

ÍNDICE

Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XV
Abreviaturas	XVI

I. Introducción general	1
1.- Receptores nucleares	1
2.- PPAR: Aspectos moleculares.....	6
2.1.- Isoformas del PPAR.....	7
2.2.- PPAR: Estructura y actividad.....	8
2.2.1.- Dominio A/B.....	9
2.2.2.- Dominio de unión al ADN (DBD).....	10
2.2.2.1.- Reacción hormonal cruzada.....	11
2.2.2.1.1.- Reacción cruzada a nivel de la unión al ADN.....	11
2.2.2.1.2.- Reacción cruzada por competición en la unión al RXR.....	13
2.2.3.- Dominio de unión al ligando (LBD).....	13
2.2.3.1.- Especificidad de los ligandos del PPAR.....	14
2.2.3.2.- Ligandos específicos del RXR.....	19
2.3.- Modulación de la transcripción por PPAR.....	20
3.- PPAR: Aspectos fisiológicos	22
3.1.- Expresión tisular del PPAR.....	22
3.2.- Funciones generales de las isoformas del PPAR	25
3.2.1.- PPAR y la homeostasis lipídica	25
3.2.2.- PPAR y la homeostasis glucídica.....	26
3.3.- Funcionalidad del subtipo alfa del PPAR (PPAR α).....	27
3.3.1.- Metabolismo lipídico hepático y genes diana del PPAR α	27
3.3.1.1.- Regulación del metabolismo de las lipoproteínas.....	28
3.3.1.1.1.- PPAR α y metabolismo de las VLDL.....	29
3.3.1.1.2.- PPAR α y metabolismo de las HDL.....	33

3.3.1.2.- Regulación de la captación de los ácidos grasos por la célula	35
3.3.1.3.- Regulación intracelular del metabolismo lipídico.....	37
3.3.1.3.1.- Regulación del metabolismo lipídico mitocondrial	37
3.3.1.3.2.- Regulación del metabolismo lipídico peroxisomal	40
3.3.1.3.3.- Regulación del metabolismo lipídico microsomal	42
3.3.1.3.4.- Regulación de la síntesis de ácidos grasos	43
3.3.2. Metabolismo glucídico hepático y genes diana del PPAR α	43
3.4.- Regulación de la expresión del PPAR α	47
4.- Bibliografía	49
II. Objetivos generales.....	71
III. Materiales y Métodos.....	73
1.- Animales y condiciones experimentales	73
1.1.- Sacrificio y recogida de las muestras	73
2.- Determinaciones de parámetros plasmáticos	74
2.1.- Determinación de glucosa	74
2.2.- Determinación de ácidos grasos libres	74
2.3.- Determinación de triglicéridos	74
2.4.- Determinación de colesterol.....	74
2.5.- Determinación de insulina.....	74
2.5.1.- Técnica de radioinmunoensayo (RIA)	75
2.5.2.- Técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA).....	75
2.6.- Determinación de β -hidroxibutirato	76
2.7.- Separación secuencial de lipoproteínas.....	76
3.- Determinaciones de parámetros tisulares	77
3.1.- Determinación de proteínas.....	77
3.2.- Determinación de lípidos	77
3.2.1.- Extracción de lípidos	78
3.2.2.- Separación de las fracciones lipídicas.....	78
3.2.2.1.- Análisis de imagen y cuantificación de lípidos	78
3.3.- Determinación de la actividad de la lipoproteína lipasa.....	79

4.- Análisis de expresión génica: ARN	80
4.1.- Preparación del ADN recombinante	80
4.1.1.- Preparación de las bacterias	80
4.1.2.- Transformación bacteriana.....	80
4.1.3.- Obtención del ADN recombinante.....	81
4.1.4.- Electroforesis en gel de agarosa.....	83
4.1.5.- Digestión del ADN mediante endonucleasas de restricción	83
4.1.5.1.- Sondas de ADN.....	84
4.1.5.2.- Marcaje radiactivo de las sondas.....	86
4.2.- Obtención y preparación del ARN tisular.....	86
4.2.1.- Obtención del ARN total.....	86
4.2.2.- Electroforesis en gel desnaturalizante.....	87
4.2.3.- Análisis del ARN	87
4.2.3.1.- Análisis del ARN por <i>dot blot</i>	87
4.2.3.2.- Análisis del ARN por <i>Northern blot</i>	88
4.2.3.3.- Hibridación.....	89
4.2.3.3.1.- Autorradiografía y densitometría	89
5.- Análisis de expresión génica: proteínas	90
5.1.- Obtención y preparación de los extractos proteicos.....	90
5.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	90
5.3.- Análisis de proteínas por transferencia e inmunodetección: <i>Western blot</i>	91
5.3.1.- Transferencia.....	91
5.3.2.- Inmunodetección	92
5.3.2.1.- Cuantificación de las bandas	93
6.- Análisis estadísticos y tratamiento de datos.....	93
7.- Bibliografía	94
IV. Capítulo 1: Expresión y actividad hepática del PPARα en ratas vírgenes y gestantes en función del tipo de grasa de la dieta	97
1.- Introducción	97
2.- Objetivos	102
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	102
3.1.- Diseño experimental.....	102

3.2.- Tratamiento estadístico	105
4.- Resultados	105
4.1.- Parámetros tisulares	105
4.1.1.- Expresión génica del PPAR α hepático tras la administración de diferentes dietas.....	105
4.1.1.1.- Expresión génica del PPAR α en ratas no gestantes.....	106
4.1.1.2.- Expresión génica del PPAR α en ratas gestantes.....	107
4.1.1.3.- Expresión génica del PPAR α en fetos	108
4.1.2.- Expresión génica de la acil-CoA oxidasa (ACO) peroxisomal hepática tras la administración de diferentes dietas.....	109
4.1.2.1.- Expresión génica de ACO en ratas no gestantes	109
4.1.2.2.- Expresión génica de ACO en ratas gestantes.....	110
4.1.2.3.- Expresión génica de ACO en fetos.....	111
4.1.3.- Expresión génica de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) hepática tras la administración de diferentes dietas..	112
4.1.3.1.- Expresión génica de PEPCK en ratas no gestantes	112
4.1.3.2.- Expresión génica de PEPCK en ratas gestantes	113
4.1.3.3.- Expresión génica de PEPCK en fetos.....	114
4.2.- Parámetros plasmáticos	114
4.3.- Análisis comparativo de la expresión génica en las diferentes condiciones fisiológicas estudiadas	117
5.- Discusión.....	118
6.- Bibliografía	122

V. Capítulo 2: Expresión y actividad del PPAR α en el hígado de ratas durante el desarrollo perinatal131

1.- Introducción	131
2.- Objetivos	134
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	135
3.1.- Diseño experimental.....	135
3.2.- Tratamiento estadístico	136
4.- Resultados	137

4.1.- Parámetros tisulares	137
4.1.1.- Expresión génica a nivel hepático durante la etapa perinatal	137
4.1.2.- Proteína PPAR α	139
4.1.3.- Composición lipídica del hígado.....	140
4.1.4.- Actividad hepática de la lipoproteína lipasa	142
4.2.- Parámetros plasmáticos	143
4.2.1.- Glucosa plasmática.....	143
4.2.2.- Insulina plasmática.....	144
4.2.3.- Ácidos grasos libres en plasma	144
4.2.4.- Triglicéridos y colesterol en plasma	145
5.- Discusión.....	148
6.- Bibliografía	153
VI. Capítulo 3: Efecto del destete sobre la expresión y actividad del PPARα en el hígado de ratas	159
1.- Introducción	159
2.- Objetivos	162
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	162
3.1.- Diseño experimental.....	162
3.2.- Tratamiento estadístico	163
4.- Resultados	164
4.1.- Parámetros tisulares	164
4.1.1.- Expresión génica del PPAR α	164
4.1.2.- Expresión génica de ACO peroxisomal	166
4.1.3.- Expresión génica de PEPCK.....	167
4.1.4.- Expresión génica de apo C-III.....	168
4.1.5.- Expresión génica de LPL	169
4.1.6.- Composición lipídica del hígado.....	170
4.1.7.- Actividad hepática de la lipoproteína lipasa	172
4.2.- Parámetros plasmáticos	173
4.2.1.- Glucosa plasmática.....	173
4.2.2.- Insulina plasmática.....	174

4.2.3.- Ácidos grasos libres en plasma	175
4.2.4.- Triglicéridos plasmáticos	176
5.- Discusión.....	177
6.- Bibliografía	181

VII. Capítulo 4: Efecto de la administración de distintos nutrientes sobre la expresión y actividad hepática del PPAR α en crías lactantes.....185

1.- Introducción	185
2.- Objetivos	186
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	187
3.1.- Diseño experimental.....	187
3.2.- Tratamiento estadístico	189
4.- Resultados	190
4.1.- Parámetros tisulares	190
4.1.1.- Expresión hepática del PPAR α	190
4.1.2.- Expresión hepática de ACO peroxisomal	191
4.1.3.- Expresión hepática de PEPCK	192
4.1.4.- Expresión hepática de LPL	193
4.1.5.- Contenido lipídico del hígado	194
4.1.6.- Actividad hepática de la lipoproteína lipasa	195
4.2.- Parámetros plasmáticos	196
4.2.1.- Glucosa plasmática.....	196
4.2.2.- Insulina plasmática.....	196
4.2.3.- Ácidos grasos libres en plasma	197
4.2.4.- Triglicéridos plasmáticos	198
4.2.5.- Seguimiento temporal de los parámetros plasmáticos en el grupo de crías que recibían glucosa.....	199
5.- Discusión.....	202
6.- Bibliografía	207

VIII. Capítulo 5: Efecto de la administración de distintos nutrientes sobre la expresión y actividad hepática del PPARα en ratas adultas	213
1.- Introducción	213
2.- Objetivos	218
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	218
3.1.- Diseño experimental.....	218
3.2.- Tratamiento estadístico	221
4.- Resultados	222
4.1.- Parámetros tisulares	222
4.1.1.- Proteína del PPAR α	222
4.1.2.- Expresión hepática del PPAR α	224
4.1.3.- Expresión hepática de ACO peroxisomal	225
4.1.4.- Expresión hepática de PEPCK.....	226
4.1.5.- Expresión hepática en los animales adultos tras un ayuno de 29 horas	227
4.2.- Parámetros plasmáticos	228
4.2.1.- Glucosa plasmática.....	228
4.2.2.- Insulina plasmática.....	229
4.2.3.- Ácidos grasos libres en plasma	230
4.2.4.- Triglicéridos plasmáticos	231
4.2.5.- β -hidroxibutirato plasmático	232
4.2.6.- Seguimiento temporal de los parámetros plasmáticos tras la administración de los distintos nutrientes	233
4.2.6.1.- Glucosa plasmática.....	233
4.2.6.2.- Insulina plasmática.....	234
4.2.6.3.- Ácidos grasos libres plasmáticos.....	236
4.2.6.4.- Triglicéridos plasmáticos	237
4.2.6.5.- β -hidroxibutirato plasmático	238
4.2.7.- Modificación de los parámetros plasmáticos por las sucesivas extracciones de sangre.....	240
5.- Discusión.....	242
6.- Bibliografía	246

IX. Capítulo 6: Expresión y actividad hepática del PPARα en un modelo de postmadurez en el feto de rata	251
1.- Introducción	251
2.- Objetivos	254
3.- Diseño experimental y tratamiento estadístico.....	255
3.1.- Diseño experimental.....	255
3.2.- Tratamiento estadístico	256
4.- Resultados	257
4.1.- Parámetros corporales	257
4.2.- Parámetros tisulares	258
4.2.1.- Expresión génica a nivel hepático del PPAR α	258
4.2.2.- Expresión génica a nivel hepático de ACO peroxisomal	260
4.2.3.- Expresión génica a nivel hepático de PEPCK.....	261
4.2.4.- Expresión génica a nivel hepático de LPL.....	263
4.3.- Parámetros plasmáticos	264
4.3.1.- Glucosa plasmática.....	264
4.3.2.- Insulina plasmática.....	265
4.3.3.- Ácidos grasos libres en plasma	266
4.3.4.- Triglicéridos plasmáticos	267
5.- Discusión.....	268
6.- Bibliografía	272
X. Conclusiones.....	275
XI. Trabajos publicados	

Panadero, M.I., Herrera, E., and Bocos, C. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor- α expression in rat liver during postnatal development. *Biochimie* **82**, 723-726.

Panadero, M.I., Vidal, H., Herrera, E., and Bocos, C. (2001) Nutritionally induced changes in the peroxisome proliferator-activated receptor- α gene expression in liver of suckling rats are dependent on insulinaemia. *Arch Biochem Biophys* **394**, 182-188.