. X. (2002) 'Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells', *Journal of Neurochemistry*, 75(3), pp. 991–1003. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x.

- Escriva, F., Rodriguez, C., Cacho, J., Alvarez, C., Portha, B., Pascual-Leone, A. M. (1992) 'Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 263(1), pp. E1–E7. doi: 10.1152/ajpendo.1992.263.1.E1.
- Farr, S. A., Yamada, K. A., Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Xu, L., Miller, N. E., Banks, W. A., Morley, J. E. (2008) 'Obesity and Hypertriglyceridemia Produce Cognitive Impairment', *Endocrinology*, 149(5), pp. 2628–2636. doi: 10.1210/en.2007-1722.
- Figlewicz, D. P., Jay, J. L., Acheson, M. A., Magrisso, I. J., West, C. H., Zavosh, A., Benoit, S. C., Davis, J. F. (2013) 'Moderate High Fat Diet Increases Sucrose Self-Administration In Young Rats', *Appetite*, 61(1), pp. 19–29. doi: 10.1016/j.appet.2012.09.021.
- la Fleur, S. E., van Rozen, A. J., Luijendijk, M. C. M., Groeneweg, F., Adan, R. A. (2010) 'A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia', *International Journal Of Obesity*, 34(3), pp. 537-546. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2009.257>.
- Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L., James, I. (2001) 'The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*, 92(1-2), pp. 91-100. doi: 10.1046/j.1533-2500.2001.1039_18.x.
- Franzek, E. J., Sprangers, N., Janssens, A. C. J. W., Van Duijn, C. M., Van De Wetering, B. J. M. (2008) 'Prenatal exposure to the 1944–45 Dutch "hunger winter" and addiction later in life', *Addiction*, 103(3), pp. 433–438. doi: 10.1111/j.1360-0443.2007.02084.x.
- Fukui, K., Imagawa, A. (2014) 'Adaptation of the brain to hypoglycemia: Does the brain stand by for the next hypoglycemia event?', *Journal of Diabetes Investigation*, 5(3), pp. 284–285. doi: 10.1111/jdi.12210.
- Gelissen, I. C., Hochgrebe, T., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., Jessup, W., Dean, R. T., Brown, A. J. (1998) 'Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function?', *Biochemical Journal*, 331(Pt 1), pp. 231–237. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219343/>.
- Ghasemi, R., Haeri, A., Dargahi, L., Mohamed, Z., Ahmadiani, A. (2012) 'Insulin in the Brain: Sources, Localization and Functions', *Molecular Neurobiology*, 47(1), pp. 145-171. doi: 10.1007/s12035-012-8339-9.
- van de Giessen, E., la Fleur, S. E., Eggels, L., de Bruin, K., van den Brink, W., Booij, J. (2013) 'High fat/carbohydrate ratio but not total energy intake induces lower striatal dopamine D2/3 receptor availability in diet-induced obesity', *International Journal of Obesity*, 37(5), pp. 754-757. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2012.128>.
- Gil, S. Y., Youn, B. S., Byun, K., Huang, H., Namkoong, C., Jang, P.-G., Lee, J.-Y., Jo, Y.-H., Kang, G. M., Kim, H.-K., Shin, M.-S., Pietrzik, C. U., Lee, B., Kim, Y.-B., Kim, M.-S. (2013) 'Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway', *Nature Communications*, 4, p. 1862. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2896>.
- Goicoechea, C., Martín, M. I. (2006) 'Mecanismos periféricos y centrales del dolor', *Reumatol Clin*, 2(1), pp. 55–66. doi: 10.1016/S1699-258X(06)73084-4.
- Gordon, E. L., Ariel-Donges, A. H., Bauman, V., Merlo, L. J. (2018) 'What Is the Evidence for "Food Addiction?" A Systematic Review', *Nutrients*, 10(4), p. 477. doi: 10.3390/nu10040477.
- Hals, I. K., Singh, R., Ma, Z., Scholz, H., Björklund, A., Grill, V. (2016) 'Culture at low glucose up-regulates mitochondrial function in pancreatic β cells with accompanying effects on viability', *Islets*, 8(6), pp. 165–176. doi: 10.1080/19382014.2016.1246637.

- Han, B.H., DeMattos, R.B., Dugan, L.L., Kim-Han, J.S., Brendza, R.P., Fryer, J.D., Kierson, M., Cirrito, J., Quick, K., Harmony, J.A., Aronow, B.J., Holtzman, D. M. (2001) 'Clusterin contributes to caspase-3 – independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia', *Nature Medicine*, 7(3), pp. 338-343.
- Haslam, D. W., James, W. P. T. (2005) 'Obesity', *The Lancet*, 366(9492), pp. 1197–1209. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67483-1.
- Hebebrand, J., Albayrak, Ö., Adan, R., Antel, J., Dieguez, C., de Jong, J., Leng, G., Menzies, J., Mercer, J. G., Murphy, M., van der Plasse, G., Dickson, S. L. (2014) "Eating addiction", rather than "food addiction", better captures addictive-like eating behavior', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 47, pp. 295–306. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.016>.
- Heimer, L., Zahm, D. S., Churchill, L., Kalivas, P. W., Wohltmann, C. (1991) 'Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat', *Neuroscience*, 41(1), pp. 89–125. doi: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90202-Y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90202-Y).
- Higgs, S. (2015) 'Social norms and their influence on eating behaviours', *Appetite*, 86, pp. 38–44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.10.021>.
- Hoofnagle, A. N., Wu, M., Gosmanova, A. K., Becker, J. O., Wijsman, E. M., Brunzell, J. D., Kahn, S. E., Knopp, R. H., Lyons, T. J., Heinecke, J. W. (2010) 'Low Clusterin Levels in High Density Lipoprotein Associate with Insulin Resistance, Obesity, and Dyslipoproteinemia', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(12), pp. 2528–2534. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.212894.
- Hruby, A., Hu, F. B. (2015) 'The Epidemiology of Obesity: A Big Picture', *PharmacoEconomics*, 33(7), pp. 673–689. doi: 10.1007/s40273-014-0243-x.
- Huang, Z., Cheng, C., Jiang, L., Yu, Z., Cao, F., Zhong, J., Guo, Z., Sun, X. (2015) 'Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury', *Journal of Neurochemistry*, 136(5), pp. 1017–1025. doi: 10.1111/jnc.13491.
- Kadam, R., Teni, T. (2016) 'Clusterin in Cancer : Dual role as a Tumor Suppressor Gene and an Oncogene', *Biomedical Research Journal*, 3(2), pp. 130–156.
- Kai, Y., Li, Y., Sun, T., Yin, W., Mao, Y., Li, J., Xie, W., Chen, S., Wang, L., Li, J., Zhang, Z., Tao, W. (2018) 'A medial prefrontal cortex-nucleus acumens corticotropin-releasing factor circuitry for neuropathic pain-increased susceptibility to opioid reward', *Translational Psychiatry*, 8(1), p. 100. doi: 10.1038/s41398-018-0152-4.
- Karch, J., Molkentin, J. D. (2015) 'Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak', *Circulation Research*, 116(11), pp. 1800–1809. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305421.
- Kelly, C. J., Martina, M. (2018) 'Circuit-selective properties of glutamatergic inputs to the rat prelimbic cortex and their alterations in neuropathic pain', *Brain Structure and Function*, 223(6), pp. 2627–2639.
- Klaus, A., Polge, C., Zorman, S., Auchli, Y., Brunisholz, R., Schlattner, U. (2012) 'A two-dimensional screen for AMPK substrates identifies tumor suppressor fumarate hydratase as a preferential AMPK α 2 substrate', *Journal of Proteomics*, 75(11), pp. 3304–3313. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.040>.
- Knight, J. A. (2011) 'Diseases and Disorders Associated with Excess Body Weight', *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 41(2), pp. 107–121. Disponible en: <http://www.annclinlabsci.org/content/41/2/107.abstract>.
- Kovalevich, J., Langford, D. (2013) 'Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology', *Methods in Molecular Biology*, 1078, pp. 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.

- Leskov, K. S., Klokov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J., Boothman, D. A. (2003) 'Synthesis and Functional Analyses of Nuclear Clusterin, a Cell Death Protein', *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp. 11590–11600. doi: 10.1074/jbc.M209233200.
- Li, L., Wu, L.-T. (2016) 'Substance Use after Bariatric Surgery: A Review', *Journal of Psychiatric Research*, 76, pp. 16–29. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.01.009.
- Li, N., Zoubeidi, A., Beraldi, E. and Gleave, M. E. (2013) 'GRP78 regulates clusterin stability , retrotranslocation and mitochondrial localization under ER stress in prostate cancer', *Oncogene*, 32(15), pp. 1933–1942. doi: 10.1038/onc.2012.212.
- Lind, A.-L., Emami Khoonsari, P., Sjödin, M., Katila, L., Wetterhall, M., Gordh, T., Kultima, K. (2016) 'Spinal Cord Stimulation Alters Protein Levels in the Cerebrospinal Fluid of Neuropathic Pain Patients: A Proteomic Mass Spectrometric Analysis', *Neuromodulation*, 19(6), pp. 549–562. doi: 10.1111/ner.12473.
- Liu, L. W., Lu, J., Wang, X. H., Fu, S. K., Li, Q., Lin, F. Q. (2013) 'Neuronal apoptosis in morphine addiction and its molecular mechanism', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(7), pp. 540–545. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731185/>.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsbl&AN=RN110370659&lang=es&site=eds-live>.
- Lizárraga-Mollinedo, E., Álvarez, C., Fernández-Millán, E., Escrivá, F., González-Martín, C., Salas, E., Pérez-Ortiz, J. M., Alguacil, L. F. (2013) 'Undernutrition upregulates fumarate hydratase in the rat nucleus accumbens', *Metabolic Brain Disease*, 28(1), pp. 111–115. doi: 10.1007/s11011-012-9358-y.
- Lizárraga-Mollinedo, E., Fernández-Millán, E., García-San Frutos, M., de Toro-Martín, J., Fernández-Agulló, T., Ros, M., Álvarez, C., Escrivá, F. (2015) 'Early and Long-term Undernutrition in Female Rats Exacerbates the Metabolic Risk Associated with Nutritional Rehabilitation', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(31), pp. 19353–19366. doi: 10.1074/jbc.M114.549204.
- Lizárraga-Mollinedo, E., Fernández-Millán, E., De Miguel-Santos, L., Martínez-Honduvilla, C. J., Alvarez, C., Escrivá, F. (2009) 'Early undernutrition increases glycogen content and reduces the activated forms of GSK3, AMPK, p38 MAPK, and JNK in the cerebral cortex of suckling rats', *Journal of Neurochemistry*, 112(1), pp. 123–133. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06434.x.
- Lumley, J., Stevenson, R. J., Oaten, M. J., Mahmut, M., Yeomans, M. R. (2016) 'Individual differences in impulsivity and their relationship to a Western-style diet', *Personality and Individual Differences*, 97, pp. 178–185. doi: 10.1016/j.paid.2016.03.055.
- Ma, J., Qu, H., Sun, X., Zheng, Q., Yuan, X., Zhang, J., Wang, D. (2015) 'The role of reactive oxygen species in morphine addiction of SH-SY5Y cells', *Life Sciences*, 124, pp. 128–135. doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.003.
- Matafome, P., Seíça, R. (2017) 'Function and Dysfunction of Adipose Tissue', En: *Obesity and Brain Function*, Letra, L. y Seíça, R. (eds.), pp. 3-31. Springer International Publishing: Cham, Suiza. doi: 10.1007/978-3-319-63260-5_1.
- May, P. C., Robison, P., Fuson, K., Smalstig, B., Stephenson, D., Clemens, J. A. (1992) 'Sulfated glycoprotein-2 expression increases in rodent brain after transient global ischemia', *Molecular Brain Research*, 15(1), pp. 33–39. doi: [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90148-5).

- de Melo Martimiano, P. H., da Silva, G. R., Coimbra, V. F. da S. A., Matos, R. J. B., de Souza, B. F. P., da Silva, A. A. M., de Melo, D. D. C. B., de Souza, S. L., de Freitas, M. F. L. (2015) 'Perinatal malnutrition stimulates motivation through reward and enhances drd1a receptor expression in the ventral striatum of adult mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 134, pp. 106–114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.04.008>.
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., Meisel, A. (2013) 'Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function', *Trends in Neurosciences*, 36(10), pp. 587–597. doi: [10.1016/j.tins.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001).
- Meule, A., Gearhardt, A. (2014) 'Five years of the Yale Food Addiction Scale: Taking stock and moving forward', *Current Addiction Reports*, 1, pp. 193-205. doi: [10.1007/s40429-014-0021-z](https://doi.org/10.1007/s40429-014-0021-z).
- Morales, L., Pérez-García, C., Herradón, G., Alguacil, L. F. (2007) 'Place conditioning in a two- or three-conditioning compartment apparatus: a comparative study with morphine and U-50,488', *Addiction Biology*, 12(3-4), pp. 482–484. doi: [10.1111/j.1369-1600.2007.00071.x](https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00071.x).
- Moreno, C., Prada, D. M. (2004) 'Fisiopatología del dolor clínico', Asociación Colombiana de Neurología, Bogotá. Disponible en: <http://acnweb.org/guia/g3cap2.pdf>.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., Galler, J. R. (2002) 'Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(4), pp. 471–483. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00012-X).
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: [10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Muñoz-Rodríguez, J. R., Agarrado, A., Martín-Fernández, J., Salas, E., González-Martín, C., Alguacil, L. F. (2018) 'Cocaine and amphetamine regulated transcript and brain-derived neurotrophic factor in morbid obesity. One-year follow-up after gastric bypass', *Surgery for Obesity and Related Diseases* (en prensa). doi: <https://doi.org/10.1016/j.soard.2018.07.026>.
- Narouze, S., Souzalnitski, D. (2015) 'Obesity and Chronic Pain: Systematic Review of Prevalence and Implications for Pain Practice', *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 40(2), pp. 91-111. Disponible en: https://journals.lww.com/rapm/Fulltext/2015/03000/Obesity_and_Chronic_Pain__Systematic_Review_of.1.aspx.
- Nathan, P. J., Bullmore, E. T. (2009) 'From taste hedonics to motivational drive: central μ -opioid receptors and binge-eating behaviour', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(7), pp. 995–1008. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1017/S146114570900039X](https://doi.org/10.1017/S146114570900039X).
- Nestler, E. J. (2004) 'Molecular Mechanisms of Drug Addiction', *Neuropharmacology*, 47(1), pp. 24–32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.031>.
- Nestler, E. J. (2005) 'The Neurobiology of Cocaine Addiction', *Science & Practice Perspectives*, 3(1), pp. 4–10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851032/>.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany E C, Biryukov S, Abbafati C, Abera S F, Abraham J P, Abu-Rmeileh N M, Achoki T, AlBuhairan F S, Alemu Z A, Alfonso R, Ali M K, Ali R, Guzman N A, Ammar W, Anwar P, Banerjee A, Barquera, G. H. *et al.* (2014) 'Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013', *The Lancet*, 384(9945), pp. 766–781. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8).

- Nizard, P., Tetley, S., Le, Y., Watrin, T., Goff, P. Le, Wilson, M. R., Michel, D. (2007) 'Stress-Induced Retrotranslocation of Clusterin / ApoJ into the Cytosol', *Traffic*, 8(5), pp. 554–565. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x.
- O'Flaherty, L., Adam, J., Heather, L. C., Zhdanov, A. V., Chung, Y.-L., Miranda, M. X., Croft, J., Olpin, S., Clarke, K., Pugh, C. W., Griffiths, J., Papkovsky, D., Ashrafian, H., Ratcliffe, P. J., Pollard, P. J. (2010) 'Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism', *Human Molecular Genetics*, 19(19), pp. 3844–3851. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq305>.
- Oberbach, A., Blüher, M., Wirth, H., Till, H., Kovacs, P., Kullnick, Y., Schlichting, N., Tomm, J. M., Rolle-Kampczyk, U., Murugaiyan, J., Binder, H., Dietrich, A., Bergen, M. von (2011) 'Combined Proteomic and Metabolomic Profiling of Serum Reveals Association of the Complement System with Obesity and Identifies Novel Markers of Body Fat Mass Changes', *Journal of Proteome Research*, 10(10), pp. 4769–4788. doi: 10.1021/pr2005555.
- Obrosova, I. G., Ilnytska, O., Lyzogubov, V. V., Pavlov, I. A., Mashtalir, N., Nadler, J. L., Drel, V. R. (2007) 'High-Fat Diet-Induced Neuropathy of Pre-Diabetes and Obesity', *Diabetes*, 56(10), pp. 2598-2608. Disponible en: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/56/10/2598.abstract>.
- Oh, Y. M., Ma, T. Z., Kwak, Y. G., Eun, J. P. (2013) 'Proteomic evaluation to identify biomarkers for carpal tunnel syndrome: A comparative serum analysis', *Connective Tissue Research*, 54(1), pp. 76–81. doi: 10.3109/03008207.2012.746320.
- Opolski, M., Chur-Hansen, A., Wittert, G. (2015) 'The eating-related behaviours, disorders and expectations of candidates for bariatric surgery', *Clinical Obesity*, 5(4), pp. 165–197. doi: 10.1111/cob.12104.
- Palmiter, R. D. (2007) 'Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior?', *Trends in Neurosciences*, 30(8), pp. 375–381. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.004>.
- Paniagua, N., Girón, R., Goicoechea, C., López-Miranda, V., Vela, J. M., Merlos, M., Martín Fontelles, M. I. (2017) 'Blockade of sigma 1 receptors alleviates sensory signs of diabetic neuropathy in rats', *European Journal of Pain*, 21(1), pp. 61–72. doi: 10.1002/ejp.897.
- Park, C. H., Kim, Y. S., Lee, H. K., Kim, Y. H., Choi, M. Y., Jung, D. E., Yoo, J. M., Kang, S. S., Choi, W. S., Cho, G. J. (2007) 'Citicoline Reduces Upregulated Clusterin Following Kainic Acid Injection in the Rat Retina', *Current Eye Research*, 32(12), pp. 1055–1063. doi: 10.1080/02713680701758719.
- Pascual, D., Goicoechea, C., Suardiaz, M., Martín, M. I. (2005) 'A cannabinoid agonist, WIN 55,212-2, reduces neuropathic nociception induced by paclitaxel in rats', *Pain*, 118(1–2), pp. 23–34. doi: 10.1016/j.pain.2005.07.008.
- Pascual, D., Goicoechea, C., Burgos, E., Martín, M. I. (2010) 'Antinociceptive effect of three common analgesic drugs on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95(3), pp. 331–337. doi: 10.1016/j.pbb.2010.02.009.
- Pereira, R. M., Mekary, R. A., Cruz Rodrigues, K. C., Anaruma, C. P., Ropelle, E. R., Silva, A. S. R., Cintra, D. E., Pauli, J. R., Moura, L. P. (2018) 'Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes', *Heart Failure Reviews*, 23(1), pp. 123-129. doi: 10.1007/s10741-017-9654-z.
- Pérez-Ortiz, J. M., Galiana-Simal, A., Salas, E., González-Martín, C., García-Rojo, M., Alguacil, L. F. (2016) 'A high-fat diet combined with food deprivation increases food seeking and the expression of candidate biomarkers of addiction', *Addiction Biology*, 22(4), pp. 1002–1009. doi: 10.1111/adb.12389.

- Petropoulou, C., Trougakos, I. P., Kolettas, E., Toussaint, O., Gonos, E. S. (2001) 'Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts', *FEBS Letters*, 509(2), pp. 287–297. doi: S0014-5793(01)03150-7 [pii].
- Potenza, M. N. (2014) 'Obesity, food, and addiction: Emerging neuroscience and clinical and public health implications', *Neuropsychopharmacology*, 39(1), pp. 249–250. doi: 10.1038/npp.2013.198.
- Pratchayasakul, W., Kerdphoo, S., Petsophonakul, P., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. C. (2011) 'Effects of high-fat diet on insulin receptor function in rat hippocampus and the level of neuronal corticosterone', *Life Sciences*, 88(13), pp. 619–627. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.02.003>.
- Pursey, M. K., Stanwell, P., Gearhardt, N. A., Collins, E. C., Burrows, L. T. (2014) 'The Prevalence of Food Addiction as Assessed by the Yale Food Addiction Scale: A Systematic Review', *Nutrients*, 6(10), pp. 4552–4590. doi: 10.3390/nu6104552.
- Rahn, E. J., Makriyannis, A., Hohmann, A. G. (2007) 'Activation of cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors suppresses neuropathic nociception evoked by the chemotherapeutic agent vincristine in rats', *British Journal of Pharmacology*, 152(5), pp. 765–777. doi: 10.1038/sj.bjp.0707333.
- Rohne, P., Prochnow, H., Koch-Brandt, C. (2016) 'The CLU-files : disentanglement of a mystery', *Biomolecular Concepts*, 7(1), pp. 1–15. doi: 10.1515/bmc-2015-0026.
- Rosmond, R., Björntorp, P. (2001) 'The hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke', *Journal of Internal Medicine*, 247(2), pp. 188–197. doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00603.x.
- Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. (1983) 'Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells', *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4), pp. 741–747. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/71.4.741>.
- Schwochau, G. B., Nath, K. A., Rosenberg, M. E. (1998) 'Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties', *Kidney International*, 53(6), pp. 1647–1653. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00902.x>.
- da Silva, A. A. M., Borba, T. K. F., de Almeida Lira, L., Cavalcante, T. C. F., de Freitas, M. F. L., Leandro, C. G., do Nascimento, E., De Souza, S. L. (2013) 'Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(5), pp. 334–341. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.05.001.
- da Silva, A. A. M., Oliveira, M. M., Cavalcante, T. C. F., do Amaral Almeida, L. C., de Souza, J. A., da Silva, M. C., de Souza, S. L. (2016) 'Low protein diet during gestation and lactation increases food reward seeking but does not modify sucrose taste reactivity in adult female rats', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 49, pp. 50–59. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.01.004.
- Singh, S. P., Pullen, G. L., Snyder, A. K. (1988) 'Effects of ethanol on fetal fuels and brain growth in rats', *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 112(6), pp. 704–710. doi: 10.5555/uri:pii:0022214388903095.
- Small, D. M., Jones-Gotman, M., Dagher, A. (2003) 'Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers', *NeuroImage*, 19(4), pp. 1709–1715. doi: [https://doi.org/10.1016/S1053-8119\(03\)00253-2](https://doi.org/10.1016/S1053-8119(03)00253-2).

- Souza, C. G., Moreira, J. D., Siqueira, I. R., Pereira, A. G., Rieger, D. K., Souza, D. O., Souza, T. M., Portela, L. V., Perry, M. L. S. (2007) 'Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior', *Life Sciences*, 81(3), pp. 198–203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.001>.
- Steele, C. C., Pirkle, J. R. A., Kirkpatrick, K. (2017) 'Diet-induced impulsivity: Effects of a high-fat and a high-sugar diet on impulsive choice in rats', *PLoS ONE*, 12(6), pp. 1–17. doi: [10.1371/journal.pone.0180510](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180510).
- Steffen, K., G. Engle, S., Wonderlich, J., Pollert, G., Sondag, C. (2015) 'Alcohol and Other Addictive Disorders Following Bariatric Surgery: Prevalence, Risk Factors and Possible Etiologies', *European Eating Disorders Review*, 23(6), pp. 442-450. doi: [10.1002/erv.2399](https://doi.org/10.1002/erv.2399).
- Stevens, G. A., Singh, G. M., Lu, Y., Danaei, G., Lin, J. K., Finucane, M. M., Bahalim, A. N., McIntire, R. K., Gutierrez, H. R., Cowan, M., Paciorek, C. J., Farzadfar, F., Riley, L., Ezzati, M., Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index) (2012) 'National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences', *Population Health Metrics*, 10(1), p. 22. doi: [10.1186/1478-7954-10-22](https://doi.org/10.1186/1478-7954-10-22).
- Thompson, S. J., Pitcher, M. H., Stone, L. S., Tarum, F., Niu, G., Chen, X., Kiesewetter, D. O., Schweinhardt, P., Bushnell, M. C. (2018) 'Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat', *Pain*, 159(9), pp. 1856–1866. doi: [10.1097/j.pain.0000000000001282](https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001282).
- Tonkiss, J., Shukitt-Hale, B., N. Formica, R., J. Rocco, F., Galler, J. (1990) 'Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats', *Physiology & Behavior*, 48(5), pp. 675–680. doi: [10.1016/0031-9384\(90\)90210-U](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90210-U).
- Trougakos, I. P., Gonos, E. S. (2006) 'Regulation of clusterin / apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases', *Free Radical Research*, 40(12), pp. 1324–1334. doi: [10.1080/10715760600902310](https://doi.org/10.1080/10715760600902310).
- Trougakos, I. P., Lourda, M., Antonelou, M. H., Kletsas, D., Gorgoulis, V. G., Papassideri, I. S., Zou, Y., Margaritis, L. H., Boothman, D. A., Gonos, E. S. (2009) 'Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-bax protein complex', *Clinical Cancer Research*, 15(1), pp. 48–59. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-08-1805](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1805).
- Valdomero, A., Bussolino, D. F., Orsingher, O. A., Cuadra, G. R. (2006) 'Perinatal protein malnutrition enhances rewarding cocaine properties in adult rats', *Neuroscience*, 137(1), pp. 221–229. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.055>.
- Valdomero, A., Velazquez, E. E., de Olmos, S., De Olmos, J. S., Orsingher, O. A., Cuadra, G. R. (2007) 'Increased rewarding properties of morphine in perinatally protein-malnourished rats', *Neuroscience*, 150(2), pp. 449–458. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.006>.
- Varela-Moreiras, G., Alguacil Merino, L.F., Alonso Aperte, E. et al. (2013) 'Obesity and sedentarism in the 21 st century : what can be done and what must be done ?', *Nutrición Hospitalaria*, 28(Suppl. 5), pp. 1–12. doi: [10.3305/nh.2013.28.sup5.6869](https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.sup5.6869).
- Villacres, C., Tayi, V., Lattová, E., Perreault, H., Butler, M. (2015) 'Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture', *Biotechnology Journal*, 10(7), pp. 1051-1610. doi: [10.1002/biot.201400662](https://doi.org/10.1002/biot.201400662).
- Virtue, S., Vidal-Puig, A. (2008) 'It's Not How Fat You Are, It's What You Do with It That Counts', *PLoS Biology*, 6(9), p. e237. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060237>.

- Volkow, N. D., O'Brien, C. P. (2007) 'Issues for DSM-V: Should obesity be included as a brain disorder?', *American Journal of Psychiatry*, 164(5), pp. 708–710. doi: 10.1176/ajp.2007.164.5.708.
- Volkow, N., Wang, G.-J., Tomasi, D., Baler, R. (2013) 'The Addictive Dimensionality of Obesity', *Biological Psychiatry*, 73(9), pp. 811-818. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.12.020.
- Vucetic, Z., Totoki, K., Schoch, H., Whitaker, K. W., Hill-Smith, T., Lucki, I., Reyes, T. M. (2010) 'Early life protein restriction alters dopamine circuitry', *Neuroscience*, 168(2), pp. 359–370. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.010.
- Wang, G.-J., Volkow, N. D., Thanos, P. K., Fowler, J. S. (2004) 'Similarity Between Obesity and Drug Addiction as Assessed by Neurofunctional Imaging', *Journal of Addictive Diseases*, 23(3), pp. 39–53. doi: 10.1300/J069v23n03_04.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante Jr., A. W. (2003) 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp. 1796–1808. doi: 10.1172/JCI19246.
- Wilson, M. R., Zoubeidi, A. (2017) 'Clusterin as a therapeutic target', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(2), pp. 201–213. doi: 10.1080/14728222.2017.1267142.
- Won, J. C., Park, C.-Y., Oh, S. W., Lee, E. S., Youn, B.-S., Kim, M.-S. (2014) 'Plasma Clusterin (ApoJ) Levels Are Associated with Adiposity and Systemic Inflammation', *PLoS ONE*, 9(7), p. e103351. doi: 10.1371/journal.pone.0103351.
- Xie, Z., Harris-White, M., Wals, P.A., Frautschy, S.A., Finch, C.E., Morgan, T.E. (2005) 'Apolipoprotein J (clusterin) activates rodent microglia in vivo and in vitro', *Journal of Neurochemistry*, 93(4), pp. 1038-1046. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03065.x.
- Yogev, O., Naamati, A., Pines, O. (2011) 'Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions', *The FEBS Journal*, 278(22), pp. 4230–4242. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08359.x.
- Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R., Wang, C. (2005) 'Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax', *Nature Cell Biology*, 7(9), pp. 909-915. doi: 10.1038/ncb1291.
- Zheng, H., Berthoud, H.-R. (2007) 'Eating for pleasure or calories', *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), pp. 607–612. doi: 10.1016/j.coph.2007.10.011.
- Zhu, Y., Han, S., Zhao, H., Liang, J., Zhai, J., Wu, Z., Qiu, G. (2011) 'Comparative analysis of serum proteomes of degenerative scoliosis', *Journal of Orthopaedic Research*, 29(12), pp. 1896–1903. doi: 10.1002/jor.21466.
- Zinkie, S., Gentil, B. J., Minotti, S., Durham, H. D. (2013) 'Expression of the protein chaperone, clusterin, in spinal cord cells constitutively and following cellular stress, and upregulation by treatment with Hsp90 inhibitor', *Cell Stress & Chaperones*, 18(6), pp. 745–758. doi: 10.1007/s12192-013-0427-x.