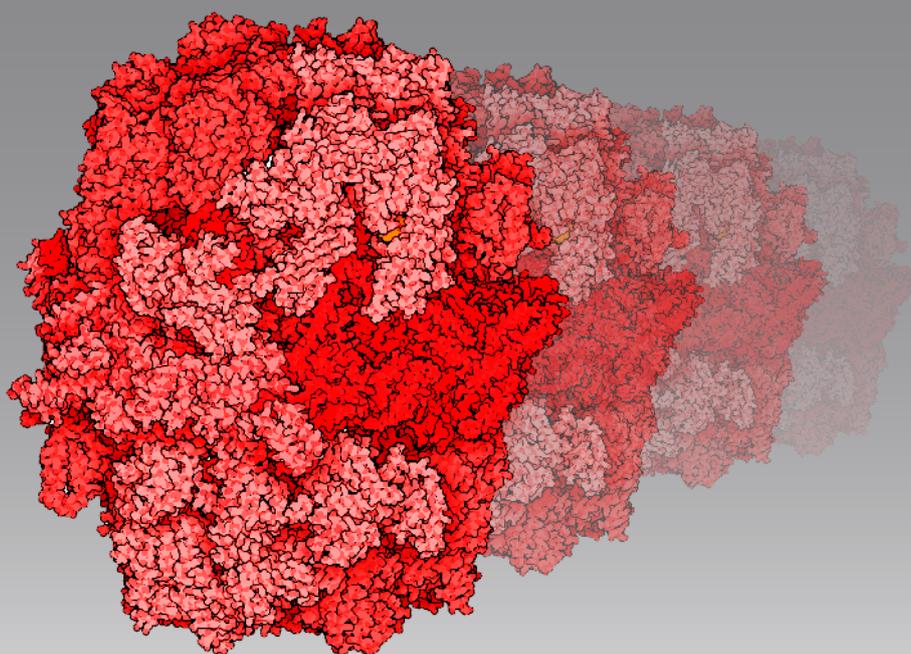


Mecanismos centrales y periféricos implicados en el desarrollo de obesidad por dietas ricas en grasa en roedores

TESIS DOCTORAL
Francisco Hernández Nuño de la Rosa



Universidad CEU-San Pablo
Facultad de Farmacia
Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud

Mecanismos centrales y periféricos implicados en el desarrollo de obesidad por dietas ricas en grasa en roedores

Memoria que presenta para optar al grado de Doctor por la
Universidad CEU-San Pablo

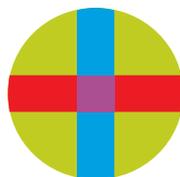
Francisco Hernández Nuño de la Rosa

Bajo la dirección de:

Prof. Dr. Mariano Ruiz Gayo

Dr^a. Julie Ann Chowen King

Octubre de 2015



Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud

Facultad de Farmacia

Universidad CEU-San Pablo

Diseño de portada:

Dr. Víctor González Ruiz & Francisco Hernández.

Imagen de portada:

Estructura química de la colecistoquinina 8. Estructura tridimensional de la sintasa de ácidos grasos (Tomado del Protein Data Bank). **Contraportada:** Esquema representativo de la reacción en cadena de la polimerasa. Representación de los niveles de expresión de mensajero de los genes *Bmal1* y *Per2*.

*A Verónica,
mis padres y mi hermana.*

“El que no es capaz de soñar, jamás realizará sus sueños”

Heráclito

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Universitaria San Pablo-CEU, el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-09714), el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-35353 y BFU2011-27492) y el CIBEROBN. Francisco Hernández Nuño de la Rosa ha sido becario de la Fundación Universitaria San Pablo-CEU desde octubre de 2010 hasta octubre de 2014.

Agradecimientos

Con esta tesis termina una de las etapas más intensas que he vivido, en la que he aprendido mucho de la ciencia y de la vida. Pero si hay algo que en este tiempo he podido constatar, es que un laboratorio no es algo inerte compuesto sólo por aparatos y reactivos. Un laboratorio es algo vivo formado por todas y cada una de las personas que trabajan en él. Cuando echo la vista atrás, en estos años no veo experimentos, reactivos o pipetas, sino los rostros de las personas que me han acompañado en este camino. Al pensar en este tiempo soy consciente de la suerte que he tenido por encontrarme con esas personas. Gracias a ellos soy lo que soy. Gracias a las buenas personas con las que me he encontrado, por enseñarme hacia dónde mirar y gracias a las no tan buenas por enseñarme el camino que debo evitar. Así, no puedo concluir esta etapa sin expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que, de una forma u otra, con su apoyo y colaboración, han contribuido a la realización de esta Tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis Directores el haberme enseñado y guiado en este camino, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciar mi carrera científica, por haberme acogido en vuestros laboratorios y por todo el cariño que me habéis demostrado estos años. Vuestro apoyo y comprensión han sido fundamentales a lo largo de este periodo de formación. A Julie por su optimismo y su capacidad para ver el lado bueno de las cosas, su capacidad de escuchar y su interés incondicional por mi trabajo. A Mariano, gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia, estar siempre dispuesto a tenderme una mano en los momentos difíciles y haber hecho de mí lo que soy. Esta tesis es tan mía como vuestra.

A la Fundación CEU-San Pablo por haberme concedido una Beca de Investigación y al Hospital Niño Jesús por haber puesto a mi alcance todos los medios técnicos necesarios, sin los cuales este trabajo no habría sido posible.

Gracias a todos aquellos con quien tuve la oportunidad de trabajar estos años. A todos mis queridos compañeros de la universidad por el compañerismo que me habéis brindado. A los que ya terminaron, por enseñarme y tratarme desde el principio como uno más, por vuestra paciencia y consideración conmigo: Alberto, Esther, Ismael, Marta y Paula; y a los que estáis ahora: Adrián, Carmen, Concha, Danila, Marta y Miriam por vuestro cariño y apoyo, por contagiarme ilusión y optimismo, y por todos los amables detalles y especial preocupación que me habéis demostrado en estos años.

A todos los profesores del Departamento, en especial a Beatriz S, Carmen G, Carmen P, Gonzalo, Lidia, Luis Fernando y Nuria, por vuestra cariñosa acogida cuando llegué, vuestra disposición para ayudarme y por vuestros consejos en estos años. Mención especial a Bea M y Mariví, por vuestra compañía en los buenos y malos momentos, por estar siempre cerca y por todo lo que hemos compartido en estos años. Gracias Mariví, por invitarme a participar en esta aventura, por ver en mí algo diferente. No se me olvidará nunca el día en que nos conocimos. No deja de asombrarme cómo algunos momentos de la vida que aparentemente son intrascendentes te cambian para siempre, ya que si no nos hubiéramos conocido seguro que esta tesis no existiría.

A todos mis queridos compañeros del Hospital Niño Jesús, ¡el primer día que fui nunca pensé que sería para tanto tiempo! Gracias por acogerme y tratarme como uno más desde el principio, todavía me cuesta creer que lo que comenzó siendo una corta estancia de tan sólo un par de días se convirtiera en años de trabajo juntos. Al profesor Dr. Jesús Argente, por haberme acogido en su laboratorio, su confianza, su apoyo y su interés en mi formación científica, que han sido muy importantes para mí. A David, Elena, Eva, Laura, Sandra y Vicente, por sus múltiples consejos, por prestarme vuestro tiempo cuando lo he necesitado y por vuestro apoyo y comprensión. A Ale, Esther, Paqui, Pilar, Puri y Vir, por demostrarme que hasta en los peores momentos se puede contar con vosotras, por transmitirme vuestra alegría y pasión por la ciencia. Gracias por haber sido mis amigas y confidentes y por haber estado ahí, tanto en lo personal como en lo profesional.

A todos los miembros del *Department of Comparative Medicine (Yale University School of Medicine)* por su amabilidad, su simpatía y por hacerme muy agradables los meses de mi estancia allí con ellos. Al profesor Dr. Tamas L. Horvath por aceptarme en su laboratorio, su apoyo y generosidad. A la Dra. Sabrina Diano por su ayuda, sus constantes orientaciones y consejos. A todos los postdoc por su supervisión y dedicación en las largas jornadas de trabajo: Luis, Jae, Marcelo D., Marco, Jing, Jung y Toda. Además, no puedo olvidarme de mis compañeros: Anthony, Kim, Marcelo Z. y Sung-Ho, gracias por enseñarme tanto, por vuestra compañía y por vuestra disponibilidad.

En el terreno personal, tengo que agradecerles a todos mis amigos su apoyo, paciencia y comprensión. A Ángel, Esperanza, Edu, Diego, Sara, Carlos, Simona, Jorge y Ana por estar siempre dispuestos a escucharme e interesarse por mis experimentos y mis animales, por los momentos de desconexión que hemos compartido: celebraciones, comidas, juegos, viajes... y porque sin vuestra compañía no habría sido capaz. A Elena y Víctor, por animarme a empezar, por no dejarme abandonar y por ayudarme a terminar. No tengo palabras para agradecerlos todo lo que he aprendido en estos años de vosotros.

Por encima de todo quiero dedicar esta tesis y dar las gracias a Vero por haber estado conmigo todos estos años, por compartir conmigo tu vida, animarme, cuidarme y quererme tanto. Gracias por tu paciencia y apoyo incondicional, por convertir lo malo en bueno y lo pesado en ligero. Puedo asegurar, sin temor a equivocarme, que sin ti nunca hubiera escrito esta tesis.

Y, por último, aunque deberían ser los primeros, a mis padres y mi hermana, por su confianza, apoyo, por darlo todo sin pedir nada y ser una inspiración para mí. Con especial cariño a mi tía Cecilia, por ser una gran confidente, y no perder nunca la fe en mí.

Para terminar, gracias a todos los que no menciono en estas líneas y han puesto su granito de arena en esta tesis.

Por todo esto muchísimas gracias a todos.

Tabla de contenido

Introducción general.....	1
1. La obesidad.....	2
2. La obesidad en investigación básica: modelos animales de obesidad	4
3. Regulación neuroendocrina del apetito y la saciedad: mantenimiento de la homeostasis energética	5
4. El hipotálamo	7
4.1. Regulación hipotalámica de la ingesta.....	8
4.2. Otras zonas implicadas en la regulación de la ingesta.....	13
5. El tejido adiposo	14
5.1. Tipos de tejido adiposo.....	15
5.2. El tejido adiposo como órgano endocrino.....	17
6. Metabolismo del tejido adiposo	20
6.1. Transporte de lípidos.....	20
6.2. Lipoproteína lipasa y ANGPTL4.....	21
6.3. Lipogénesis	25
Capítulo 1	31
1. Introducción.....	33
1.1. Colecistoquinina	33
1.2. Receptores de la CCK.....	34
1.3. Papel de la CCK en el control de la ingesta	35
1.4. La CCK y el metabolismo energético.....	36
2. Hipótesis y objetivos	39
3. Material y métodos	41
3.1. Diseño experimental.....	41
3.2. Determinaciones bioquímicas en plasma.....	42
3.3. Determinación del contenido total de lípidos en el tejido adiposo	45
3.4. Test de tolerancia a la glucosa.....	46
3.5. Determinación de proteínas mediante <i>western blotting</i>	46
3.6. Actividad enzimática de lipoproteína lipasa	48
3.7. Análisis de ARN mensajeros.....	49
3.8. Estadística	50

4. Resultados	51
4.1. Efecto de la CCK-8 sobre el peso corporal, ingesta de alimentos, peso del tejido adiposo e hígado y contenido en lípidos del tejido adiposo.....	51
4.2. Efecto de la CCK-8 sobre los parámetros plasmáticos.....	53
4.3. Test de tolerancia a glucosa.....	54
4.4. Efecto de la CCK-8 en el grado de fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (pAMPK) y de la proteína quinasa B (pAKT).....	55
4.5. Efecto de la CCK-8 sobre la actividad y la expresión de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo.....	56
4.6. Efecto de la CCK-8 sobre la expresión de <i>Angptl4</i>	57
4.7. Efecto de la CCK-8 sobre los niveles de ARNm de los transportadores de ácidos grasos FATP-1 y FAT/CD36.....	58
4.8. Efecto de la dieta sobre la expresión del CCK2R en el TAL.....	59
5. Discusión	61
Capítulo 2.....	65
1. Introducción.....	67
1.1. Los ritmos circadianos	67
1.2. Control funcional de los ritmos circadianos	68
1.3. El reloj biológico a nivel molecular.....	70
1.4. Efecto del patrón circadiano de la ingesta en los ritmos circadianos.....	72
1.5. El reloj biológico y la obesidad.....	73
2. Hipótesis y Objetivos.....	75
3. Material y métodos	77
3.1. Animales de experimentación.....	77
3.2. Determinación de la distribución de grasa corporal	79
3.3. Disección del cerebro para la obtención del hipotálamo.....	80
3.3. Bioquímica plasmática.....	80
3.4. Análisis de ARN mensajero.....	81
3.5. Análisis estadístico	82
4. Resultados	83
4.1. Efecto del tratamiento con una dieta HF durante 48 h.....	83
4.2. Efecto del ayuno sobre la expresión de genes tras 48 h de dieta HF y 12 h de ayuno	91

4.3. Efecto de la sincronización forzada tras 8 semanas de dieta HF	98
5. Discusión	109
5.1. Caracterizar el efecto de una dieta HF sobre la variación circadiana de parámetros biométricos.....	109
5.2. Investigar los cambios en los ritmos de los parámetros plasmáticos inducidos por el tratamiento con una dieta HF de manera aguda y a largo plazo.....	111
5.3. Estudiar la influencia de los ritmos biológicos y las dietas HF sobre la producción de mediadores inflamatorios circulantes e hipotalámicos.....	112
5.4. Evaluar el efecto del tratamiento dietético sobre los mecanismos hipotalámicos reguladores de la ingesta.....	113
5.5. Determinar los efectos inducidos en la expresión de los genes <i>clock</i> por la ingesta de una dieta rica en grasa.....	115
5.6. Analizar y comparar el efecto de la dieta HF sobre la FAS y enzimas implicados en la síntesis de NADPH.....	117
5.7. Consideraciones finales.....	118
Conclusiones	119
Bibliografía	123

Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de las vías por las cuales las señales de adiposidad y saciedad interactúan con los circuitos centrales implicados en la regulación de la homeostasis energética.....	7
Figura 2. Estructura del hipotálamo	8
Figura 3. Esquema del cerebro de rata que muestra las principales regiones del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos.....	9
Figura 4. Control de la homeostasis energética por las neuronas del núcleo arqueado	10
Figura 5. Integración de las vías neuronales implicadas en la recompensa y la regulación del balance energético por las neuronas del NAR.....	14
Figura 6. Mecanismo de acción de la UCP	16
Figura 7. Lipoproteínas y transporte de lípidos.....	21
Figura 8. Esquema del metabolismo de las lipoproteínas por la lipoproteína lipasa (LPL)	22
Figura 9. Síntesis de ácidos grasos.....	25
Figura 10. Regulación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en la síntesis de ácidos grasos.....	26
Figura 11. Esquema general de la ruta de las pentosas fosfato.....	28
Figura 12. Obtención de NADPH mediante el enzima málico.....	30
Figura 13. Secuencia de la CCK-8	33
Figura 14. Esquema del modelo experimental.....	42
Figura 15. Determinación de leptina por radioinmunoensayo.....	43
Figura 16. Determinación de insulina por ELISA “sándwich” directo.....	43
Figura 17. Determinación colorimétrica de glucosa.....	44
Figura 18. Determinación colorimétrica de TG	44
Figura 19. Determinación colorimétrica de NEFA.....	45
Figura 20. Esquema de la inmunodetección en <i>western blot</i>	47
Figura 21. Evolución del peso corporal (A) e incremento del peso (B) tras 8 semanas de dieta HF. Efecto del tratamiento dietético sobre la ingesta diaria de alimento (C) y sobre la ingesta calórica diaria (D)	51
Figura 22. Curva de glucemia tras una sobrecarga i.p. de 1g glucosa/Kg peso (A). Calculo del área bajo la curva (B).....	55
Figura 23. Efecto de la CCK sobre la fosforilación de AKT y AMPK en ratas control, HF-OP y HF-OR.....	56
Figura 24. Efecto de la CCK-8 sobre la actividad y la expresión de la LPL en ratas control, HF-OP y HF-OR.....	57
Figura 25. Efecto de la CCK-8 en la expresión de <i>Angptl4</i> y correlación entre expresión de <i>Angptl4</i> y actividad de la LPL en el TAL.....	59
Figura 26. Determinación del CCK2R en el TAL.....	60
Figura 27. Esquema de la entrada al NSQ y las vías de salida en el hipotálamo	70
Figura 28. Mecanismo molecular del reloj circadiano en los mamíferos	71
Figura 29. Esquema del modelo experimental 48 h con dieta HF.....	77
Figura 30. Esquema del modelo experimental 48 h con dieta HF y 12 h de ayuno.....	78
Figura 31. Representación del modelo experimental de sincronización forzada de la ingesta.....	79
Figura 32. Esquema de la disección del hipotálamo.....	80
Figura 33. Incremento del peso corporal tras 48 horas de dieta HF (A, B, C y D). Ingesta diaria de alimento e ingesta calórica diaria (E y F).....	83
Figura 34. Evolución del peso absoluto y relativo del TAS, TAL e hígado.....	84
Figura 35. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C).....	85
Figura 36. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF- α (D)	86
Figura 37. Niveles de expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en hipotálamo.....	87
Figura 38. Niveles de expresión de ARNm de <i>Agrp</i> (A), <i>Npy</i> (B) y <i>Pomc</i> (C).....	88

Figura 39. Niveles de expresión de ARNm de <i>Il-1β</i> (A) e <i>Il-6</i> (B)	88
Figura 40. Niveles de expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B) e <i>Me1</i> (C) en hipotálamo.....	89
Figura 41. Expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en TAS.....	90
Figura 42. Expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B) y <i>Me1</i> (C) en TAS.....	91
Figura 43. Incremento de peso (A). Pérdida de peso con el ayuno (B). Ingesta diaria de alimento (C). Ingesta calórica diaria (D).....	92
Figura 44. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C).....	93
Figura 45. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF-α (D).....	94
Figura 46. Niveles de expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en hipotálamo.....	95
Figura 47. Niveles de expresión de ARNm de <i>Agrp</i> (A), <i>Npy</i> (B) y <i>Pomc</i> (C) en hipotálamo	95
Figura 48. Niveles de expresión de ARNm de <i>Il-1β</i> (A) e <i>Il-6</i> (B) en hipotálamo.....	96
Figura 49. Niveles de expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B), y <i>Me1</i> en hipotálamo.....	96
Figura 50. Niveles de expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en TAS.....	97
Figura 51. Niveles de expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B) y <i>Me1</i> (C) en TAS.....	98
Figura 52. Evolución del peso corporal durante 8 semanas de dieta HF. (A, B, C y D).....	99
Figura 53. Evolución de la ingesta expresada en calorías	100
Figura 54. Evolución del peso absoluto y relativo del TAS, TAL e hígado tras 8 semanas de dieta HF	101
Figura 55. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C).....	102
Figura 56. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF-α (D).....	103
Figura 57. Expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en hipotálamo.....	104
Figura 58. Expresión de ARNm de <i>Agrp</i> (A), <i>Npy</i> (B) y <i>Pomc</i> (C) en hipotálamo.....	104
Figura 59. Expresión de ARNm de <i>Il-1β</i> (A) e <i>Il-6</i> (B) en hipotálamo.....	105
Figura 60. Expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B) y <i>Me1</i> (C) en hipotálamo.....	106
Figura 61. Expresión de ARNm de <i>Bmal1</i> (A), <i>Clock</i> (B) y <i>Per2</i> (C) en el TAS.....	107
Figura 62. Expresión de ARNm de <i>Fas</i> (A), <i>G6pdx</i> (B) y <i>Me1</i> (C) en TAS	108

Índice de Tablas

Tabla 1. Señales periféricas y centrales que regulan la ingesta de alimentos.....	6
Tabla 2. Perfil energético de las dietas utilizadas en los experimentos.....	41
Tabla 3. Sondas usadas para PCR cuantitativa de tejido adiposo lumbar.....	50
Tabla 4. Efecto de la CCK-8 en el peso corporal y la ingesta de alimentos	52
Tabla 5. Efectos de la CCK-8 sobre el peso, contenido de lípidos y lípidos totales en diferentes tejidos adiposos blancos e hígado	53
Tabla 6. Efecto del tratamiento con CCK-8 en parámetros plasmáticos nocturnos (24:00 h)	53
Tabla 7. Efecto del tratamiento con CCK-8 en parámetros plasmáticos diurnos (12:00 h).....	54
Tabla 8. Grupos experimentales.....	79
Tabla 9. Límites de sensibilidad y coeficientes de variación del inmunoensayo múltiple en suspensión.....	81
Tabla 10. Sondas usadas para PCR cuantitativa	82
Tabla 11. Peso de tejidos adiposos e hígado	92

Abreviaturas

- ACC:** Acetil-CoA carboxilasa.
ACTH: Hormona adrenocorticotropa.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
ADP: Adenosina difosfato.
AG: Ácidos grasos.
AgRP: Péptido relacionado con la proteína agoutí.
AHL: Área hipotalámica lateral.
AKT: Proteína-quinasa B.
AMPc: Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico.
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP.
ANGPTL4: *Angiopoietin-like 4*.
ANOVA: Análisis de la varianza.
APO: Apolipoproteína.
APOV: Área preóptica ventrolateral.
ARN: Ácido ribonucleico.
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
ATP: Adenosina trifosfato.
ATV: Área tegmental ventral.
AUC: Área bajo la curva.
BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro.
BHE: Barrera hematoencefálica.
BMAL1: *Brain and Muscle ARNT-Like protein 1*.
CART: Tránsito regulado por cocaína y anfetamina.
CCK: Colecistoquinina.
CCK2R: Receptor CCK-2.
CoA: Coenzima A.
CPT: Carnitín palmitoil transferasa.
CRH: Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa.
CRY: *Cryptochrome*.
DAG: Diacilglicerol.
DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa.
DIO: Diet-induced obesity.
E.E.M.: Error estándar de la media.
FAS: Sintasa de ácidos grasos.
FAT/CD36: Translocasa de ácidos grasos.
FATP-1: Proteína transportadora de ácidos grasos 1.
G6PD: Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa.
GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1.
GPIHBP1: *Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1*.
HDL: Lipoproteína de alta densidad.
HF: *High fat*.
icv: Intracerebroventricular.
ip: Intraperitoneal.
IL: Interleuquina.
IMC: Índice de masa corporal.
JAK: *Janus* quinasa.
KO: *Knock-out*.
LDL: Lipoproteína de baja densidad.
LPL: Lipoproteína lipasa.
MC4R: Receptor de melanocortina 4.
MCH: Hormona concentradora de melanina.
ME1: Enzima málico citosólico.
MSH: Hormona estimuladora de melanocitos.
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido.
NAR: Núcleo arqueado del hipotálamo.
NDM: Núcleo dorsomedial del hipotálamo.
NEFA: Ácidos grasos libres no esterificados.
NPV: Núcleo paraventricular del hipotálamo.
NPY: Neuropeptido Y.
NSQ: Núcleo supraquiasmático.
NTS: Núcleo del tracto solitario.
NVM: Núcleo ventromedial del hipotálamo.
ObR: Receptor de leptina.
OLEFT: *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty*.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
OP: Resistente al desarrollo de obesidad (*obesity prone*).
OR: Sensible al desarrollo de obesidad (*obesity resistant*).
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PER: *Period*.
PGK1: Fosfoglicerato quinasa 1.
PKA: Proteína quinasa A.
PKC: Proteína quinasa C.
PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas.
POMC: Proopiomelanocortina.
PYY₃₋₃₆: Péptido YY₃₋₃₆.
r.p.m.: Revoluciones por minuto.

REV-ERB α : *Reverse erythroblastosis virus α* .

ROR α : Receptor huérfano asociado a retinoide α .

RTI: Restricción temporal de la ingesta.

SF-1: Factor esteroideogénico tipo 1.

SNC: Sistema nervioso central.

SREBP1C: *Sterol regulatory element-binding protein 1C*.

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.

TA: Tejido adiposo.

TG: Triglicéridos.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

TRH: Hormona liberadora de tirotropina.

UCP: *Uncoupling protein*. Proteína desacopladora.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

VMN: Núcleo ventromedial del hipotálamo.

WT: *Wild-type*.

ZSP: Zona subparaventricular.

El resto de abreviaturas son de uso común o se detallan el texto.

Introducción general

1. La obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La obesidad es consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo, es decir, responde al desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, entendiéndose por gasto energético la suma de la actividad física, el metabolismo basal y la termogénesis adaptativa. Este equilibrio está influido por factores internos de tipo genético y hormonal, así como por factores externos de tipo nutricional, ambiental y psicosocial (Raj & Kumar 2010).

Para identificar en adultos el sobrepeso y la obesidad se utiliza el índice de masa corporal (IMC), que es un indicador simple que relaciona el peso y la talla. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilogramos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Según la OMS, un $\text{IMC} \geq 25$ se considera sobrepeso, y un $\text{IMC} \geq 30$ obesidad (WHO 2013).

La obesidad es un importante problema de salud pública debido al aumento de su incidencia en la población infantil-juvenil y al elevado gasto económico que supone, entre otras razones, por su asociación con otras enfermedades. La obesidad supone un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas, como apnea del sueño, osteoartritis, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Crowley 2008).

En la actualidad la obesidad se considera una epidemia causante del 5% de las muertes a nivel mundial. Cada año mueren al menos 2,8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso o la obesidad (Pérez Rodrigo 2013). Según los datos de la OMS, en los últimos 30 años se ha duplicado el número de personas con obesidad en todo el mundo. En 2010, una de cada diez personas de la población adulta mundial era obesa (WHO 2013). Según las estimaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), en los países europeos hasta un 6% del presupuesto sanitario se destina al tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad. Se estima que el coste sanitario de una persona obesa es un 25% más alto que el de una persona con normopeso (OECD 2010).

En Europa, la prevalencia de la obesidad infantil ha triplicado sus cifras en las últimas décadas, pasando de un 6% en los años 80, a un 19% a lo largo de la primera década del siglo XXI (Ogden *et al.* 2012). En 2011 se llevó a cabo en España el estudio de vigilancia del crecimiento "ALADINO" (ALimentación, Actividad física, Desarrollo INfantil y Obesidad) cuyo objeto de estudio fue la población infantil entre 6 y 9,9 años de edad. Los datos obtenidos (tomando como referencia los estándares de la OMS) revelaron una prevalencia de sobrepeso en España del 26,3% en niños y del 25,9% en niñas. La prevalencia de obesidad fue del 22% en niños y del 16,2% en niñas (Pérez-Farinós *et al.* 2013). Según los datos de la OCDE, las tasas de obesidad son más altas en España que la media de los países miembros de la OCDE, tanto en adultos como en niños. Según esta organización, uno de cada seis adultos es obeso en España y más del 50% tienen sobrepeso/obesidad. Además, los datos más recientes muestran que la proporción de adultos

con sobrepeso está aumentando. En cuanto a obesidad, se han observado grandes diferencias sociales, existiendo una relación inversa entre la tasa de obesidad y el nivel educativo. Además, esta relación se incrementa en el caso de las mujeres (OECD 2014).

La obesidad es una enfermedad multifactorial, resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales (Barness *et al.* 2007). En la actualidad, el estilo de vida sedentario y el consumo de comidas precocinadas o comidas ricas en grasas saturadas parecen ser las principales causas de obesidad. La obesidad afecta principalmente a aquellos individuos predispuestos genéticamente y expuestos a condiciones ambientales que favorezcan su desarrollo, como una dieta hipercalórica y un marcado sedentarismo (Argente *et al.* 1997; Raj & Kumar 2010).

2. La obesidad en investigación básica: modelos animales de obesidad

Los modelos animales ofrecen una herramienta muy útil para el estudio de la obesidad. Existen diferentes modelos animales para el estudio de la obesidad en roedores, entre los que destacan los siguientes: i) el **ratón *ob/ob***, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Ob* que le impide producir leptina funcional (Lindström 2007; Drel *et al.* 2006); ii) el **ratón *db/db*** que presenta una mutación en el gen que codifica la síntesis del receptor de leptina (Hummel *et al.* 1966); iii) la **rata Zucker *fafa*** que presenta una mutación en la isoforma larga del receptor Ob (ObRb), implicado en la señalización intracelular de la leptina (Bray 1977; Conti *et al.* 2004; Stapleton *et al.* 2008); iv) la **rata obesa espontáneamente hipertensa** (*Spontaneously Hypertensive Obese Rat*, SHROB) que desarrolla hipertensión espontánea, resistencia a insulina y obesidad (Mukaddam-Daher *et al.* 2003); y v) la **rata Otsuka Long Evans Tokushima Fatty** (OLETF) que desarrolla obesidad, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Moran & Bi 2006; Schroeder *et al.* 2009). Sin embargo, estas modificaciones genéticas son poco frecuentes en el hombre, por lo que estos modelos resultan poco representativos de lo que sucede en la obesidad humana. Una alternativa al uso de estos animales es el empleo de modelos de obesidad inducida por la dieta (*Diet-Induced Obesity*, DIO), que permite obtener un fenotipo obeso mediante la alimentación con una dieta rica en grasas saturadas (dietas *high-fat*, HF). La obtención de este fenotipo está determinada principalmente por la especie, la cepa, el sexo, la edad, la composición de la dieta y la duración del tratamiento dietético.

El modelo más utilizado para el desarrollo de DIO es el ratón de la cepa C57BL/6J. Del mismo modo que ocurre en humanos obesos, cuando estos animales se someten a un tratamiento con dietas HF desarrollan obesidad, hiperinsulinemia e hiperglucemia y resistencia a insulina (Rebuffé-Scrive *et al.* 1993; Surwit *et al.* 1995; Nishikawa *et al.* 2007). El consumo de estas dietas durante 2 semanas en ratones recién destetados es suficiente para producir un incremento del peso corporal, de los tejidos adiposos y de los niveles plasmáticos de leptina, así como resistencia a esta hormona (Van Heek *et al.* 1997). Además, el modelo DIO es susceptible de desarrollar hiperglucemia e hiperinsulinemia. El consumo durante 3 semanas de estas dietas se asocia con el desarrollo de resistencia a insulina a nivel periférico, hiperleptinemia e incremento del contenido graso en hígado y músculo esquelético (S.-Y. Park *et al.* 2005; Nishikawa *et al.* 2007).

En el caso de la rata, una de las cepas más utilizadas es la *Sprague-Dawley*, en la que se ha observado que la alimentación con dieta HF genera dos fenotipos diferentes, apareciendo un grupo sensible al desarrollo de obesidad (*obesity prone*, OP) que aumenta su peso con el tratamiento dietético, y otro grupo resistente al desarrollo de obesidad (*obesity resistant*, OR) (Levin *et al.* 1997; Levin & Keesey 1998). Aunque las bases fisiopatológicas de esta diferenciación fenotípica no se conocen por completo, se especula con la existencia de una posible alteración en los mecanismos que regulan la homeostasis energética a nivel central (Levin & Dunn-Meynell 2002; Cottone *et al.* 2007). Actualmente, el modelo DIO es uno de los más empleados para el estudio de las adaptaciones y/o alteraciones producidas durante el desarrollo de la obesidad. Presenta la ventaja de que nos permite realizar estudios longitudinales y analizar los cambios debidos al consumo de una dieta rica en grasa, tanto en estadios iniciales como en estadios más avanzados del desarrollo de obesidad.

3. Regulación neuroendocrina del apetito y la saciedad: mantenimiento de la homeostasis energética

La homeostasis energética es el proceso fisiológico encargado de mantener el equilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. Este proceso está regulado estrechamente por el sistema nervioso central, que recibe e integra señales endocrinas, metabólicas y neurales que informan del estado energético. Como consecuencia, desencadena las respuestas metabólicas y conductuales adecuadas para lograr un equilibrio energético óptimo (Hagan & Niswender 2012; Sánchez-Lasheras *et al.* 2010).

Las señales que forman el sistema de regulación neuroendocrina de la ingesta se pueden clasificar según su localización en centrales y periféricas (Tabla 1). A nivel central, el hipotálamo es la principal región cerebral que regula el control homeostático de la ingesta. Sin embargo, existen otras regiones cerebrales que participan en el control de la ingesta y de la masa corporal. Es el caso de regiones como la corteza insular, la corteza orbitofrontal, el núcleo accumbens, el área tegmental ventral, la amígdala y el hipocampo. Estos hechos nos llevan a pensar en la existencia de una fuerte asociación entre la regulación hipotalámica de la ingesta y los circuitos emocionales, de recompensa, aprendizaje y memoria (Benarroch 2010; Kanoski 2012).

A nivel periférico, el sistema nervioso simpático tiene una gran importancia en la regulación de la homeostasis energética. Este sistema regula la termogénesis y la lipólisis, y también estimula la oxidación de los ácidos grasos y de la glucosa, a través de la inervación simpática de tejidos periféricos como músculo esquelético, hígado o tejido adiposo. También regula la producción de hormonas implicadas en la regulación de la ingesta, como por ejemplo la leptina (Webber & Macdonald 2000).

Tabla 1. Señales periféricas y centrales que regulan la ingesta de alimentos. Tomado de Benarroch 2010.

<i>Efecto</i>	<i>Señales periféricas</i>	<i>Señales centrales</i>
<i>Anorexigénico</i>	Colecistoquinina (CCK)	Pro-opiomelanocortina (POMC)
	Péptido YY ₃₋₃₆	Transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART)
	Oxintomodulina	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
	Péptido similar a glucagón (GLP-1)	Hormona liberadora de tirotropina (TRH)
	Leptina	Oxitocina
	Adiponectina	Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
	Nesfatina	Serotonina
	Insulina	Noradrenalina
	Glucosa	Histamina
<i>Orexigénico</i>	Ghrelin	Neuropéptido Y (NPY)
		Péptido relacionado con la proteína Agouti (AgRP)
		Ghrelin
		Orexina
		Hormona concentradora de melanina (MCH)
		Galanina
		Endocannabinoides
Opioides		

Durante la ingesta, el hipotálamo recibe información de los tejidos periféricos. Esta información llega a través del torrente sanguíneo (como es el caso de la leptina, la insulina o la ghrelina) y a través del núcleo del tracto solitario (NTS), conectado con la periferia a través del nervio vago y de aferencias sensitivas (Figura 1). El NTS es un área del tronco encefálico que integra la información sensorial del tracto gastrointestinal, vísceras abdominales y la información del sabor procedente de la cavidad oral (Woods & D'Alessio 2008; Schwartz *et al.* 2000). De esta manera, el hipotálamo actúa como integrador de las señales periféricas con las señales procedentes de otras regiones centrales. A partir de estas señales aferentes se generan una serie de respuestas integradas encargadas de la regulación de la saciedad y del metabolismo energético.

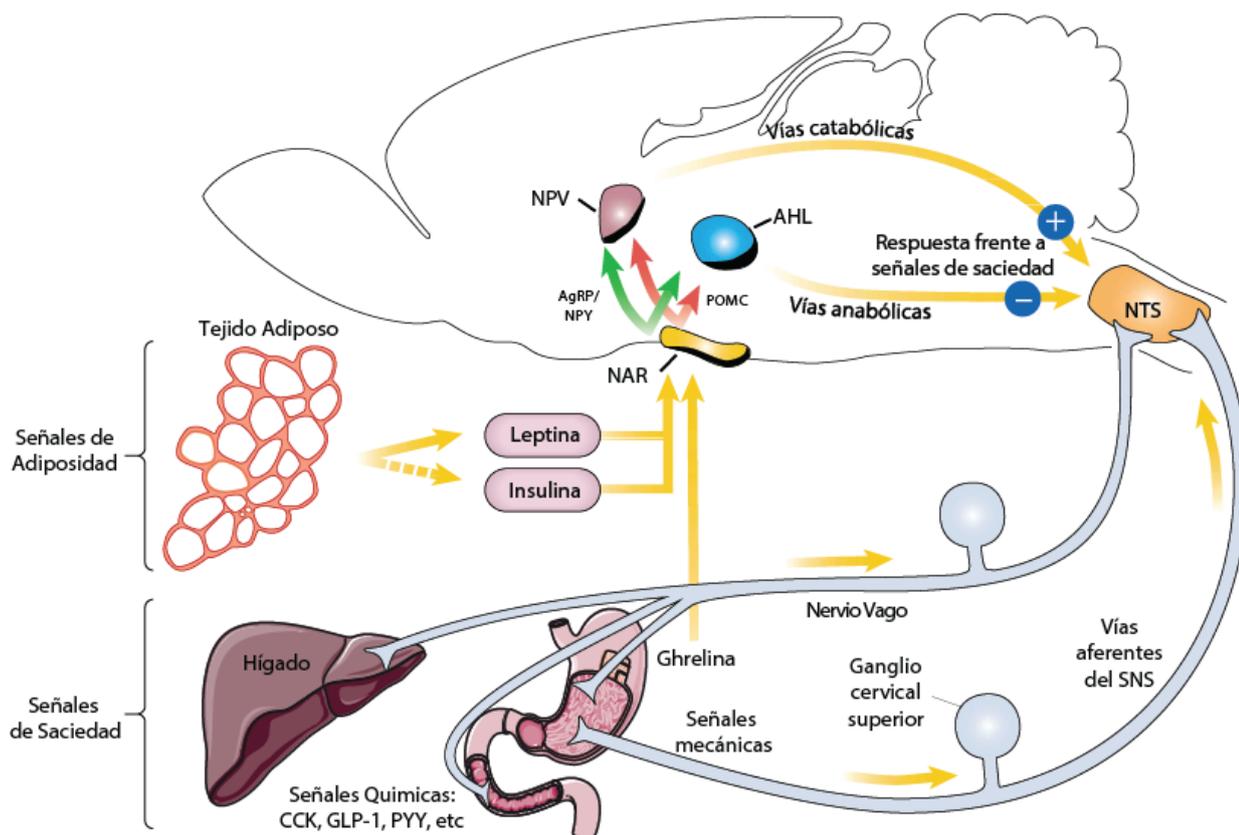


Figura 1. Representación esquemática de las vías por las cuales las señales de adiposidad y saciedad interactúan con los circuitos centrales implicados en la regulación de la homeostasis energética. Cuando ingerimos alimentos, se incrementa la distensión estomacal y se generan señales de saciedad, mediadas por factores humorales (CCK, GLP-1, etc). Estas señales se transmiten mediante impulsos nerviosos que activan a las neuronas del NTS responsables de la regulación de la cantidad de comida que ingerimos. En el estómago, la ghrelina liberada tiene un doble mecanismo de acción, por un lado actúa sobre el nervio vago, y por el otro es capaz de estimular directamente las neuronas del NAR. Por su parte, la leptina y la insulina acceden al SNC para informar del grado de adiposidad de nuestro organismo. Estos factores humorales actúan sobre neuronas del NAR que sintetizan POMC o NPY y AgRP. Las neuronas del NAR se proyectan a su vez sobre otras áreas hipotálamicas, como el NPV y el AHL. La estimulación del NPV activa las vías catabólicas y potencia las señales de saciedad en el cerebro medio. La estimulación del AHL activa las vías anabólicas y suprime las señales de saciedad. Si esta modulación de la homeostasis energética funciona adecuadamente, la composición de grasa corporal tiende a mantenerse relativamente constante durante largos periodos de tiempo. AHL: área hipotalámica lateral; NAR: núcleo arqueado; NPV: núcleo paraventricular; NTS: núcleo del tracto solitario. Tomado de Woods & D'Alessio 2008.

4. El hipotálamo

El hipotálamo desempeña un papel muy importante en la regulación del sistema nervioso autónomo, integrando la respuesta autónoma y la función endocrina con el comportamiento. El hipotálamo realiza esta función recurriendo a tres mecanismos principales. Por un lado, tiene acceso a información sensitiva de casi todo el organismo. Por otra parte, el hipotálamo compara la información sensitiva con valores de referencia biológicos. Finalmente, cuando el hipotálamo detecta una desviación respecto a un valor de referencia, ajusta un conjunto de respuestas autónomas, endocrinas y conductuales para restablecer la homeostasis (Kandel *et al.* 2000).

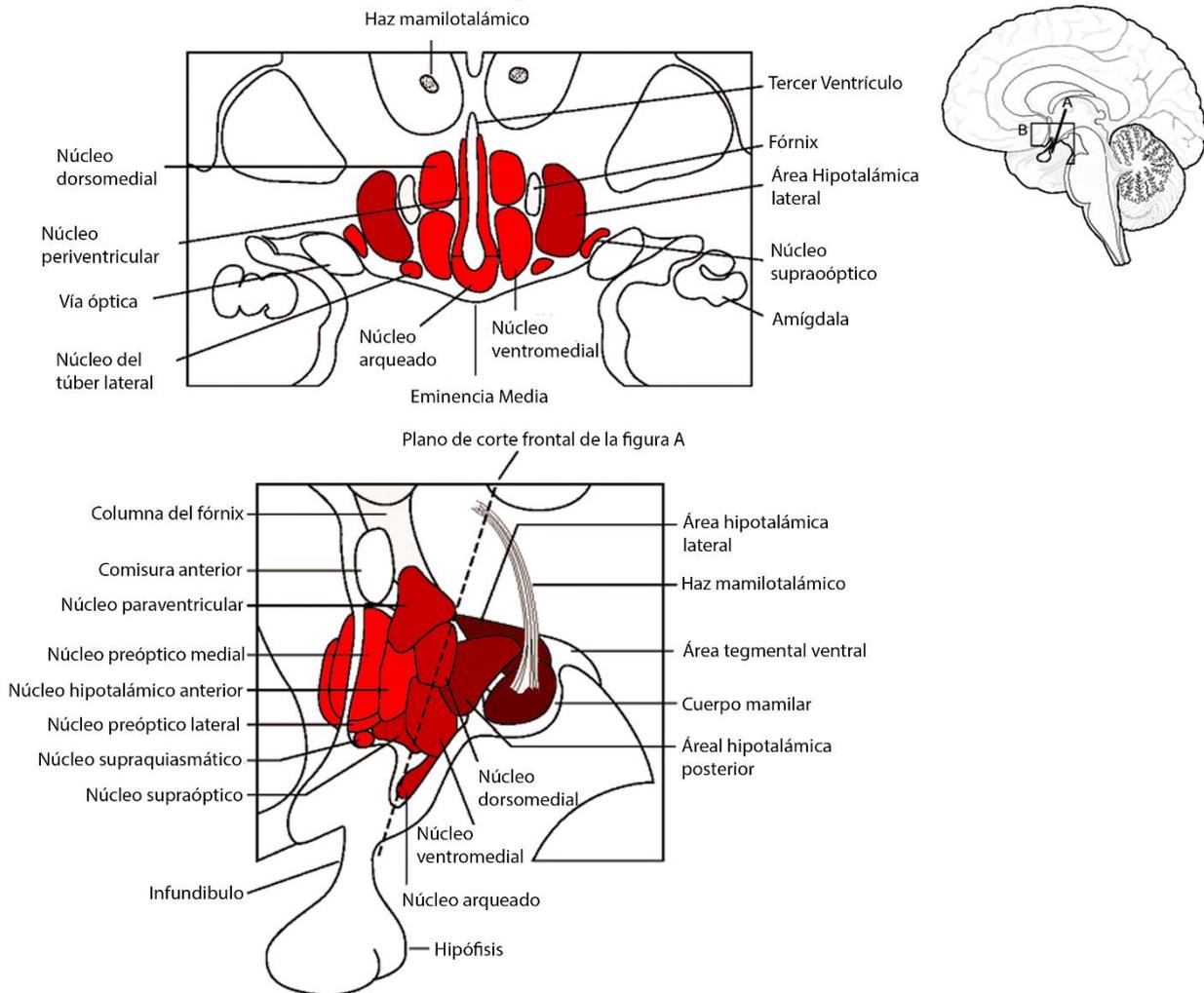


Figura 2. Estructura del hipotálamo. A. Visión frontal del hipotálamo (corte a lo largo del plano que se muestra en la parte B). **B.** Visión medial que muestra la mayoría de los núcleos principales. Modificado de Kandel *et al.* 2000.

4.1. Regulación hipotalámica de la ingesta

Estudios realizados en los años 1940 y 1950 en animales con lesiones en diversas estructuras hipotalámicas pusieron de manifiesto la implicación del hipotálamo en el control de la ingesta y la regulación del balance energético. Se demostró la existencia de una asociación entre las lesiones del núcleo ventromedial con un mayor consumo de alimentos, desarrollo de obesidad mórbida y resistencia a la insulina. Por el contrario, las lesiones del hipotálamo lateral se asociaron con anorexia y adipisia (Brobeck 1946; Hetherington & Ranson 1942). Las áreas hipotalámicas más importantes en el control de la ingesta son el núcleo arqueado (NAR), el núcleo paraventricular (NPV), el área hipotalámica lateral (AHL), el núcleo dorsomedial (NDM) y el núcleo ventromedial (NVM). Estos núcleos se disponen de manera bilateral alrededor del tercer ventrículo (Gao & Horvath 2008).

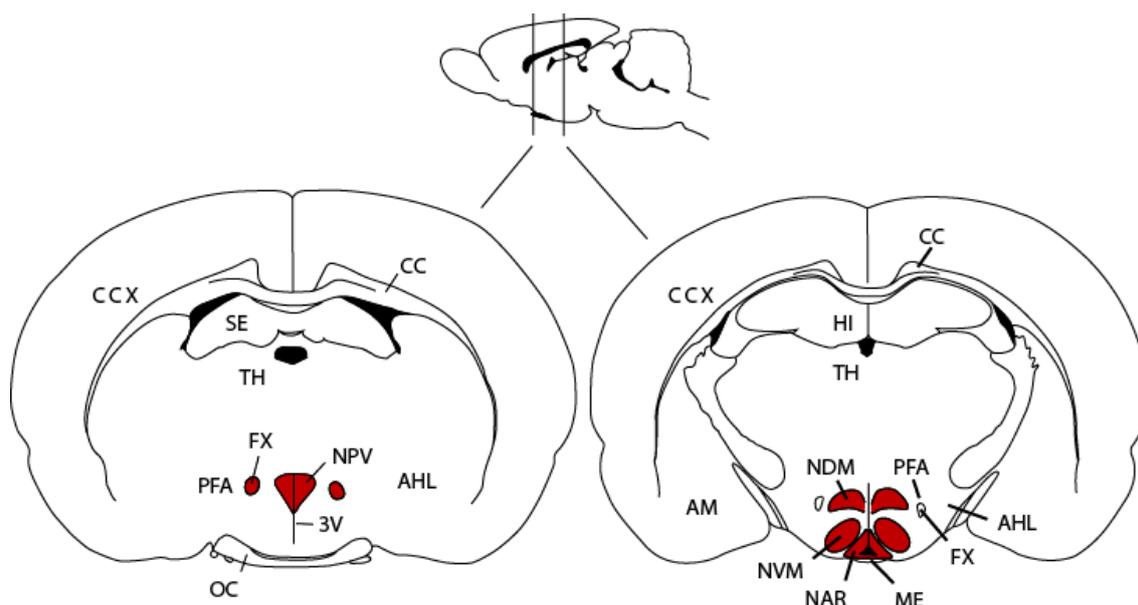


Figura 3. Esquema del cerebro de ratona que muestra las principales regiones del hipotálamo implicadas en la regulación de la ingesta de alimentos. AHL: hipotálamo lateral; AM: amígdala; CC: cuerpo caloso; CCX: córtex cerebral; FX: fórnix; HI: hipocampo; ME: eminencia media; NAR: núcleo arqueado; NDM: núcleo dorsomedial; NPV: núcleo paraventricular; NVM: núcleo ventromedial; OC: quiasma óptico; PFA: área perifornical; SE: septum; TH: tálamo; 3V: tercer ventrículo. Modificado de Schwartz *et al.* 2000.

4.1.1. El núcleo arqueado

El NAR se localiza en la base del hipotálamo, a ambos lados del tercer ventrículo. Se trata de un núcleo muy vascularizado, al que llegan señales periféricas reguladoras del apetito, que acceden a través de la eminencia media, la cual carece de barrera hematoencefálica (Broadwell & Brightman 1976). Debido a estas características anatómicas, el NAR tiene una posición estratégica que le permite detectar variaciones en sangre de varias hormonas (tales como inulina, ghrelina y leptina) y de nutrientes, pudiendo integrar las señales periféricas y permitiendo la regulación de la ingesta. (Cone *et al.* 2001; Gao & Horvath 2008).

En el NAR existen dos grandes poblaciones de neuronas que regulan el apetito y el gasto energético, denominadas neuronas de primer orden, debido a que las señales metabólicas periféricas son detectadas aquí en primer lugar. El primer grupo de neuronas expresan neuropéptido Y (NPY) y péptido relacionado con la proteína Agouti (AgRP). La activación de estas neuronas tiene efecto orexigénico (Hahn *et al.* 1998). Las situaciones de balance energético negativo activan estas neuronas, aumentando la ingesta de alimentos. Por el contrario, cuando el balance energético es positivo, la insulina y la leptina pueden inhibirlas, disminuyendo la ingesta. El segundo grupo de neuronas expresan proopiomelanocortina (POMC) y transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART) (Gao & Horvath 2008). La activación de estas neuronas tiene efecto anorexigénico, además de incrementar el gasto energético y reducir el peso corporal. La POMC sufre un proceso de escisión postranscripcional en péptidos denominados melanocortinas (Cone 2005), entre los que se encuentra el α -MSH (Harmer & Bicknell 2004; Millington 2007), el cual realiza sus efectos anorexigénicos a través de los subtipos 3 y 4 del receptor de

melanocortinas (Huszar *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000; Harrold *et al.* 2003). Estas neuronas con función anorexigénica están inervadas por las neuronas de NPY/AgRP.

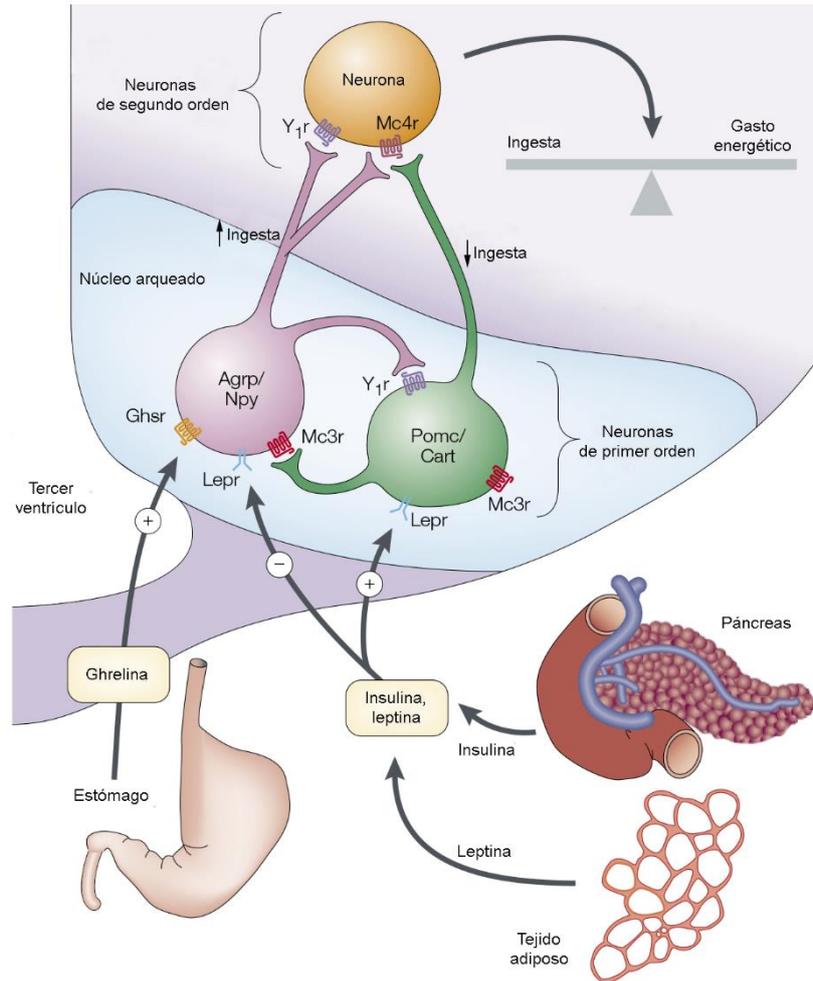


Figura 4. Control de la homeostasis energética por las neuronas del núcleo arqueado. En el núcleo arqueado se localizan las neuronas AgRP/NPY y las POMC/CART. Los neuropéptidos AgRP y NPY estimulan la ingesta de alimentos y disminuyen el gasto energético, mientras que α -MSH (derivado de la de la POMC) y CART inhiben la ingesta y aumentan el gasto energético. La insulina y la leptina inhiben a las neuronas AgRP/NPY y estimulan las POMC/CART. Además, la ghrelina puede estimular la ingesta de alimentos mediante la activación de las neuronas AgRP/NPY. GhSR: Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento; Lepr: receptor de leptina; Mc3r/Mc4r: receptor de melanocortinas tipo 3 y 4; Y1r: receptor de neuropéptido Y tipo 1. Modificado de Barsh & Schwartz 2002.

Ambas poblaciones neuronales son puntos de convergencia de señales centrales y periféricas. Las señales procedentes de la periferia y del cerebro convergen en estos circuitos modulando su actividad (Cowley 2003). Sus proyecciones las comunican con otras áreas del hipotálamo implicadas en la regulación del apetito, como el NPV, NVM, NDM y el AHL (Simpson *et al.* 2009). Estas áreas que reciben proyecciones desde el NAR son las denominadas neuronas de segundo orden y están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis energética (Schwartz *et al.* 2000) (Figura 4).

4.1.2. El núcleo paraventricular

El NPV se encuentra en el hipotálamo anterior, encima del tercer ventrículo. Las neuronas de este núcleo sintetizan neuropéptidos con acción catabólica, tales como la

hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la somatostatina, la vasopresina y la oxitocina (Kandel *et al.* 2000). El NPV es una de las principales áreas de integración neuroendocrina, ya que conecta con la hipófisis a través de la eminencia media, regulando la secreción de hormonas como la hormona estimulante del tiroides y la hormona adrenocorticotropa (ACTH), entre otras (Elmqvist *et al.* 1998). Además, el NPV presenta conexiones con regiones extrahipotalámicas como el núcleo del tracto solitario y la médula espinal (Billington *et al.* 1994; Elmqvist *et al.* 1997).

Diversos estudios han demostrado la importancia del NPV en la regulación de la ingesta y el peso corporal. Así, se ha visto que la microinyección de sustancias orexigénicas o anorexigénicas como el NPY (Lambert *et al.* 1995), la ghrelina (Lawrence *et al.* 2002), la colecistoquinina (CCK) (Hamamura *et al.* 1991), el CART o CRH modifican la ingesta (Krahn *et al.* 1988).

El NPV sintetiza la CRH y la TRH, ambas con efecto anorexigénico. Por un lado las neuronas CRH están directamente implicadas en el control de la homeostasis energética mediante las conexiones que se establecen con las neuronas AgRP/NPY del NAR. También regulan la homeostasis energética de manera indirecta regulando la producción de POMC en la hipófisis, que es el precursor de ACTH y principal regulador de la síntesis de glucocorticoides adrenales (Richard & Baraboi 2004).

Por otro lado encontramos las neuronas que expresan TRH. Esta hormona ejerce su efecto en la hipófisis anterior regulando la TSH (hormona estimulante de tiroides), participando en el mantenimiento de la homeostasis de las hormonas tiroideas. También tiene efectos centrales, participando en la regulación de la ingesta, la termogénesis, la activación del aparato locomotor y la regulación del sistema nervioso autónomo. Las neuronas TRH se activan por la acción de la α -MSH y se inhiben por la de AgRP/NPY (Lechan & Fekete 2006).

4.1.3. El núcleo ventromedial

Diversos estudios han demostrado que la lesión de este núcleo produce hiperfagia y obesidad, de ahí que durante muchos años se le denominara “*centro de la saciedad*”. Sin embargo, la interrupción de la conexión entre el AHL y el NVM induce igualmente obesidad e hiperfagia (Sclafani 1971). Esto hace suponer que la regulación de la ingesta implica la participación de grupos neuronales localizados en diversos núcleos hipotalámicos que conforman un circuito regulador de la ingesta y la saciedad (Morley 1987). Las neuronas del NVM reciben proyecciones de neuronas POMC y AgRP del NAR. A su vez las neuronas del NVM emiten proyecciones a otras áreas hipotalámicas, como el NDM y el NAR, y otras regiones extrahipotalámicas como el NTS (Everitt & Hökfelt 1990).

Estudios realizados mediante microdissección láser han puesto de manifiesto la existencia de varios genes marcadores característicos del NVM. Uno de los más importantes es el factor esteroideogénico tipo 1 (SF-1) en el NVM (Segal *et al.* 2005), cuya función es necesaria para el desarrollo y correcto funcionamiento de este núcleo (Davis *et al.* 2004; Parker *et al.* 2002). Algunos autores consideran a las neuronas SF-1 del NVM como

neuronas de primer orden responsables de los efectos de la leptina en la regulación de la masa corporal. En este sentido, se ha observado que las neuronas que expresan SF-1 también expresan el receptor de leptina (Dhillon *et al.* 2006). Otro dato que apoya esta hipótesis es el hecho de que los ratones que carecen del receptor de leptina en estas neuronas desarrollan esteatosis hepática, hiperleptinemia o dislipemia (Majdic *et al.* 2002). Además, el SF-1 participa en la regulación de la termogénesis, como se ha demostrado en estudios realizados con ratones que carecen de SF-1 en el NVM sometidos a una dieta rica en grasa, que desarrollan obesidad y sufren una reducción en la termogénesis (Kim *et al.* 2011).

Otra proteína que se expresa en el NVM es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Esta proteína actúa como factor de crecimiento y está implicada en la regulación del desarrollo y plasticidad sináptica (Huang & Reichardt 2001). Se ha comprobado en humanos y ratones que la ausencia de BDNF o de su receptor (TRKB) produce hiperfagia y obesidad (Lyons *et al.* 1999; Yeo *et al.* 2004). Asimismo, la administración central de BDNF suprime la hiperfagia y el aumento de peso observado en ratones que carecen del receptor MC4R (Xu *et al.* 2003).

4.1.4. El núcleo dorsomedial

El NDM tiene un papel importante en el control de la ingesta y la regulación del peso corporal (Bellinger & Bernardis 2002). Además, está implicado en una gran variedad de mecanismos reguladores. Así, se ha demostrado que las lesiones en este núcleo disminuyen los ritmos circadianos de sueño-vigilia, la actividad locomotora y los niveles séricos de glucocorticoides (Chou *et al.* 2003; Bi 2013). Se ha comprobado que la lesión en este núcleo produce hiperfagia y obesidad, siendo ésta menos grave que la observada tras una lesión en el NVM (Bernardis & Bellinger 1987). Por otro lado, la inyección de moléculas orexigénicas como NPY o galanina en el NDM incrementa la ingesta (Stanley *et al.* 1985). Se ha propuesto que el este núcleo desempeña un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético, ya que la administración intracerebroventricular (*icv*) de leptina inhibe la ingesta inducida por NPY y aumenta la expresión de c-Fos, un marcador de actividad neuronal, en el NDM (Elmqvist *et al.* 1998; Yokosuka *et al.* 1998). El NDM conecta con otros núcleos hipotalámicos como el NAR, del que recibe proyecciones de neuronas NPY y AgPR, aunque también contiene cuerpos neuronales que expresan NPY (Kalra *et al.* 1999) y emite eferencias hacia el NVM y NPV (Bernardis & Bellinger 1987). También el NDM tiene un papel importante en la regulación de la termogénesis y la adiposidad (Bi 2013).

4.1.5. El área hipotalámica lateral

El AHL se extiende rostralmente desde el mesencéfalo hasta el área preóptica lateral. Durante mucho tiempo fue considerado el “*centro del hambre*”, ya que su lesión produce afagia temporal y pérdida de peso (Bernardis & Bellinger 1996).

El AHL contiene neuronas que expresan péptidos orexigénicos como la hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas A y B, también conocidas como hipocretinas (de Lecea *et al.* 1998). La administración *icv* de estos péptidos produce un incremento de la ingesta de alimentos (Rossi *et al.* 1997; Sakurai *et al.* 1998). Se ha observado en

experimentos en animales que el ayuno incrementa la expresión del ARNm de prepro-orexina (proteína precursora de la orexina A y B) y de MCH (Qu *et al.* 1996; Sakurai *et al.* 1998). Además, estudios realizados en rata han demostrado que la administración *icv* de MCH produce hiperfagia y aumenta los depósitos de tejido adiposo (Qu *et al.* 1996). Las neuronas que producen orexinas emiten proyecciones hacia la propia AHL, el NAR, el NPV y el NTS, así como a otras regiones cerebrales que participan en funciones fisiológicas tan importantes como la regulación de la presión sanguínea, el sistema neuroendocrino, la temperatura corporal y el ciclo de sueño-vigilia (Peyron *et al.* 1998).

4.2. Otras zonas implicadas en la regulación de la ingesta

4.2.1. Núcleo del tracto solitario

Otra zona clave implicada en la ingesta de alimentos y el balance energético es el NTS, localizado en el tronco del encéfalo. Las señales de saciedad procedentes del tracto gastrointestinal son transmitidas al NTS a través del nervio vago, que transmite información acerca del tamaño y la duración de las comidas. El NTS se localiza en el lugar idóneo para la recepción de señales humorales y neuronales, ya que se encuentra próximo al área postrema, que es una zona donde la barrera hematoencefálica es más permeable (Schwartz 2000; Gao & Horvath 2008). Los efectos que producen algunos nutrientes como la glucosa, las hormonas leptina, insulina y ghrelina y los neuropéptidos α -MSH y CRH sobre la ingesta y el peso corporal son similares a los efectos que producen en el hipotálamo (Gao & Horvath 2008).

También se ha demostrado que el NTS recibe aferencias desde el NAR, el AHL y el NPV del hipotálamo, por lo que existe una fuerte conexión entre el hipotálamo y el tronco del encéfalo (Kishi *et al.* 2003; Ciriello *et al.* 2003; Geerling *et al.* 2010).

4.2.2. El mesencéfalo

El sistema dopaminérgico mesencefálico está implicado en la regulación de funciones fisiológicas tan importantes como la actividad locomotora, el estado de ánimo, la conducta sexual y los circuitos de recompensa (Gao & Horvath 2008).

Los alimentos con alta palatabilidad pueden activar los circuitos cerebrales de recompensa mesencefálicos, formados principalmente por las neuronas dopaminérgicas que conectan el área tegmental ventral (ATV) con el núcleo accumbens. Este núcleo integra los aspectos homeostáticos, hedónicos, motivacionales y cognitivos de la ingesta de alimentos a través de sus conexiones con la corteza prefrontal, la amígdala y el AHL (Benarroch 2010). De hecho, la ingesta de alimentos con alta palatabilidad incrementa los niveles de dopamina extracelular en este núcleo (Wilson *et al.* 1995). La dopamina tiene un papel clave en la regulación de la ingesta. Así, la inactivación de la enzima tirosina hidroxilasa (paso limitante en la biosíntesis de dopamina) en ratones suprime la ingesta de manera similar a las lesiones en el AHL (Gao & Horvath 2008).

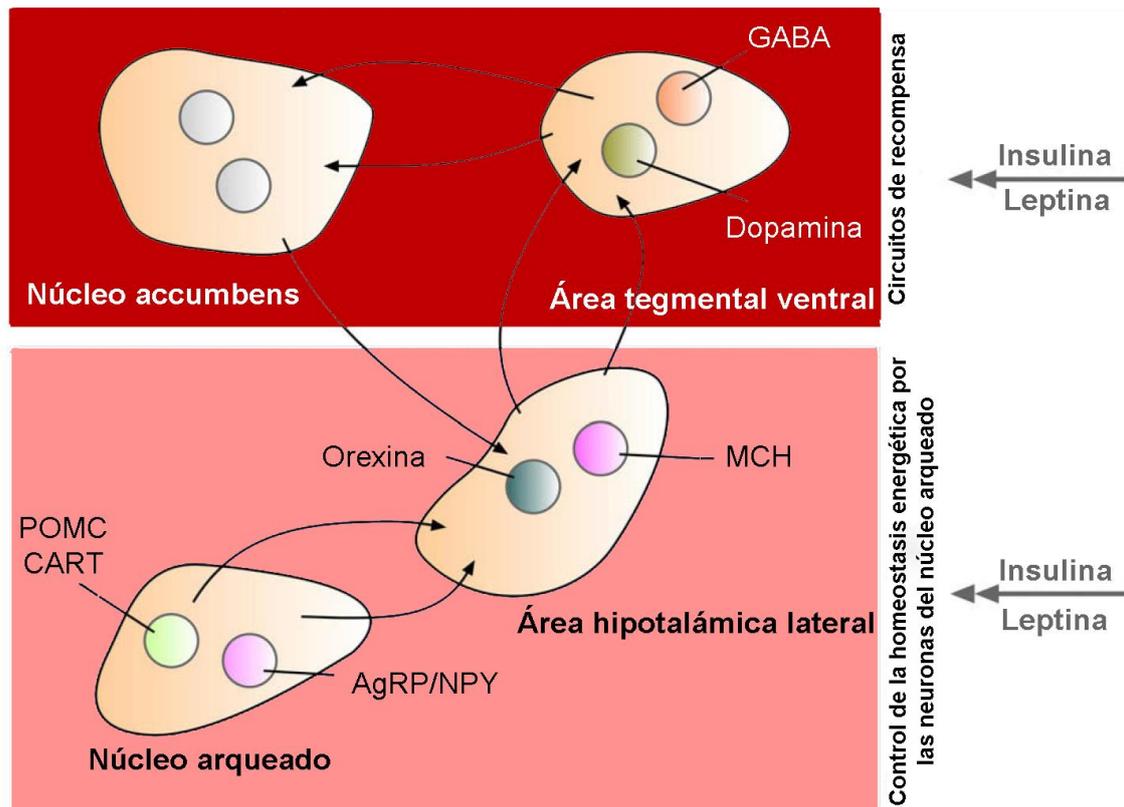


Figura 5. Integración de las vías neuronales implicadas en la recompensa y la regulación del balance energético por las neuronas del NAR. Esquemáticamente, el sistema de regulación de la homeostasis energética del cerebro está formado por las neuronas de primer orden que expresan POMC/CART y AgRP/NPY en el NAR y sus proyecciones a las neuronas de segundo orden, por ejemplo, en el AHL. En el AHL existen poblaciones de neuronas que expresan Orexina y MCH. Estas neuronas se proyectan a varias regiones del cerebro (incluyendo el área tegmental ventral), conectando con el sistema de recompensa del cerebro. Los circuitos de recompensa están formados principalmente por las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral, que se proyectan hacia el núcleo accumbens. Además, desde el área tegmental ventral también se proyectan neuronas GABAérgicas al núcleo accumbens. Se ha demostrado que la insulina y la leptina pueden actuar directamente sobre el sistema de recompensa del cerebro. Modificado de Sánchez-Lasheras *et al.* 2010.

La actividad de las neuronas dopaminérgicas del ATV está regulada por la acción de algunos neuropéptidos hipotalámicos, como NPY, AgRP, α -MSH, orexinas y MCH, así como por hormonas circulantes como insulina, ghrelina y leptina (Gao & Horvath 2008). Se ha demostrado que la leptina disminuye los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (Krügel *et al.* 2003). Asimismo, la administración directa de leptina en el ATV tiene un efecto anorexigénico (Hommel *et al.* 2006) (Figura 5). Estos datos sugieren que la interacción entre el sistema dopaminérgico y la leptina a nivel mesencéfalo es importante en el control de la homeostasis de la energía. Sin embargo, aún son necesarios más estudios que nos permitan establecer los mecanismos exactos por los cuales la leptina establece sus mecanismos moduladores sobre el sistema dopaminérgico mesencéfalo.

5. El tejido adiposo

El tejido adiposo es el reservorio de energía más importante del organismo, almacena el exceso de energía en forma de triglicéridos para poder hacer frente a situaciones que requieran una mayor demanda energética, como el ejercicio físico intenso o el ayuno prolongado. Se distribuye ampliamente, localizándose alrededor de los órganos y vasos

sanguíneos, bajo la piel y en la cavidad abdominal. Dependiendo de la localización se pueden distinguir tres áreas principales: dermal, subcutánea e intraperitoneal o visceral (que incluye el tejido adiposo mesentérico, omental, lumbar y epididimal) (Mårin *et al.* 1992; Wajchenberg 2000). El tejido adiposo es considerado actualmente como un órgano endocrino, que secreta adipoquinas como la leptina y la adiponectina, implicadas en la regulación de la homeostasis energética. (Ahima *et al.* 1996; Wozniak *et al.* 2009).

5.1. Tipos de tejido adiposo

Se han identificado, tanto en humanos como en otros mamíferos, dos tipos de tejidos adiposos: blanco y pardo o marrón. Existen diferencias entre ambos en cuanto a color, morfología, funciones metabólicas, características bioquímicas y patrones de expresión génica. El tejido adiposo blanco es el principal órgano de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos para el organismo, mientras que el tejido adiposo marrón juega un papel en la regulación de la temperatura corporal mediante la generación de calor a través del consumo de energía almacenada (Park *et al.* 2014; Frayn *et al.* 2003). El desempeño de las funciones propias de cada uno de estos tejidos y el equilibrio entre el tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón contribuyen al mantenimiento del balance energético del organismo.

El tejido adiposo blanco está formado por los adipocitos, que son células adiposas uniloculares, ya que contienen una única gota de lípido que ocupa la mayor parte del citoplasma. Es el tejido adiposo más abundante del organismo, constituyendo generalmente el 20% del peso corporal de los seres humanos adultos. El desarrollo del tejido adiposo blanco comienza en el útero, pero se concentra principalmente después del nacimiento cuando se necesitan células especializadas de almacenamiento de grasa para proporcionar energía durante los períodos de ayuno (Wozniak *et al.* 2009; Langin *et al.* 2009). Desde un punto de vista histológico, el tejido adiposo blanco está formado por los adipocitos y por la fracción estroma-vascular. Los adipocitos son el componente más abundante del tejido adiposo y son los encargados de almacenar triglicéridos en su interior (Vázquez-Vela *et al.* 2008; Frayn *et al.* 2003). La fracción estroma-vascular está formada por macrófagos, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, células madre mesenquimales y preadipocitos. La mayor parte de las adipoquinas son liberadas por la fracción estroma-vascular del tejido adiposo, mientras que la leptina y adiponectina son producidas por los adipocitos (Fain *et al.* 2004; Lafontan 2005; Langin *et al.* 2009).

El tejido adiposo marrón está formado por adipocitos multiloculares. A diferencia de los adipocitos blancos, los adipocitos del tejido adiposo marrón tienen mayor cantidad de mitocondrias, las cuales debido a su alto contenido en hierro son las responsables de la coloración marrón. Las mitocondrias expresan cantidades elevadas de proteínas desacopladoras (*uncoupling protein*, UCPs), destinadas a regular la termogénesis (Cinti 2006). La termogenina o UCP-1 es la UCP más abundante, localizándose en la membrana interna mitocondrial y cuya expresión está regulada por el sistema nervioso simpático. La UCP-1 es responsable del flujo de protones desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia la matriz mitocondrial, reduciendo el gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones, convirtiendo así la energía química en calor

(Figura 6). Por tanto, la UCP-1 es responsable de la función principal del tejido adiposo marrón y también un marcador característico de los adipocitos marrones (Cannon & Nedergaard 2004). El tejido adiposo marrón es fundamental en la regulación del metabolismo energético en los mamíferos. Aunque es más abundante en los recién nacidos, también se encuentra en los mamíferos adultos, en los que puede tener un papel importante en la regulación del metabolismo y el balance energético (Virtanen *et al.* 2009). Además de su papel en la termorregulación, la UCP-1 es clave en la adaptación metabólica a las dietas ricas en grasas, mediante un proceso conocido como termogénesis inducida por la dieta (Kontani *et al.* 2005; Kopecky *et al.* 1995). Todo ello convierte al tejido adiposo marrón en una pieza clave en la regulación del metabolismo, principalmente gracias a su función en la regulación de la termogénesis. De ello se desprende que el incremento en la actividad de UCP-1 mejoraría la capacidad de generar calor, lo que incidiría directamente en una disminución de la acumulación de energía en forma de grasa; de ahí que sea necesario profundizar más en el estudio del tejido adiposo marrón en el tratamiento de la obesidad.

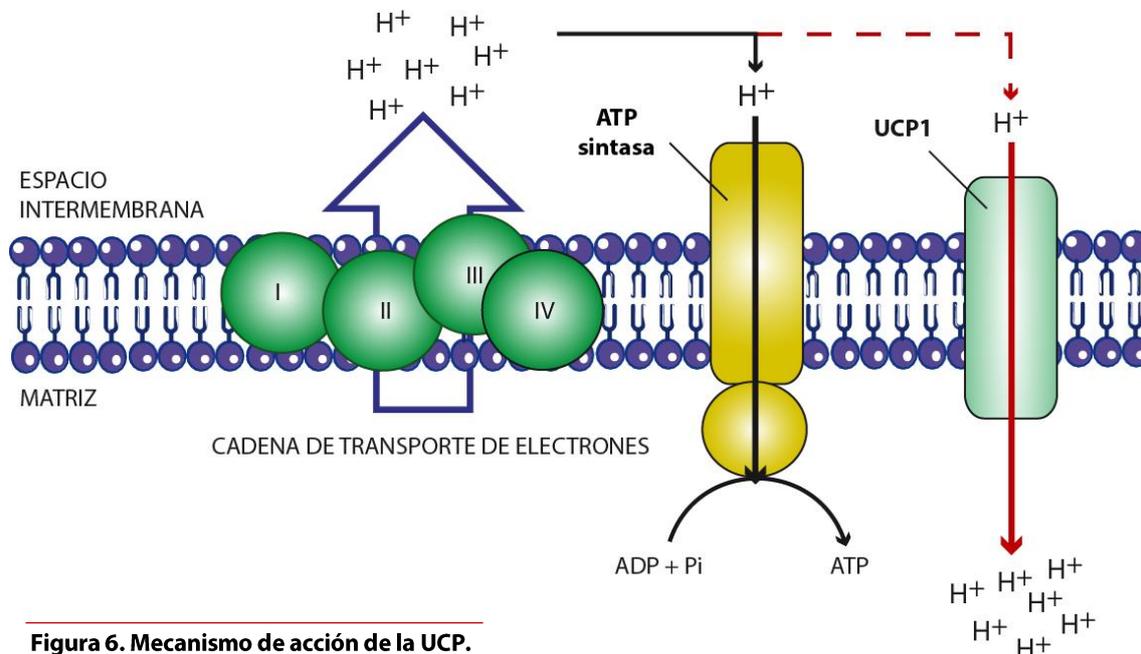


Figura 6. Mecanismo de acción de la UCP.

Recientemente, se ha descubierto un nuevo tipo de adipocitos, con apariencia similar a los adipocitos marrones, llamados adipocitos beige. Curiosamente, estas células beige son similares a las células del TA blanco, pero responden a estímulos termogénicos incrementando la expresión de UCP-1. Además, los adipocitos beige tienen un patrón de expresión génica diferente de las células de TA blanco o marrón (Park *et al.* 2014).

En ocasiones el tejido adiposo funciona de forma incorrecta, generalmente como consecuencia de la aparición de resistencia a insulina tras un excesivo aporte calórico mantenido en el tiempo, de forma que se altere o disminuya su capacidad para almacenar lípidos, cambie el patrón de síntesis y/o liberación de adipoquinas, o sintetice mediadores que normalmente no produce. Estas alteraciones pueden facilitar el depósito ectópico de lípidos en tejidos/células como el músculo esquelético, hígado, endotelio vascular y páncreas, dando lugar a un fenómeno conocido como lipotoxicidad. La lipotoxicidad

favorece la aparición de alteraciones clínicas importantes como la esteatosis, la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2 (Unger *et al.* 2010).

5.2. El tejido adiposo como órgano endocrino

Como se ha dicho previamente, el tejido adiposo, además de ser un órgano que almacena energía en forma de triglicéridos, desempeña una función endocrina, sintetizando y liberando numerosas sustancias bioactivas, denominadas adipoquinas, capaces de actuar de manera local y endocrina. Las adipoquinas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas y péptidos, en el que se incluyen citoquinas inflamatorias, como la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), péptidos implicados en la regulación del tono vascular, como el angiotensinógeno, y hormonas producidas específicamente por el tejido adiposo, como la leptina o la adiponectina (Galic *et al.* 2010; Karastergiou & Mohamed-Ali 2010; Karlsson *et al.* 1998). En los últimos años se han identificado nuevas adipoquinas, que cumplen funciones biológicas muy diversas como la regulación de la ingesta y del gasto energético, la reproducción, la inflamación y la inmunidad, la homeostasis vascular, la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono (Karastergiou & Mohamed-Ali 2010).

La adipoquina mejor conocida es la leptina (del griego *leptos*: delgado), una hormona peptídica de 16 kDa, codificada por el gen *Ob*, producida y secretada principalmente por los adipocitos. Se ha observado que existen otros tejidos capaces de producir pequeñas cantidades de leptina, entre ellos cabe destacar hígado, mucosa gástrica, hipotálamo, hipófisis, hueso, ovario y placenta. Con el descubrimiento de la leptina en 1994 por Friedman y colaboradores mediante la mutación del gen *Ob*, se demostró que la ausencia de este gen y de su producto producía ratones obesos (*ob/ob*), y se asoció con la aparición de hiperfagia, infertilidad y diabetes tipo 2 (Zhang *et al.* 1994). La leptina tiene un papel clave en la regulación de la homeostasis energética, reduciendo la ingesta calórica e incrementado el gasto energético. La leptina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para interactuar con sus receptores hipotalámicos, especialmente en el NAR, implicados en la regulación de la homeostasis energética (Schwartz *et al.* 1996; Cowley *et al.* 2001).

La concentración y secreción de leptina circulante en el organismo es pulsátil y depende de diversos factores tales como la edad, el sexo, la ingesta calórica y el IMC (Mantzoros *et al.* 2011). Así, se ha observado tanto en humanos como en roedores que los niveles plasmáticos de leptina correlacionan con el IMC y la cantidad de tejido adiposo (Maffei *et al.* 1995). Además, se incrementan por las dietas ricas en grasa, la insulina y los glucocorticoides. De igual forma se disminuyen por el ayuno, el ejercicio físico, el frío y la estimulación β adrenérgica (Szkudelski 2007). La leptina presenta un ritmo circadiano, aumentando progresivamente durante las horas de luz en humanos y reduciéndose en el caso de roedores (Saad *et al.* 1998; Sinha *et al.* 1996; Simón & Del Barrio 2002).

El receptor de leptina se distribuye tanto a nivel central, como en la periferia. Se han descrito hasta 6 isoformas del receptor ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe y ObRf. El receptor de leptina se identificó por primera vez en 1995 como un receptor de membrana perteneciente a la familia de receptores de las citoquinas de clase I (Mantzoros *et al.* 2011;

Tartaglia *et al.* 1995). Las isoformas cortas ObRa y ObRc se localizan principalmente en la barrera hematoencefálica y se piensa que están relacionadas con el transporte de esta hormona al cerebro (Hileman *et al.* 2002). La isoforma larga del receptor (ObRb), se expresa principalmente en el hipotálamo y es la responsable de las acciones de esta hormona. El receptor ObRb es el único que contiene un dominio de señalización intracelular necesario para la transducción de las señales inducidas por la leptina a través de las vías JAK/STAT (Bjørbaek *et al.* 1997). Por último, la isoforma ObRe o isoforma soluble (por lo que es cuantificable en plasma), se une a la leptina circulante y actúa como un sistema de transporte a través del torrente circulatorio, regulando su aclaramiento y por tanto su vida media, modulando de esta manera los niveles plasmáticos de esta hormona (Chan *et al.* 2002).

Independientemente del papel en la regulación del peso corporal a largo plazo, la leptina también está relacionada con el metabolismo lipídico y glucídico. Por un lado, la leptina estimula la gluconeogénesis, inhibe la secreción de insulina por las células β -pancreáticas, aumenta la captación de glucosa desde el músculo esquelético e incrementa el transporte de glucosa a través del intestino delgado (Trayhurn *et al.* 1999). Además, en ratones obesos *ob/ob*, el tratamiento con leptina disminuye los niveles de glucosa y de insulina (Ahima *et al.* 1998). Por otra parte, la leptina estimula la β -oxidación, promoviendo el gasto energético en tejido adiposo y músculo esquelético (Minokoshi *et al.* 2002; Zhou *et al.* 1997). También, estimula la lipólisis en el adipocito, provoca una modificación del reparto lipídico en el tejido muscular, estimula la termogénesis y aumenta la lipogénesis en el hígado (Ahima & Flier 2000). Además, esta hormona está implicada en otras múltiples funciones fisiológicas, como la termorregulación, la respuesta inmune, la hematopoyesis, la reproducción y el metabolismo óseo (Mantzoros *et al.* 2011).

Como se ha dicho anteriormente, existe una relación directa entre los niveles de leptina plasmáticos y la cantidad de tejido adiposo. Por lo tanto, en la obesidad se produce un aumento de las concentraciones circulantes de leptina que puede desencadenar la aparición de resistencia a la misma y la pérdida de su acción antilipogénica, favoreciendo el desarrollo de lipotoxicidad y resistencia a insulina (Wang *et al.* 2001; Unger 2003).

La adiponectina es un péptido de 30 kDa, de producción exclusivamente adipocitaria, con propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas. Además, esta adipoquina tiene un rol relevante en el metabolismo de los hidratos de carbono y de lípidos, ya que actúa sensibilizando a los tejidos a la acción de la insulina (Lee *et al.* 2013). De manera contraria a lo descrito anteriormente para la leptina, en la obesidad se produce una disminución de los niveles de adiponectina circulantes (Arita *et al.* 1999). Debido a sus acciones biológicas, esta adipoquina permite contrarrestar el desarrollo de enfermedades como hipertensión arterial, arteriosclerosis o diabetes mellitus tipo 2, mientras que el déficit de adiponectina se relaciona con desarrollo de obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (Bełtowski 2003; Kawano & Arora 2009).

En la obesidad, el tejido adiposo libera cantidades más elevadas de TNF- α , IL-6 y resistina, que favorecen el desarrollo de inflamación y resistencia a insulina (Pittas *et al.* 2004).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria con un papel clave en la modulación del metabolismo del tejido adiposo y con múltiples actividades biológicas tales como inflamación, apoptosis celular, citotoxicidad y resistencia a insulina (Arner 2003). El TNF- α es sintetizado como una proteína transmembrana de 26 kDa que se libera a la circulación en forma de molécula soluble con un peso de 17 kDa (Kriegler *et al.* 1988). El TNF- α es producido principalmente por los macrófagos de la fracción estroma vascular, aunque se ha demostrado que los adipocitos también pueden producir TNF- α (Weisberg *et al.* 2003). Datos epidemiológicos y estudios experimentales en animales demuestran una importante asociación entre el aumento de la expresión de esta citoquina y el incremento del peso corporal (Arner 2003). Asimismo, se ha observado una mayor producción de TNF- α en diferentes modelos experimentales de obesidad y en pacientes obesos que presentan resistencia a la acción de la insulina (Hotamisligil 1999). En 1993, Hotamisligil y colaboradores demostraron que el ARNm del TNF- α se veía incrementado en el tejido adiposo en condiciones de obesidad y que la neutralización de esta citoquina proinflamatoria mejoraba la resistencia a insulina en ratas obesas (Hotamisligil *et al.* 1993). Además, distintos estudios han demostrado que el TNF- α interfiere con los mecanismos de señalización intercelular de la insulina, lo que impide las acciones de la misma (Peraldi *et al.* 1996; Ruan *et al.* 2002). También es importante destacar que el TNF- α contribuye de manera indirecta a la resistencia a la insulina disminuyendo los niveles de adipoquina e incrementando los de IL-6 (Ruan *et al.* 2002). Por último, el TNF- α incrementa la lipólisis y disminuye la captación de los ácidos grasos libres plasmáticos en adipocitos ocasionando un aumento en el plasma de la concentración de ácidos grasos libres favoreciendo la aparición de lipotoxicidad y de resistencia a la insulina (Yu & Ginsberg 2005; Sethi & Hotamisligil 1999).

La IL-6 es una citoquina circulante con múltiples efectos en inflamación, defensa inmunológica y respuesta frente al daño celular. Es sintetizada por los adipocitos y por la fracción estroma vascular y circula en plasma como una proteína glicosilada. Su peso molecular oscila entre 21 y 28 kDa, dependiendo del estado de glicosilación y fosforilación. (Eder *et al.* 2009). La IL-6 es una adipoquina cuya producción y concentración plasmática se correlaciona positivamente con los depósitos grasos (Bastard *et al.* 2000). Aproximadamente un tercio de su contenido en plasma procede del tejido adiposo blanco (Mohamed-Ali *et al.* 1997). El aumento de la IL-6 en plasma estimula la secreción hepática de triglicéridos, contribuyendo a la hipertrigliceridemia asociada a la obesidad. Algunas hormonas como el TNF- α y las catecolaminas pueden aumentar la expresión de IL-6 en el tejido adiposo, mientras que los glucocorticoides la disminuyen (Frühbeck *et al.* 2001). Diversos autores han demostrado que los niveles plasmáticos y la expresión en el tejido adiposo se encuentran elevados en la obesidad (Mohamed-Ali *et al.* 1997; Bastard *et al.* 2000; Vozarova *et al.* 2001; Roytblat *et al.* 2000). La IL-6 también tiene un papel importante en los mecanismos que favorecen el desarrollo de resistencia a insulina y lipotoxicidad. Por un lado, existe una fuerte interacción entre la IL-6 y las rutas de señalización de la insulina. Ambas hormonas comparten varios mecanismos de señalización intracelular, por este motivo se ha propuesto la IL-6 como un agente capaz de desarrollar resistencia a insulina debido a su capacidad de disminuir la señalización mediada por el receptor de insulina (Mooney *et al.* 2001; Senn *et al.* 2003). Además, se ha observado en

humanos que la administración subcutánea de IL-6 incrementa los niveles de glucosa en plasma de manera dosis dependiente (Tsigos *et al.* 1997). Por otro lado, a nivel del tejido adiposo, la IL-6 disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL, enzima que hidroliza los triglicéridos circulantes asociados a lipoproteínas), incrementando la lipólisis. De esta manera, se produce un aumento de los niveles de ácidos grasos en plasma, favoreciendo su lipotoxicidad y dando lugar a resistencia a la insulina (Greenberg *et al.* 1992). Además, tiene un efecto indirecto en la aparición de resistencia a insulina debido a que disminuye la síntesis y liberación de adiponectina (Fasshauer *et al.* 2003).

Otra adipoquina que aumenta en la obesidad es la resistina, una proteína rica en cisteína de 12,5 kDa. Esta adipoquina está implicada en el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (Steppan *et al.* 2001; Kim *et al.* 2001). Aunque en ratones es producida por los adipocitos, en los seres humanos la principal fuente de resistina son los macrófagos (Patel *et al.* 2003). En ratones, la resistencia a insulina se asocia con un aumento de la resistina en plasma y un aumento de la expresión de SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), que es un potente inhibidor de las vías de señalización de insulina y de leptina como la JAK/STAT (Steppan *et al.* 2005; Steppan *et al.* 2001). Además, la resistina podría contribuir a la resistencia a la insulina mediante el incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias. En adipocitos humanos aislados, la resistina incrementa los niveles de IL-6 y TNF- α (implicadas en la resistencia a insulina); mientras que al tratar las células con rosiglitazona, un agente sensibilizador de la acción de la insulina, se observaba una disminución en los niveles de estas citoquinas proinflamatorias (Kusminski *et al.* 2007). Además, en humanos se ha observado una correlación negativa entre los niveles séricos de resistina y los de adiponectina (Wasim *et al.* 2006). Estos datos sugieren que un aumento de la resistina circulante podría jugar un papel clave en el desarrollo de inflamación y de resistencia a insulina, y, consecuentemente, en el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2.

Todo ello convierte al tejido adiposo en una parte importante del control metabólico, siendo determinante en el desarrollo de inflamación y de resistencia a la insulina; de ahí que sea necesario profundizar aún más en el estudio de la función endocrina de este tejido para el tratamiento de la obesidad.

6. Metabolismo del tejido adiposo

6.1. Transporte de lípidos

Los lípidos de la dieta, en su mayoría triglicéridos (TG), son insolubles en medio acuoso, por lo que para poder absorberse a nivel intestinal deben emulsionarse gracias a la acción de las sales biliares y las lipasas pancreáticas. Las sales biliares son sintetizadas en el hígado a partir de colesterol y almacenadas en la vesícula biliar hasta que son necesarias. Las lipasas pancreáticas hidrolizan los TG de la dieta permitiendo la entrada de glicerol y ácidos grasos en las células epiteliales intestinales, donde se vuelven a esterificarse.

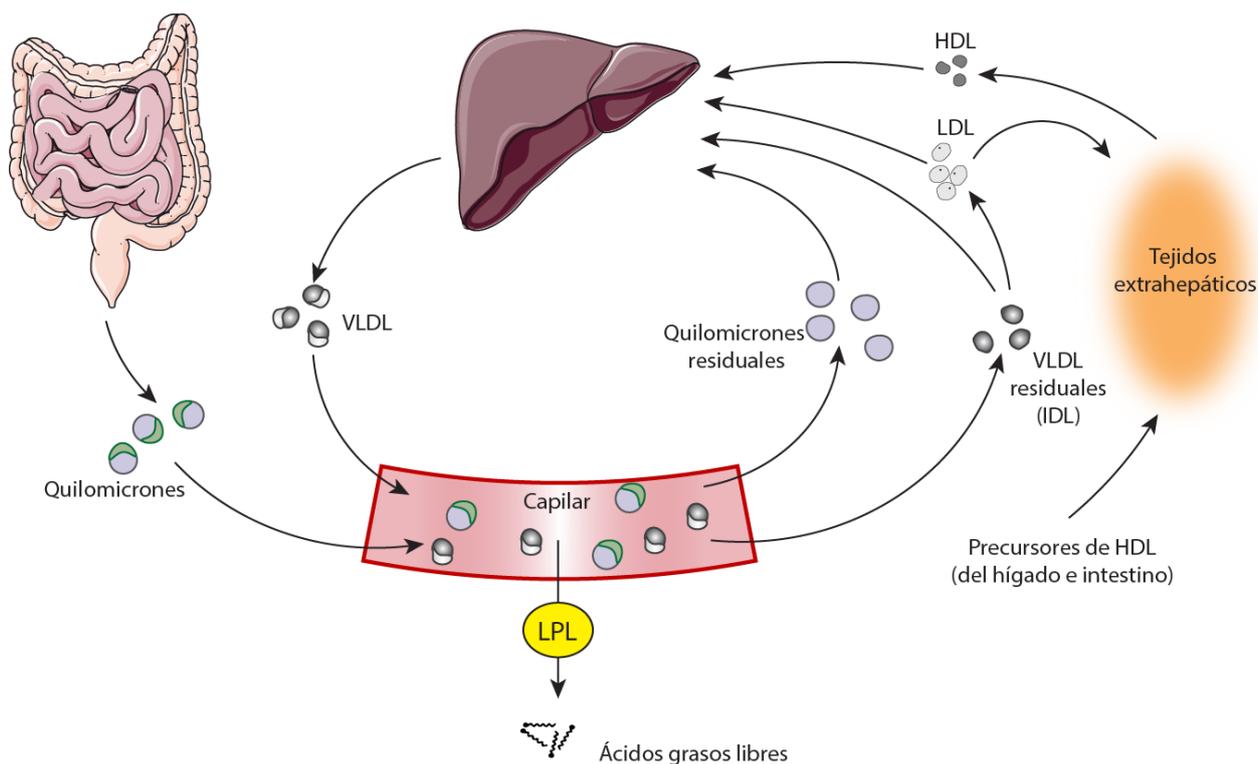


Figura 7. Lipoproteínas y transporte de lípidos. Los lípidos de la dieta son transportados por los quilomicrones. Los lípidos de origen hepático, colesterol y triglicéridos, son vehiculizados por el hígado a través de las VLDL. La extracción de lípidos de las VLDL y la pérdida de alguna apolipoproteína transforma las VLDL en LDL. Las LDL transfieren el colesterol a los tejidos extrahepáticos o vuelven al hígado. En el hígado se produce la captación de LDL, quilomicrones residuales y VLDL residuales (también llamadas IDL). El exceso de colesterol en los tejidos extrahepáticos se transporta nuevamente al hígado por las HDL y allí parte del colesterol se convierte en sales biliares. Modificado de Nelson & Cox 2006.

El transporte de los lípidos en plasma se realiza mediante la unión a apolipoproteínas y colesterol, constituyendo agregados lipoproteicos como los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoproteins*, VLDL), lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoproteins*, LDL) y lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoproteins*, HDL). La LPL anclada al endotelio vascular hidroliza los lípidos plasmáticos transportados por los quilomicrones y las VLDL, formando ácidos grasos (que son captados por las células de los tejidos) y glicerol (Wang & Eckel 2009) (Figura 7). En el músculo, los ácidos grasos son oxidados para obtener energía mientras que en los adipocitos se reesterifican para quedar almacenados en forma de TG (Lafontan & Langin 2009).

6.2. Lipoproteína lipasa y ANGPTL4

La LPL es una enzima que se encuentra anclada al endotelio capilar, producida por miocitos y adipocitos y transportada hacia el lumen del endotelio gracias a la proteína GPIHBP1 (*glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1*) (Davies *et al.* 2010). Una vez en el endotelio vascular, la LPL se une a la carga negativa de los proteoglicanos de heparán-sulfato de las células endoteliales (Eisenberg *et al.* 1992; Ruge *et al.* 2005) (Figura 8).

La LPL es clave en la regulación de la homeostasis lipídica. Así, los ratones que no expresan LPL tienen unos niveles elevados de triglicéridos en el nacimiento y mueren tras 18 horas debido a la incapacidad de procesar los lípidos de la leche (Weinstock *et al.* 1995). De la misma manera, los ratones con déficit de GPIHBP1 presentan una marcada hipertrigliceridemia (Beigneux *et al.* 2007).

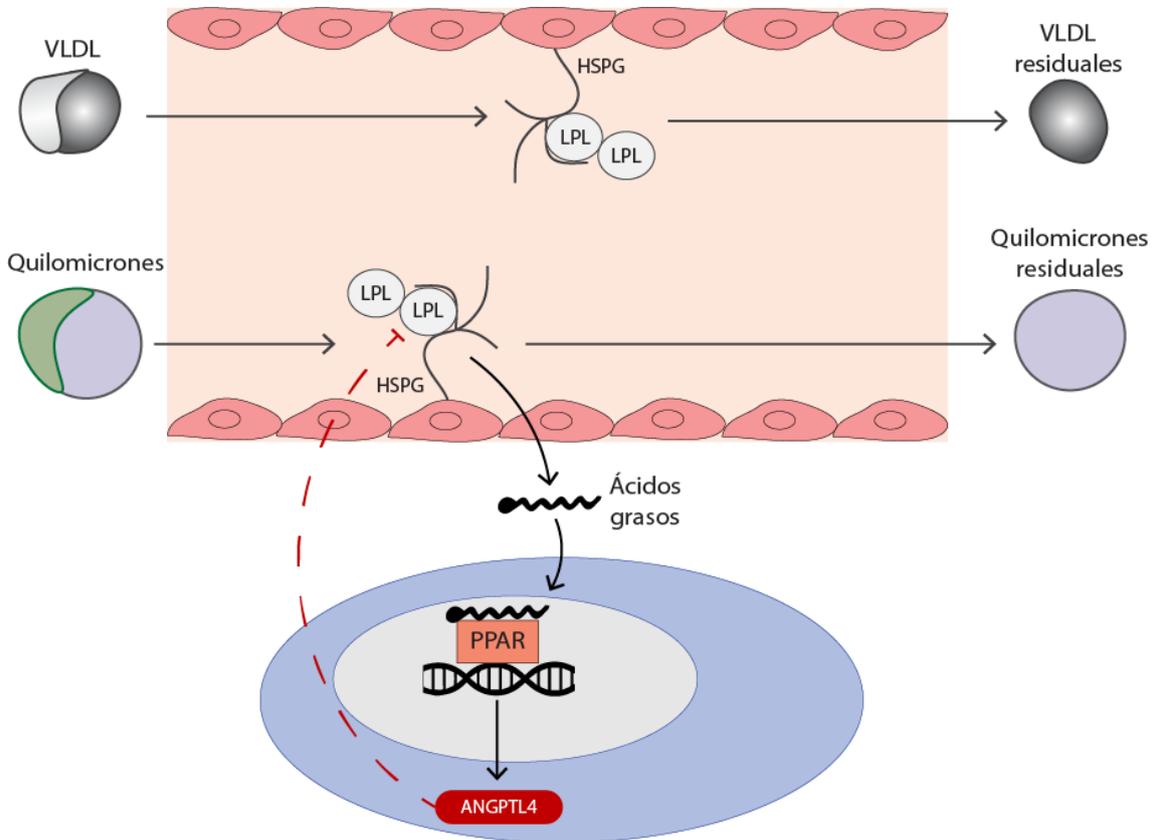


Figura 8. Esquema del metabolismo de las lipoproteínas por la lipoproteína lipasa (LPL). La LPL, sintetizada en los miocitos y adipocitos se encuentra anclada al endotelio capilar formando un dímero, gracias a los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). Esta proteína cataliza la hidrólisis de los quilomicrones y las VLDL para proporcionar ácidos grasos libres a los tejidos. Los ácidos grasos regulan la actividad de LPL mediante el aumento de expresión de la ANGPTL4, a través de los PPARs. Modificado de Georgiadi *et al.* 2010.

La LPL pertenece a la familia de las lipasas, que incluyen la lipasa endotelial, la lipasa pancreática y la lipasa hepática. La LPL está compuesta por dos dominios estructuralmente distintos unidos por un pequeño péptido. En el dominio amino-terminal (N-terminal) se localiza el centro catalítico del enzima. El dominio carboxilo-terminal (C-terminal) es necesario para la unión de la LPL a las lipoproteínas. La forma activa de la LPL es un homodímero formado por 2 subunidades de 55 kDa (Wong *et al.* 1997; Kobayashi *et al.* 2002). Se ha comprobado que la disociación de los homodímeros provoca la pérdida de la actividad enzimática de la LPL (Osborne *et al.* 1985).

La actividad de la LPL está determinada por los requerimientos energéticos, los cambios hormonales y por proteínas extracelulares. Se ha comprobado que la regulación de la actividad de LPL depende de las necesidades metabólicas del tejido, de forma que se garantice el suministro adecuado de ácidos grasos a cada tejido en el momento apropiado.

Así, el ayuno disminuye la actividad de la LPL en el tejido adiposo y la aumenta en el músculo esquelético. Esta diferencia de actividad en función del tejido tiene como objetivo dirigir los ácidos grasos al tejido adiposo después de las comidas para su almacenamiento y hacia el tejido muscular para su uso como combustible cuando existe escasez de alimentos (Ruge *et al.* 2005; Bergö *et al.* 1996).

A su vez, la actividad de LPL está regulada por algunas hormonas, tales como las catecolaminas, la hormona del crecimiento, la testosterona y los estrógenos, que disminuyen la actividad enzimática de la LPL en el tejido adiposo blanco y la incrementan en el músculo esquelético. Por el contrario, la insulina incrementa la actividad en el tejido adiposo y la disminuye en el músculo esquelético (Wang & Eckel 2009).

La actividad de la LPL en situaciones como el ayuno y el ejercicio parece estar regulada por mecanismos postraduccionales a través de proteínas extracelulares, que incluyen las apolipoproteínas y las proteínas similares a angiopoyetina. Las primeras (APO-CI, APO-CII, APO-CIII, y APO-E) son responsables del transporte de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los diferentes órganos y se combinan con los lípidos para formar las lipoproteínas. Algunas, como la APO-CII pueden activar la LPL, mientras que otras como APO-CI, APO-CIII, y APO-E la inhiben (Vainio *et al.* 1983; MacPhee *et al.* 2000; Otarod & Goldberg 2004).

El segundo grupo de proteínas reguladoras de la actividad de la LPL incluye a varios miembros de la familia de las proteínas similares a angiopoyetina (ANGPTL3, ANGPTL4 y ANGPTL8) de las que la más estudiada y mejor conocida es la ANGPTL4, también llamada factor adiposo inducido por ayuno (*fasting-induced adipose factor*, FIAF).

La ANGPTL4 es una proteína de unos 50 kDa, producida por varios tejidos entre los que se encuentran el tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético, el corazón, la piel y el intestino (Kersten *et al.* 2009). Su molécula contiene un péptido señal N-terminal (N-ANGPTL4), una región de unión, y un dominio tipo fibrinógeno C-terminal (C-ANGPTL4). El dominio N-terminal es el responsable de los efectos inhibitorios sobre la LPL, mientras que el dominio C-terminal está implicado en la regulación de la angiogénesis, y no parece participar en el metabolismo lipídico. La ANGPTL4 completa sufre un proceso de escisión, que puede tener lugar en la matriz extracelular o en el plasma, mediado por unas enzimas llamadas convertasas proproteína, para dar lugar a N-ANGPTL4 (15 kDa) y C-ANGPTL4 (37 kDa) (Lei *et al.* 2011).

Antes de la secreción y escisión, la ANGPTL4 se oligomeriza en dímeros y tetrámeros en el interior celular. La oligomerización se realiza mediante la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína 76 y 80 de la porción N-terminal. Por tanto, pueden oligomerizar la N-ANGPTL4 y la ANGPTL4 completa, pero no la C-ANGPTL4. La oligomerización protege la ANGPTL4 de la degradación manteniendo su capacidad para inhibir la LPL (Yin *et al.* 2009).

La ANGPTL4 se expresa mayoritariamente a nivel periférico, aunque también lo hace a nivel central. En ratón, se ha detectado ANGPTL4 en regiones como hipotálamo, corteza e

hipófisis (Wiesner *et al.* 2006). Se ha demostrado que la ANGPTL4 está implicada en la regulación de la ingesta de alimentos y del gasto energético. La administración *icv* de ANGPTL4 en ratones disminuye la ingesta de alimentos y el peso corporal, y aumenta el gasto energético a través de un mecanismo que se ha relacionado con la inhibición de la actividad de la AMPK hipotalámica. De forma coherente con estos datos, los ratones *knock out* (KO) de *Angptl4* muestran un incremento del peso corporal y de la actividad de la AMPK hipotalámica y una disminución del gasto energético (Kim *et al.* 2010).

Existen numerosos indicios de que la ANGPTL4 inhibe la actividad de LPL. Se ha demostrado que la sobreexpresión de ANGPTL4 incrementa los niveles de triglicéridos en plasma de ratones además de disminuir la actividad de la LPL (Lichtenstein *et al.* 2007; Köster *et al.* 2005). Asimismo, la administración de ANGPTL4 recombinante produce hipertrigliceridemia en ratones (Yoshida *et al.* 2002). Del mismo modo, se ha demostrado que los ratones que no expresan ANGPTL4 presentan hipotrigliceridemia y un aumento en la actividad de LPL (Köster *et al.* 2005). Estudios *in vitro* e *in vivo*, revelan que la ANGPTL4 favorece la conversión de los dímeros de LPL (forma activa) en monómeros inactivos (Sukonina *et al.* 2006; Lichtenstein *et al.* 2007). Además, otro factor que interviene *in vivo* en la regulación de la actividad de LPL por ANGPTL4 es el GPIHBP1. Esta proteína tiene una alta afinidad por la LPL, ya que es la responsable del transporte transendotelial de LPL, desde las células del parénquima subyacentes hacia la luz capilar. Se ha demostrado *in vitro* que la acción inhibitoria de ANGPTL4 sobre la LPL disminuye cuanto ésta se encuentra unida a GPIHBP1 (Sonnenburg *et al.* 2009).

Numerosos estímulos pueden regular la expresión de ANGPTL4. En el tejido adiposo, los glucocorticoides inducen la expresión de ANGPTL4 en situaciones de ayuno (Koliwad *et al.* 2009), mientras que la insulina tiene un efecto supresor sobre la expresión de ANGPTL4 (Yamada *et al.* 2006). De esta forma, el incremento de insulina posprandial favorece la activación de la LPL, permitiendo al tejido adiposo la captación de ácidos grasos procedentes de las lipoproteínas plasmáticas, mientras que el incremento de los niveles de glucocorticoides durante el ayuno inhibe la actividad de la LPL. Además, la restricción calórica crónica y los ácidos grasos libres, a través de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (*Peroxisome proliferator-activated receptor*, PPARs) también incrementan los niveles plasmáticos de ANGPTL4 (Kersten *et al.* 2009; Mandard *et al.* 2004). También, algunas situaciones fisiológicas tales como la diferenciación de los adipocitos, la hipoxia, el embarazo y la lactancia incrementan la expresión de ANGPTL4 (Dutton & Trayhurn 2008; Josephs *et al.* 2007; Le Jan *et al.* 2003; Wiesner *et al.* 2006).

Como se ha dicho previamente, la ANGPTL4 es una pieza clave en la regulación del metabolismo lipídico, especialmente en situaciones de ayuno. El ayuno incrementa los niveles plasmáticos de ANGPTL4 y su expresión en tejido adiposo y en hígado. Por el contrario, las dietas ricas en grasa disminuyen los niveles plasmáticos de esta proteína (Kersten *et al.* 2000). Asimismo, la actividad de la LPL en el tejido adiposo blanco varía en función de los ciclos de alimentación y ayuno, habiéndose demostrado que los ratones que no expresan ANGPTL4 no son sensibles al efecto inhibitorio del ayuno sobre la actividad de la LPL, lo que apoya la hipótesis de que la disminución en la actividad de la

LPL durante el ayuno está mediada por el aumento de la expresión de la ANGPTL4 (Kroupa *et al.* 2012).

6.3. Lipogénesis

Las células transforman el exceso de energía en ácidos grasos, que se esterifican con glicerol para almacenarse como triglicéridos (Frayn 2002). En este proceso intervienen numerosos enzimas sometidos a un estricto control nutricional y hormonal, aunque en este capítulo nos centraremos en la sintasa de ácidos grasos y los enzimas responsables de la síntesis de NADPH, el cofactor necesario para síntesis de lípidos.

Este proceso se realiza en el citoplasma celular gracias a dos enzimas: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (*Fatty acid synthase*, FAS). El primer paso en la biosíntesis de ácidos grasos es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA por la acción de la ACC (Wakil & Abu-Elheiga 2009). A continuación, la FAS cataliza la formación de las cadenas carbonadas largas de los ácidos grasos (como el palmitato) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA (Figura 9). En este proceso se requieren el ATP para unir CO₂ al acetil-CoA y producir malonil-CoA, y el NADPH (Nelson & Cox 2006; Liu *et al.* 2010).

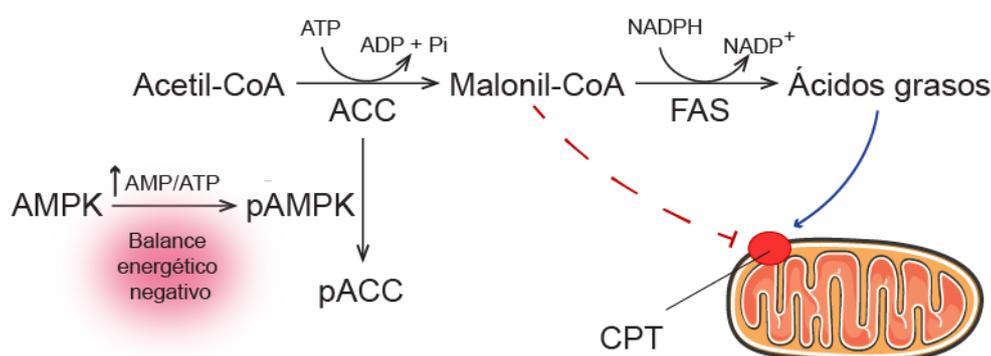


Figura 9. Síntesis de ácidos grasos. ACC: acetil-CoA carboxilasa; AMPK: proteína quinasa dependiente de AMP; CPT: complejo carnitil-palmitoil transferasa; FAS: ácido graso sintasa. Modificado de Nelson & Cox 2006.

El paso limitante de la biosíntesis de los ácidos grasos es la reacción catalizada por la ACC, por esta razón se le considera uno de los principales puntos de regulación de la síntesis de ácidos grasos. El palmitoil-CoA, principal producto de la síntesis de ácidos grasos y el malonil-CoA actúan como inhibidores de esta enzima. El citrato, producto del ciclo del ácido cítrico, es un activador alostérico de esta enzima, incrementado la velocidad de biosíntesis de los ácidos grasos. Cuando existe una situación de balance energético positivo, se produce un aumento en las concentraciones mitocondriales de acetil-CoA y ATP, lo que favorece el transporte de citrato fuera de las mitocondrias; la enzima citrato liasa convierte el citrato en acetil-CoA citosólico, que se transforma en malonil-CoA por la acción de la ACC (Saha *et al.* 1997). Al mismo tiempo, el citrato citosólico actúa activando alostéricamente la ACC (Brownsey *et al.* 2006), e inhibiendo la fosfofructoquinasa-1, reduciendo la actividad de la glucólisis (Randle 1998). De esta manera, el citrato juega un papel central en la desviación del metabolismo celular del consumo del combustible metabólico a su almacenamiento en forma de ácidos grasos (Figura 10). Este proceso está activado por la

hormona insulina, que desencadena la activación de la enzima citrato liasa, la cual convierte el citrato en acetil-CoA. A su vez, la insulina estimula la desfosforilación y activación de la ACC (Yu *et al.* 1990; Witters *et al.* 1988). Por otro lado, el glucagón y la adrenalina desencadenan la fosforilación de ACC, inactivándola (Koh *et al.* 2007). La ACC también está regulada por la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). La activación de AMPK produce una inhibición en la síntesis de ácidos grasos, al mismo tiempo que estimula la β -oxidación. La AMPK activada fosforila la ACC inactivándola, inhibiendo de esta manera la producción de malonil-CoA (Figura 9). El malonil-CoA es el primer intermediario en la biosíntesis de ácidos grasos, y un inhibidor de la CPT-I (complejo carnitin-palmitoiltransferasa), enzima que permite la entrada de los ácidos grasos en la mitocondria para que se pueda realizar la β -oxidación (Kudo *et al.* 1995; Ruderman *et al.* 1999).

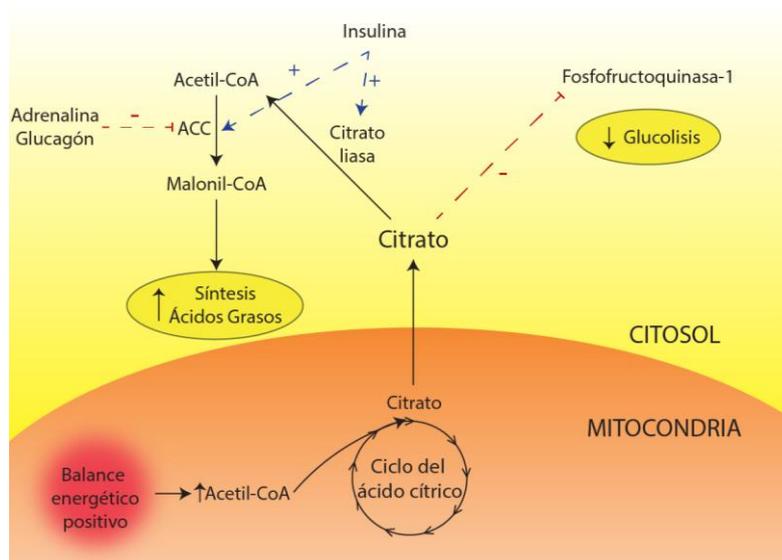


Figura 10. Regulación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en la síntesis de ácidos grasos.

6.3.1. Sintasa de ácidos grasos

La FAS es una enzima citosólica con un peso molecular de 270 kDa. Esta enzima es un homodímero formado por dos unidades idénticas, cada una formada a su vez por varias subunidades necesarias para la reacción de síntesis de ácidos grasos (Smith *et al.* 2003; Wakil 1989). La síntesis de ácidos grasos catalizada por la FAS está constituida por tres fases: i) condensación de malonil-CoA con acetil-CoA, ii) elongación de la cadena de ácidos grasos por adición de malonil-CoA a través de reacciones de reducción y iii) liberación de la cadena larga de ácidos grasos de la FAS. Para la síntesis de una molécula palmitato se necesitarían una molécula de acetil-CoA, 7 de malonil-CoA, 7 de ATP y 14 de NADPH (Liu *et al.* 2010).

Este enzima tiene una gran importancia en la homeostasis de la energía. Se ha demostrado en ratones que la inhibición de la FAS reduce la adiposidad (Loftus *et al.* 2000). Por el contrario, el incremento de la actividad de la FAS en el tejido adiposo podría incrementar los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, favoreciendo el desarrollo de resistencia a insulina (Semenkovich 1997). En este sentido, se ha vinculado el aumento de

expresión de *Fas* en el tejido adiposo con el desarrollo de resistencia a insulina y con el incremento de adipocinas circulantes como IL-6 y leptina (Berndt *et al.* 2007).

La FAS se expresa mayoritariamente en tejidos con actividad lipogénica, como el hígado y el tejido adiposo (Kusakabe *et al.* 2000). La actividad de la FAS está disminuida en tejidos que no sintetizan lípidos, como el músculo. Esto se debe a que los ácidos grasos sintetizados se dirigen hacia la β -oxidación para obtener energía y no se almacenan en forma de triglicéridos. La ingestión de hidratos de carbono, la insulina y los glucocorticoides aumentan la expresión de la FAS, mientras que los ácidos grasos insaturados, AMPc y glucagón la disminuyen (Sul & Wang 1998).

La expresión de la FAS en tejidos periféricos está regulada por la dieta, la glucosa, la tiroxina y por el factor de transcripción SREBP1C (*Sterol regulatory element-binding protein 1c*). En situaciones de deficiencia energética, como el ayuno, la expresión de ARNm y proteína de FAS disminuye en hígado pero no en cerebro, lo que indica que la FAS a nivel central tiene una función distinta a la de almacenar energía (Ronnelt *et al.* 2005). Así, se ha visto que la inhibición de la FAS hipotalámica, mediante la administración central de un inhibidor de esta enzima, suprime la ingesta de alimentos, al mismo tiempo que activa la β -oxidación en el músculo esquelético (Cha *et al.* 2005).

6.3.2. Ruta de las pentosas fosfato y NADPH

El cofactor necesario para la síntesis de ácidos grasos es el NADPH. Por lo tanto, la magnitud de la lipogénesis dependerá del aporte de los sustratos necesarios para la lipogénesis y del aporte de NADPH. Las principales fuentes de NADPH son la ruta de las pentosas fosfato y la reacción catalizada por el enzima málico. En la ruta de las pentosas fosfato, la glucosa-6-fosfato se transforma en ribosa necesaria para la síntesis de nucleótidos y NADPH. Esta vía, es necesaria para la reducción del glutatión, la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Riganti *et al.* 2012). La ruta de las pentosas fosfato tiene lugar en el citosol y se divide en dos fases: la fase oxidativa (genera ribosa 5-fosfato y NADPH) y la fase no oxidativa (convierte pentosas fosfato de nuevo en hexosas fosfato, permitiendo que continúen las reacciones oxidativas). La primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato es la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), que forma 6-fosfogluconolactona. El NADP^+ actúa como aceptor de electrones, formando NADPH. A continuación, se produce la hidrólisis de la 6-fosfogluconolactona gracias a la acción de la 6-fosfogluconolactona lactonasa, obteniéndose 6-fosfogluconato. Por último, el 6-fosfogluconato se oxida y se descarboxila por la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, formando ribulosa-5-fosfato. Esta reacción genera una segunda molécula de NADPH (Figura 11) (Tian *et al.* 1998).

El NADPH formado es necesario para las reacciones biosintéticas (como la síntesis de ácidos grasos, esteroides, etc.), la regeneración del glutatión reducido, el mantenimiento de la actividad de la catalasa y la regulación del equilibrio redox celular. En los tejidos en los que se necesita gran cantidad de NADPH, las pentosas fosfato producidas se reciclan a glucosa-6-fosfato. Este proceso está regulado por la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Cuando una célula está convirtiendo rápidamente NADPH en NADP^+ , en reducciones biosintéticas, aumenta el nivel de NADP^+ lo que estimula alostéricamente la G6PD, incrementando de este modo

el flujo de glucosa 6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato. Cuando disminuye la demanda de NADPH, disminuye el nivel de NADP^+ , haciendo más lenta la ruta de las pentosas fosfato y, en su lugar, la glucosa 6-fosfato se utiliza como combustible para la glucólisis (Nelson & Cox 2006).

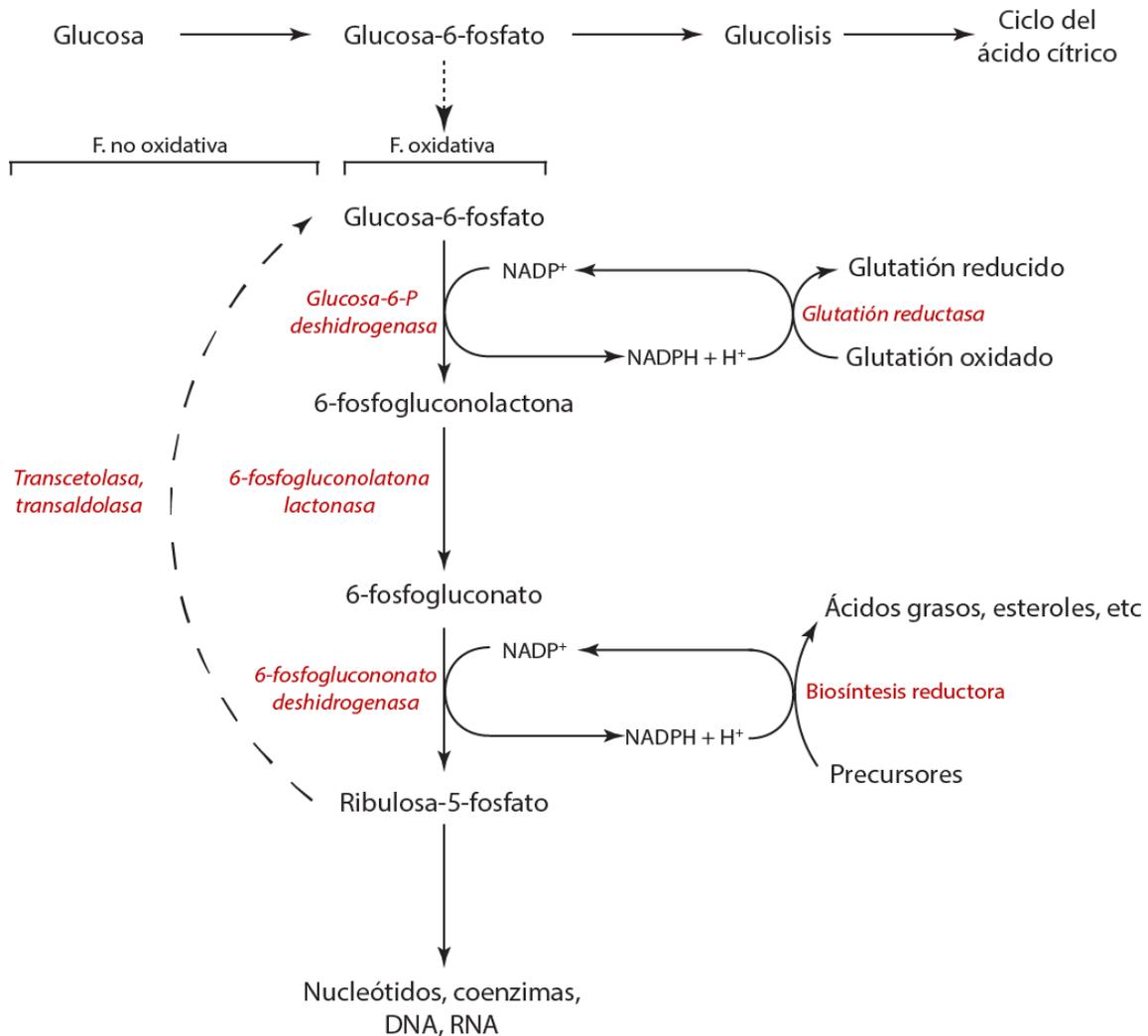


Figura 11. Esquema general de la ruta de las pentosas fosfato. El NADPH formado en la fase oxidativa es utilizado para reducir el glutati3n y para sostener la biosíntesis reductora. El otro producto de la fase oxidativa es la ribulosa 5-fosfato, que sirve como precursor de nucle3tidos, coenzimas y ácidos nucleicos. En las células que no utilizan ribosa 5-fosfato para la biosíntesis, la fase oxidativa recicla las pentosas fosfato producidas a glucosa-6 fosfato. Tomado de Nelson & Cox 2006.

La cantidad de glucosa metabolizada por la vía de la pentosas fosfato varía según el tejido entre un 5 y un 30%. Los tejidos donde esta vía tiene mayor actividad son el tejido adiposo, el hígado, las glándulas mamarias, las glándulas suprarrenales, las gónadas y los eritrocitos. En el resto de tejidos, la actividad de esta vía está condicionada por la disponibilidad de NADP^+ y de agentes oxidantes, así como por la actividad proliferativa (Riganti *et al.* 2012).

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la principal fuente de NADPH en el organismo y el enzima limitante de la velocidad en la vía de las pentosas fosfato. Este enzima, se expresa de forma ubicua y está implicado en diversas funciones celulares, incluyendo el

crecimiento celular, la supervivencia y la regulación redox. La deficiencia de este enzima causa anemia hemolítica e ictericia neonatal (Xu *et al.* 2005; Beutler 1994).

Como se ha dicho previamente, a nivel del tejido adiposo la G6PD suministra el NADPH necesario para la biosíntesis de lípidos. La importancia de la interacción entre la G6PD y la lipogénesis se puede observar en el incremento de este enzima en hígado y tejido adiposo en varios modelos animales de obesidad (J. Park *et al.* 2005; Gupte *et al.* 2009). En este sentido, se ha observado que la sobreexpresión de este enzima en adipocitos origina un incremento celular de los ácidos grasos libres y triglicéridos, así como una alteración en la expresión de adipoquinas (TNF- α , resistina y adiponectina), lo que desencadena resistencia a la insulina (J. Park *et al.* 2005).

La dieta y las hormonas tienen un papel importante en la regulación de la actividad de la G6PD. Así, se ha demostrado que las dietas con alto contenido en hidratos de carbono, los ácidos grasos saturados, el glucagón y el ayuno disminuyen los niveles hepáticos de G6PD, mientras que la insulina, hormonas tiroideas y glucocorticoides tienen el efecto contrario (Kletzien *et al.* 1994; Salati & Amir-Ahmady 2001). La hiperglucemia producida en la diabetes inhibe la vía de las pentosas fosfato mediante la disminución de la expresión de la G6PD (Xu *et al.* 2005). Por otra parte, se ha observado una disminución de la velocidad lipogénica y de las concentraciones de lipoproteínas en los pacientes que presentan deficiencia en esta enzima (Dessi *et al.* 1986; Dessì *et al.* 1992). Por último, se ha visto que la dehidroepiandrosterona, una hormona esteroidea sintetizada principalmente en las glándulas suprarrenales, es capaz de inhibir la G6PD, disminuyendo la formación de NADPH y por tanto la lipogénesis (Williams 2000).

El enzima málico (ME) es otro enzima generador del NADPH necesario para la lipogénesis. Es una proteína tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas, cuyos monómeros carecen de actividad. El enzima málico cataliza la descarboxilación oxidativa reversible de malato en piruvato (Figura 12). Esta reacción, que une la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, implica la reducción de NAD(P) a NAD(P)H (Chang & Tong 2003). En los mamíferos existen tres isoformas de este enzima: una isoforma citosólica (ME1) y dos isoformas mitocondriales (ME2 y ME3). Aunque esta reacción es reversible, se piensa que, al menos la isoforma citosólica, se encuentra desplazada hacia la formación de piruvato *in vivo* (Veech *et al.* 1969). Se localiza en los tejidos donde se sintetizan ácidos grasos, especialmente en el tejido adiposo y en hígado, donde este enzima desempeña un papel clave en la lipogénesis porque es una de las principales fuentes del NADPH necesario para la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Chang & Tong 2003). Además este enzima tiene un papel importante en el metabolismo ya que sirve de vínculo entre la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. El malato es uno de los principales productos intermedios del ciclo de Krebs y es exportado desde la mitocondria al citosol, donde el ME1 genera piruvato y poder reductor a partir del malato (MacDonald 1995).

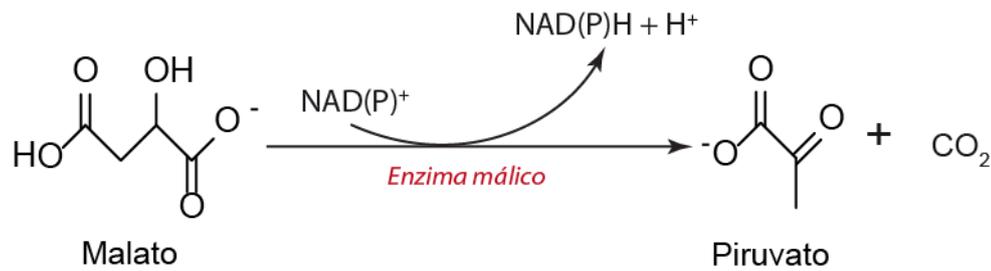


Figura 12. Obtención de NADPH mediante el enzima málico.

Como en el caso anterior, el ME también está regulado por factores dietéticos y hormonales. La composición de las dietas es capaz de influir en la actividad del ME1. Así, las dietas ricas en grasa disminuyen la actividad del ME1 en hígado y TA, mientras que las dietas bajas en grasa la incrementan (Fitch & Chaikoff 1960; Crozier *et al.* 1987; van Schothorst *et al.* 2006). Además, se ha demostrado que la restricción calórica incrementa la expresión de ME1 en el tejido adiposo en ratón (van Schothorst *et al.* 2006; Higami *et al.* 2004). La insulina y la T3 tienen un papel inductor de la transcripción del ME, mientras que el glucagón tiene el efecto contrario (Katsurada *et al.* 1988; Goodridge & Adelman 1976).

Numerosos estudios muestran la importancia del ME1 en la obesidad, la homeostasis energética y la diabetes (van Schothorst *et al.* 2006; Higami *et al.* 2004; Coleman 1992). Se ha demostrado en modelos animales que en la obesidad se produce un incremento de la actividad del ME1 en el tejido adiposo y en el hígado (Yen *et al.* 1976; Huupponen *et al.* 1989). Existe una estrecha relación, tanto en humanos como en roedores, entre el ME1 y la predisposición a la obesidad y la diabetes tipo 2. Así, se ha observado que los ratones adultos que carecen de ME1 son resistentes a la diabetes y al desarrollo de obesidad por dietas HF (Zhong *et al.* 2010; X. Yang *et al.* 2009).

Todo esto sugiere que tanto la G6PD como el ME podrían jugar un papel clave en la lipogénesis y, consecuentemente, en el mantenimiento de la homeostasis energética. Por tanto, los cambios en el patrón de expresión de estas enzimas pueden contribuir a la regulación del metabolismo energético y del peso corporal.

Capítulo 1

Papel de la colecistoquinina (CCK-8) en la regulación del almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo en un modelo de obesidad en rata

1. Introducción

1.1. Colecistoquinina

La CCK fue caracterizada en 1928 por Ivy y Oldberg en el tracto gastrointestinal como una hormona que contraía la vesícula biliar. Unos años más tarde, se describió su presencia en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos (Vanderhaeghen *et al.* 1975; Ivy & Oldberg 1928). Existen múltiples formas de la CCK con actividad biológica, aunque la primera molécula que se identificó era un péptido formado por 33 aminoácidos (CCK-33) (Mutt & Jorpes 1971). La CCK posee una gran variedad de formas biológicamente activas, todas ellas derivadas de la misma molécula de ARNm que se traduce en una molécula de 114 aminoácidos denominada pre-procolecistoquinina. La existencia de diferentes formas moleculares de CCK se puede explicar por modificaciones postraduccionales específicas de cada tejido (Gubler *et al.* 1984). La actividad biológica de las diferentes formas de CCK depende de la longitud del péptido y de la presencia de formas sulfatadas, que son más potentes (Bonetto *et al.* 1999). La forma predominante en tejidos periféricos es la CCK-33, aunque también se han detectado otras como la CCK-8, la CCK-58 o la CCK-39. En el SNC, la forma predominante es la CCK-8 sulfatada (Figura 13), aunque también existen la CCK-8 no sulfatada, la CCK-4 y la CCK-5 (Rehfeld & Hansen 1986).

A nivel central, la CCK participa en la regulación de la actividad cardiovascular, la actividad respiratoria, la percepción del dolor, el sueño, el comportamiento sexual, la memoria, la actividad dopaminérgica y la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. A nivel periférico, la CCK estimula la liberación de amilasa y lipasa por el páncreas exocrino, retrasa el vaciado gástrico, y está implicada en la regulación de la ingesta (Crawley & Corwin 1994; Cano, Ezquerro, *et al.* 2003a).

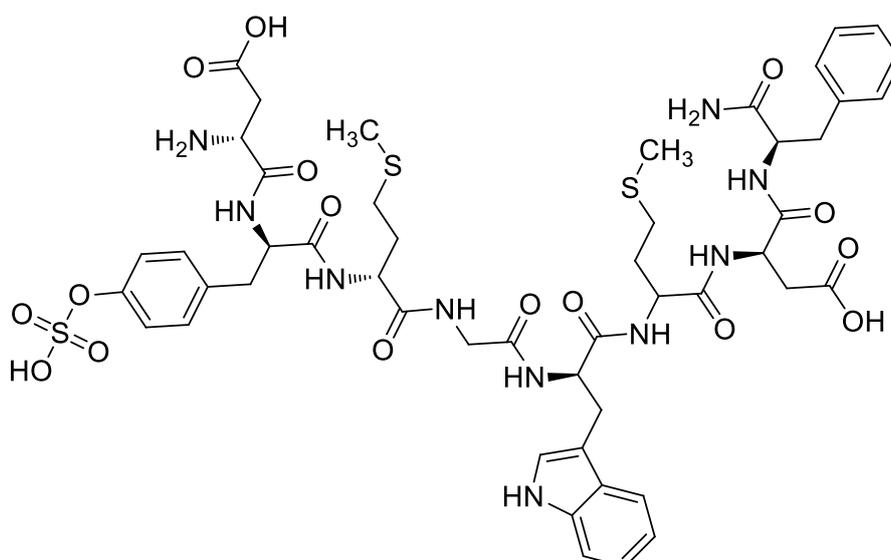


Figura 13. Secuencia de la CCK-8. HOOC-Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂.

La CCK se produce principalmente en el duodeno y en el íleon por las células I, aunque también se sintetiza en el SNC (Rehfeld & Hansen 1986; Rehfeld 1978). La liberación

de CCK intestinal, es estimulada por la presencia intraluminal de los nutrientes originados en la digestión. Esta secreción es favorecida por las dietas ricas en grasa, en proteínas y en glucosa (Moran & Kinzig 2004; Liddle *et al.* 1985). Se ha demostrado que la capacidad de estimular la liberación de CCK intestinal depende de la longitud de la cadena de los ácidos grasos de la dieta, sobre todo de los de cadena superior a once átomos de carbono (McLaughlin *et al.* 1999). Asimismo, los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y el triptófano también favorecen la liberación de CCK (Wang *et al.* 2011). En la mayoría de las especies, la concentración plasmática basal de CCK es de aproximadamente 1 pmol/l y aumenta hasta 5-8 pmol/l después de la ingesta. Estos niveles aumentan gradualmente durante 10-30 minutos y posteriormente disminuyen, manteniéndose elevados durante 3-5 horas (Moran & Kinzig 2004).

También es importante destacar que esta hormona se ha podido identificar en varias áreas cerebrales. En la rata, la CCK se distribuye en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el bulbo olfatorio, el hipotálamo y el tálamo (Crawley & Corwin 1994), mientras que en humanos, se localiza principalmente en la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, la amígdala, el tálamo o el cerebelo (Vanderhaeghen *et al.* 1992).

1.2. Receptores de la CCK

En los años 80, Innis y Snyder identificaron en páncreas y cerebro dos tipos de receptores de CCK: receptores CCK-1 y CCK-2, formados por 429 y 452 aminoácidos respectivamente. El receptor CCK-1 está localizado principalmente en tejidos periféricos, mientras que el receptor CCK-2 es de localización central fundamentalmente. Estos receptores presentan diferente estructura y grado de afinidad por los fragmentos de CCK (Innis & Snyder 1980). Los dos presentan siete dominios transmembrana y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Wank 1995).

El receptor CCK-1 se localiza en páncreas, mucosa gástrica, vesícula biliar, capa muscular del tracto gastrointestinal y nervio vago (Wank 1995; Zarbin *et al.* 1981). También, se ha identificado el receptor CCK-1 en diversos núcleos del SNC como el área postrema, el núcleo del tracto solitario, el núcleo supraóptico, el NPV, el NDM, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el núcleo accumbens (Wank 1995; Hill *et al.* 1990; Hill *et al.* 1987).

El receptor CCK-2 se sitúa a nivel periférico en estómago y tejido adiposo. A nivel central está ampliamente distribuido, localizándose principalmente en núcleo accumbens, núcleos del telencéfalo y del diencefalo, hipocampo y diversos núcleos hipotalámicos, como el supraóptico o el ventromedial (Mercer *et al.* 2000; Wank 1995; Attoub *et al.* 1999). Cada vez está más aceptado que el receptor CCK-2 es esencial para la homeostasis normal del tejido adiposo. En este sentido, se ha observado que los ratones que no expresan este receptor presentan un mayor peso corporal y una mayor ingesta de alimentos, pero tienen menor cantidad de tejido adiposo (Chen *et al.* 2006; Weiland *et al.* 2004).

Existen estudios que han revelado polimorfismos en los receptores CCK-1 y CCK-2, lo que pone de manifiesto que existen diferencias interindividuales en cuanto a la eficacia y

afinidad de los receptores CCK por los diferentes ligandos (Houston *et al.* 2006; Kopin *et al.* 1997).

1.3. Papel de la CCK en el control de la ingesta

La CCK es una de las señales de saciedad más estudiadas, capaz de reducir de forma dosis-dependiente el tamaño de las raciones ingeridas en numerosas especies, incluida la humana (Moran & Schwartz 1994; Smith & Gibbs 1992; Gibbs *et al.* 1973a; West *et al.* 1984). La saciedad inducida por la CCK está mediada principalmente por los receptores CCK-1, razón por la que los antagonistas del receptor CCK-1 provocan un aumento de la ingesta, mientras que los agonistas la disminuyen (Simmons *et al.* 1998; Corwin *et al.* 1991).

El efecto saciante de la CCK se debe a la interacción de mecanismos periféricos y centrales. Por un lado, la CCK es un potente inhibidor del vaciado gástrico, por lo que algunos de sus efectos inhibidores de la ingesta pueden estar mediados indirectamente por la retención de alimento en el estómago (Liddle *et al.* 1986; Liddle *et al.* 1988). Por el otro, la presencia de alimento en el intestino produce la liberación de CCK, que interacciona con receptores CCK-1 vagales y activan el NTS, que está conectado con el NPV y NDM del hipotálamo (Schwartz & Moran 1994; Crawley & Schwaber 1984; Ter Horst *et al.* 1989). Es importante resaltar que la administración de antagonistas del receptor 5-HT₃ disminuye la activación neuronal del NTS y del área postrema y la saciedad inducida por CCK, lo que indica que el sistema serotoninérgico puede modular los efectos de la CCK en la ingesta (Daughters *et al.* 2001).

Los efectos de la CCK sobre la saciedad también están mediados por mecanismos exclusivamente centrales. Así, se ha comprobado que la administración central de CCK disminuye la ingesta en ratones (Blevins *et al.* 2000), mientras que la administración central de antagonistas del receptor CCK-1 bloquea este efecto (Hirosue *et al.* 1993). Incluso en animales vagotomizados, los antagonistas selectivos del receptor CCK-1 pueden estimular la ingesta de alimentos (Reidelberger 1992). Además, la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal durante el ayuno parece estar mediada por receptores CCK. De hecho, la administración sistémica de CCK induce la liberación de ACTH (Kamilaris *et al.* 1992) y activa la transcripción de c-Fos en las neuronas NPV que expresan CRH (Verbalis *et al.* 1991). En consonancia con todo ello, el bloqueo del receptor CCK-1 durante el ayuno evita la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (Ruiz-Gayo *et al.* 2000).

El papel del receptor CCK-2 en el control de la ingesta se conoce con menos detalle, aunque su presencia en distintas áreas hipotalámicas (Cano *et al.* 2003; Noble *et al.* 1999; Burdakov & Ashcroft 2002) así como la hiperfagia observada en ratones deficientes de este receptor (Chen *et al.* 2006; Clerc *et al.* 2007) hace pensar que tiene una función relevante. Por otra parte, se ha comprobado que los agonistas y los antagonistas del receptor CCK-2 no tienen efectos sobre la ingesta (Corwin *et al.* 1991; Parrott 1993). Además, el efecto saciante de la CCK administrada por vía intraperitoneal desaparece en los ratones que carecen del receptor CCK-1, pero se mantiene en los animales que carecen del receptor CCK-2 (Kopin *et al.* 1999). Estos animales presentan además una mayor velocidad de

vaciado gástrico, lo que indica que la importancia del receptor CCK-2 en la regulación está relacionada indirectamente con la distensión gástrica (Miyasaka *et al.* 2004; Kissileff *et al.* 2003).

Uno de los modelos más usados para determinar el papel de la CCK en el control de la ingesta y la homeostasis energética es la rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*). Estas ratas carecen de los receptores CCK-1 funcionales, lo cual se asocia con una disminución en la capacidad de procesar las señales gastrointestinales de saciedad. Las ratas OLETF desarrollan hiperfagia, obesidad y diabetes tipo 2 (Moran & Bi 2006; Schroeder *et al.* 2009). Por el contrario, los ratones que carecen de CCK parecen ser resistentes a la obesidad inducida por dietas HF (Lo *et al.* 2010) ya que presentan un aumento del gasto energético y menores depósitos adiposos que sus controles. Además, se ha demostrado que los animales alimentados con dieta HF son menos sensibles a los efectos saciantes de la CCK comparados con los animales alimentados con una dieta baja en grasa (Covasa & Ritter 1998). Por último, se ha demostrado que tras 4 semanas de dieta HF, la CCK es más eficaz como agente saciante en las ratas resistentes (*obesity-resistant*, OR) que en las sensibles al desarrollo de obesidad (*obesity-prone*, OP), lo que sugiere una resistencia a esta hormona en los segundos (Duca *et al.* 2013). A pesar de todos estos estudios, aún quedan diferentes elementos por determinar en torno al papel de la CCK en la regulación de la ingesta.

1.4. La CCK y el metabolismo energético

Cada vez son más los estudios que sitúan a la CCK como una pieza fundamental en la maquinaria reguladora de la homeostasis energética a corto plazo, limitando el tamaño de las raciones y a largo plazo, modulando, directa o indirectamente las acciones de la leptina y de la insulina. En relación con la insulina se ha demostrado que la CCK regula la glucemia posprandial mediante el aumento de la liberación de insulina mediado por el receptor CCK-1 (Ahrén *et al.* 2000; Rossetti *et al.* 1987; Karlsson & Ahrén 1992) y el enlentecimiento del vaciado gástrico (Liddle *et al.* 1988). Por lo tanto, el efecto de la CCK en los niveles de insulina depende por un lado del equilibrio entre la acción secretagoga directa y por otro de la inhibición indirecta de la liberación de insulina, debido al efecto inhibitorio sobre el vaciado gástrico. Por otra parte, la administración de dosis bajas de insulina directamente en el cerebro también aumenta el efecto saciante de la CCK (Figlewicz *et al.* 1995). Por último, es importante destacar que la CCK podría estar implicada en las respuestas de adaptación en los islotes pancreáticos. Durante la obesidad se produce un incremento de la CCK, la cual actúa aumentando la supervivencia de las células β e incrementando su masa, compensando así la resistencia a la insulina que acompaña a la obesidad (Lavine *et al.* 2010).

También existe una acción sinérgica entre los efectos saciantes de la leptina y de la CCK, que se ha observado en términos de expresión de c-Fos en diversas áreas cerebrales implicadas en la regulación de homeostasis energética como el NPV, el área postrema y el NTS (Emond *et al.* 1999; Barrachina *et al.* 1997). Por otro lado, la CCK, a través de receptores CCK-1, facilita el paso de leptina a líquido cefalorraquídeo (Cano, Ezquerra, *et al.* 2003b), lo que puede contribuir a la regulación de la ingesta. Para que la CCK pueda reducir la ingesta es necesario el correcto funcionamiento de las vías de señalización de

leptina en el NAR (Morton *et al.* 2005). Además, se ha comprobado que el efecto conjunto de leptina y CCK sobre la pérdida de peso podría estar regulado por mecanismos independientes de los que regulan la ingesta, como un incremento de la tasa metabólica en reposo y de la termogénesis o una disminución de los procesos de absorción y almacenamiento de los nutrientes ingeridos (Matson *et al.* 2000). También se ha propuesto que la leptina secretada por la mucosa gástrica durante la ingesta, podría actuar de forma paracrina junto a la CCK sobre los receptores de leptina de las vías aferentes vagales abdominales. De esta forma, la leptina actuaría incrementando el efecto saciante de la CCK (Peters *et al.* 2005). En conjunto, estos resultados demuestran que la regulación del gasto energético y de la ingesta de alimentos está controlada, al menos en parte, por los cambios en la sensibilidad a insulina y leptina originados por la CCK.

La CCK modula el efecto de otros mediadores implicados en la regulación del metabolismo energético, como la ghrelina, el PYY₃₋₃₆ y la apolipoproteína AIV (APO-AIV). Por un lado se ha observado que la CCK inhibe el efecto orexigénico de la ghrelina periférica mediante la atenuación de la actividad neuronal en el NAR del hipotálamo (Date *et al.* 2005; Kobelt *et al.* 2005). A nivel periférico, la ghrelina y la CCK ejercen sus efectos orexigénicos y anorexigénicos, respectivamente, a través del nervio vago, donde se localizan el receptor de ghrelina y el receptor de CCK-1. Asimismo, ambas moléculas tienen efecto cuando se administran a nivel central (Date *et al.* 2005). Además de participar en el control de la homeostasis energética, la ghrelina regula la motilidad y secreción gástrica. La ghrelina y la CCK no solo tienen funciones opuestas en la regulación de la ingesta, sino también en la regulación del vaciado gástrico, así mientras la CCK retrasa el vaciado gástrico, la ghrelina lo estimula (Dornonville de la Cour *et al.* 2004; Crawley & Corwin 1994). Por otro lado, existe una interacción entre la CCK y el péptido anorexigénico PYY₃₋₃₆. La administración de este péptido activa la vía aferente vagal, lo que produce una disminución de la velocidad de vaciado gástrico, pero no tiene efectos sobre la ingesta. Esto se debe a que el efecto anorexigénico de este péptido se produce a nivel hipotalámico. La administración de un antagonista selectivo del receptor CCK-1 produjo una atenuación de la activación de la vía aferente vagal y de la inhibición del vaciado gástrico. Esto sugiere que las respuestas a PYY₃₋₃₆ a nivel del nervio vago dependen, en parte, de la expresión del receptor CCK-1 (Whited *et al.* 2007). Por último, se ha comprobado que la APO-AIV, que es una proteína encargada del transporte de lípidos en plasma, potencia el efecto saciante de la CCK por un mecanismo dependiente del receptor CCK-1 (Lo *et al.* 2007).

Todos estos datos en conjunto apoyan la idea de que para la correcta regulación de la ingesta es necesaria la combinación de señales a corto y a largo plazo y subrayan la importancia de la CCK en la modulación de la ingesta y del balance energético. A pesar de todos estos estudios, aún quedan diferentes elementos por determinar sobre el papel de la CCK en la regulación del almacenamiento de los triglicéridos de la dieta.

2. Hipótesis y objetivos

Basándonos en el hecho de que la CCK limita el tamaño de las raciones, facilita la absorción intestinal de los lípidos que forman parte de la dieta y estimula la secreción de insulina, nos preguntamos si esta hormona estaría también implicada en la distribución tisular de los lípidos de la dieta, de forma que, al igual que la insulina, regule la dinámica de las reservas energéticas y a su vez, evite que los lípidos se acumulen indebidamente en tejidos no adiposos, impidiendo la aparición de fenómenos de lipotoxicidad.

Nuestra hipótesis es que la CCK puede ser un elemento integral de los mecanismos homeostáticos que regulan el flujo de lípidos hacia el tejido adiposo durante los periodos posprandiales, con el fin de que los triglicéridos de la dieta sean asimilados convenientemente.

El objetivo general que nos hemos planteado en este estudio ha sido caracterizar el efecto del octapéptido C-terminal sulfatado de la CCK (CCK-8) en la rata *Sprague-Dawley* alimentada con una dieta rica en grasa saturada sobre los mecanismos implicados en la captación de lípidos por el tejido adiposo.

Los objetivos concretos de nuestra investigación han sido los siguientes:

1. Evaluar el efecto de la CCK sobre el peso corporal, la ingesta y la cantidad de tejido adiposo.
2. Investigar el papel de la CCK sobre la actividad del eje LPL-ANGPTL4 en la regulación del almacenamiento de los lípidos de la dieta y el control del peso corporal en ratas con dieta HF.

3. Material y métodos

3.1. Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas macho *Sprague-Dawley* de seis semanas de edad (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, España). Los animales se estabularon individualmente en condiciones controladas de humedad (45-50%) y temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con un ciclo de 12 horas de luz (8:00-20:00 h) y 12 horas de oscuridad (20:00-8:00 h). Durante la primera semana de estabulación todos los animales tuvieron acceso a una dieta sólida estándar (RMN, Harlan Interfauna Iberica, España) y agua *ad libitum*. El estudio se realizó de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005) y fue aprobado por el comité ético de la universidad CEU-San Pablo (protocolos 2006-02456 y 2009-09714/038-1).

Tras la primera semana de estabulación, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos con similar peso corporal. Los animales del primer grupo (n=16), recibieron una dieta control. Los animales del segundo grupo (n=32) recibieron una dieta rica en grasa (HF; 58V8, TestDiet, Reino Unido). El peso corporal y la ingesta de alimentos se monitorizaron dos veces por semana (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil energético de las dietas utilizadas en los experimentos.

	<i>Control</i>	<i>HF</i>
Energía (kcal/g)	3,1	4,6
Calorías de proteínas (%)	24	18,1
Calorías de grasa (%)	18	46,1
Calorías de carbohidratos (%)	58	35,8

La contribución de cada principio inmediato al contenido energético de ambas dietas, se expresa como el porcentaje respecto al total de calorías. Datos obtenidos de la ficha técnica proporcionada por el fabricante.

Después de 6 semanas de tratamiento dietético, las ratas del grupo HF se dividieron en dos subgrupos en función del incremento de peso corporal mostrado durante el tratamiento. Las ratas HF que mostraron un peso corporal en el mismo rango que el incremento de peso corporal del grupo control (peso \pm E.E.M.) se asignaron al grupo resistentes al desarrollo de obesidad (n= 15; HF-OR), mientras que las ratas HF por encima de este rango se asignaron al grupo sensibles al desarrollo de obesidad (n=17, HF-OP). El día 49, se administró una dosis de CCK-8 intraperitoneal (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso) a las 10:00 h y se les extrajo sangre de la vena caudal 2 h más tarde. El día 56, los animales se pesaron a las 22:00 h y recibieron una dosis intraperitoneal de CCK-8 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso) o vehículo (suero salino). Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* hasta las 24:00 h (Figura 14). Después de pesar los animales, se decapitaron las ratas, se recogió la sangre en tubos refrigerados de polipropileno recubiertos de EDTA y los tejidos se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

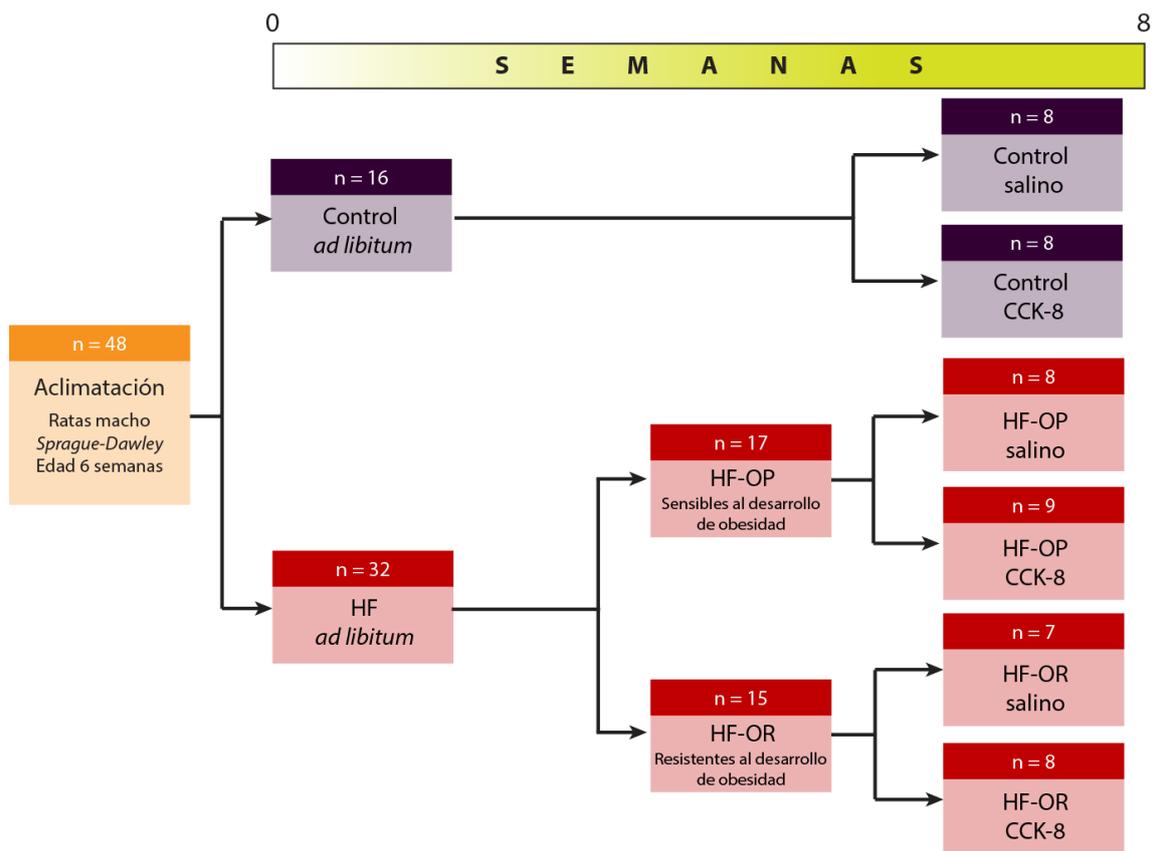


Figura 14. Esquema del modelo experimental

3.2. Determinaciones bioquímicas en plasma

3.2.1. Obtención de plasma

El último día de tratamiento dietético, se determinó el peso corporal de los animales y se sacrificaron por decapitación, entre las 24:00 h y la 01:00 h. Las muestras de plasma de la mañana (12:00 h) se obtuvieron mediante la punción de la vena caudal, mientras que las muestras de la noche (24:00 h) se obtuvieron a partir de sangre troncal. La sangre se recolectó en tubos de polipropileno tapizados con EDTA (microvettes 3 mL, Sarsted). El plasma se obtuvo tras centrifugación a 4°C durante 20 min a 4000 r.p.m. (Centrifuge 5810, Eppendorf), y se conservó a -20°C en tubos Eppendorf hasta su utilización.

3.2.2. Determinación de los niveles circulantes de leptina

La concentración de leptina en plasma se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) específico para leptina de rata utilizando un kit comercial (Linco Research, EE.UU; Figura 15). El ensayo se realizó en tubos de propileno de 12 ml (Deltalab) y a 4°C. En cada tubo se añadió: 100 µl de tampón fosfato pH=7,4 (0,05 M), 100 µl de muestra o de estándares y 100 µl de anticuerpo anti-leptina de rata. Después de incubar los tubos durante 24 horas a 4°C, se añadieron 100 µl de I¹²⁵-leptina a cada muestra. Los tubos se incubaron nuevamente durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se añadió 1 ml de solución precipitante a cada tubo y se incubó durante 1 hora a 4°C. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 30 min a 14000 r.p.m. (Centrifuge 5810, Eppendorf) a 4°C. El sobrenadante se descartó y se determinó la radioactividad contenida en el precipitado

(complejo anticuerpo- I^{125} -leptina) mediante un contador gamma (1470 WIZARD, Wallac). Los resultados se obtuvieron tras extrapolar la radioactividad obtenida con la curva estándar de leptina de rata (0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ng/ml). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 4,8% y del 3,4%, respectivamente.

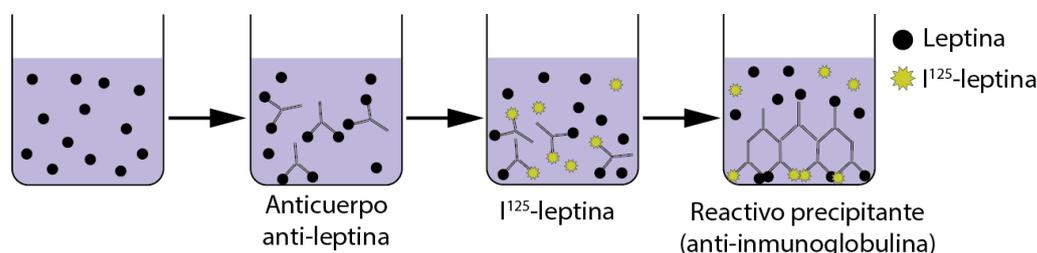


Figura 15. Determinación de leptina por radioinmunoensayo. Este método se basa en la competencia por la unión con un anticuerpo específico que se produce entre la sustancia que se va a cuantificar, en este caso leptina; y la misma sustancia unida a un isótopo radioactivo (I^{125} -leptina). Tras la incubación con el anticuerpo antileptina, la hormona libre queda en solución, mientras que la hormona unida al anticuerpo precipita. La cantidad de I^{125} -leptina presente en el precipitado es inversamente proporcional a la concentración de leptina de la muestra.

3.2.3. Determinación de los niveles circulantes de insulina

La concentración de insulina en plasma se determinó utilizando una técnica directa tipo “sandwich” mediante un inmunoensayo enzimático específico para insulina de rata (ELISA Merckodia, Suecia; Figura 16).

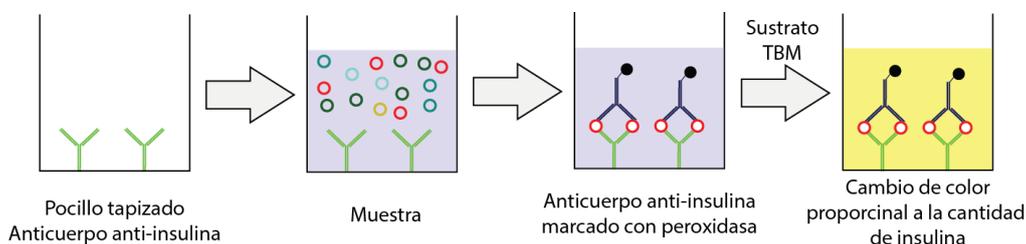


Figura 16. Determinación de insulina por ELISA “sándwich” directo. Esta técnica consistió en la unión de la insulina a dos anticuerpos monoclonales. Durante la incubación, la insulina presente en la muestra reaccionó con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa y a los anticuerpos anti-insulina unidos al pocillo (fase sólida). El anticuerpo que no se unió a la insulina se eliminó durante la fase de lavado. Tras la adición del sustrato TMB (3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina) y por la acción de la enzima peroxidasa se originó un metabolito coloreado. La reacción se detuvo añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico. La intensidad del color fue proporcional a la concentración de insulina presente en la muestra

El ensayo se realizó en placas con pocillos tapizados con un anticuerpo anti-insulina de rata. En cada pocillo se añadieron 10 μ l de plasma y 100 μ l de una solución de anticuerpo anti-insulina de rata conjugado con peroxidasa. Tras 2 horas de incubación a 25°C y en agitación, la placa se lavó 6 veces con 700 μ l tampón de lavado. A continuación, se añadieron 200 μ l/pocillo de sustrato TMB. La placa se incubó durante 15 min a 25°C y en oscuridad. Para detener la reacción, se añadieron 50 μ l/pocillo de H_2SO_4 (0,5 M). La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas (Versa-Max, Molecular Devices). El ensayo se validó mediante la utilización de una curva patrón de insulina (0,2; 0,5; 1,5; 3; 6,5 ng/ml). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 3,3% y del 3,0%, respectivamente.

3.2.4. Determinación de la glucemia

La concentración de glucosa en plasma se determinó mediante un método enzimático colorimétrico utilizando un kit comercial (Método Trinder, Roche, España; Figura 17).

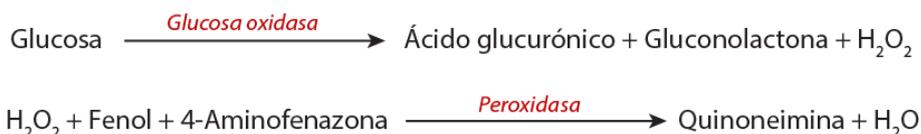


Figura 17. Determinación colorimétrica de glucosa. Este método se basa en la oxidación de la glucosa, mediante la enzima glucosa oxidasa, a ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno. Éste último reaccionó con fenol y 4-aminofenazona por acción de la peroxidasa, dando lugar a la formación de quinoneimina. Este producto presentó una coloración rosa que fue proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos (Greiner bio-one). En cada pocillo se añadieron 10 µl de plasma y 250 µl de reactivo [tampón fosfato (100 mmol/l), 4-aminofenazona (0,7 mmol/l), glucosa oxidasa (20000 UI/l), peroxidasa (1000 UI/l) y clorofenol (10 mmol/l)]. Tras incubar 10 min a 37°C, se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Versa-Max, Molecular Devices). El ensayo se validó mediante la utilización de un estándar de glucosa (100 mg/dl). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 1,3% y del 1,2%, respectivamente.

3.2.5. Determinación de los niveles circulantes de triglicéridos

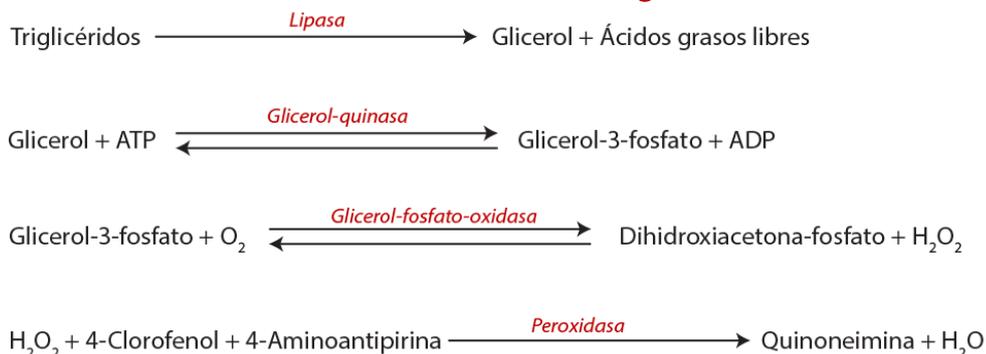


Figura 18. Determinación colorimétrica de TG. Los TG se hidrolizaron a glicerol y a ácidos grasos libres por acción de la lipasa. El glicerol, por la glicerol quinasa, reaccionó con la adenosina trifosfato (ATP), formando glicerol fosfato y adenosina difosfato (ADP). A su vez, el glicerol fosfato se oxidó, en presencia de la glicerol fosfato oxidasa, a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reaccionó con 4-clorofenol y 4-aminoantipirina, y por acción de la enzima peroxidasa, dio lugar a la formación de quinoneimina.

La determinación de triglicéridos en plasma se realizó, como describen Fossati y Prencipe (1982), mediante un método colorimétrico enzimático utilizando un kit de diagnóstico (método glicerol fosfato oxidasa, Biolabo, Maizy, Francia). Los TG se transformaron en un producto coloreado (quinoneimina) cuya concentración fue proporcional a la cantidad de TG presentes en la muestra (Figura 18). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, en cada pocillo se añadieron 10 µl de plasma y 200 µl de reactivo (100 mM PIPES; 9,8 mM MgCl₂; 3,5 mM 4-clorofenol; 1000 U/l lipasa; 1700 U/l peroxidasa; 3000 U/l glicerol-3-fosfato oxidasa; 660 U/l glicerol kinasa; 0,5 mM 4-aminoantipirina; 1,3 mM adenosintrifosfato sódico). Tras 10 min de incubación a

temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 500 nm. El método se validó mediante la utilización de un estándar de triglicéridos (200 mg/dl). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 0,6% y del 1,8%, respectivamente.

3.2.6. Determinación de los niveles circulantes de ácidos grasos libres no esterificados

La concentración de ácidos grasos libres no esterificados (*Non-esterified fatty acid*, NEFA) en plasma se determinó mediante un método colorimétrico enzimático utilizando un kit comercial (ACS-ACOD, Wako Bioproducts, EE.UU; Figura 19).

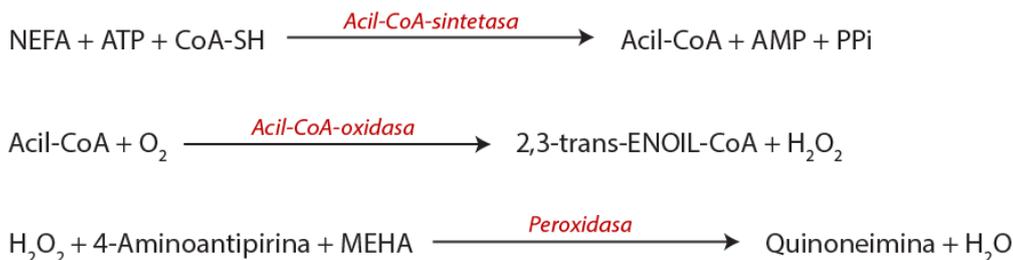


Figura 19. Determinación colorimétrica de NEFA. La enzima acetil-CoA sintetasa transformó los NEFA en acil-CoA. El acetil-CoA se oxidó a peróxido de hidrógeno por la acetil-CoA oxidasa. El peróxido de hidrógeno reaccionó con la 4-aminofenazona transformándose, por acción de la peroxidasa, en un compuesto coloreado (quinoneimina). La coloración rosa de la quinoneimina fue directamente proporcional a la concentración de NEFA en la muestra.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 10 µl de muestra y 100 µl de reactivo A [acil-CoA-sintetasa (0,3 kU/l), ascorbato oxidasa (3 kU/l), coenzima A (0,6 g/l), ATP (5 mmol/l), 4-aminoantipirina (1,5 mmol/l), tampón fosfato pH=6,9 (50 mmol/l), cloruro magnésico (3 mmol/l)]. Tras una incubación de 10 min a 37°C, se añadieron 200 µl/pocillo de reactivo B [acilCoA oxidasa (6,6 kU/l), peroxidasa (7,5 kU/l), MEHA (3-metil-N-etil-N-(β-hidroxietilo)-anilina) (1,2 mmol/l)]. Tras una segunda incubación de 10 min a 37°C, se determinó la absorbancia a 550 nm. El método se validó mediante la utilización de un estándar de ácido oleico (28,2 mg/dl). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 2,2% y del 2,7%, respectivamente.

3.3. Determinación del contenido total de lípidos en el tejido adiposo

Los extracción de lípidos se llevó a cabo en 100 mg de tejidos adiposos lumbar y subcutáneo siguiendo el método de Folch con algunas modificaciones (Herrera & Ayanz 1972). Las muestras se colocaron en tubos de vidrio con 3 ml de cloroformo/metanol (2:1), y se agitaron 12 h en un rotatubos (AT20, Magna). Tras separar el disolvente, el procedimiento se repitió el proceso anterior y se agitaron en rotatubos de inversión durante 2 horas. Reunidas todas las fases orgánicas, se enrasó a 10 ml con la misma mezcla de disolventes. Tras lavar durante 15 min con 2,5 ml de H₂O destilada y centrifugar a 1500 r.p.m. (6 min), se enrasó a 10 ml la fase orgánica con metanol, y se lavó (2 veces, 15 min) con 2,5 ml de NaCl al 2%. La fase orgánica se enrasó a 10 ml con cloroformo/metanol (2:1). Se dejaron evaporar 2 ml del preparado en una campana extractora durante 12 h. El extracto seco se pesó, obteniendo así los mg de lípidos totales de las muestras. Los resultados se expresaron en mg de lípidos por g de tejido utilizado.

3.4. Test de tolerancia a la glucosa

En la octava semana de tratamiento con dieta HF se realizó una prueba de sobrecarga de glucosa en los animales. Previamente a la administración de glucosa, los animales se ayunaron durante 6 h (08:00–14:00 h). Se administró glucosa (1g/kg animal intraperitoneal). La curva de glucemia se realizó a diferentes tiempos: i) previa a la administración de glucosa, y ii) tras 15, 30, 60 y 120 min de la administración de glucosa. Para medir la glucemia se obtuvo una muestra de sangre mediante la punción de la vena caudal. Los niveles de glucosa se determinaron utilizando un glucómetro Accu-Chek Aviva® y sus correspondientes tiras reactivas (Roche Diagnostics, Alemania). Este ensayo se llevó a cabo en animales diferentes de los utilizados en el ensayo de CCK-8.

3.5. Determinación de proteínas mediante *western blotting*

3.5.1. Obtención y procesado de las muestras

Para la detección de proteínas, se pesaron 150 mg de tejido adiposo lumbar y subcutáneo y se homogeneizó con un Ultra-Turrax (Heidolph DIAX 900) en 1 ml de tampón de lisis frío, compuesto por 0,42 M de NaCl, 20 mM de HEPES (pH 7,9), 1 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 20% de glicerol, 1 mg/ml de aprotinina, 1 mg/ml leupeptina, 20 mM fluoruro de sodio, 1 mM ortovanadato trisódico, y 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Con el fin de favorecer el proceso de extracción de proteínas, los tubos con los homogeneizados se sometieron a un choque térmico. Para ello, se congelaron rápidamente a -80°C en nitrógeno líquido y se atemperaron en baño termostatizado a 37°C . La operación se repitió tres veces consecutivas. Tras el choque térmico, las muestras se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 10 min (Centrifuge 5810, Eppendorf) a 4°C . A continuación se recogió el sobrenadante para la posterior determinación de proteínas mediante el método de Bradford (1976). Todas las muestras se ajustaron a una concentración de proteínas $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ utilizando el reactivo de Laemli (Tris 0,5 M pH=6,8; 10% de glicerol; 2% de dodecilsulfato sódico (SDS); 5% de β -mercapto etanol y azul de bromofenol). Las muestras así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

3.5.2. Determinación de la concentración de proteínas totales

La cuantificación de la concentración de proteínas se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico basado en el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón. Este método se basa en la reacción de los grupos sulfonados ácidos del azul de Coomassie (reactivo de Bradford) con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) de las proteínas, que da como resultado un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorbancia a 592 nm.

Para ello, se tomaron 50 μl de muestra y se completó el volumen con 200 μl de reactivo de Bradford. Transcurridos 5 min, se agitó la placa y se determinó la concentración de proteína mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Versa-Max, Molecular Devices, EE.UU.). Para validar el método se utilizó una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA, 0, 1, 5, 7, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.5.3. Detección de proteínas por *western blotting*

La electroforesis, transferencia e inmunodetección se realizaron tras hervir las muestras a 100°C durante 5 min. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes a 200 V durante 45 min, en geles de acrilamida/bisacrilamida al 10%, en tampón de electroforesis (0,2 M de glicina, 25 mM de Tris y SDS al 0,1%). A continuación, las proteínas retenidas en los geles se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, GE Healthcare, España), a 400 mA durante 90 min en frío y en presencia de tampón de transferencia (0,2 M de glicina, 25 mM de Tris, SDS al 0,1% y metanol al 20%). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron en solución de lavado (PBS-T: 0,1% de leche desnatada en polvo en tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,5%). Seguidamente, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T, para evitar uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes frente a las proteínas que se desearon determinar. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una solución de BSA al 0,5% y azida al 0,05% en PBS-T. Las membranas se incubaron con las diluciones convenientes de anticuerpos primarios durante 24 h a 4°C. Tras las 24 h de incubación, las membranas se lavaron dos veces con solución de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa, diluido en una solución de leche desnatada al 1% en PBS-T, durante 1 h a temperatura ambiente.

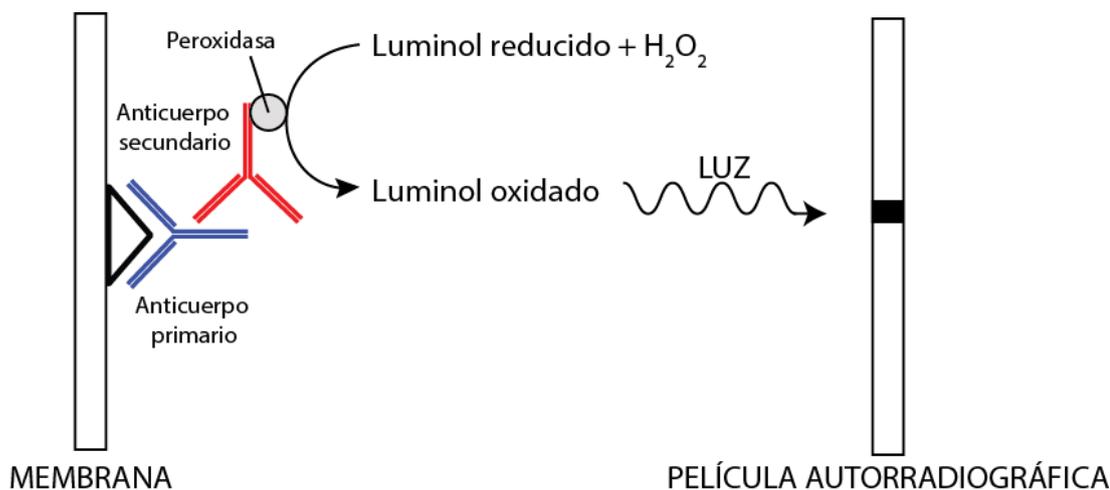


Figura 20. Esquema de la inmunodetección en *western blot*.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron varias veces con solución de lavado para eliminar los restos de anticuerpo secundario no unido. La densidad de proteínas en las membranas se detectó mediante una reacción quimioluminiscente, utilizando un kit comercial de detección (ECL, GE Healthcare), y posterior exposición a una película fotográfica (Kodak X-OMAT, GE Healthcare; Figura 20).

Una vez reveladas, las películas se escanearon utilizando un densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad, España). La densidad óptica de las bandas se cuantificó mediante el programa informático Quantity One (Bio-Rad, España). Los valores de densidad óptica

obtenidos para cada una de las proteínas se normalizaron mediante la utilización de un control de carga.

3.5.4. Determinación de la fosforilación de AMPK (pAMPK)

La detección de pAMPK y AMPK (62 kDa) se realizó en tejido adiposo mediante *western blotting*. La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Los geles se cargaron con 20 µg de proteínas por pocillo. Para determinar la pAMPK se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling, EE.UU.) dirigido frente a la fosfoThr¹⁷², como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido) marcado con peroxidasa. A continuación, en la misma membrana se determinó la AMPK, utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling, EE.UU.). Como anticuerpo secundario se empleó una IgG anticonejo (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido) marcado con peroxidasa.

3.5.5. Determinación de la fosforilación de AKT (pAKT)

La detección de pAKT y AKT (60 kDa) se realizó en tejido adiposo mediante *western blotting*. La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Los geles se cargaron con 20 µg de proteínas por pocillo. Para determinar la pAKT se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling, EE.UU.) dirigido frente a la fosfoSer⁴⁷³, como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido) marcado con peroxidasa. A continuación, en la misma membrana se determinó la AKT, utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:1000; Cell Signalling, EE.UU.). Como anticuerpo secundario se empleó una IgG anticonejo (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido) marcado con peroxidasa.

3.5.6. Determinación del receptor de CCK-2

La expresión del receptor de CCK tipo 2 (CCK2R; 80 kDa) se determinó en tejido adiposo mediante *western blotting*. La electroforesis se llevó a cabo en gel de acrilamida/bisacrilamida al 10%. Los geles se cargaron con 20 µg de proteínas por pocillo. Se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), como anticuerpo secundario una IgG anticonejo (1:4000; Amersham Bioscience, Reino Unido) marcado con peroxidasa. Como control de carga se determinó la expresión de β-actina (49 kDa), utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-β-actina (1:1000; Affinity Bioreagents, EE.UU.). Como anticuerpo secundario se utilizó una IgG antiratón (1:5000; Amersham Bioscience, Reino Unido), marcada con peroxidasa.

3.6. Actividad enzimática de lipoproteína lipasa

Se homogeneizaron 50 mg de tejido adiposo en 0,8 ml de tampón 0,2 M Tris-HCl, pH=8,2. Después de la centrifugación (10 min, 3000 r.p.m.), la fase acuosa se transfirió a tubos Eppendorf que contenían 50 µl de plasma precalentado de ternera fetal (60°C; 10 min). Las proteínas se precipitaron con acetona fría (-20°C), después se lavó con éter dietílico y se evaporó bajo corriente de nitrógeno. El polvo resultante se resuspendió en 1 ml de 0,05 M de tampón NH₄OH/NH₄Cl (pH=8,1). Después de la cuantificación de proteínas, las muestras se prepararon para determinar la actividad de la LPL como se describe (Sugden *et al.* 1993). Resumidamente, 0,2 ml de muestra se incubaron con 0,05

ml de agua destilada y 0,1 ml de mezcla de reacción preparada a partir de: i) 0,04 ml de tampón 0,2 M de Tris-HCl (pH=8,2; NaCl 0,15 M; 6% albúmina sérica bobina (BSA) libre de ácidos grasos), ii) 0,02 ml plasma precalentado de ternera fetal y iii) 0,04 ml de solución de trioleína marcada con C^{14} (69 mg trioleína fría; 3,3 mg de lecitina; 12,5 μ Ci ^{14}C -trioleína y 5 ml de glicerol). Se utilizó como control positivo el plasma de las ratas que recibieron 25 UI de heparina/200 g peso corporal, 15 min antes del sangrado.

La actividad determinada en presencia de NaCl 5 M se restó de los valores totales. Después de la incubación durante 30 min a 37°C, la reacción enzimática se detuvo por la adición de 2 ml de una mezcla de cloroformo/heptano/metanol (1/1/1) y el ácido oleico C^{14} -libre se extrajo con 1 ml 0,1 M KBO_3/K_2CO_3 (pH=8,5). Después de la centrifugación (3000 r.p.m., 15 min), la radiactividad contenida en 1 ml de la fase acuosa superior se cuantificó en un contador de centelleo. Todas las muestras se realizaron por triplicado. La actividad enzimática se expresó en nmol/min/mg proteína.

3.7. Análisis de ARN mensajeros

3.7.1. Obtención y preparación de ARN total

El ARN total se extrajo de tejido adiposo lumbar empleando el reactivo Trizol Reagent (Invitrogen), de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Este método se basa en la extracción de ARN con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo (Chomczynski & Sacchi 1987). Para la extracción del ARN se homogeneizaron 100 mg de tejido adiposo lumbar en 1 ml de Trizol, se dejó 5 min a temperatura ambiente para favorecer la lisis celular y la solubilización del ARN. A continuación se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se agitaron durante 15 s. Se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente e inmediatamente se centrifugaron las muestras a 12000xg durante 15 min a 4°C. Se recogieron las fases superiores acuosas en tubos nuevos. Para la precipitación del ARN se añadieron 0,5 ml de isopropanol y se agitaron los tubos por inversión. Se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12000xg durante 10 min a 4°C, obteniendo un precipitado blanco. Se descartaron los sobrenadantes, y los precipitados se lavaron con 1 ml de etanol 75% (v/v). Se volvieron a centrifugar las muestras 7500xg durante 5 min a 4°C. Los precipitados se volvieron a resuspender con 20 μ l de H_2O libre de ARNasa. La concentración total de ARN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm con espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific).

3.7.2. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real

Una vez cuantificado el ARN, se llevó a cabo la retrotranscripción o transcripción inversa (RT, *reverse transcription*) para la síntesis de ADN. Se sintetizó el ADNc a partir de 2 microgramos de ARN total mediante el uso de un kit de ADNc de RT de alta capacidad (Applied Biosystems, EE.UU.). Este kit se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante en un termociclador Perlier Thermal Cycler Tetrad2 (BioRad, EE.UU.). El proceso de RT se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la PCR.

Tabla 3. Sondas usadas para PCR cuantitativa de tejido adiposo lumbar

<i>Sonda</i>	<i>Número catalogo</i>	<i>Nombre</i>
Actb	Rn00667869_m1	Actina
Angptl4	Rn01528817_m1	Angiopietin-like 4
Fat/Cd36	Rn02115479_g1	Translocasa ácidos grasos
Fatp-1	Rn00585821_m1	Proteína transportadora de ácidos grasos 1
Lpl	Rn00561482_m1	Lipoproteína lipasa

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó usando el kit PCR TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, EE.UU.). Este ensayo se realizó en un volumen final de 20 μ l compuesto por: 9 μ l ADNc, 1 μ l de 20X TaqMan Gen Expression Assay Mix (Applied Biosystems) y 10 μ l de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 min a 60°C. Los genes de expresión empleados se recogen en la Tabla 3, y se analizaron mediante un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Para la cuantificación relativa se utilizó el método de $\Delta\Delta C_T$, tomando el ARNm de actina como control invariable (*housekeeping*).

3.8. Estadística

Para el análisis estadístico se empleó el programa StatView 5.0 (SAS Institute Inc, EE.UU.) y para la realización de las gráficas el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE.UU.).

El análisis del incremento de peso semanal y de la ingesta, fue analizado con un ANOVA de medidas repetidas seguido por test *post-hoc* de Newman-Keuls. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA), en función del número de variables a considerar. En el caso del ANOVA de dos vías los factores de variación fueron el tratamiento dietético y el tratamiento con CCK-8. La significancia estadística se confirmó mediante análisis *post-hoc* de Newman-Keuls. Se consideró que los resultados fueron significativamente distintos entre los grupos experimentales, cuando $p < 0,05$. Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media (E.E.M.).

4. Resultados

4.1. Efecto de la CCK-8 sobre el peso corporal, ingesta de alimentos, peso del tejido adiposo e hígado y contenido en lípidos del tejido adiposo.

Se midió el peso corporal tras someter a los animales a 8 semanas de dieta HF (el 46,1% energía procede de la grasa). Tal y cómo se muestra en la Figura 21, los animales del grupo HF-OP presentaron un peso corporal significativamente superior que los animales del grupo control y del grupo HF-OR (ANOVA de medidas repetidas, $F_{(14,231)}=7,113$; $p<0,001$). El tratamiento dietético aumentó el peso corporal desde $241,2\pm 5,6$ g hasta $475,4\pm 10,1$ g ($p<0,001$) en el grupo control; $532,7\pm 8,6$ g ($p<0,001$) en el grupo HF-OP y $472,8\pm 11,5$ g ($p<0,001$) en el grupo HF-OR. Además, el incremento de peso fue significativamente mayor ($F_{(2,33)}=7,290$; $p<0,01$) en el grupo HF-OP, en comparación con el grupo control y el grupo HF-OR.

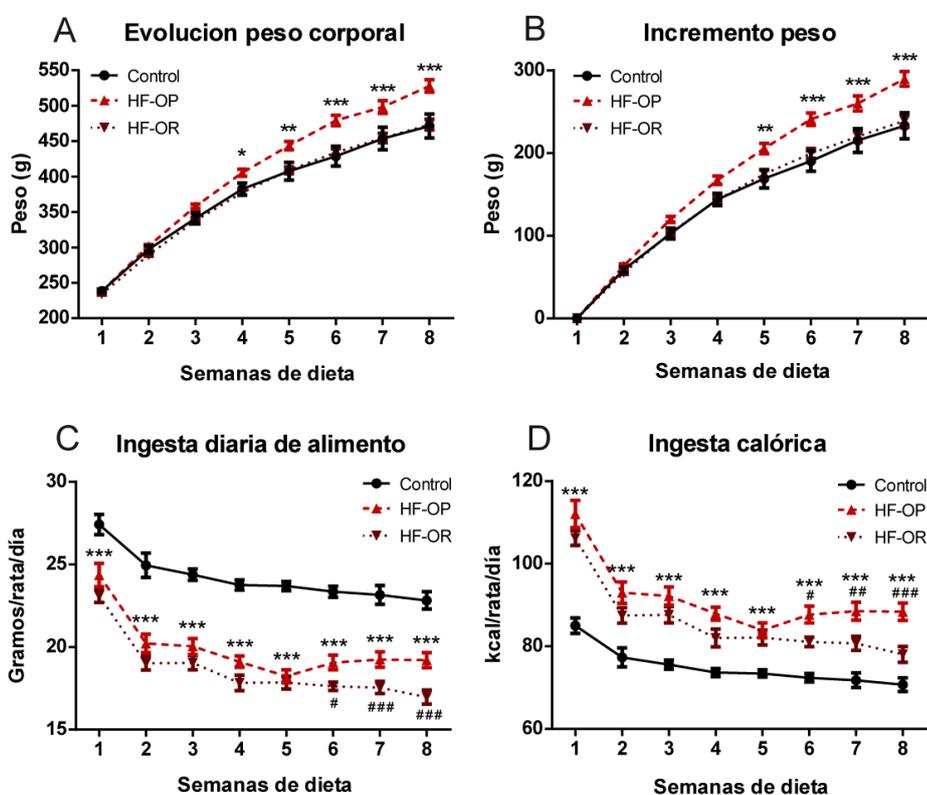


Figura 21. Evolución del peso corporal (A) e incremento del peso (B) tras 8 semanas de dieta HF. Efecto del tratamiento dietético sobre la ingesta diaria de alimento (C) y sobre la ingesta calórica diaria (D). Los valores son las medias \pm E.E.M. de 15-17 animales por grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ con respecto al grupo control. # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ HF-OP respecto a HF-OR (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF-OP (▲), HF-OR (▼).

Además, se caracterizó la ingesta de los animales a lo largo de 8 semanas de tratamiento dietético, expresada en g/rata/día y en kcal/rata/día, teniendo en cuenta que el aporte calórico de las dietas fue diferente (dieta control: 3,1 kcal/g y dieta HF: 4,6 kcal/g). La Figura 21 muestra que la ingesta diaria de alimento en los animales HF fue significativamente menor que en los controles desde la primera semana de tratamiento (ANOVA medidas repetidas, $F_{(2,360)}=310,2$; $p<0,001$). Sin embargo, la ingesta calórica

diaria fue superior en los animales alimentados con dieta HF (ANOVA medidas repetidas, $F_{(2,360)}=155,1$; $p<0,001$). Aunque durante la mayor parte del experimento la ingesta calórica fue equivalente en los animales alimentados con dieta HF, las últimas 3 semanas de tratamiento la ingesta de los animales HF-OR fue inferior respecto a los HF-OP ($p<0,05$).

Tras el tratamiento intraperitoneal con CCK-8 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso) se detectó un efecto sobre el peso corporal del tratamiento con CCK-8 ($F_{(1,27)}=485,9$; $p<0,001$), con una interacción entre la dieta y el tratamiento con CCK-8 ($F_{(2,27)}=26,32$; $p<0,001$). El tratamiento con CCK-8 redujo el peso corporal ($F_{(1,42)}=416,5$; $p<0,01$) y la ingesta ($F_{(2,46)}=26,175$; $p<0,001$; Tabla 4), no detectándose diferencias entre los grupos experimentales en la respuesta a la CCK. El ANOVA de una vía reveló una disminución de la ingesta del 65% en los animales del grupo control ($F_{(1,15)}=6,097$; $p<0,05$), del 65% en los animales del grupo HF-OR ($F_{(1,17)}=33,489$; $p<0,01$), y del 40% en los animales del grupo HF-OP ($F_{(1,14)}=3,755$; $p=0,05$). De manera similar, el tratamiento con CCK-8 redujo el peso corporal en los 3 grupos experimentales (Control: $F_{(1,15)}=6,097$; $p<0,05$. HF-OP: $F_{(1,17)}=11,042$; $p<0,01$. HF-OP: $F_{(1,14)}=16,723$; $p<0,01$).

Tabla 4. Efecto de la CCK-8 en el peso corporal y la ingesta de alimentos.

	<i>Tratamiento</i>	<i>Incremento de peso (g)</i>	<i>Ingesta de alimentos (kcal/animal)</i>
Control	Salino	5,3 \pm 0,5	32,1 \pm 4,8
	CCK-8	- 5,6 \pm 0,3**	11,5 \pm 3,1**
HF-OR	Salino	1,8 \pm 0,4	28,1 \pm 2,9
	CCK-8	- 3,2 \pm 0,3**	10,0 \pm 3,8**
HF-OP	Salino	2,4 \pm 0,2	33,4 \pm 4,1
	CCK-8	- 4,3 \pm 0,7**	20,1 \pm 3,9*

Se administró CCK-8 o solución salina a las 22:00 h, los animales se sacrificaron 2 horas después, a las 24:00 h. Los animales y la comida se pesaron antes de la administración del tratamiento y antes del sacrificio. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ comparado con el grupo salino (Test de Newman-Keuls).

La Tabla 5 muestra que la dieta HF provocó un aumento generalizado de la adiposidad en el grupo HF-OP. En el peso del TAM, el ANOVA-2 mostró un efecto significativo de la dieta ($F_{(2,43)}=10,12$; $p<0,001$), independiente del tratamiento con CCK-8. El efecto fue significativo en el grupo HF-OP, comparado con los grupos control y HF-OR ($p<0,05$). En el caso del peso del TAL también se observó un efecto de la dieta (ANOVA-2; $F_{(2,42)}=13,58$; $p<0,001$), que fue significativo en los animales HF-OP ($p<0,001$) y HF-OR ($p<0,05$), en comparación con el grupo control. En este tejido se observó un efecto significativo de la CCK-8 en los animales HF-OP, que incrementó tanto el peso como los lípidos totales ($p<0,05$). Como en los casos anteriores, el peso del TAS se vio incrementado por la dieta (ANOVA-2; $F_{(2,42)}=6,186$; $p<0,01$), alcanzando significancia estadística en el grupo HF-OP ($p<0,05$). El tratamiento con CCK-8 incrementó el contenido de lípidos (mg/g de tejido) del TAS en los animales de los grupos control ($p<0,01$), mientras que incrementó los lípidos totales ($p<0,05$) y el contenido lipídico ($p<0,01$) del TAS en los animales del grupo HF-OP.

El peso del hígado aumento de forma significativa como consecuencia de la dieta HF en los animales del grupo HF-OP ($p<0,01$). De la misma manera, los lípidos totales también

aumentaron en este grupo, en comparación con los grupos control y HF-OR ($p < 0,05$). No se detectó efecto del tratamiento con CCK-8 en ningún grupo experimental.

Tabla 5. Efectos de la CCK-8 sobre el peso, contenido de lípidos y lípidos totales en diferentes tejidos adiposos blancos e hígado.

		<i>Control</i>		<i>HF-OR</i>		<i>HF-OP</i>	
		<i>Salino</i>	<i>CCK-8</i>	<i>Salino</i>	<i>CCK-8</i>	<i>Salino</i>	<i>CCK-8</i>
TAM	Peso (g)	3,9 ± 0,4	4,3 ± 0,8	4,3 ± 0,3	3,9 ± 0,2	5,3 ± 0,4	6,6 ± 0,5
	Peso (g)	4,0 ± 0,5	5,7 ± 1,1	6,6 ± 0,9	5,7 ± 0,7	7,7 ± 0,7	10,9 ± 1,1*
TAL	Contenido lípidos (mg/g de tejido)	737,2 ± 33,2	749,0 ± 19,3	734,1 ± 17,1	763,7 ± 16,0	810,6 ± 15,3	742,7 ± 44,5
	Lípidos totales (g)	2,9 ± 0,2	4,3 ± 0,8	4,8 ± 0,7	4,2 ± 0,6	5,7 ± 0,3	8,1 ± 1,0*
TAS	Peso (g)	3,0 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,5 ± 0,4	4,1 ± 0,5	5,1 ± 0,4
	Contenido lípidos (mg/g de tejido)	637,0 ± 17,3	723,5 ± 17,0**	679,0 ± 11,4	605,6 ± 42,0	626,1 ± 23,1	737,8 ± 19,8**
	Lípidos totales (g)	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,6 ± 0,3	3,8 ± 0,2*
Hígado	Peso (g)	14,2 ± 0,4	14,8 ± 0,7	14,9 ± 0,7	14,8 ± 0,5	17,2 ± 0,4	17,4 ± 0,7
	Contenido lípidos (mg/g de tejido)	20,6 ± 5,1	28,3 ± 2,2	36,1 ± 12,8	33,4 ± 5,6	40,9 ± 4,3	43,5 ± 10,1
	Lípidos totales (g)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2

Los tejidos fueron diseccionados 2 horas después de la administración de CCK-8. TAM, tejido adiposo mesentérico; TAL, tejido adiposo lumbar; TAS, tejido adiposo subcutáneo. Cada resultado representa la media ± E.E.M. (n=7-9). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado con su respectivo grupo salino (Test de Newman-Keuls).

4.2. Efecto de la CCK-8 sobre los parámetros plasmáticos

La Tabla 6 resume el efecto del tratamiento dietético y con CCK-8 sobre los parámetros plasmáticos en ratas con acceso *ad libitum* a comida y agua que fueron tratadas con CCK-8 (10 µg/kg de peso) en horario nocturno (22:00 h) y sacrificadas a las 24:00 h.

Tabla 6. Efecto del tratamiento con CCK-8 en parámetros plasmáticos nocturnos (24:00 h)

<i>Tratamiento</i>		<i>Glucosa</i> (mg/dL)	<i>NEFA</i> (mM)	<i>TG</i> (mg/dL)	<i>Insulina</i> (ng/mL)	<i>Leptina</i> (ng/mL)
Control	Salino	96,7 ± 1,8	0,38 ± 0,10	51,8 ± 7,1	1,9 ± 0,6	1,2 ± 0,2
	CCK-8	97,1 ± 2,5	0,64 ± 0,20	35,8 ± 4,0	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2
HF-OR	Salino	98,3 ± 3,3	1,80 ± 0,10	118,3 ± 14,6	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2
	CCK-8	102,5 ± 1,7	1,63 ± 0,20	72,4 ± 10,3*	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1
HF-OP	Salino	100,9 ± 1,5	2,05 ± 0,30	122,6 ± 18,5	2,3 ± 0,4	1,5 ± 0,1
	CCK-8	99,9 ± 2,8	1,21 ± 0,11*	105,3 ± 22,4	3,0 ± 0,5	2,2 ± 0,3*

Cada resultado representa la media ± E.E.M. (n=7-9). * $p < 0,05$ comparado con su grupo salino (Test de Newman-Keuls)

En el caso de los NEFA, se detectó un efecto de la dieta ($F_{(2,27)}=26,96$; $p < 0,001$) y una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento con CCK-8 ($F_{(2,27)}=4,579$; $p < 0,05$). En el caso de los TG, hubo un efecto de la dieta ($F_{(2,27)}=13,92$; $p < 0,001$) y del tratamiento con CCK-8 ($F_{(1,27)}=5,509$; $p < 0,05$). La dieta HF incrementó los niveles de NEFA y TG en todos los grupos experimentales ($p < 0,01$). Además, el tratamiento con CCK-8 redujo los niveles de NEFA en los animales del grupo HF-OP ($p < 0,01$). Por otra parte, se observó que el tratamiento con CCK-8 disminuyó los niveles de TG en plasma en los animales del

grupo HF-OR ($p < 0,01$) y tendió a reducirlo en los animales de los grupos control y HF-OP. En cuanto a la insulina, no se observó ninguna variación debida a la dieta o al tratamiento con CCK-8. Sin embargo, los niveles de leptina en plasma aumentaron como consecuencia del tratamiento con CCK-8 (ANOVA-1; $F_{(5,27)}=18,87$; $p < 0,001$) en los animales del grupo HF-OP ($p < 0,05$), no observándose diferencias en el resto de los grupos.

Por otra parte, se analizó la bioquímica plasmática en ratas no ayunadas que fueron tratadas con CCK-8 a las 12:00 h y de las que se obtuvieron muestras de sangre a las 14:00 h (Tabla 7). La dieta HF incrementó los niveles plasmáticos de TG ($F_{(2,30)}=3,948$; $p < 0,05$) en los animales del grupo HF-OP ($p < 0,05$). En el caso de la insulina, la dieta HF tendió a aumentar los niveles en los animales HF-OR y HF-OP, pero no alcanzó significación estadística. En el caso de los niveles de leptina, se observó un efecto de la dieta ($F_{(2,30)}=31,97$; $p < 0,001$), del tratamiento con CCK-8 ($F_{(1,30)}=6,718$; $p < 0,05$) y una interacción significativa entre ambos ($F_{(2,30)}=4,197$; $p < 0,05$). En este caso, las ratas alimentadas con dieta HF presentaron mayores niveles de leptina plasmática que los animales alimentados con dieta control ($p < 0,01$). Además, el tratamiento con CCK-8 incrementó los niveles del leptina en los animales del grupo control y HF-OP, alcanzando significancia únicamente en este grupo ($p < 0,05$).

Tabla 7. Efecto del tratamiento con CCK-8 en parámetros plasmáticos diurnos (12:00 h)

	<i>Tratamiento</i>	<i>Glucosa</i> (mg/dL)	<i>NEFA</i> (mM)	<i>TG</i> (mg/dL)	<i>Insulina</i> (ng/mL)	<i>Leptina</i> (ng/mL)
Control	Salino	87,7 ± 1,0	1,18 ± 0,10	48,5 ± 6,5	0,27 ± 0,10	0,37 ± 0,10
	CCK-8	89,8 ± 1,3	1,01 ± 0,30	50,3 ± 7,5	0,38 ± 0,09	0,54 ± 0,11
HF-OR	Salino	90,7 ± 0,9	1,02 ± 0,10	54,6 ± 3,4	0,54 ± 0,14	1,14 ± 0,16
	CCK-8	89,5 ± 1,1	1,30 ± 0,10	74,2 ± 11,2	0,73 ± 0,16	1,14 ± 0,18
HF-OP	Salino	93,1 ± 1,4	1,15 ± 0,10	83,7 ± 12,1	0,41 ± 0,10	1,42 ± 0,19
	CCK-8	92,4 ± 1,1	1,31 ± 0,11	89,8 ± 26,3	0,69 ± 0,28	2,41 ± 0,29*

Cada resultado representa la media ± E.E.M. (n=7-9). * $p < 0,05$ comparado con el grupo salino (Test de Newman-Keuls).

4.3. Test de tolerancia a glucosa

La Figura 22 muestra los perfiles de tolerancia a la glucosa en ratas control, HF-OP y HF-OR. Las ratas se sometieron a una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (1 g/kg). El ANOVA-2 de medidas repetidas reveló un efecto del tiempo ($F_{(4,84)}=51,06$; $p < 0,001$) y de la dieta ($F_{(2,21)}=3,856$; $p < 0,05$) en los valores de glucosa plasmática, sin existir interacción entre ambos factores. La glucemia tras 15 min fue mayor en los animales tratados con dieta HF (Control: 176,9±12,2; HF-OP: 220,0±19,7 mg/dL; HF-OR: 248,1±16,5 mg/dL) respecto al control ($p < 0,05$). Además, la integración del área bajo la curva (AUC) reveló que las ratas alimentadas con dieta HF tuvieron mayores valores de AUC que las ratas control, independientemente de su fenotipo delgado u obeso ($p < 0,05$).

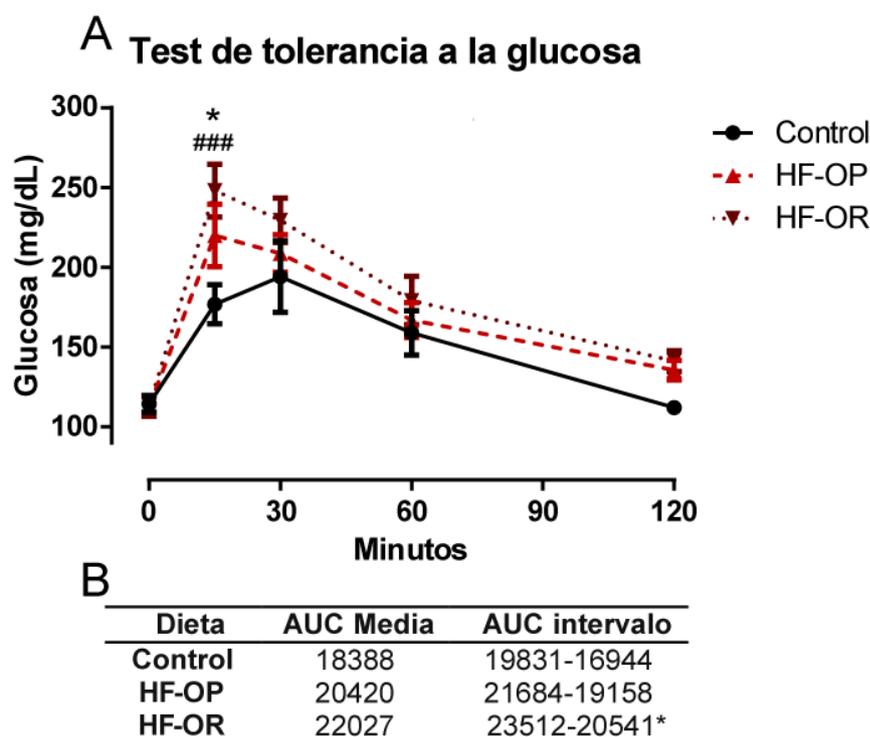


Figura 22. Curva de glucemia tras una sobrecarga i.p. de 1g glucosa/Kg peso (A). Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=7-9 animales/grupo). * $p < 0,05$ HF-OP vs. control; ### $p < 0,001$ HF-OR vs. control (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF-OP (▲), HF-OR (▼). **Cálculo del área bajo la curva (B).** Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=7-9 animales/grupo).

4.4. Efecto de la CCK-8 en el grado de fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (pAMPK) y de la proteína quinasa B (pAKT)

Con el fin de analizar si los cambios en el peso corporal y la adiposidad se podían relacionar con cambios en la actividad adipogénica en los tejidos adiposos, se cuantificó, por *western blotting*, el efecto de la CCK-8 y de la dieta sobre el grado de fosforilación de AMPK en la Thr¹⁷² (pAMPK) y de AKT en la Ser⁴⁷³ (pAKT).

En el TAS no se detectaron cambios en la fosforilación de AMPK y AKT ni por la dieta, ni por el tratamiento con CCK-8 (Figura 23A y B). Sin embargo, en el TAL, los animales del grupo control tratados con CCK-8 presentaron una disminución en los niveles de pAMPK ($F_{(2,18)}=5,028$; $p < 0,01$; Figura 23D), pero no se detectaron cambios en las ratas alimentadas con dieta HF. La disminución de la pAMPK sugiere que el tratamiento con CCK-8 podría estimular la síntesis *de novo* de ácidos grasos únicamente en los animales alimentados con una dieta control. Como en el caso del TAS, el tratamiento con CCK-8 no tuvo efecto sobre el grado de fosforilación de AKT en el TAL (Figura 23C).

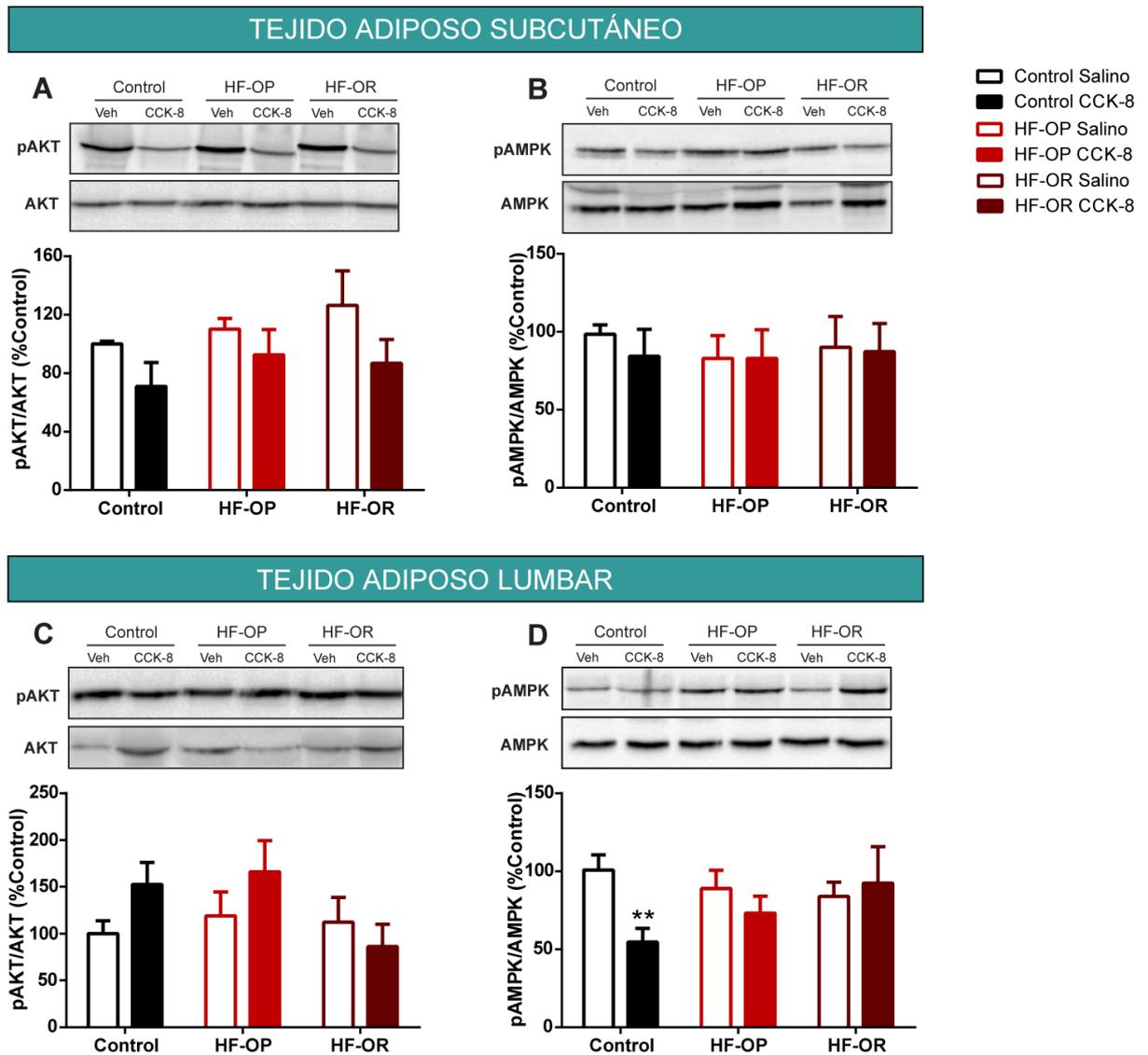


Figura 23. Efecto de la CCK sobre la fosforilación de AKT y AMPK en ratas control, HF-OP y HF-OR. Los blots muestran el efecto de la CCK-8 sobre la AKT fosforilada (pAKT) y AMPK fosforilada (pAMPK) en TAS (A y B) y en TAL (C y D). Los gráficos de barras representan la relación pAKT/AKT y pAMPK/AMPK a partir del análisis densitométrico de los blots. Los valores (unidades arbitrarias) representan las medias \pm E.E.M. (n=6). El tratamiento con CCK-8 sólo disminuye la relación pAMPK/AMPK en TAL en el grupo control. **p<0,01 comparado con su grupo control (Test de Newman-Keuls).

4.5. Efecto de la CCK-8 sobre la actividad y la expresión de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo

En el TAS, la dieta HF produjo una disminución en la actividad de la LPL ($F_{(2,20)}=7,554$; $p<0,001$) en las ratas del grupo HF-OP respecto a los animales del grupo control ($p<0,01$; Figura 24A). El tratamiento con CCK-8 disminuyó la actividad de LPL en los animales del grupo control ($p<0,05$) y se observó una tendencia similar en los animales del grupo HF-OR ($p=0,090$). Por el contrario, la CCK-8 estimuló la actividad de LPL en el grupo HF-OP ($p<0,05$). Los niveles de expresión de la *Lpl* en el TAS no se vieron modificados por los factores experimentales (Figura 24B).

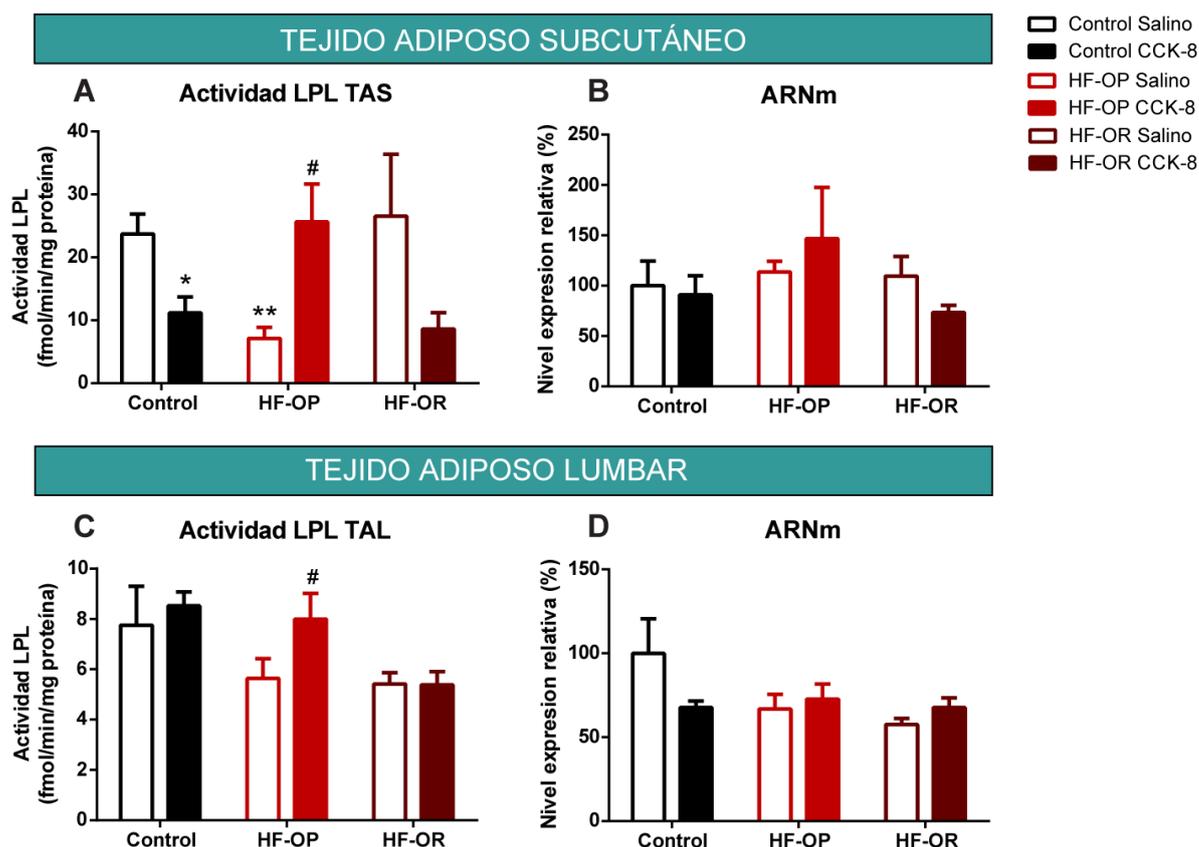


Figura 24. Efecto de la CCK-8 sobre la actividad y la expresión de la LPL en ratas control, HF-OP y HF-OR. La actividad de la LPL se cuantificó en TAS (A) y en TAL (C) después de la administración de CCK-8. En el TAS (A), la CCK-8 produjo una disminución de la actividad LPL en el grupo control y el grupo HF-OR, pero aumentó la actividad de la misma en los animales HF-OP. El tratamiento dietético inhibió la actividad de LPL específicamente en este grupo experimental. En el TAL (C), el tratamiento con CCK-8 sólo aumentó de la actividad LPL en el grupo HF-OP. En este tejido no se detectó ningún efecto del tratamiento dietético. Las figuras B y D muestran que ni el tratamiento dietético ni el tratamiento con CCK-8 tuvieron efecto sobre la expresión de ARNm *Lpl*. Los valores (unidades arbitrarias) son medias \pm E.E.M. ($n=7-9$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ con respecto al grupo control salino. # $p<0,05$ con respecto al grupo HF-OP salino (Test de Newman Keuls).

En el TAL, la actividad de la LPL se vio afectada por la dieta ($F_{(2,29)}=5,137$; $p<0,05$). Los animales del grupo HF-OR presentaron menores niveles de actividad de LPL que los animales del grupo control. Al igual que sucedía en el TAS, el tratamiento con CCK-8 incrementó la actividad de LPL en el grupo HF-OP ($p<0,05$). En ambos tejidos analizados, la expresión de LPL no se vio afectada ni por la dieta ni por el tratamiento con CCK-8 (Figura 24B y D).

De estos resultados se puede deducir que el tratamiento con CCK-8 aumentó la actividad de la LPL en el tejido adiposo de ratas HF-OP pero no logró modificar su expresión.

4.6. Efecto de la CCK-8 sobre la expresión de *Angptl4*

Se analizó el efecto de la CCK-8 sobre la expresión de *Angptl4*, un regulador negativo de la actividad de la LPL (Sukonina *et al.* 2006), así como su correlación con la actividad de la LPL en el TAL.

La Figura 25A muestra el efecto de la CCK-8 y de la dieta HF en la expresión de ARNm de *Angptl4* en TAL. El ANOVA-2 reveló una interacción significativa entre la dieta y el tratamiento con CCK-8 ($F_{(2,26)}=3,730$; $p<0,05$). El tratamiento con CCK-8 redujo la expresión de *Angptl4* en el grupo HF-OP ($p<0,05$).

Se detectó una correlación negativa ($r=0,7$; $p<0,05$) entre actividad de LPL y la expresión de ARNm de la *Angptl4* en el grupo HF-OP tratado con CCK-8 ($p<0,05$, Figura 25B). Sin embargo, esta correlación no existió en los animales HF-OR tratados con CCK-8 (Figura 25C).

4.7. Efecto de la CCK-8 sobre los niveles de ARNm de los transportadores de ácidos grasos FATP-1 y FAT/CD36.

Tras la hidrólisis de los triglicéridos por acción de la LPL, los ácidos grasos libres entran en las células mediante difusión pasiva o a través de transportadores específicos, como la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP-1).

Los niveles de expresión de *Fatp-1* no se vieron modificados ni por el tratamiento dietético, ni por la administración de CCK-8 (Figura 25D). Sin embargo, la expresión de la translocasa de ácidos grasos, *Fat/Cd36*, se vio afectada por la dieta ($F_{(2,22)}=5,890$; $p<0,01$) y el tratamiento con CCK-8 ($F_{(1,22)}=8,203$; $p<0,01$), con una interacción significativa entre ambos ($F_{(2,22)}=3,515$; $p<0,05$). El tratamiento con CCK-8 redujo la expresión de *Fat/Cd36* en el grupo HF-OP ($F_{(1,8)}=8,932$; $p<0,05$; Figura 25E). Estos datos sugieren que el efecto de la CCK-8 en la captación de lípidos por parte del tejido adiposo es debido principalmente a la acción de la LPL.

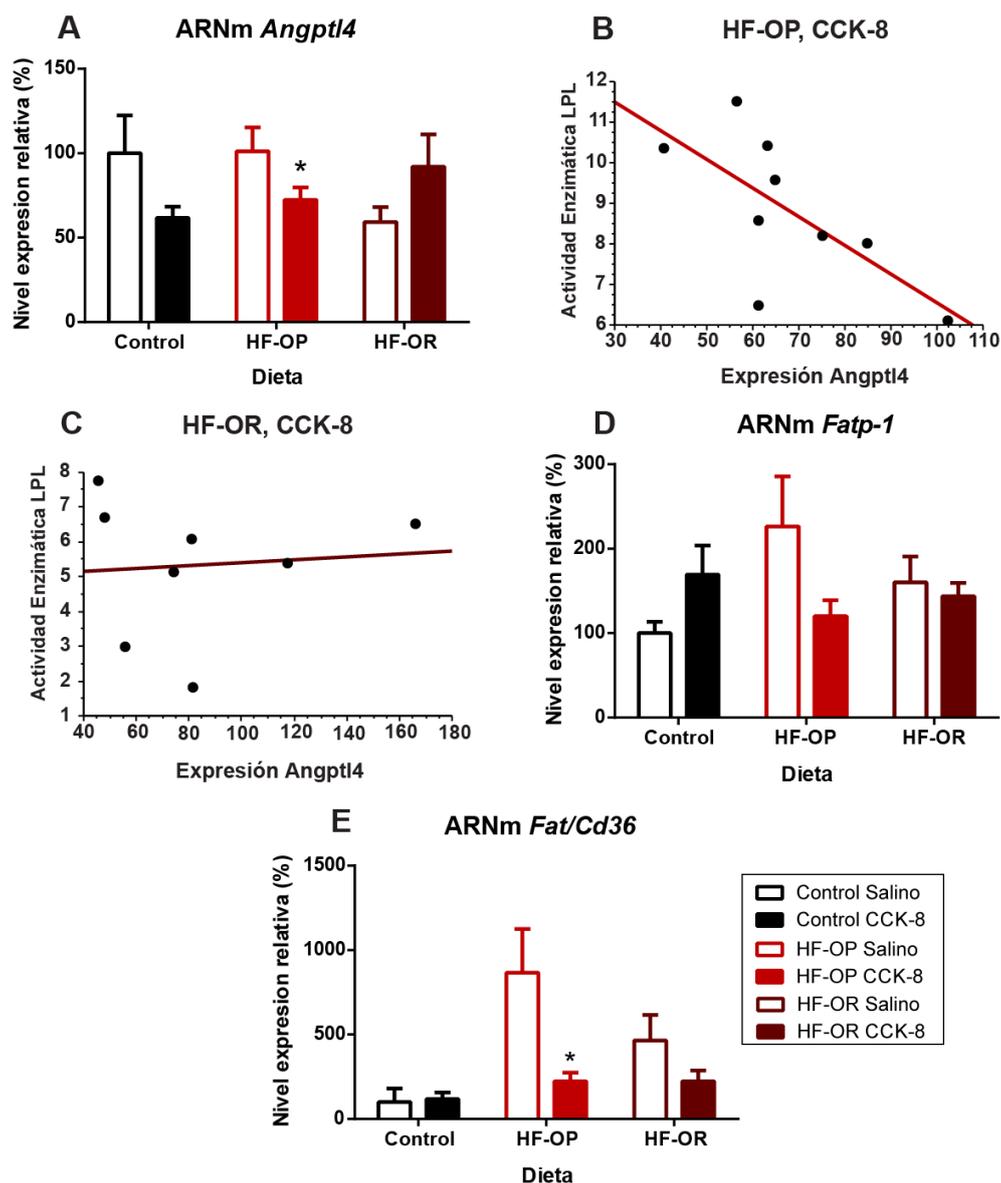


Figura 25. Efecto de la CCK-8 en la expresión de *Angptl4* y correlación entre expresión de *Angptl4* y actividad de la LPL en el TAL. (A) La CCK-8 inhibió la expresión de *Angptl4* en ratas HF-OP y tendió a inhibirla en los animales control, en el TAL. (B) La expresión de *Angptl4* correlacionó negativamente con la actividad de LPL en ratas HF-OP tratadas con CCK-8. (C) Esta correlación no existió en los animales HF-OR. (D) El tratamiento dietético indujo la expresión de *Fatp-1* en HF-OP, pero la CCK-8 no pudo modificar la expresión de ARNm de *Fatp-1*, aunque la CCK-8 tendió a disminuir la expresión de *Fatp-1*. (E) El tratamiento dietético incrementó la expresión de *Fat/Cd36* en el grupo HF-OP. Los valores representan las medias \pm EEM (n=7-9). *p<0,05 con respecto al grupo HF-OP salino (Test de Newman-Keuls).

4.8. Efecto de la dieta sobre la expresión del CCK2R en el TAL

Debido a los cambios originados por el tratamiento con CCK-8 en la absorción de lípidos en el tejido adiposo lumbar observados en los animales sensibles al desarrollo de obesidad (HF-OP), se llevó a cabo el análisis de los niveles de proteína de los receptores de CCK-2 con el objetivo de intentar determinar si una diferencia de expresión del receptor podría justificar las diferencias encontradas en el efecto del tratamiento con CCK-8 entre ambos fenotipos.

Se determinó la densidad relativa de los receptores CCK-2 (CCK2R) en el TAL por medio de *western blotting*. Como se ilustra en la Figura 26, la banda correspondiente al CCK2R (80 kDa) era más intensa en los animales control y HF-OP que en los HF-OR ($F_{(2,21)}=5,476$; $p<0,05$). Estos datos sugieren que el efecto de la CCK-8 en la captación de lípidos por parte del tejido adiposo lumbar podría estar mediado por el CCK2R.

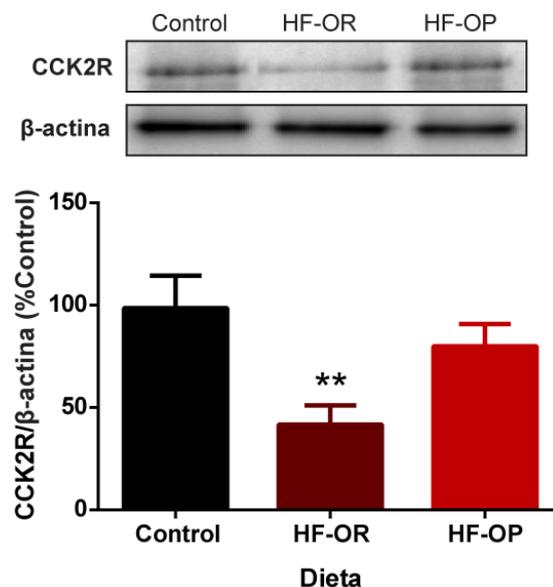


Figura 26. Determinación del CCK2R en el TAL. Los *blots* muestran el efecto de la dieta sobre los niveles del CCK2R. Los gráficos de barras representan la relación CCK2R/β-actina a partir del análisis densitométrico de los *blots*. Los valores (unidades arbitrarias) representan las medias ± E.E.M. (n=5-6). Los niveles del CCK2R fueron menores en los animales del grupo HF-OR respecto de los animales del grupo control y HF-OP. ** $p<0,01$ comparado con su grupo control (Test de Newman-Keuls).

5. Discusión

Para la correcta regulación del almacenamiento de los hidratos de carbono y los triglicéridos de la dieta es necesaria la acción coordinada de las hormonas gastrointestinales tales como la insulina y la CCK. Por un lado, la CCK regula el vaciado gástrico y actúa como un secretagogo de la lipasa y la amilasa intestinal, permitiendo la absorción intestinal de la glucosa y los triglicéridos. Por otro lado, la insulina dirige la glucosa y los ácidos grasos hacia el tejido adiposo y el hígado.

En este trabajo se muestra que la CCK podría tener un papel muy relevante en la regulación de la distribución de los triglicéridos de la dieta y en su captación por el tejido adiposo, al menos en condiciones experimentales asociadas a la obesidad y a un aparente deterioro de la sensibilidad a la insulina. Con este estudio se demuestra, por primera vez, el papel de la CCK en la regulación posprandial de la distribución de lípidos mediante la activación de los mecanismos de captación de triglicéridos en el tejido adiposo blanco dependientes de la LPL y de su proteína reguladora ANGPTL4 (Sukonina *et al.* 2006). Este efecto de la CCK podría tener una gran relevancia en la regulación fisiológica del metabolismo lipídico y de la homeostasis energética.

Hace algunas décadas se planteó la posibilidad de usar fármacos relacionados con la CCK como posibles herramientas farmacológicas para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo, aunque la CCK actúa como un agente saciante capaz de disminuir el tamaño de las raciones, carece de efecto sobre la ingesta calórica diaria acumulada (Gibbs *et al.* 1973b; West *et al.* 1984). Este hecho, junto con su acción estimulante sobre la liberación de insulina, da pie a la hipótesis de que la CCK regula el tamaño de las raciones con el fin de permitir la correcta distribución de los nutrientes en el organismo, ya sea para su uso como combustible o para su almacenamiento en forma de grasa. De esta manera en lugar de reducir la ingesta total de nutrientes de forma global, la CCK impediría la sobrecarga de nutrientes circulantes, que podría llegar a saturar los mecanismos celulares implicados en la captación de glucosa y/o triglicéridos. Esta hipótesis encaja bien con la idea de que la CCK es una hormona implicada en la regulación de la ingesta a corto plazo, pero en contraposición a otras hormonas como la leptina, no tiene una función evidente en la regulación del peso corporal. Sin embargo, como ocurre con la insulina, su función estaría más bien ligada al manejo posprandial de los nutrientes. Estudios previos muestran que la CCK es más eficaz como agente saciante en los animales HF-OR que en sus homólogos HF-OP (Duca *et al.* 2013). Este trabajo demuestra que, con independencia del efecto anorexígeno de la CCK-8, el tejido adiposo de los animales HF-OP es más sensible a los efectos de la CCK que el de los HF-OR. Esta observación es coherente con la menor densidad del CCK2R detectada en el tejido adiposo de las ratas HF-OR, respecto a las ratas HF-OP y los controles.

En estudios previos se había propuesto que la CCK disminuye el peso corporal mediante el aumento de la actividad catabólica del músculo esquelético a través de un mecanismo que implica la participación de los receptores centrales de leptina (Merino *et al.* 2008; V. Cano *et al.* 2008). En este trabajo hemos observado que el tratamiento con CCK-8 provoca un aumento paradójico del tejido adiposo blanco en los individuos del grupo HF-OP, mientras que en los animales del grupo HF-OR los depósitos adiposos

tienden a ser menores que su control salino. Este hecho permite descartar la influencia que la composición de la dieta pudiera tener en el efecto de la CCK-8. Además, dado que no existen diferencias en los perfiles del test de tolerancia a la glucosa entre los grupos HF-OP y HF-OR, se puede descartar la posible influencia de este factor en los animales alimentados con dieta HF. Finalmente, también se puede descartar un efecto diferencial del tratamiento con CCK-8 sobre la liberación de insulina dado que los niveles de insulina plasmática no se vieron afectados por el tratamiento con CCK-8. Tanto los valores de insulina en plasma nocturnos como los diurnos se mantuvieron sin cambios después del tratamiento CCK-8 en los grupos HF-OP y HF-OR.

Por lo tanto, estos datos sugieren que la diferencia en la respuesta a CCK-8 podría estar vinculada a los niveles de expresión del receptor CCK-2 en el tejido adiposo. El hecho de que la expresión del receptor CCK-2 sea menor en el tejido adiposo de los animales HF-OR sugiere que el tratamiento con la dieta HF inhibe la expresión del receptor en esta población y también que la existencia de dos poblaciones de ratas *Sprague-Dawley*, HF-OP y HF-OR, desveladas por el tratamiento con dietas HF podría deberse a esta diferente regulación de la expresión del receptor CCK-2. También da apoyo a la participación de este subtipo de receptor en la homeostasis del tejido adiposo. Finalmente, la aparente falta de efecto de la CCK-8 en los animales del grupo control se debería a la heterogeneidad de este grupo.

En este trabajo se muestra que la CCK podría ser crucial en la regulación de la gestión posprandial de la grasa de la dieta mediante la movilización de ésta hacia el tejido adiposo. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que muestran que el CCK2R es esencial para la homeostasis del tejido adiposo (Chen *et al.* 2006). Puesto que la saciedad mediada por CCK se ejerce principalmente a través del CCK1R (Bado *et al.* 1991; Crawley *et al.* 1991), nuestra hipótesis es que la CCK puede tener una doble acción en función del receptor al que se una. Por un lado, el receptor CCK-1 mediaría el efecto saciante de la CCK, y por otro, el receptor CCK-2 sería el responsable de los efectos adipotrópicos de la hormona. Además, es interesante destacar que el receptor CCK-1 no se expresa en el tejido adiposo de rata (Attoub *et al.* 1999; Irwin *et al.* 2013).

El aumento de la leptina en plasma de ratas HF-OP tratadas con CCK-8 se correlaciona con un aumento de la adiposidad en este grupo y es coherente con el efecto de la CCK-8 sobre la secreción de leptina (Attoub *et al.* 1999). Además, la leptina también podría contribuir a la reducción de NEFA en plasma observada en estos animales, ya que se ha demostrado que la leptina estimula el catabolismo de los ácidos grasos en los tejidos oxidativos (Unger *et al.* 1999; Guzmán-Ruiz *et al.* 2010). Curiosamente el tratamiento con CCK-8 no tuvo efecto sobre los niveles de TG plasmáticos en los animales HF-OP. Este resultado es inesperado ya que el aumento de la adiposidad detectado en estos animales llevaría a esperar una disminución en los lípidos plasmáticos. Sin embargo, este parámetro es difícil de interpretar en nuestras condiciones experimentales ya que independientemente del efecto de la CCK-8 en la captación de triglicéridos, esta hormona también puede mejorar la absorción intestinal de triglicéridos (Lo *et al.* 2010). Otro hallazgo sorprendente es la falta de efecto de la dieta HF sobre los valores de leptina plasmáticos por la noche, pese a que los valores de leptina plasmáticos por la mañana eran ligeramente superiores en los

animales HF-OP. Una posible explicación de este hecho, es que durante la fase de oscuridad se produce un aumento circadiano normal de leptina circulante, lo que podría contribuir a homogeneizar todas las poblaciones (Saad *et al.* 1998; Sinha *et al.* 1996; Kalsbeek *et al.* 2001).

La LPL en su forma activa se encuentra principalmente en las células endoteliales y tiene un papel central en la regulación de los niveles de triglicéridos circulantes mediante la hidrólisis de estos en ácidos grasos libres (Sukonina *et al.* 2006; Bergö *et al.* 2002). Numerosos estudios han demostrado que la ANGPTL4, una proteína relacionada con el metabolismo glucídico y lipídico, es un potente inhibidor de la actividad de la LPL, que actúa incrementando los niveles de triglicéridos circulantes (Mattijssen & Kersten 2012). El hallazgo más relevante de este estudio es el aumento de la actividad de la LPL por el tratamiento con CCK-8, detectado específicamente en el tejido adiposo de ratas HF-OP, junto con la correlación negativa de dicha actividad enzimática con la expresión de *Angptl4* en el TAL. Nuestros resultados indican que la CCK-8 inhibe la expresión de *Angptl4*, lo que sugiere que la CCK-8 podría ser parte integral de los mecanismos que regulan la ANGPTL4 durante los ciclos circadianos de alimentación-ayuno (Bergö *et al.* 2002). Igualmente, no se puede descartar la posible influencia de la grasa de la dieta en la expresión de *Angptl4*, ya que algunos estudios han sugerido que los lípidos de la dieta inducen la expresión de *Angptl4* en el tejido cardíaco de ratón a través de un mecanismo dependiente de PPAR (Georgiadi *et al.* 2010).

Nuestro estudio muestra, además, que el tratamiento con CCK-8 no afectó a la expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos *Fatp-1* y que disminuyó la expresión de la traslocasa de ácidos grasos *Fat/Cd36* en los animales del grupo HF-OP. Estos datos sugieren que el efecto de la CCK-8 sobre la captación de lípidos por el tejido adiposo está mediado principalmente por la LPL y no por los transportadores de ácidos grasos.

Estos datos tomados en conjunto apoyan la hipótesis de que la CCK-8 podría favorecer la captación de triglicéridos sin interferir con otros procesos sensibles al metabolismo de los lípidos. En resumen, nuestros datos sugieren que la CCK inhibe la expresión de *Angptl4* a través del CCK2R en el tejido adiposo, lo que lleva a un aumento de la actividad LPL.

Capítulo 2

Desincronización entre el ciclo luz/oscuridad y el ritmo circadiano de la ingesta causada por una dieta rica en grasa: repercusión sobre la expresión génica y el metabolismo energético

1. Introducción

1.1. Los ritmos circadianos

La vida no es un fenómeno invariable, sino un fenómeno dinámico y en constante cambio. Al estudiar las actividades biológicas nos encontramos con variaciones en el tiempo, siguiendo patrones temporales predecibles, lo que indica que estas actividades se realizan rítmicamente. La Tierra gira alrededor de su eje originando ciclos de luz y oscuridad cada 24 horas. Los seres vivos han evolucionado para predecir estos cambios desarrollando un reloj biológico endógeno. La organización temporal de la conducta y la fisiología es una característica común de todos los seres vivos, que permite la adaptación a los cambios en el medio ambiente. La palabra circadiano proviene del latín: “*circa*” (alrededor de, cerca de) y “*dies*” (día) (Panda *et al.* 2002). Este hecho es una parte tan natural en nuestras vidas que no solemos ser conscientes de ello. Así, el correcto funcionamiento de este sistema permite a los seres vivos predecir y anticiparse a los cambios en el medio ambiente, pudiendo adaptar su conducta y sus funciones fisiológicas a dicho entorno (Reppert & Weaver 2002).

Los ritmos circadianos se definen como las variaciones en la fisiología o el comportamiento que se repiten cada 24 horas (Weaver 1998). La primera evidencia que puso de manifiesto el carácter endógeno de los ritmos circadianos fue descrita en 1729 por el astrónomo francés Jean-Jacques Dortous de Mairan, quien demostró que los ritmos diarios de apertura y cierre de las flores de una planta heliotrópica se mantenían en condiciones de oscuridad constante. Anteriormente se pensaba que este fenómeno estaba determinado por los ciclos de luz-oscuridad (Kraft & Martin 1995). Desde entonces, el estudio de los ritmos circadianos se ha centrado tanto en los procesos ambientales que los sincronizan como en los mecanismos endógenos innatos responsables de estos ritmos.

Los ritmos circadianos no se circunscriben solo a los ritmos de sueño-vigilia, sino que afectan a todo el organismo regulando funciones tan importantes como: i) temperatura corporal, ii) liberación de hormonas y neurotransmisores, iii) activación simpática, iv) ingesta, v) metabolismo energético (lipólisis, gluconeogénesis, sensibilidad a insulina) y vi) transcripción génica (Laposky *et al.* 2008). Debido a la gran importancia de este sistema, los seres vivos han desarrollado un mecanismo de cronometraje interno. Este mecanismo está formado por relojes biológicos endógenos que pueden funcionar en ausencia de estímulos externos y oscilan con un periodo aproximado de 24 horas. Estos relojes biológicos se localizan en el SNC y a nivel periférico y se rigen por un mecanismo molecular similar (Schibler & Sassone-Corsi 2002).

Existe una fuerte conexión entre los ciclos circadianos y la fisiología. La alteración de los ritmos normales de sueño-vigilia origina fatiga, desorientación, insomnio, alteración de los niveles nocturnos de melatonina y enfermedades metabólicas (Davis & Mirick 2006). Estudios llevados a cabo en seres humanos por Scheer y cols. (2009) demostraron que la desincronización circadiana causada por un cambio de fase de 12 horas en el ciclo luz-oscuridad provocaba alteraciones fisiológicas importantes, como un incremento de la tensión arterial durante el día y modificaciones en la concentración de leptina, insulina y glucosa (Scheer *et al.* 2009). También se ha relacionado la alteración de los ritmos

biológicos con la aceleración y propensión de ciertos tipos de cáncer, lo que sugiere que el reloj circadiano controla la progresión de tumores (Davis & Mirick 2006; Gery *et al.* 2006; Fu *et al.* 2002). Todo esto sugiere que la correcta sincronización entre los ritmos circadianos y los procesos fisiológicos podría jugar un papel crucial en la prevención y tratamiento de patologías tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad y síndrome metabólico (Salgado-Delgado *et al.* 2010; Erren & Reiter 2008; Penev *et al.* 1998).

1.2. Control funcional de los ritmos circadianos

Los relojes biológicos regulan los procesos fisiológicos, asegurando la correcta organización temporal de los mismos y permitiendo su coordinación con el medio ambiente. En los mamíferos, el sistema responsable de la generación de los ritmos circadianos y la sincronización con el entorno está formado por un reloj biológico central o marcapasos que se localiza en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo anterior, y por múltiples relojes periféricos. A su vez, el NSQ está formado por miles de osciladores unicelulares sincronizados (Reppert & Weaver 2002). El periodo de oscilación endógeno del NSQ es de aproximadamente 24 horas, siendo la luz su principal sincronizador (Boivin *et al.* 1996).

Los relojes periféricos se localizan en el resto de las células del organismo. Así, diversos autores han demostrado la existencia de relojes similares en otras regiones del cerebro y en la mayoría de los órganos y tejidos periféricos (Guilding & Piggins 2007; Dibner *et al.* 2010; Reppert & Weaver 2002). Estos sistemas generan un orden temporal interno en las funciones fisiológicas. El NSQ sincroniza los relojes periféricos mediante conexiones neuronales o factores humorales (Balsalobre *et al.* 2000; Akashi & Nishida 2000), que a su vez modulan los ritmos del NSQ (Saeb-Parsy *et al.* 2000; Yi *et al.* 2006). Por otro lado, se ha visto que algunas situaciones, como la administración de glucocorticoides y el cambio en el horario de alimentación, alteran los patrones circadianos de expresión de los genes *clock* (implicados en la regulación de los ritmos circadianos) en tejidos periféricos, como el hígado, pero no en el NSQ (Schibler *et al.* 2003; Damiola *et al.* 2000). En cualquier caso, el NSQ vuelve a sincronizar los osciladores periféricos (recuperando su ritmo normal) cuando las situaciones que lo perturban desaparecen (Schibler & Sassone-Corsi 2002; Damiola *et al.* 2000). Además de la luz existen otros factores periódicos como el horario de las comidas, el ejercicio programado, la temperatura, los olores y las señales sociales que también permiten sincronizar los osciladores periféricos en los mamíferos (Reppert & Weaver 2002; Laposky *et al.* 2008). Asimismo, varios estudios vinculan los regímenes de alimentación y el tipo de dieta con los ritmos circadianos (Mistlberger 1994).

Las lesiones en el NSQ alteran los ritmos del ciclo de sueño-vigilia, la actividad locomotora, los niveles de corticosterona y leptina, la tolerancia a la glucosa y la ingesta de agua y comida (Laposky *et al.* 2008), mientras que el trasplante neural los restablece (Lehman *et al.* 1987). Por otra parte, la destrucción de las neuronas del NSQ suprime la ritmicidad circadiana en la periferia. Sin embargo, a nivel celular se mantienen las oscilaciones pero con distinta fase (Yoo *et al.* 2004).

En ratones, el NSQ está formado por dos pequeños núcleos de unas 10.000 neuronas, localizados a ambos lados del tercer ventrículo, en posición dorsal con respecto al quiasma óptico (Welsh *et al.* 2010). Cada NSQ se puede dividir en dos regiones anatómicamente diferenciadas: i) la zona ventral o "*core*", contigua al quiasma óptico, recibe información directamente desde la retina; y ii) la zona dorsal o "*shell*", que es el verdadero marcapasos, genera ritmos de actividad nerviosa de manera autónoma y que será transmitida a todo el núcleo. Esta zona rodea parcialmente a la zona ventral y recibe aferencias de ésta. Ambas subdivisiones y ambos núcleos actúan como una sola unidad transmitiendo la ritmicidad a los sistemas efectores (Leak *et al.* 1999).

De todas las señales externas capaces de sincronizar el NSQ, la principal y mejor caracterizada es la luz. Ésta viaja desde la retina hasta el NSQ a través del tracto retinohipotalámico (Moore & Lenn 1972). Sorprendentemente, el sistema de fotorreceptores formado por los conos y los bastones de la retina no es necesario para la sincronización del NSQ por la luz, sino que ésta es captada por las células ganglionares de la retina, que contienen un pigmento denominado melanopsina (Qiu *et al.* 2005). Esta ruta, a través de sus proyecciones directas sobre el NSQ, es suficiente para sincronizar el reloj central. Por otra parte, se ha demostrado que desaparece la sincronización del NSQ por la luz ambiental en ratones desprovistos tanto de melanopsina como de conos y bastones (Hattar *et al.* 2003; Panda *et al.* 2003). Durante la fase de luz, las señales luminosas son transducidas en el NSQ y enviadas a la glándula pineal. Esta glándula secreta la hormona melatonina que es un importante agente sincronizador (Reppert *et al.* 1981; Lewy *et al.* 1980). La secreción de melatonina está regulada por las señales lumínicas, siendo baja durante el periodo de actividad y aumentando durante el periodo de descanso (Wyatt *et al.* 2006).

Las principales conexiones eferentes del NSQ se dirigen hacia las regiones ventral y dorsal de la zona subparaventricular (ZSP) del hipotálamo (Figura 27). Esta zona envía proyecciones principalmente al núcleo dorsomedial del hipotálamo (NDM), el cual a su vez, envía proyecciones: i) al área preóptica ventrolateral (APOV), importante en el control de sueño-vigilia, ii) al núcleo paraventricular (NPV), que contiene neuronas que sintetizan la hormona liberadora de corticotropina y las neuronas que median las salidas preganglionares del sistema nervioso autónomo, y iii) al área hipotalámica lateral, donde se producen los neuropéptidos estimulantes del hambre, las orexinas y la hormona concentradora de melanina (Saper 2006). También se han visto proyecciones del NSQ que llegan al núcleo ventromedial (NVM) del hipotálamo (Watts *et al.* 1987). Estos núcleos son importantes para la regulación del balance energético (Dallman *et al.* 1993). Los ritmos del sueño y del metabolismo se ven afectados por lesiones neurotóxicas de la ZSP y del NDM (Gooley *et al.* 2006). El NDM recibe además aferencias del núcleo arqueado, un área hipotalámica fundamental en la regulación de la ingesta y del gasto energético, así como en la capacidad de controlar el estado energético periférico, especialmente a través del receptor de leptina (Saper 2006). En el tálamo, los axones del NSQ también inervan los núcleos paraventricular y paratenial y, posiblemente la laminilla intergeniculada (recibe conexiones desde los ganglios de la retina). Además, existen indicios de conexiones entre el NSQ y otras estructuras como la habénula y la amígdala, pero aún no han sido confirmadas (Guilding & Piggins 2007).

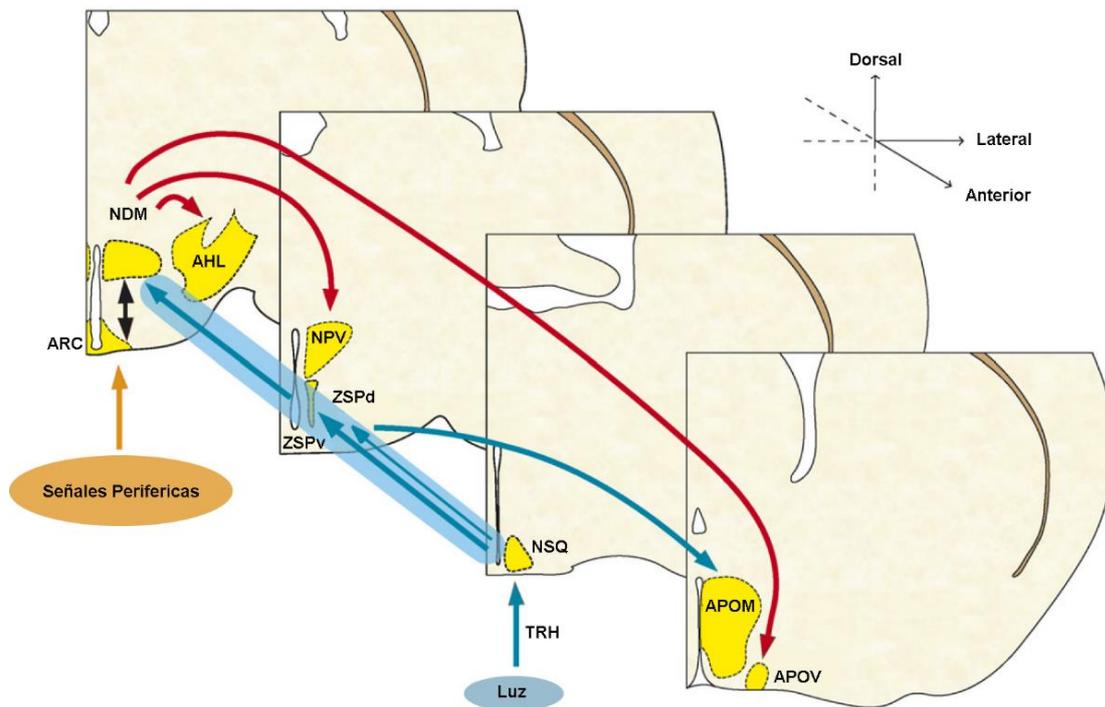


Figura 27. Esquema de la entrada al NSQ y las vías de salida en el hipotálamo. Secciones coronales de las áreas del hipotálamo anterior y posterior. El NSQ, la ZSP y el NAR están localizados en el hipotálamo mediobasal, alrededor del tercer ventrículo. AHL: área hipotalámica lateral; APOM: área preóptica medial; APOV: área preóptica ventrolateral; NAR: núcleo arqueado; NDM: núcleo dorsomedial del hipotálamo; NPV: núcleo paraventricular; TRH: tracto retinohipotalámico; ZSPv y ZSPd: zona subparaventricular ventral y dorsal. Modificado de Laposky *et al.* 2008.

1.3. El reloj biológico a nivel molecular

En los mamíferos, el reloj biológico comparte el mismo mecanismo intracelular en las neuronas del NSQ que en las células periféricas (Schibler *et al.* 2003). A nivel molecular, la generación de los ritmos circadianos depende de la expresión armónica de los genes *clock*, cuyos mecanismos subyacentes están muy conservados entre especies (Bunney & Bunney 2000; Panda *et al.* 2002). Este sistema está compuesto por un mecanismo de autorregulación mediante bucles de retroalimentación positivos y negativos que regulan de manera rítmica la transcripción y traducción de sus propios genes (Schibler & Sassone-Corsi 2002; Reppert & Weaver 2002). Por tanto, los genes *clock*, se pueden definir como los genes cuyos productos proteicos son necesarios para la generación y la regulación de los ritmos circadianos (Ko & Takahashi 2006).

Dentro de las proteínas que componen este sistema, encontramos las proteínas CLOCK y BMAL1 (Figura 28). Ambas proteínas poseen dominios de unión al ADN y dominios PAS (*Period-Arnt-Single-minded*), que pueden interactuar con dominios PAS de otras proteínas. Así, CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que se une a las secuencias reguladoras denominadas caja E (*E-box*) en los promotores de sus reguladores negativos: *Per1* (*Period1*), *Per2*, *Per3*, *Cry1* (*Cryptochrome1*) y *Cry2* (Reppert & Weaver 2002). Las proteínas PER y CRY se oligomerizan y se translocan al núcleo para inhibir la transcripción mediada por el heterodímero formado por CLOCK y BMAL1 y, por lo tanto, su propia expresión. La expresión de *Per* y *Bmal1* tiene una marcada oscilación en fases opuestas

(Reppert & Weaver 2002). Todos los genes mencionados poseen un ritmo circadiano en el NSQ y en los tejidos periféricos, a excepción del gen *Clock* que se ha demostrado que no oscila en el NSQ (Dunlap 1999). Sin embargo, se ha demostrado que CLOCK tiene actividad de histona acetiltransferasa, lo que sugiere que para el desarrollo de los ritmos circadianos es importante el papel de CLOCK en la remodelación de la cromatina (Doi *et al.* 2006).

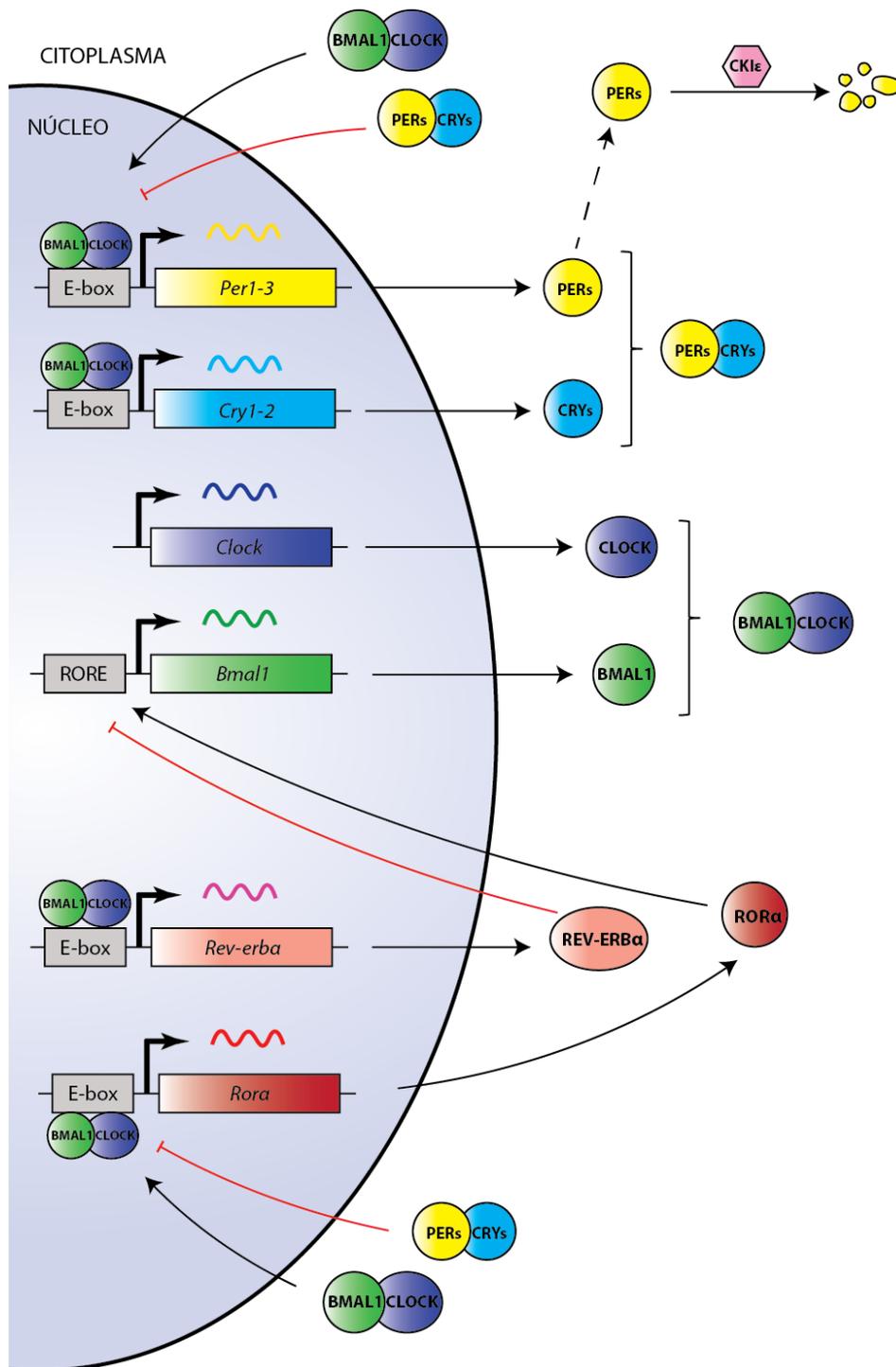


Figura 28. Mecanismo molecular del reloj circadiano en los mamíferos.

Existen otras moléculas que también son importantes para la función del reloj biológico. La caseína quinasa I epsilon (CKI ϵ) fosforila las proteínas PER aumentando su inestabilidad y favoreciendo su degradación (Dunlap 1999; Eide, Woolf, *et al.* 2005). Por otra parte, la CKI ϵ también fosforila y activa parcialmente el factor de transcripción BMAL1 (Eide, Kang, *et al.* 2005). Como mecanismo de control adicional, la expresión de *Bmal1* está regulada por los receptores nucleares ROR α (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor α*) y REV-ERB α (*reverse erythroblastosis virus α*). El heterodímero formado por CLOCK y BMAL1 activa la transcripción de los genes *Rora* y *Rev-erba*. En el promotor del gen *Bmal1* hay elementos RORE (*ROR response element*) que responden a las proteínas de ROR α y REV-ERB α , regulando su transcripción. Así la expresión de *Bmal1* está regulada negativamente por REV-ERB α y positivamente por ROR α . (Preitner *et al.* 2002; Sato *et al.* 2004; Ueda *et al.* 2005).

Los genes *clock* regulan la transcripción de un conjunto de genes denominados genes controlados por el reloj (*Clock-controlled genes*, CCG), los cuales presentan secuencias *E-box* o RORE en sus promotores. De hecho, se ha comprobado que aproximadamente entre un 5 y 10% de los genes, dependiendo de los tejidos, parecen tener un ritmo de expresión guiado por los genes *clock* (Shostak *et al.* 2013). Entre los genes que se encuentran bajo esta regulación circadiana se incluyen proteínas implicadas en la regulación de los procesos moleculares y fisiológicos (Reppert & Weaver 2002). Por lo tanto, la regulación de la expresión de los CCG por el reloj circadiano confiere ritmicidad a los procesos fisiológicos de manera específica para cada tejido.

1.4. Efecto del patrón circadiano de la ingesta en los ritmos circadianos

La ingesta es un potente sincronizador de los relojes biológicos periféricos. El protocolo de restricción temporal de la ingesta (RTI) limita el tiempo de acceso a los alimentos sin reducir el aporte calórico diario (Damiola *et al.* 2000; Boulamery-Velly *et al.* 2005). La RTI tiene efectos profundos en el comportamiento y la fisiología de los animales. Así, muchas funciones fisiológicas normalmente reguladas por el NSQ, tales como la actividad locomotora, temperatura corporal y frecuencia cardíaca se alteran por este protocolo (Boulamery-Velly *et al.* 2005). Los primeros estudios en roedores que señalaban la comida como un elemento capaz de regular los ritmos circadianos mostraron que la restricción generaba una intensa actividad locomotora y de búsqueda durante las horas previas al acceso a la comida. Este fenómeno, denominado actividad de anticipación al alimento (Bolles & Stokes 1965), va acompañado de un aumento de temperatura corporal, secreción de corticosterona, motilidad gastrointestinal y actividad de las enzimas digestivas (Stephan 2002). Por otra parte, la RTI es capaz de restablecer los ritmos circadianos en animales con lesiones en el NSQ, lo que sugiere la existencia de un oscilador circadiano distinto e independiente del NSQ (Mistlberger 1994; Stephan 2002). Además, se ha demostrado que la RTI actúa sincronizando los relojes periféricos, pero no tiene efecto sobre el NSQ (Schibler *et al.* 2003). Así, cuando la disponibilidad del alimento vuelve a ser *ad libitum*, el NSQ (cuya fase no se vio alterada) es capaz de volver a sincronizar de nuevo los relojes periféricos (Damiola *et al.* 2000). Estos datos refuerzan la hipótesis de que la regulación de los relojes periféricos mediada por la ingesta de alimentos

puede tener un papel trascendental en la regulación de los ritmos circadianos y el metabolismo energético.

Existen numerosos estudios que demuestran que la alteración del ritmo circadiano de la ingesta se asocia con un aumento del peso corporal y la adiposidad. Por ejemplo, se ha demostrado que las personas que no desayunan tienden a tener un peso mayor que las personas que sí lo hacen; esto se debe, al menos en parte, al mayor consumo de calorías a lo largo del día (Giovannini *et al.* 2008). De manera similar, los trabajadores nocturnos, suelen consumir comidas durante la noche, es decir, durante la fase de descanso, lo que promueve cambios en el patrón de alimentación. Se ha descrito que estas personas tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes, así como enfermedades cardiovasculares (Lennernäs *et al.* 1995; Karlsson *et al.* 2001; Knutson *et al.* 2007). Además, es interesante destacar que existen algunos pacientes obesos que presentan el síndrome del comedor nocturno. Estos pacientes se caracterizan porque la mayor parte de las calorías diarias se consumen por la noche, coincidiendo con el periodo de descanso y provienen generalmente de dietas con alta palatabilidad (Stunkard & Allison 2003). Todos estos datos en conjunto, subrayan la importancia del ritmo circadiano de la ingesta en la regulación del peso corporal. Sin embargo, aún son necesarios más estudios que nos permitan establecer los mecanismos exactos por los cuales la alteración del ritmo circadiano se relaciona con una alteración del metabolismo energético y el desarrollo de obesidad.

Los roedores son animales nocturnos, por lo que en condiciones normales la mayor parte de la ingesta diaria se realiza durante su periodo de actividad (aproximadamente el 80% del total diario). Análogamente a lo que sucede en los seres humanos, se ha demostrado que la restricción del acceso a los alimentos durante la fase de luz (periodo de descanso) se asocia a un aumento del peso corporal (Arble *et al.* 2009). Además, se ha demostrado que las dietas HF alteran el patrón de ingesta normal, incrementando la ingesta de alimentos durante el periodo de luz (Stucchi *et al.* 2012; Pendergast *et al.* 2013; Kohsaka *et al.* 2007). Este cambio va acompañado de alteraciones en el patrón de expresión de los genes *clock* y en las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (Kohsaka *et al.* 2007). Además, la dieta HF origina variaciones en el ritmo de los niveles de hormonas que intervienen en el metabolismo energético tales como leptina, TSH y corticosterona (P. Cano *et al.* 2008; Cha *et al.* 2000).

1.5. El reloj biológico y la obesidad

Las alteraciones del reloj biológico se asocian con disfunciones en el metabolismo. Así, se ha observado una fuerte vinculación entre las mutaciones y/o deficiencias en los genes *clock* y la obesidad. Por ejemplo, se ha observado que los ratones que presentan una mutación en el gen *Clock* tienen alterado el ritmo circadiano de la ingesta, son hiperfágicos y obesos, y además, presentan hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática e hiperglucemia (Turek *et al.* 2005). Asimismo, los ratones deficientes de *Bmal1* se caracterizan por desarrollar hipertrofia de los adipocitos y obesidad tanto con una dieta estándar como con una dieta rica en grasas (Guo *et al.* 2012). Ambos modelos carecen de variaciones circadianas en los niveles de glucosa y triglicéridos además de tener inhibida la gluconeogénesis (Rudic *et al.* 2004). Asimismo, los ratones deficientes de *Per2* presentan

una alteración en el ritmo circadiano de la ingesta, carecen del ritmo circadiano de la secreción de glucocorticoides y desarrollan obesidad con dietas ricas en grasa (S. Yang *et al.* 2009). Por otro lado, las alteraciones metabólicas también se relacionan con trastornos en los ritmos circadianos. Varios trabajos en modelos animales utilizados para el estudio de la obesidad sugieren que esta patología se relaciona con alteraciones en la expresión de los genes implicados en el control de los ritmos circadianos. Se ha demostrado en ratas Zucker *falfa* (presentan una mutación en el gen del receptor de leptina) que la expresión de *Clock* se encuentra disminuida en el hígado, pero no en el tejido adiposo blanco ni en el NSQ (Motosugi *et al.* 2011). Además, se ha demostrado que los ratones *ob/ob* (presentan una mutación en el gen de leptina) presentan una menor amplitud en las oscilaciones de varios genes *clock* en el hígado y tejido adiposo, pero no en el NSQ (Ando *et al.* 2011). Por último, es importante destacar que los estudios epidemiológicos en humanos demuestran la asociación existente entre la obesidad y la presencia de diversos polimorfismos de los genes implicados en la regulación de los ritmos circadianos (Garaulet *et al.* 2009; Scott *et al.* 2008; Garaulet *et al.* 2010; Goumidi *et al.* 2013).

La importancia del reloj biológico en la fisiología se demuestra por la variación circadiana existente en una gran variedad de sistemas, tales como los ciclos de sueño-vigilia, la regulación de la ingesta, el metabolismo, la actividad endocrina y la transcripción génica. El estilo de vida actual lleva asociado un alto consumo de alimentos hipercalóricos que junto con una disminución de las horas de descanso y una alteración de los ritmos circadianos de la ingesta puede favorecer el desarrollo de trastornos metabólicos. Además, como se ha dicho anteriormente, la alteración de los ritmos biológicos podría atenuar el ritmo circadiano de la ingesta, alterando el metabolismo, y favoreciendo el desarrollo de obesidad. Todo ello convierte al reloj biológico en una parte importante en el control del metabolismo, de ahí que sea necesario profundizar aún más en el estudio de los ritmos circadianos para el tratamiento de la obesidad.

2. Hipótesis y Objetivos

Los mecanismos reguladores de la homeostasis energética se alteran por las dietas HF. Esta alteración se debe, al menos parcialmente, a cambios en la maquinaria molecular del reloj biológico y se produce de manera aguda y a largo plazo.

Con el objetivo de contrastar nuestra hipótesis desarrollamos tres modelos experimentales basados en el consumo de una dieta HF: i) tratamiento dietético durante 48 horas, ii) tratamiento dietético durante 48 horas seguido de 12 horas de ayuno y iii) tratamiento dietético durante 4 semanas seguido de 4 semanas con un protocolo de sincronización forzada de la ingesta. Los protocolos se detallan en el apartado “Material y Métodos” de este capítulo (pág. 77).

Los objetivos concretos de nuestra investigación han sido los siguientes:

Objetivo 1: Evaluar el efecto a corto plazo (48 h) de una dieta HF sobre la variación circadiana de los parámetros biométricos, variación circadiana en los niveles plasmáticos de insulina, leptina e interleuquinas y en la expresión génica de proteínas implicadas en los ritmos circadianos, la ingesta y la lipogénesis a nivel central y periférico.

Objetivo 2: Evaluar el efecto del ayuno tras 48 h de dieta sobre los parámetros biológicos citados previamente.

Objetivo 3: Evaluar el efecto de 8 semanas de dieta HF y de la reorganización del patrón de ingesta sobre los parámetros biológicos citados previamente.

3. Material y métodos

3.1. Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho de la cepa C57BL/6J (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, España) de 4 semanas de edad con un peso comprendido entre 17-19 g. Los animales se estabularon en grupos de 6-8 ratones por jaula, en condiciones controladas de humedad (45-50%), temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y con un ciclo de 12 h de luz (8:00-20:00h) y 12 h de oscuridad. Durante la primera semana todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta sólida estándar (RMN, Harlan Interfauna Iberica, España) y agua. El estudio se realizó de acuerdo con la Directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE) para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005) y fue aprobado por el comité ético de la universidad CEU-San Pablo.

3.1.1. Tratamiento dietético con una dieta HF durante 48 horas

Tras la primera semana de aclimatación los animales se redistribuyeron en grupos (7-8 animales/jaula) de peso corporal medio semejante. Los animales del grupo control recibieron una dieta sólida estándar (RMN, Harlan Interfauna Iberica, España). Los animales del grupo *high-fat* (HF) recibieron una dieta sólida rica en grasa (58V8, TestDiet, Reino Unido; Tabla 2).

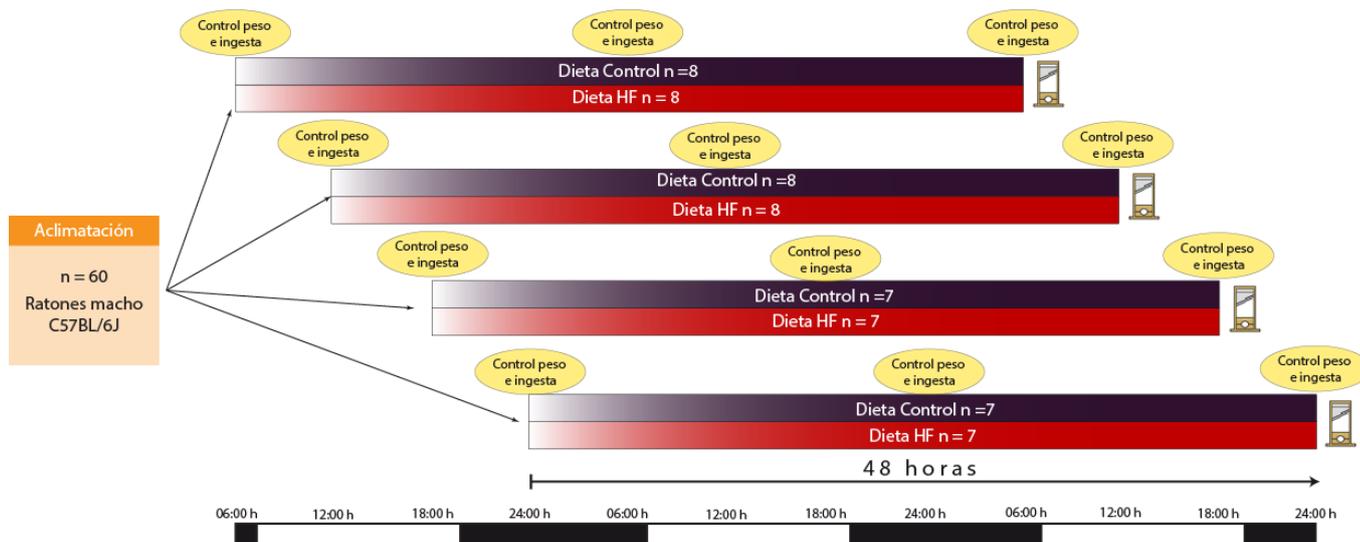


Figura 29. Esquema del modelo experimental 48 h con dieta HF.

El tratamiento dietético se mantuvo durante 48 h. Para que todos los animales estuviesen en las mismas condiciones, el tratamiento se inició de forma escalonada, de manera que se introdujo la dieta HF al primer grupo a las 06:00 h y luego al resto de grupos experimentales en intervalos de 6 h. Trascorridas 48 h los animales se sacrificaron. La evolución del peso corporal e ingesta de los animales se monitorizó desde el inicio del tratamiento dietético hasta el momento del sacrificio cada 24 h (Figura 29).

3.1.2. Tratamiento dietético con una dieta HF durante 48 h y 12 h de ayuno

Tras una semana de aclimatación, los animales se dividieron en 4 grupos homogéneos. A las 18:00 h dos de ellos recibieron una dieta HF y los dos restantes una dieta control. Tras 48 h, un grupo control y otro HF se sometieron a un ayuno de 12 h, mientras que los otros tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua. Los animales se sacrificaron a las 06:00 h. Al igual que en el experimento anterior se realizó la monitorización del peso corporal y de la ingesta cada 24 h desde el inicio del tratamiento dietético hasta el momento del sacrificio (Figura 30).

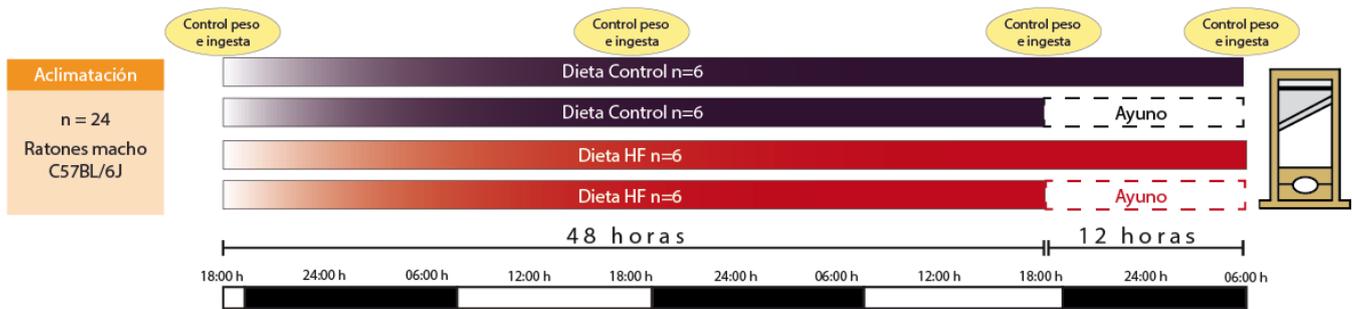


Figura 30. Esquema del modelo experimental 48 h con dieta HF y 12 h de ayuno.

3.1.3. Tratamiento dietético con dieta HF durante 8 semanas. Protocolo de sincronización forzada de la conducta alimentaria

Puesto que las dietas HF causan una alteración del ritmo circadiano de la conducta alimentaria nos propusimos caracterizar la influencia que podría tener sobre la expresión génica y el metabolismo un protocolo de restricción temporal de la ingesta en el que se obligara a los animales HF a consumir su comida de acuerdo con un patrón estándar, acoplando su ingesta a la de los animales con dieta control alimentados *ad libitum*. Estos animales se denominarán a partir de ahora “sincronizados”.

Se partió de dos grupos de ratones (n=50) de cinco semanas de edad, que fueron asignados a tratamiento dietético con una dieta control o una dieta HF. Tras 28 días *ad libitum*, durante los que se monitorizó periódicamente la ingesta nocturna (18:00 h – 09:00 h) y diurna (09:00 h – 18:00 h), cada grupo se dividió en dos subgrupos de 25 ratones. A uno de ellos se le siguió suministrando su misma dieta *ad libitum*, mientras que al otro se le sometió a un protocolo de sincronización forzada (sincronizado, ver esquema en Figura 31). Los animales de este grupo recibieron dos raciones diarias de comida (control o HF), a las 18:00 h y a las 09:00 h, que contenían la misma cantidad de calorías consumidas por sus correspondientes grupos pareados *ad libitum* durante la noche o el día anterior. De esta forma, se generaron 4 grupos experimentales, tal y como se esquematiza en la Figura 31. Tras 28 días en estas condiciones, procedimos a sacrificar 6-7 animales de cada grupo a las 06:00 h, 12:00 h, 18:00 h y 24:00 h.

Tabla 8. Grupos experimentales

Hora Sacrificio	Control <i>ad libitum</i>	Control Sincronizado	HF <i>ad libitum</i>	HF Sincronizado
06:00 h	n=7	n=6	n=6	n=6
12:00 h	n=6	n=7	n=6	n=6
18:00 h	n=6	n=6	n=7	n=6
24:00 h	n=6	n=6	n=6	n=7

n: número de animales por grupo.

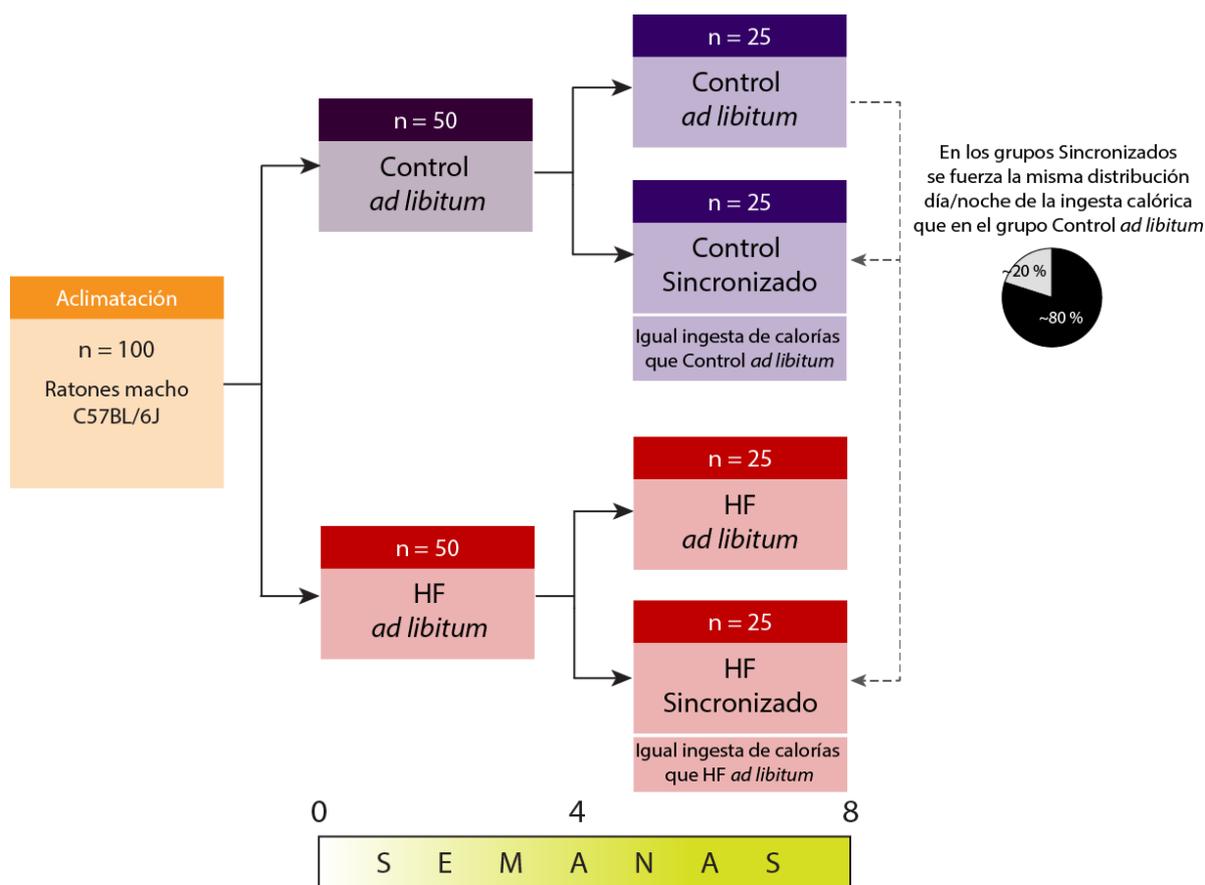


Figura 31. Representación del modelo experimental de sincronización forzada de la ingesta.

3.2. Determinación de la distribución de grasa corporal

Al finalizar el tratamiento dietético, se determinó la cantidad de los tejidos adiposos lumbar y subcutáneo para establecer el efecto del tratamiento dietético sobre la distribución de la grasa corporal.

El tejido adiposo subcutáneo se localiza bajo la piel adherido al músculo. Para caracterizar la cantidad de tejido adiposo subcutáneo se retiró la piel y con ayuda de unas tijeras se separó del paquete muscular. A continuación mediante una incisión en la cavidad abdominal se diseccionó el tejido adiposo lumbar. El tejido adiposo lumbar o tejido adiposo retroperitoneal, está situado alrededor de los riñones en la región delimitada por las vértebras L1 a L5. Con ayuda de unas tijeras se separó el tejido adiposo lumbar de los riñones y las glándulas suprarrenales. La cantidad de cada uno de los tejidos adiposos se

corrigió por el peso corporal del animal para evitar el posible efecto del tamaño de cada individuo.

3.3. Disección del cerebro para la obtención del hipotálamo

Para la cuantificación del ARNm hipotalámico se extrajo el cerebro y colocó en una pieza de metal fría apoyado sobre su parte ventral. Inmediatamente se realizó la disección del hipotálamo por el procedimiento descrito por Glowinski e Iversen (1966). Inicialmente se separó el rombencéfalo realizando un corte en la parte posterior al hipotálamo y anterior a los cuerpos mamilares (Sección A). Acto seguido, se delimitaron los laterales del hipotálamo mediante dos cortes sagitales (Secciones C y D). Después se realizó un corte en la zona hipotalámica anterior a la altura del quiasma óptico (Sección B). Por último se realizó un corte dorsal a la altura de la comisura anterior (Glowinski & Iversen 1966).

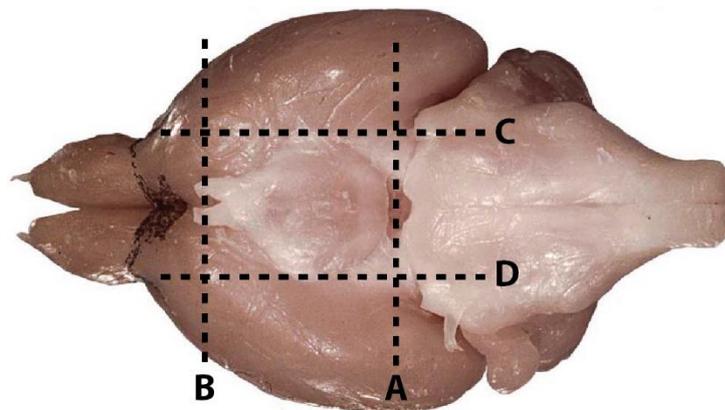


Figura 32. Esquema de la disección del hipotálamo.

3.3. Bioquímica plasmática

3.3.1. Obtención de plasma

El último día de tratamiento dietético, se determinó el peso de los animales y se sacrificaron por decapitación. La sangre se recogió en tubos de polipropileno tapizados con EDTA refrigerados (microvettes 3 mL, Sarsted). El plasma se obtuvo tras centrifugación a 4°C durante 20 min a 4000 r.p.m. (Centrifuge 5810, Eppendorf) y se conservó a -20°C en tubos Eppendorf hasta su utilización.

3.3.2. Determinaciones bioquímicas en plasma de insulina, leptina, IL-6 y TNF- α : Inmunoensayo múltiple en suspensión

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de leptina, insulina, IL-6 y TNF- α mediante un inmunoensayo múltiple en suspensión (MILLIPLEX MAP Kit Mouse Metabolic Magnetic Bead Panel; Millipore, EE.UU.). Este ensayo está basado en el uso de microesferas magnéticas con un diámetro aproximado de 5 μ m que se detectan individualmente tras la emisión de fluorescencia a una determinada longitud de onda tras su excitación, debido a la combinación en distinta proporción de dos fluoróforos rojo y naranja. En cada uno de los inmunoensayos que se realizan en un mismo pocillo, cada anticuerpo de captura se acopla a una microesfera específica. Cada una de las reacciones antígeno-anticuerpo tiene una emisión común de fluorescencia debida a la ficoeritrina y

proporcional a la concentración de cada uno de los parámetros analizados, que se separa en función de la fluorescencia específica emitida por cada una de las microesferas por un sistema similar a la citometría de flujo.

El protocolo que se llevó a cabo fue el proporcionado por la casa comercial. Se añadieron 200 μl del tampón de ensayo a cada pocillo y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de ensayo por decantación. Se añadieron 10 μl de matriz sérica a los pocillos de blancos, estándares y controles y a continuación 10 μl del tampón de ensayo a los pocillos de los blancos y las muestras. Inmediatamente, se añadieron 10 μl de cada estándar, control y muestra a su pocillo correspondiente, realizándose el ensayo por duplicado. Por último, se añadieron 25 μl de la mezcla de microesferas para leptina, insulina, IL-6 y TNF- α . La placa de ensayo se incubó en agitación durante 18-20 h a 4°C, eliminándose el contenido de los pocillos usando una placa imantada, para retener las microesferas magnéticas en la placa, y procediendo a lavar 3 veces con 200 μl de tampón. A continuación se añadieron a todos los pocillos 50 μl de disolución con anticuerpos monoclonales conjugados con biotina y se incubó en agitación 30 min a temperatura ambiente, para inmediatamente añadir otros 50 μl de estreptavidina-ficoeritrina, incubando 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces con 200 μl de tampón. Finalmente, y después de vaciar el contenido de los pocillos se añadieron 100 μl del tampón "Sheath fluid" (Millipore). La determinación se llevó a cabo en "Bio-Plex 200 System" y se analizaron los datos con "Bio-Plex Manager Software 4.1" (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). La fluorescencia emitida por la ficoeritrina, común para todos los analitos, se discriminó en función de la emitida por las microesferas conjugadas con los anticuerpos para leptina, insulina, IL-6 y TNF- α .

Los límites de sensibilidad y coeficientes de variación intra e interensayo se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Límites de sensibilidad y coeficientes de variación del inmunoensayo múltiple en suspensión.

	<i>Insulina</i>	<i>Leptina</i>	<i>IL-6</i>	<i>TNF-α</i>
Límite sensibilidad (pg/mL)	14	19	5	5
Coefficiente de variación intra-ensayo (%)	5	5	5	6
Coefficiente de variación inter-ensayo (%)	7	7	9	5

3.3.3. Determinaciones bioquímicas en plasma de glucosa, TG y NEFA

Según lo descrito en el capítulo anterior.

3.4. Análisis de ARN mensajero

Según lo descrito en el capítulo anterior.

Para la cuantificación relativa se utilizó el método de $\Delta\Delta C_T$, tomando el ARNm de *Pgk1* (fosfoglicerato quinasa 1) como control invariable en el hipotálamo y de *Rn18S* en el tejido adiposo. El análisis estadístico se realizó utilizando los valores de $\Delta\Delta C_T$.

La Tabla 10 muestra las sondas utilizadas en este capítulo.

Tabla 10. Sondas usadas para PCR cuantitativa

<i>Gen</i>	<i>Código</i>	<i>Nombre</i>
<i>Agrp</i>	Mm00475829_g1	Péptido relacionado con la proteína agoutí
<i>Bmal1</i>	Mm00500226_m1	<i>Brain and muscle Arnt-like protein-1</i>
<i>Clock</i>	Mm00455950_m1	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
<i>Fas</i>	Mm00662319_m1	Ácido graso sintasa
<i>G6pdx</i>	Mm00656735_g1	Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa
<i>Il-1β</i>	Mm01336189_m1	Interleuquina 1β
<i>Il-6</i>	Mm00446190_m1	Interleuquina 6
<i>Me1</i>	Mm00782380_s1	Enzima málico
<i>Npy</i>	Mm03048253_m1	Neuropéptido Y
<i>Per2</i>	Mm00478113_m1	<i>Period 2</i>
<i>Pgk1</i>	Mm00435617_m1	Fosfoglicerato quinasa 1
<i>Pomc</i>	Mm00435874_m1	Proopiomelanocortina
<i>Rn18s</i>	Mm03928990_g1	ARN ribosómico 18S

3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa StatView 5.0 (SAS Institute Inc., EE.UU.) y para la realización de las gráficas el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE.UU.).

Todos los datos de expresión de ARNm se normalizaron con respecto a los valores del grupo control 06:00 h de cada ensayo y se muestran como el valor de la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de la $p < 0,05$.

El análisis del incremento de peso semanal y de la ingesta, fue analizado con un ANOVA de medidas repetidas seguido por test *post-hoc* de Newman-Keuls. Se utilizó el análisis de t de Student de dos colas para los estudios comparativos entre dos grupos.

Se realizó el test estadístico ANOVA de dos vías (ANOVA-2) para comparar el efecto de la hora del día, de la dieta y si existía interacción entre ambos. A continuación, para determinar la existencia de variaciones circadianas dentro de cada tratamiento dietético se realizó el ANOVA de una vía (ANOVA-1). La significancia estadística se confirmó mediante análisis *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para el análisis del efecto del ayuno se llevó a cabo un ANOVA-2 para conocer cuál de los parámetros tenía efecto (ayuno y dieta) y si existía interacción entre ellos. La significancia estadística se confirmó mediante análisis *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para el análisis de la sincronización forzada de la ingesta con una dieta rica en grasa se llevó a cabo un ANOVA-2 para conocer si existía efecto del tratamiento dietético independientemente de la sincronización (control *ad libitum* y HF *ad libitum*), hora del día (06:00 h, 12:00 h, 18:00 h y 24:00 h) y la interacción entre ellos. A continuación, se realizó test *post-hoc* de Newman-Keuls. Posteriormente, se procedió a llevar a cabo el ANOVA-2, considerando como variables la sincronización y la hora del día, para cada tipo de dieta por separado. Posteriormente, se realizó test *post-hoc* de Newman-Keuls.

4. Resultados

4.1. Efecto del tratamiento con una dieta HF durante 48 h

4.1.1. Evolución del peso corporal, tejidos adiposos e hígado tras 48 h de dieta HF

Como se observa en la Figura 33A y B, el tratamiento con la dieta HF (46,1% energía procede de la grasa) causó una ganancia de peso mayor que la dieta control, que fue estadísticamente significativa tras 24 h de tratamiento, independientemente de la hora a la que éste comenzó (ANOVA de medidas repetidas, 06:00 h: $F_{(1,46)}=10,761$; $p<0,01$; 12:00 h: $F_{(1,46)}=18,123$; $p<0,001$; 18:00 h: $F_{(1,40)}=23,994$; $p<0,001$ y 24:00 h: $F_{(1,40)}=19,717$; $p<0,001$).

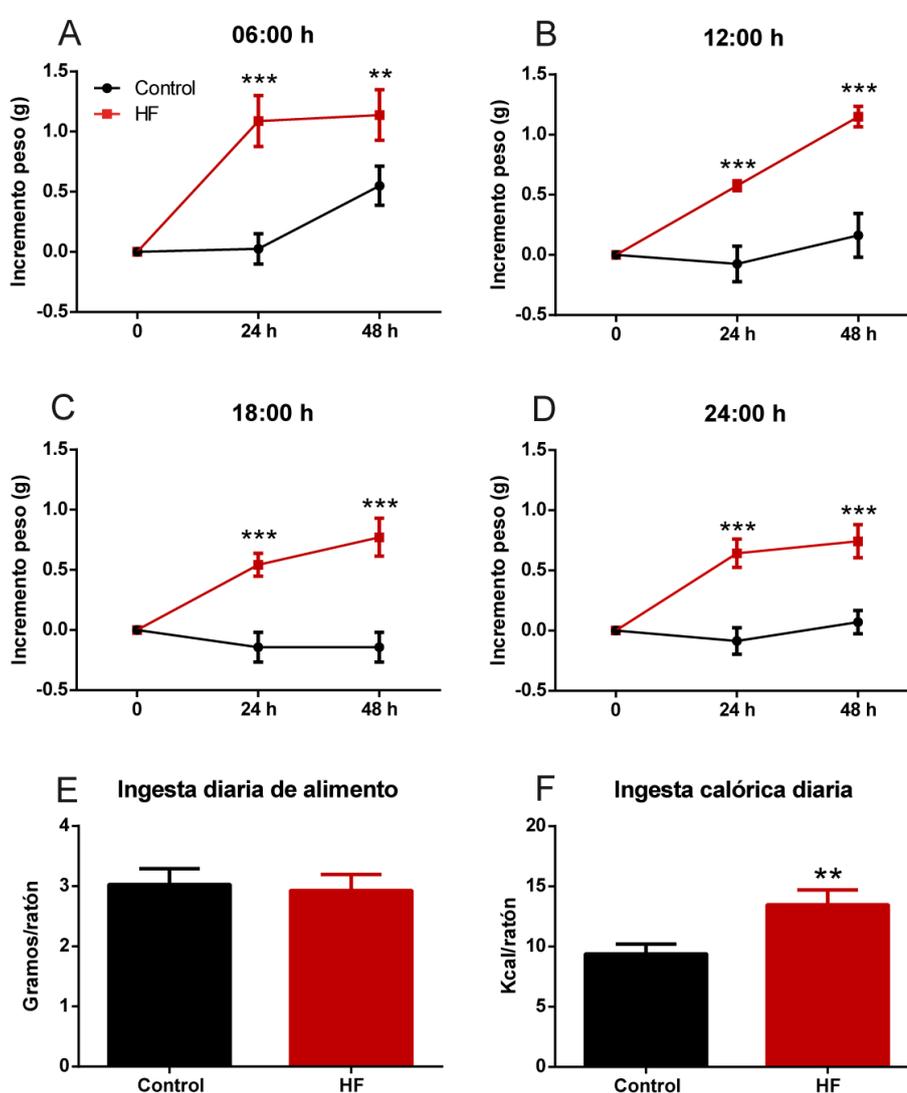


Figura 33. Incremento del peso corporal tras 48 horas de dieta HF (A, B, C y D). Los valores son las medias \pm E.E.M. de 7-8 animales. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■). **Ingesta diaria de alimento e ingesta calórica diaria (E y F).** Los valores son las medias \pm E.E.M. de 30 animales. ** $p<0,01$ (T de Student).

La ingesta diaria de estos animales aparece reflejada en la Figura 33E y F. Los datos que aparecen reflejados en las gráficas corresponden a valores medios de ingesta, expresados en g/ratón/día y en kcal/ratón/día, ya que los animales estuvieron estabulados en grupos de 6-7 individuos. En términos ponderales, la ingesta diaria (expresada en gramos) fue similar entre los grupos control y HF (Control=3,03±0,13 g/ratón/día *vs.* HF=2,93±0,14 g/ratón/día), mientras que la ingesta calórica diaria fue superior en los animales del grupo HF (Control=9,39±0,41 kcal/ratón/día *vs.* HF=13,47±0,61 kcal/ratón/día; $p < 0,01$), debido al mayor aporte calórico de esta dieta.

Para determinar si el aumento del peso corporal observado en los ratones alimentados con una dieta HF se correspondía con un incremento de los depósitos adiposos, se determinó la cantidad de tejido adiposo lumbar (TAL) y subcutáneo (TAS). Los datos aparecen resumidos en la Figura 34 en valores absolutos y relativos al peso corporal (peso tejido (g)/peso corporal (g) X 100).

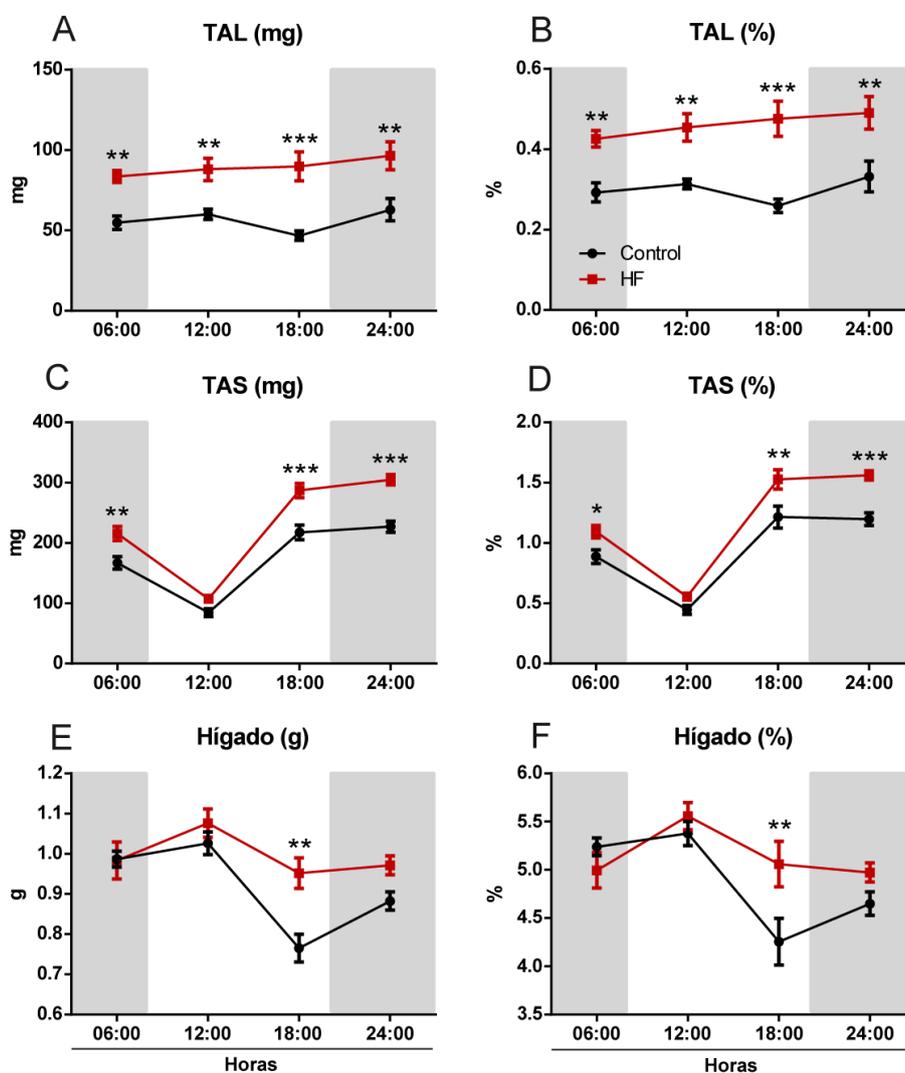


Figura 34. Evolución del peso absoluto y relativo del TAS, TAL e hígado. Los valores son las medias ± E.E.M. de 7-8 animales. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

Con independencia de la hora del día estudiada, el tratamiento dietético indujo un incremento del peso del TAL (ANOVA-2, $F_{(1,52)}=61,60$; $p<0,001$; Figura 34A), respecto a los ratones control. En el peso del TAS, se observó un efecto de la hora del día ($F_{(3,52)}=130,6$; $p<0,001$) y de la dieta ($F_{(1,52)}=63,98$; $p<0,001$), con una interacción significativa entre ambas variables ($F_{(3,52)}=3,251$; $p<0,05$; Figura 34C). En el caso del hígado (Figura 34E), se observó un efecto de la hora del día ($F_{(3,52)}=12,75$; $p<0,001$), de la dieta ($F_{(1,52)}=12,21$; $p<0,001$), así como una interacción entre ambos factores ($F_{(3,52)}=2,995$; $p<0,05$). Además, se observó la existencia de un ritmo en la variación del peso del hígado en los animales del grupo control (ANOVA-1, $F_{(3,26)}=18,85$; $p<0,001$), que desaparecía en los animales del grupo HF. Estos resultados demuestran que 48 h de dieta HF son suficientes para producir un incremento de la adiposidad y del peso corporal.

4.1.2. Determinación de los parámetros plasmáticos

Los valores plasmáticos de glucosa no sufrieron variaciones a lo largo del día, pero sí se observó una interacción significativa entre la hora del día y el tratamiento (ANOVA-2, $F_{(3,51)}=3,238$; $p<0,05$). Los animales con dieta HF mostraron niveles más elevados a las 06:00 h (Figura 35A). La variación circadiana fue menos significativa en los animales HF (ANOVA-1, $F_{(3,26)}=4,111$; $p<0,05$) que en los animales control (ANOVA-1, $F_{(3,24)}=15,50$; $p<0,001$), es decir, la dieta HF atenuó el ritmo en los niveles de TG (Figura 35B).

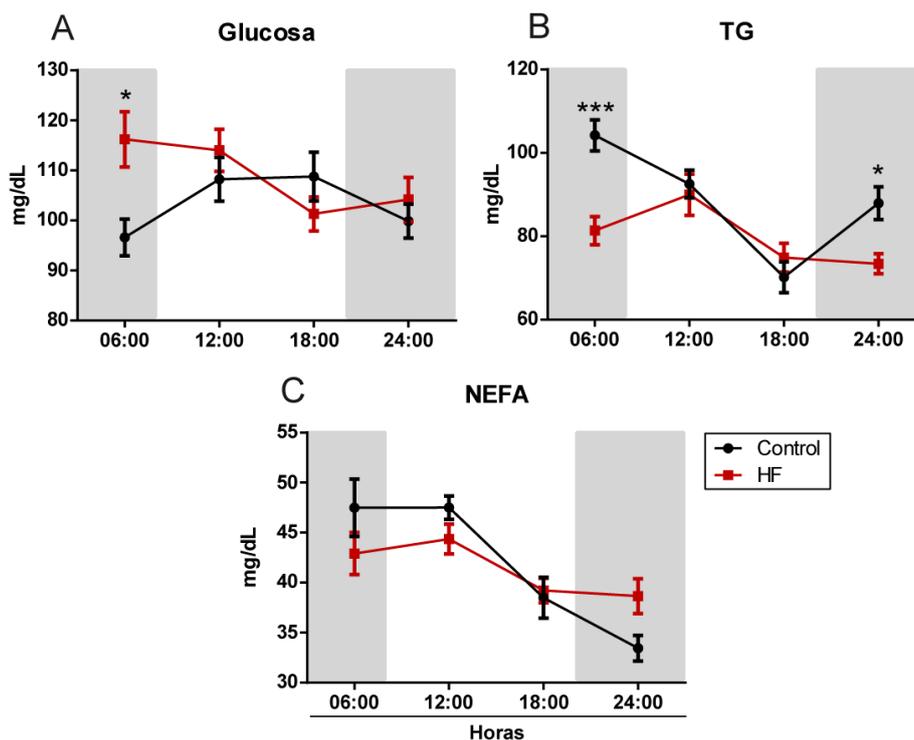


Figura 35. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C). Cada resultado representa la media \pm E.E.M. ($n=7-8$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

Los niveles plasmáticos de los NEFA se vieron afectados por la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,52)}=13,37$; $p<0,001$) pero no por la dieta (Figura 35C), de forma que, al igual que en

el caso de los TG, la variación circadiana en el grupo control (ANOVA-1, $F_{(3,26)}=11,88$; $p<0,001$) no se observó en el grupo HF.

Como se ilustra en la Figura 36A, los niveles plasmáticos de insulina se mantuvieron más elevados en los animales HF (ANOVA-2, $F_{(1,50)}=15,15$; $p<0,001$) que en los animales del grupo control. También se observó una variación de los valores a lo largo del día en los dos grupos (ANOVA-2, $F_{(3,50)}=7,611$; $p<0,001$), independientemente del tratamiento.

Los niveles de leptina fueron mayores en el grupo HF ($F_{(1,51)}=12,84$; $p<0,001$), de forma dependiente de la hora del día ($F_{(3,51)}=5,666$; $p<0,01$). Asimismo, se observó la existencia de un ritmo en los valores plasmáticos de leptina en los animales del grupo control (ANOVA-1, $F_{(3,25)}=9,449$; $p<0,001$) que desapareció en los animales alimentados con dieta HF (Figura 36B).

En el caso de las IL-6, se observó un efecto de la hora del día en los niveles circulantes (ANOVA-2, $F_{(3,49)}=9,662$; $p<0,001$; Figura 36C), pero el perfil circadiano fue similar en los dos grupos. Los niveles de TNF- α no se vieron afectados por la hora del día ni por la dieta (Figura 36D). Este resultado sugiere que no existen cambios en los marcadores plasmáticos de inflamación en 48 h de dieta HF.

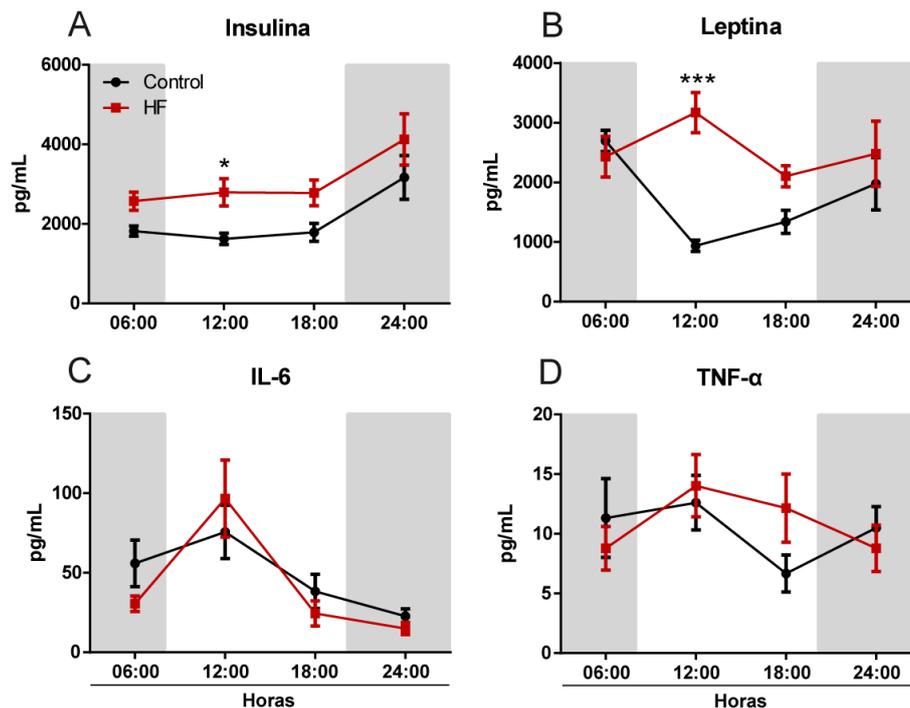


Figura 36. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF- α (D). Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6-8). * $p<0,05$; *** $p<0,001$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

4.1.3. Efecto de 48 h de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en hipotálamo

Se evaluó el efecto de 48 h de dieta HF, sobre la expresión de los genes *clock: Bmal1*, *Clock* y *Per2*. En el caso de *Bmal1* (Figura 37A), el ANOVA-2 reveló un efecto de la hora del día ($F_{(3,39)}=13,18$; $p<0,001$), con una interacción significativa entre la hora del día y el

tratamiento dietético ($F_{(3,39)}=2,928$; $p<0,05$). Además, en el grupo HF la variación circadiana fue menos pronunciada que en el grupo control. Respecto de la expresión de *Clock* (Figura 37B), el ANOVA-2 mostró efectos significativos de la dieta ($F_{(1,39)}=7,901$; $p<0,01$) y de la hora del día ($F_{(3,39)}=4,266$; $p<0,05$), sin interacción entre ambas variables. En el caso de *Per2* (Figura 37C), los niveles de expresión se encontraron afectados únicamente por la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,38)}=8,622$; $p<0,001$). A modo de resumen, cabe resaltar que todos los genes *clock* varían con el tiempo, aunque sólo *Clock* y *Bmal1* fueron sensibles al tratamiento con dieta HF. Además, se observó que la expresión de *Bmal1* y *Per2* era antifásica.

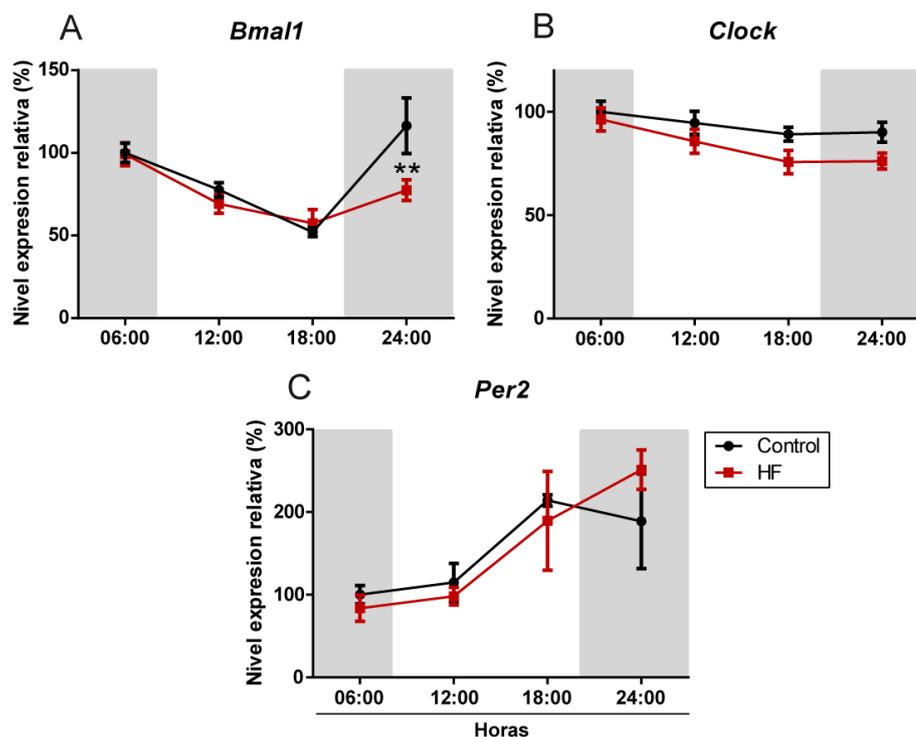


Figura 37. Niveles de expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). **p<0,01 grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

Se valoró el efecto de la dieta sobre la expresión de genes implicados en la regulación de la ingesta *Agrp*, *Npy* y *Pomc* (Figura 38). El efecto de la dieta fue significativo en el caso de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos *Agrp* (ANOVA-2, $F_{(1,39)}=19,66$; $p<0,001$) y *Npy* ($F_{(1,39)}=8,542$; $p<0,01$), de forma que la variación circadiana fue abolida por la dieta HF en los dos casos (*Agrp*: $F_{(3,39)}=6,677$; $p<0,001$; *Npy*: $F_{(3,39)}=4,597$; $p<0,01$). En el caso del neuropéptido anorexigénico *Pomc* (Figura 38C), los niveles de expresión se vieron afectados únicamente por la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,37)}=8,778$; $p<0,001$).

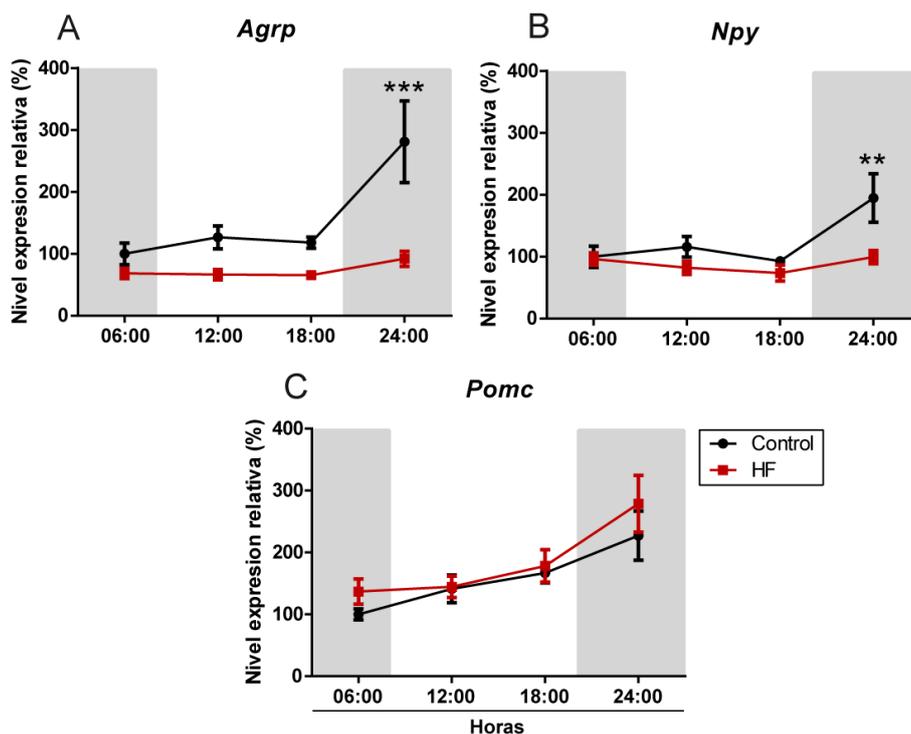


Figura 38. Niveles de expresión de ARNm de *Agrp* (A), *Npy* (B) y *Pomc* (C). Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). **p<0,01; ***p<0,001 grupo control respecto al grupo HF pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

Con el fin de determinar si 48 h de dieta HF alteraban la expresión de los genes relacionados con la respuesta inflamatoria en el hipotálamo, se midieron los niveles de mensajero de las citoquinas *Il-1 β* e *Il-6* (Figura 39). En ambos casos, el ANOVA-2 reveló un efecto significativo del tratamiento (*Il-1 β* , $F_{(3,37)}=3,179$; $p<0,05$; *Il-6*, $F_{(3,38)}=6,295$; $p<0,01$). En los animales con dieta control se observó la existencia de una variación circadiana (*Il-1 β* , $F_{(3,19)}=3,612$; $p<0,05$; *Il-6*, $F_{(3,19)}=10,59$; $p<0,001$) que no se detectó en el grupo HF.

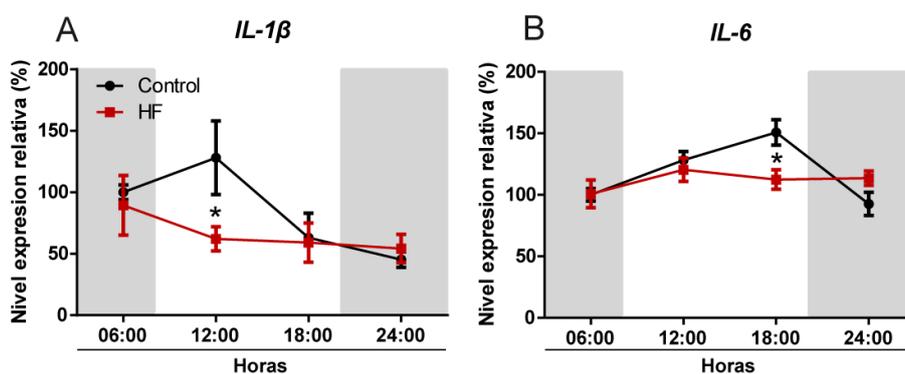


Figura 39. Niveles de expresión de ARNm de *Il-1 β* (A) e *Il-6* (B) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). *p<0,05 grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

Finalmente se determinó la expresión de genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, por considerar que una dieta rica en triglicéridos podría alterar la biosíntesis de ácidos grasos. Los genes analizados fueron los correspondientes a la sintasa de ácidos

grasos (*Fas*), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6pdx*) y el enzima málico citosólico (*Me1*). Estos dos últimos son responsables de la síntesis de NADPH, un factor reductor necesario para la síntesis de los ácidos grasos, pero también para mantener el equilibrio redox celular, necesario para procesos como, por ejemplo, la regeneración del glutatión reducido o para la actividad de la NADPH oxidasa.

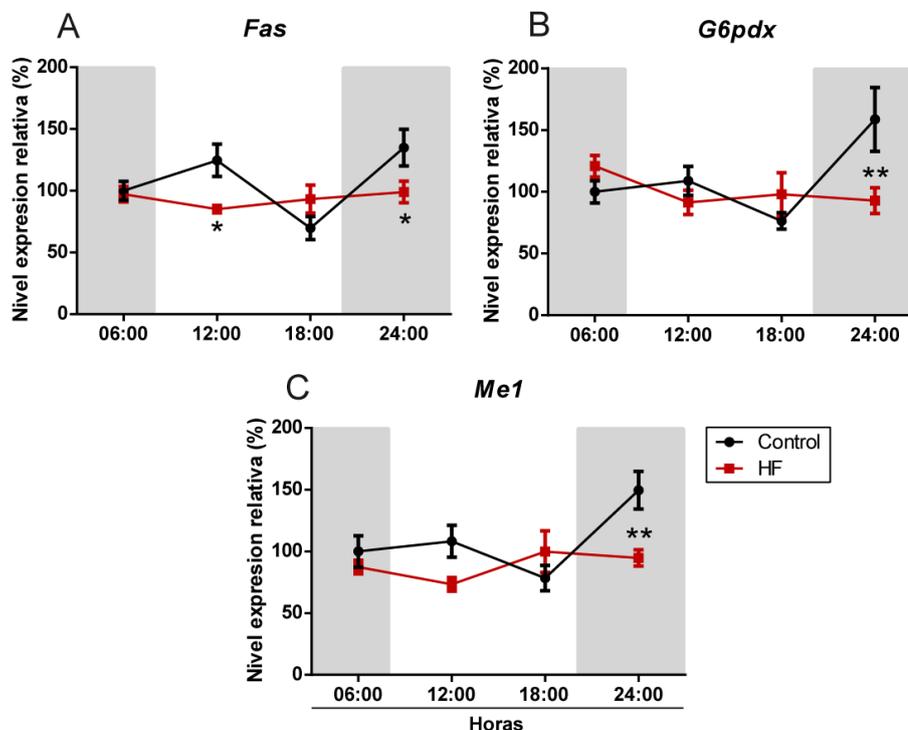


Figura 40. Niveles de expresión de ARNm de *Fas* (A), *G6pdx* (B) y *Me1* (C) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). *p<0,05; **p<0,01 grupo control respecto al grupo HF a cada tiempo (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

En el caso de la *Fas* (Figura 40A) el ANOVA-2 no detectó efecto significativo del tratamiento dietético, aunque sí de la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,38)}=4,547$; $p<0,01$), que mostró una interacción significativa con la dieta (ANOVA-2, $F_{(3,38)}=4,566$; $p<0,01$). Respecto a la expresión de la *G6pdx* (Figura 40B), se observó que el efecto de la dieta era dependiente de la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,39)}=4,596$; $p<0,01$). Asimismo, la expresión de *Me1* fue dependiente de la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,39)}=3,903$; $p<0,05$) y de la dieta (ANOVA-2, $F_{(1,39)}=6,474$; $p<0,05$), con una interacción significativa entre ambas (ANOVA-2, $F_{(3,39)}=4,128$; $p<0,05$; Figura 40C). El resultado más llamativo fue que la dieta HF provocó la pérdida del ritmo circadiano de estos tres genes (ANOVA-1, *Fas*: $F_{(3,19)}=6,536$; $p<0,01$; *G6pdx*: $F_{(3,20)}=5,132$; $p<0,01$; *Me1*: $F_{(3,20)}=5,329$; $p<0,01$).

4.1.4. Efecto de 48 h de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en el TAS

En el caso de los genes *clock*, el tratamiento con la dieta HF no modificó cualitativamente, aunque si atenuó la variación circadiana de su expresión (Figura 41). En el caso de *Bmal1*, el ANOVA-2 mostró un efecto significativo de la hora del día ($F_{(3,38)}=34,63$; $p<0,001$), así como una interacción entre la hora del día y el tratamiento ($F_{(3,38)}=4,050$; $p<0,05$), similar a lo que ocurrió con *Per2* ($F_{(3,38)}=26,64$; $p<0,001$;

$F_{(1,38)}=12,07$; $p<0,01$; $F_{(3,38)}=3,538$; $p<0,05$, respectivamente). En el caso de *Clock*, sólo se observó un efecto de la hora del día ($F_{(3,38)}=4,095$; $p<0,05$).

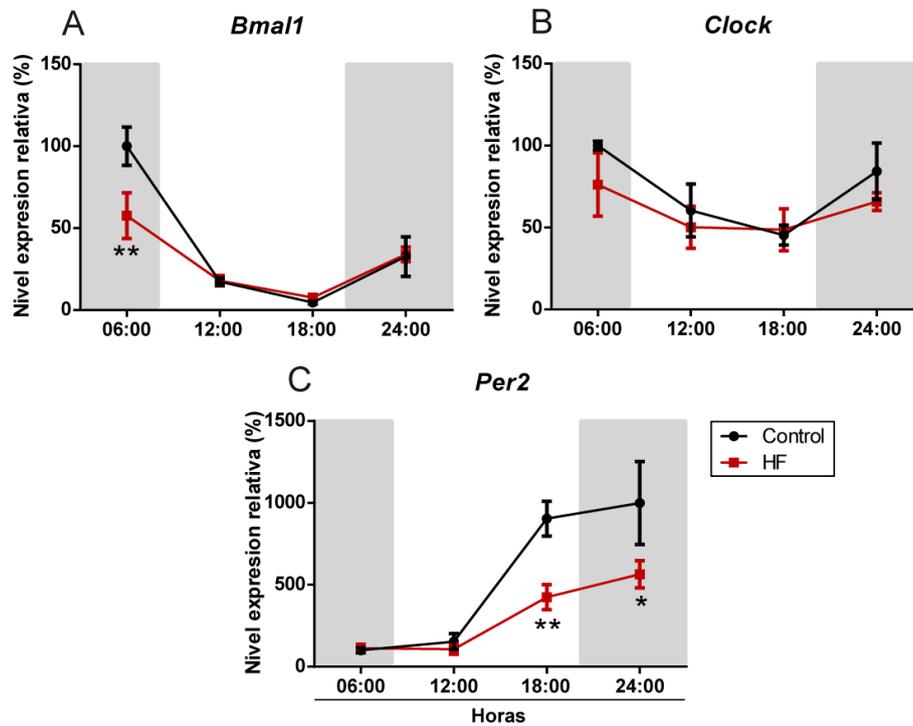


Figura 41. Niveles de expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en TAS. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

En cuanto a la expresión de la *Fas* y de genes implicados en la síntesis de NADPH (Figura 42), el ANOVA-2 mostró que la dieta HF reducía los niveles de expresión de la *Fas* ($F_{(1,38)}=41,27$; $p<0,001$), la *G6pdx* ($F_{(1,36)}=12,82$; $p<0,01$) y el *Me1* ($F_{(1,38)}=32,89$; $p<0,001$) independientemente de la hora del día.

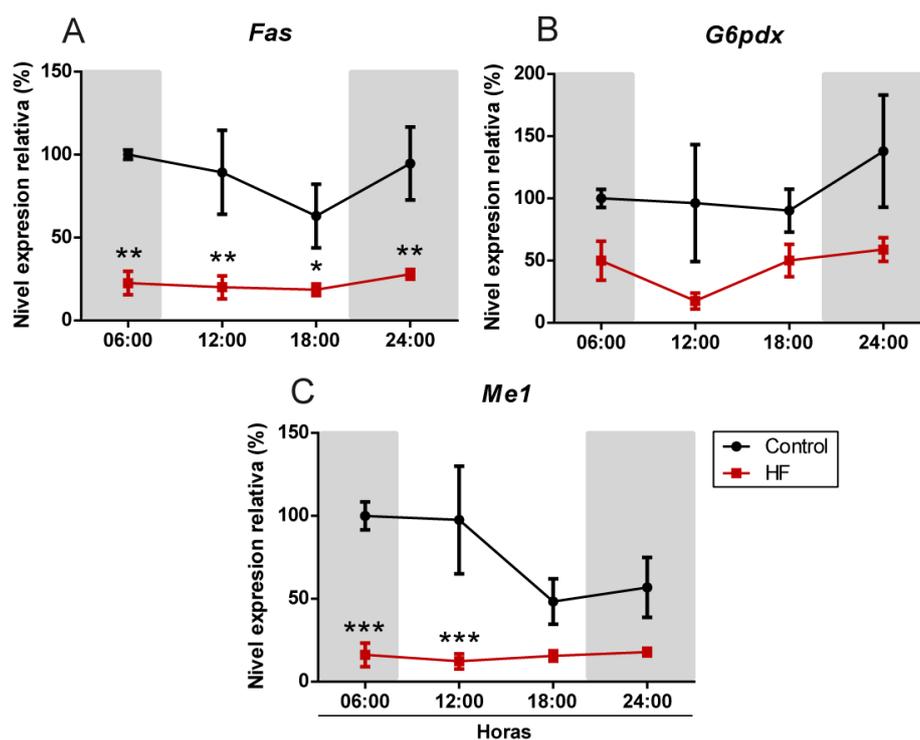


Figura 42. Niveles de expresión de ARNm de Fas (A), G6pdx (B) y Me1 (C) en TAS. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=5-6). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ grupo HF respecto al grupo control pareado (Test de Newman-Keuls). Control (●), HF (■).

4.2. Efecto del ayuno sobre la expresión de genes tras 48 h de dieta HF y 12 h de ayuno

4.2.1. Evolución del peso corporal, tejidos adiposos e hígado tras 48 h de dieta HF y 12 h de ayuno

Tal como se muestra en la Figura 43A, los animales tratados con dieta HF presentaron un peso corporal significativamente superior que sus controles (ANOVA de medidas repetidas, $F_{(3,92)}=11,195$; $p < 0,001$). Además, el ayuno causó una disminución del peso corporal mayor en los animales del grupo control (Figura 43B; $p < 0,001$).

De la misma manera que en el experimento anterior, los animales estuvieron estabulados en grupos de seis individuos, por lo que los datos representados en las gráficas corresponden a valores medios de ingesta (Figura 43C y D). La ingesta calórica diaria fue superior en los animales del grupo HF (Control= $10,89 \pm 0,14$ kcal/ratón/día *vs.* HF= $14,47 \pm 0,48$ kcal/ratón/día; $p < 0,05$).

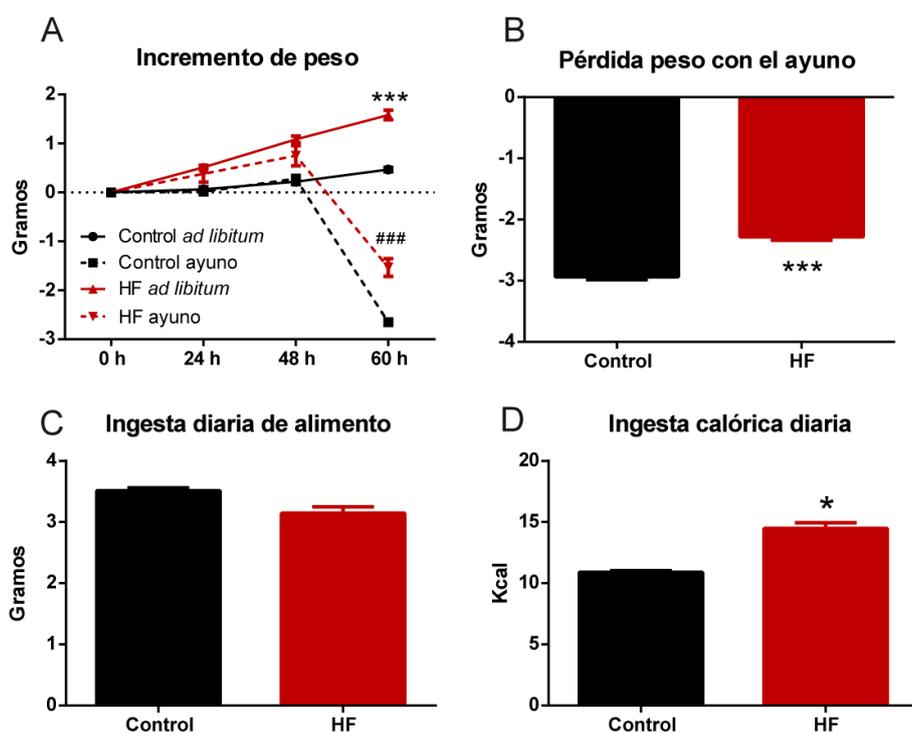


Figura 43. Incremento de peso (A). Los valores son las medias \pm E.E.M. de 6 animales. *** $p < 0,001$ respecto del grupo control *ad libitum*. ### $p < 0,001$ HF ayunado respecto de HF *ad libitum*. **Pérdida de peso con el ayuno (B).** Los animales del grupo control pierden más peso que los HF. *** $p < 0,001$ (t-test). **Ingesta diaria de alimento (C).** **Ingesta calórica diaria (D).** * $p < 0,05$ (t-test). Control (●), Control-ayuno (■), HF (▲) y HF-ayuno (▼).

Se determinó la cantidad de los tejidos adiposos (lumbar y subcutáneo) y del hígado. En el caso del TAL, el ANOVA-2 reveló efectos significativos de la dieta ($F_{(1,20)}=32,85$; $p < 0,001$) y del ayuno ($F_{(1,20)}=26,21$; $p < 0,001$), sin interacción entre ambas variables. El mismo perfil se observó en el caso del TAS (dieta: $F_{(1,20)}=16,13$; $p < 0,001$ y ayuno: $F_{(1,20)}=31,87$; $p < 0,001$). El peso del hígado disminuyó por el ayuno ($F_{(1,20)}=62,48$; $p < 0,001$), independientemente del tratamiento dietético.

Tabla 11. Peso de tejidos adiposos e hígado

	<i>Control ad libitum</i>	<i>Control ayuno</i>	<i>HF ad libitum</i>	<i>HF ayuno</i>
TAL (mg)	58,67 \pm 5,87	36,50 \pm 4,01 [#]	101,5 \pm 6,49***	62,33 \pm 7,13###
TAS (mg)	229,83 \pm 17,87	131,33 \pm 9,79 [#]	308,34 \pm 19,63**	200,00 \pm 23,28 [#]
Hígado (g)	1,25 \pm 0,07	0,80 \pm 0,03 ^{###}	1,12 \pm 0,03	0,82 \pm 0,05 ^{###}
TAL (%)	0,29 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	0,47 \pm 0,03**	0,33 \pm 0,04 [#]
TAS (%)	1,10 \pm 0,08	0,76 \pm 0,05 [#]	1,43 \pm 0,10*	1,08 \pm 0,14 [#]
Hígado (%)	6,09 \pm 0,36	4,67 \pm 0,21 [#]	5,18 \pm 0,14*	4,41 \pm 0,23

Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). El peso relativo (%) es la relación entre el peso del tejido (g) y el peso corporal (g) X 100. * $p < 0,05$ control *ad libitum* respecto a HF *ad libitum*. [#] $p < 0,05$ grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

4.2.2. Determinación de los parámetros plasmáticos

Se determinaron los valores de glucosa, TG y NEFA (Figura 44). En los tres casos, se detectó efecto del ayuno (ANOVA-2, glucosa: $F_{(1,20)}=173,1$; $p<0,001$; TG: $F_{(1,20)}=17,82$; $p<0,001$ y NEFA $F_{(1,20)}=43,56$; $p<0,001$), y solamente en el caso de la glucosa se observó un efecto de la dieta ($F_{(1,20)}=31,26$; $p<0,001$).

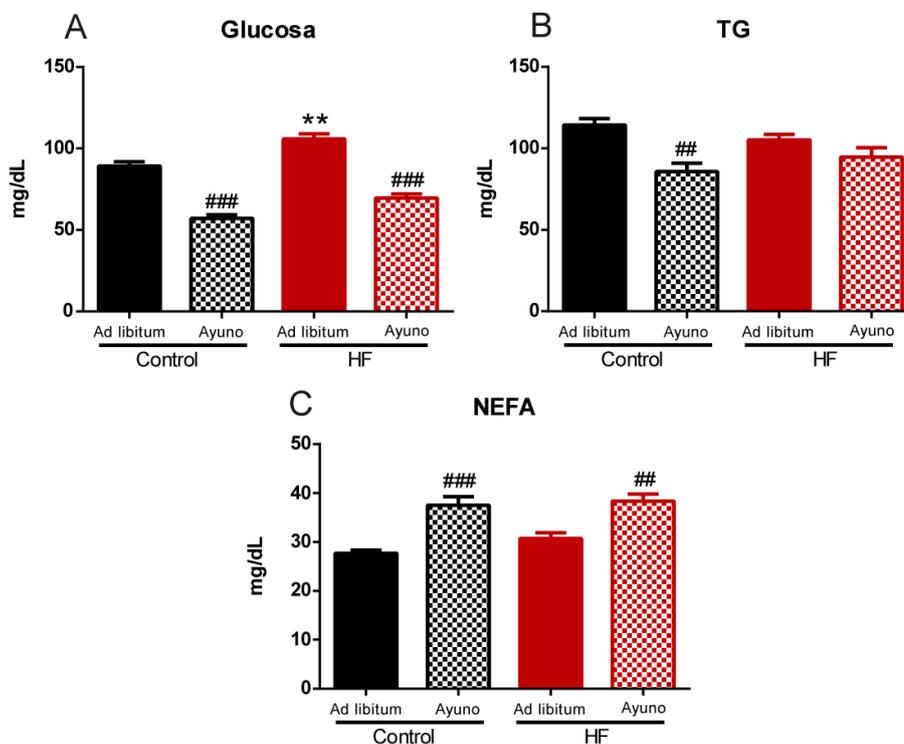


Figura 44. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C). Cada resultado representa la media \pm E.E.M. ($n=6$). ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ respecto al grupo control *ad libitum*. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

La dieta HF incrementó los niveles de insulina (ANOVA-2, $F_{(3,18)}=24,01$; $p<0,05$), sin efecto sobre la leptina. El ayuno redujo drásticamente los niveles plasmáticos de insulina (ANOVA-2, $F_{(1,18)}=65,98$; $p<0,001$) y leptina (ANOVA-2, $F_{(1,20)}=109,2$; $p<0,001$; Figura 45A y B). En el caso de las interleuquinas no se observaron efectos significativos de la dieta, el ayuno o la interacción entre ambos factores (Figura 45C y D).

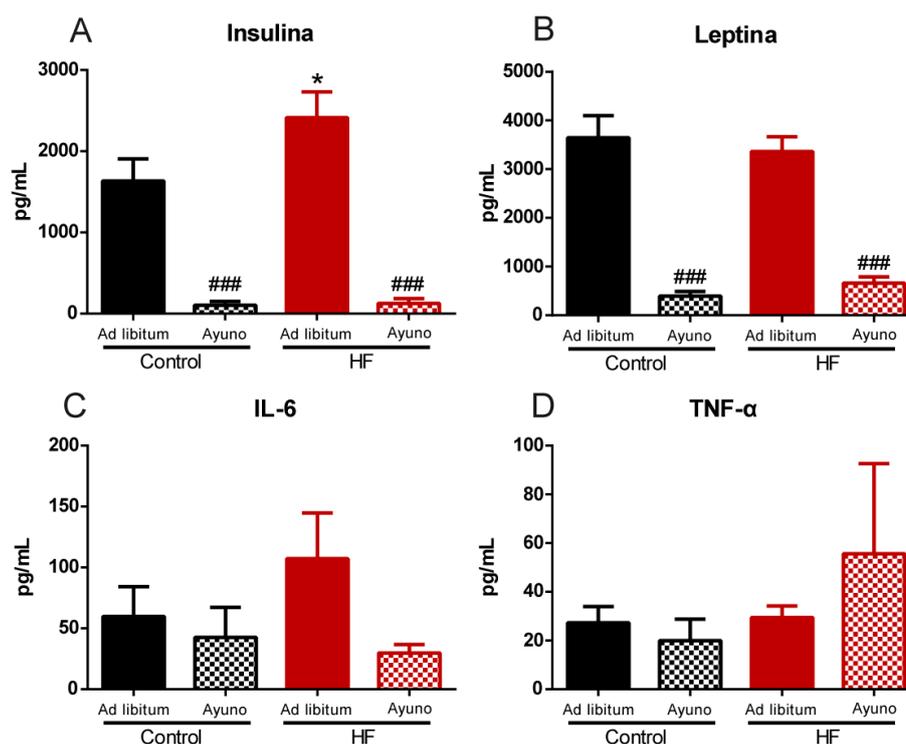


Figura 45. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF-α (D). Cada resultado representa la media ± E.E.M. (n=5-6). *p<0,05; ***p<0,001, respecto al grupo control *ad libitum*; ###p<0,001 grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

4.2.3. Efecto del ayuno después de 48 h de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en hipotálamo

Tal y como se ilustra en la Figura 46, el ANOVA-2 reveló un efecto de la dieta y del ayuno en la expresión hipotalámica de *Bmal1* (dieta: $F_{(1,20)}=12,91$; $p<0,01$ y ayuno: $F_{(1,20)}=4,604$; $p<0,05$) y *Clock* (dieta: $F_{(1,20)}=38,69$; $p<0,001$ y ayuno: $F_{(1,20)}=11,23$; $p<0,01$), aunque la interacción entre ambas variables solo fue significativa en el caso de *Bmal1* ($F_{(1,20)}=4,491$; $p<0,05$). Por último, la expresión de *Per2* no se vio modificada por nuestras condiciones experimentales.

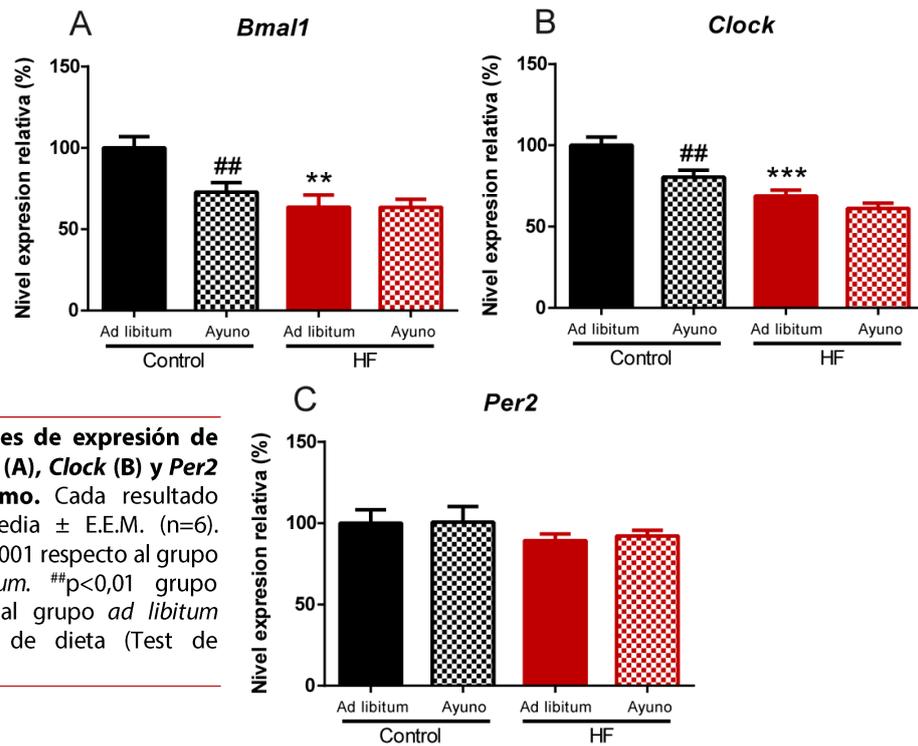


Figura 46. Niveles de expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). **p<0,01; ***p<0,001 respecto al grupo control *ad libitum*. ##p<0,01 grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

Con relación a la expresión *Agrp* y *Npy* (Figura 47A y B), el ANOVA-2 mostró un efecto de la dieta (*Agrp*: $F_{(1,20)}=56,45$; $p<0,001$; *Npy* $F_{(1,20)}=30,02$; $p<0,001$) y del ayuno (*Agrp*: $F_{(1,20)}=7,498$; $p<0,05$ y *Npy*: $F_{(1,20)}=6,962$; $p<0,05$) en ambos casos. Respecto a la expresión de *Pomc* (Figura 47C), se observó un efecto de la dieta ($F_{(1,19)}=24,28$; $p<0,001$), con una interacción entre la dieta y el ayuno ($F_{(1,19)}=12,71$; $p<0,01$).

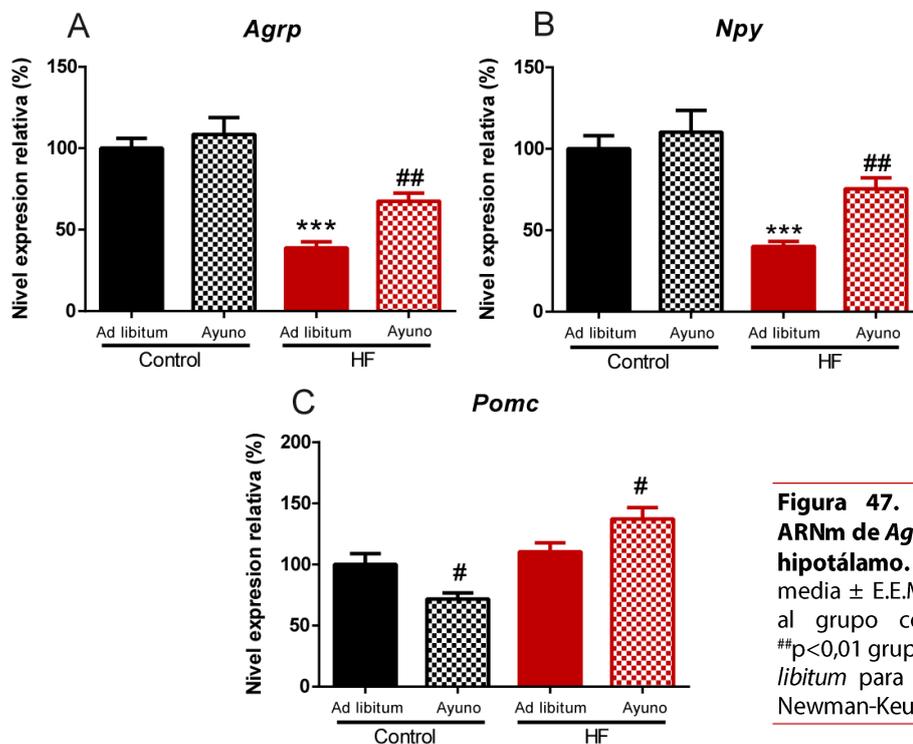


Figura 47. Niveles de expresión de ARNm de *Agrp* (A), *Npy* (B) y *Pomc* (C) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). ***p<0,001 respecto al grupo control *ad libitum*. #p<0,05; ##p<0,01 grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

Se observó un efecto de la dieta en la expresión del ARNm de las citoquinas *IL-1 β* (ANOVA-2, $F_{(1,20)}=4,547$; $p<0,05$) e *IL-6* (ANOVA-2, $F_{(1,20)}=11,38$; $p<0,01$). También, se detectó una interacción dieta x ayuno significativa en la expresión de ARNm de *IL-6* (ANOVA-2, $F_{(1,20)}=6,238$; $p<0,05$; Figura 48).

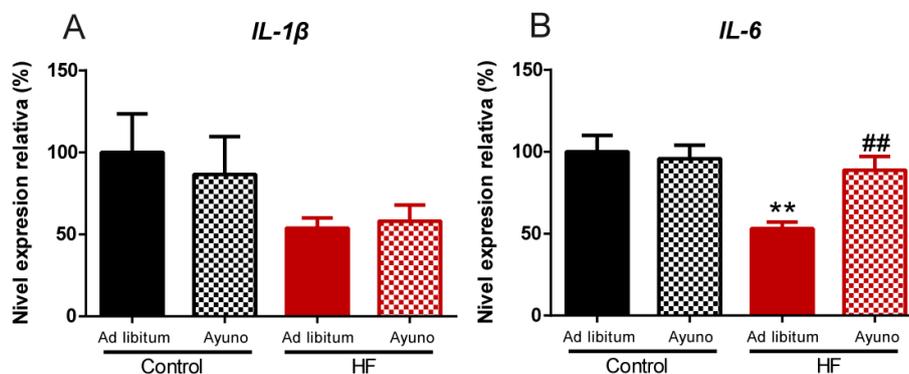


Figura 48. Niveles de expresión de ARNm de *IL-1 β* (A) e *IL-6* (B) en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). ** $p<0,01$ respecto al grupo control *ad libitum*. ## $p<0,01$ grupo HF ayuno respecto al grupo HF *ad libitum* (Test de Newman-Keuls).

Al medir los niveles de expresión de ARNm de la *Fas*, hubo un efecto de la dieta ($F_{(1,20)}=15,45$; $p<0,001$) y del ayuno ($F_{(1,20)}=28,58$; $p<0,001$), con una interacción entre ambos ($F_{(1,20)}=6,42$; $p<0,05$). Los niveles de expresión de la *G6pdx* se encontraron afectados por la dieta ($F_{(1,20)}=5,791$; $p<0,05$). También, observamos un efecto de la dieta ($F_{(1,20)}=13,69$; $p<0,01$) y del ayuno ($F_{(1,20)}=16,73$; $p<0,001$) en los niveles del *Me1*, sin existir interacción entre ambos factores (Figura 49).

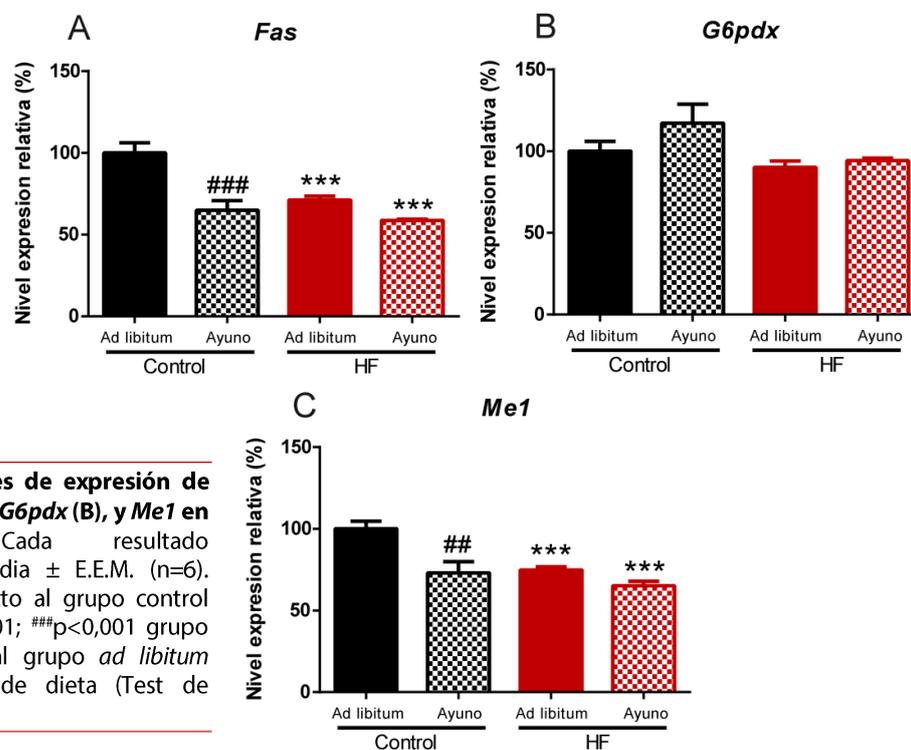


Figura 49. Niveles de expresión de ARNm de *Fas* (A), *G6pdx* (B), y *Me1* en hipotálamo. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). *** $p<0,001$ respecto al grupo control *ad libitum*. ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

4.2.4. Efecto del ayuno después de 48 h de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en TAS

Se analizó la expresión de genes *clock* y genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En la Figura 50 se ilustra la influencia de la dieta HF y del ayuno en la expresión de los genes *clock*. En el caso de *Bmal1*, sus niveles se vieron afectados por la dieta (ANOVA-2; $F_{(1,19)}=6,895$; $p<0,05$), mientras que la expresión de *Clock* se mantuvo invariable. En el caso de *Per2*, su expresión se vio incrementada por el ayuno (ANOVA-2; $F_{(1,20)}=30,67$; $p<0,001$).

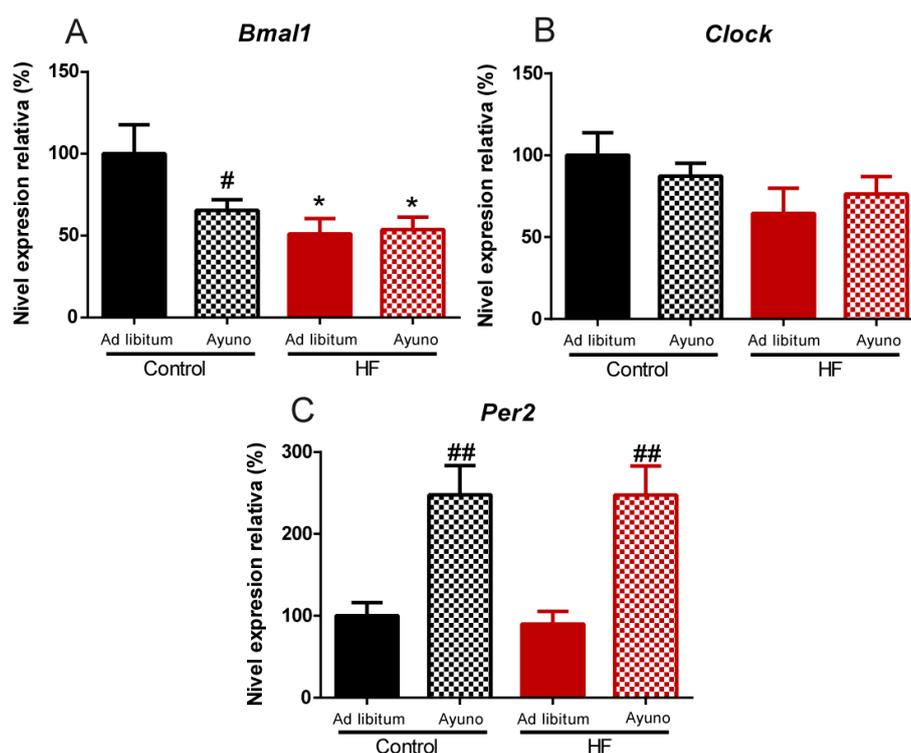


Figura 50. Niveles de expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en TAS. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. ($n=6$). * $p<0,05$ respecto al grupo control *ad libitum*. # $p<0,05$; ## $p<0,01$ grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

En la Figura 50 se ilustra la influencia de la dieta HF y del ayuno en la expresión de la *Fas*, la *G6pdx* y el *Me1*. El efecto de la dieta y del ayuno fue similar en los tres casos. El ANOVA-2 reveló un efecto de la dieta (*Fas*: $F_{(1,20)}=63,35$; $p<0,001$; *G6pdx*: $F_{(1,20)}=27,42$; $p<0,001$ y *Me1*: $F_{(1,20)}=34,50$; $p<0,001$) y del ayuno (*Fas*: $F_{(1,20)}=46,91$; $p<0,001$; *G6pdx*: $F_{(1,20)}=21,87$; $p<0,001$ y *Me1*: $F_{(1,20)}=27,60$; $p<0,001$), con una interacción significativa entre ambas variables (*Fas*: $F_{(1,20)}=31,87$; $p<0,001$; *G6pdx*: $F_{(1,20)}=10,84$; $p<0,01$ y *Me1*: $F_{(1,20)}=21,53$; $p<0,001$).

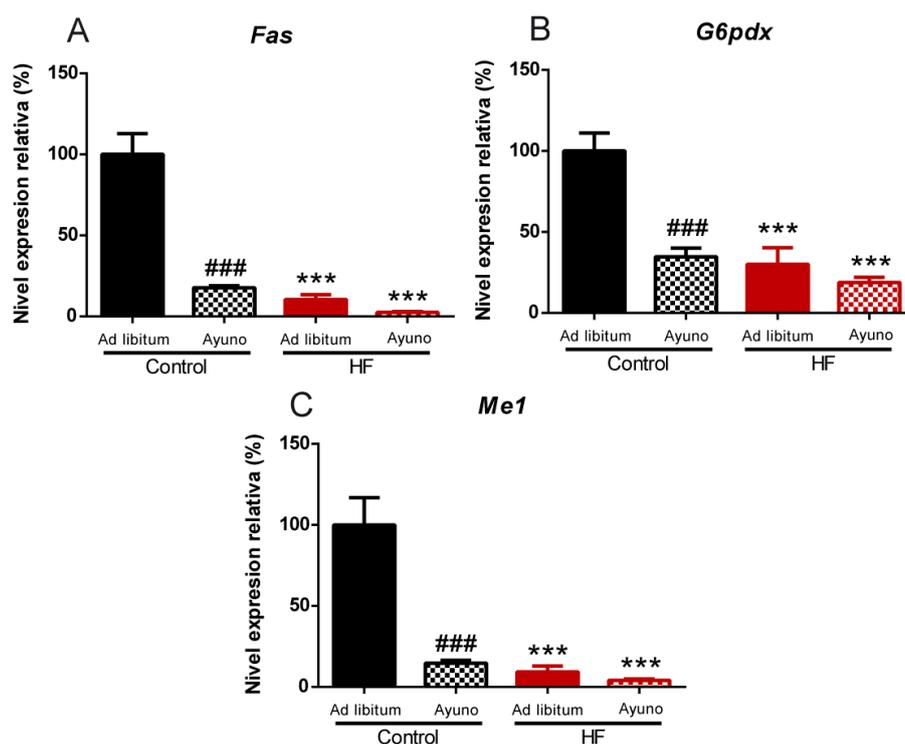


Figura 51. Niveles de expresión de ARNm de *Fas* (A), *G6pdx* (B) y *Me1* (C) en el TAS. Cada resultado representa la media \pm E.E.M. (n=6). ***p<0,001 respecto al grupo Control *ad libitum*; ###p<0,001 grupo ayuno respecto al grupo *ad libitum* para cada tipo de dieta (Test de Newman-Keuls).

4.3. Efecto de la sincronización forzada tras 8 semanas de dieta HF

4.3.1. Evolución del peso corporal, tejidos adiposos e hígado tras 8 semanas de dieta HF

Con el fin de determinar si la distribución circadiana de las comidas podría influir en las alteraciones metabólicas debidas al tratamiento con dieta HF, los animales se sometieron a un protocolo de sincronización forzada de la ingesta, detallado en el apartado “Material y Métodos” del presente capítulo (página 78).

La Figura 52 muestra el incremento del peso corporal a lo largo del tratamiento. Las diferencias en el peso corporal fueron significativas desde la cuarta semana de tratamiento dietético, aumentando progresivamente hasta la octava semana ($p < 0,05$). A partir de la cuarta semana, cuando se reorganizó la dieta (iniciándose el protocolo de sincronización forzada de la ingesta), los animales del grupo HF sincronizados tendieron a moderar la ganancia de peso. El efecto fue significativo a partir de la 7ª semana de tratamiento (ANOVA medidas repetidas, 06:00 h: $F_{(3,196)}=4,84$; $p < 0,01$; 12:00 h: $F_{(3,204)}=4,16$; $p < 0,01$; 18:00 h: $F_{(3,204)}=5,60$; $p < 0,01$ y 24:00 h: $F_{(3,204)}=6,28$; $p < 0,001$).

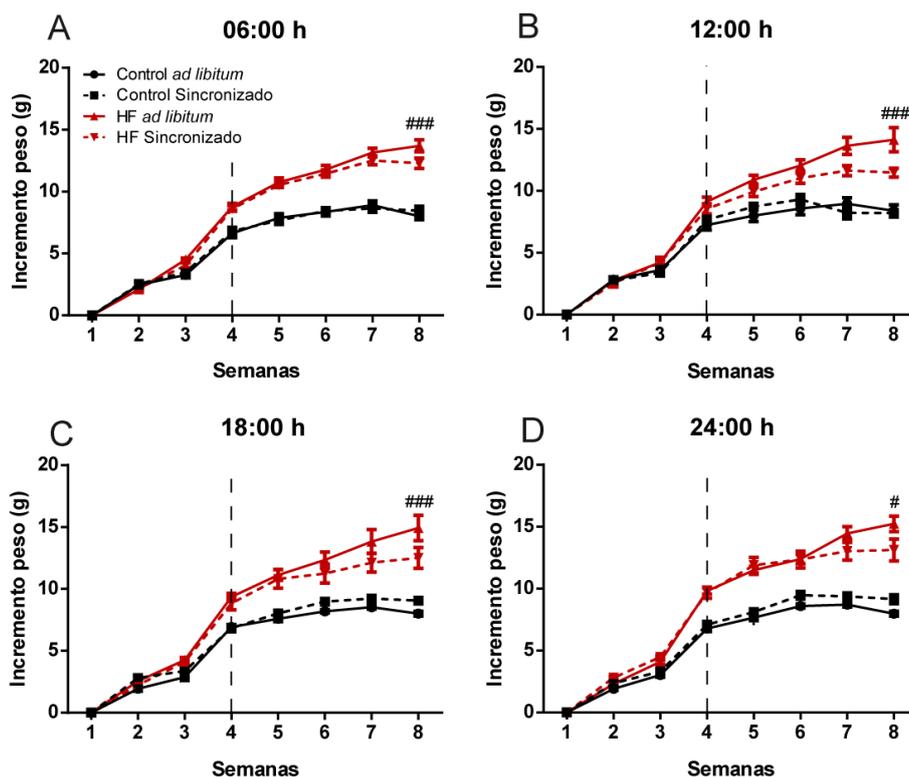


Figura 52. Evolución del peso corporal durante 8 semanas de dieta HF (A, B, C y D). A partir de la cuarta semana comienza la sincronización forzada. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 6-7 animales. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ HF *ad libitum* vs. HF sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

Como se observa en la Figura 53, la evolución de la ingesta calórica diaria reveló una hiperfagia en los animales HF en la primera semana de tratamiento. Además, los animales del grupo HF incrementaron la ingesta diurna con respecto a sus controles (ANOVA medidas repetidas, $F_{(1,210)}=286,726$; $p < 0,001$). En cambio, la ingesta nocturna fue superior al inicio del tratamiento pero fue disminuyendo paulatinamente hasta igualarse con la de los animales del grupo control al final del experimento (ANOVA medidas repetidas, $F_{(1,210)}=119,683$; $p < 0,001$). Por otra parte, se calculó el patrón circadiano de la ingesta expresado como el porcentaje de calorías ingerido durante el periodo de luz-oscuridad respecto del total de calorías diario. Se observó que los animales del grupo HF ingirieron un porcentaje mayor de calorías durante el periodo de luz respecto de sus controles (ANOVA medidas repetidas, $F_{(1,210)}=554,405$; $p < 0,001$). Es importante destacar que los animales del grupo control ingirieron aproximadamente el 90% de las calorías totales durante el periodo de oscuridad (ANOVA medidas repetidas, $F_{(1,210)}=554,405$; $p < 0,001$).

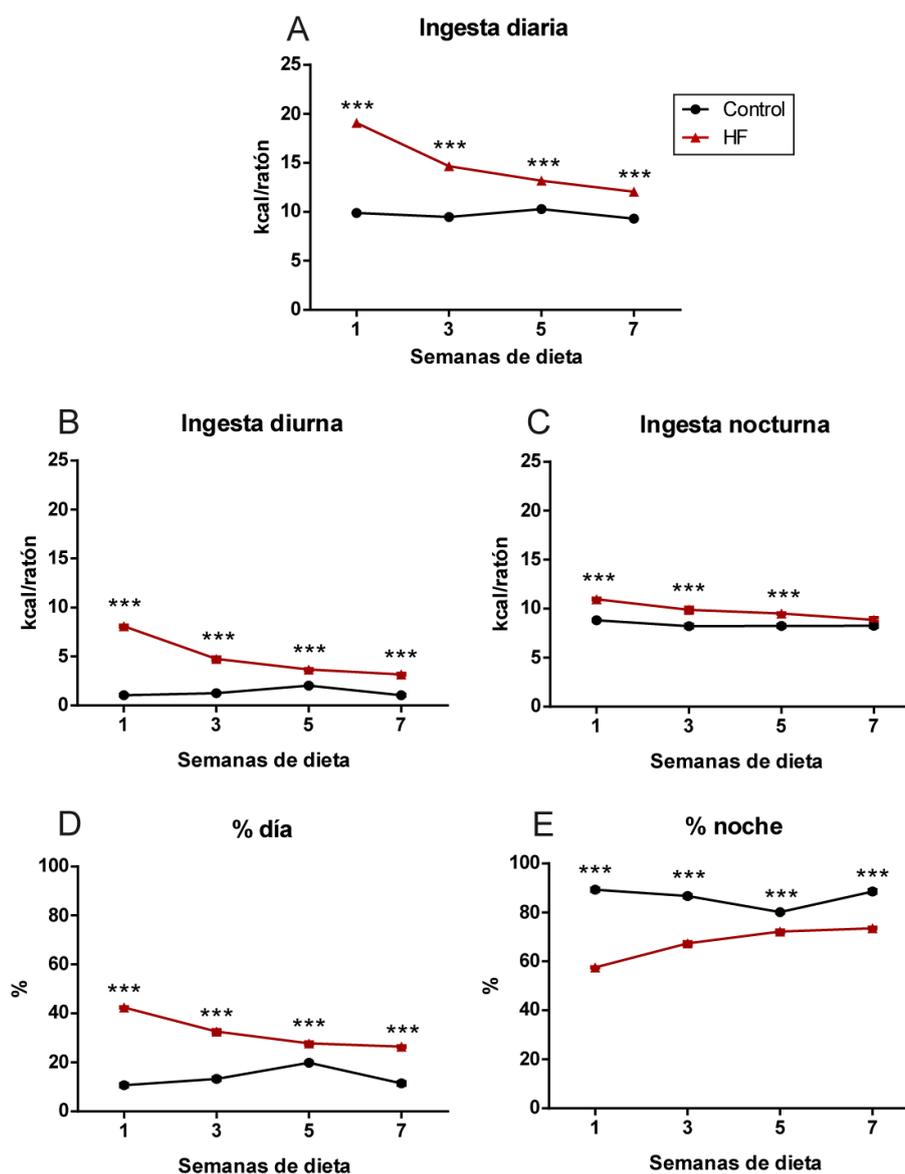


Figura 53. Evolución de la ingesta expresada en calorías. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 24-28 animales. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo Control (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●) y HF *ad libitum* (▲).

Como se muestra en la Figura 54, la dieta HF aumentó significativamente el peso absoluto de los tejidos adiposos lumbar y subcutáneo independientemente de la hora del día (ANOVA-2 TAL: $F_{(3,87)}=79,68$; $p < 0,01$; TAS: $F_{(3,87)}=55,15$; $p < 0,001$). En el caso del hígado, su peso se vio afectado por el tratamiento dietético ($F_{(3,87)}=13,33$; $p < 0,001$) y la hora del día ($F_{(3,87)}=10,37$; $p < 0,001$), con una interacción significativa entre ambos ($F_{(9,87)}=3,212$; $p < 0,01$).

Al analizar el efecto de la sincronización en los grupos control y HF por separado, el ANOVA-2 reveló un efecto de la sincronización solamente en los animales HF (TAL: $F_{(1,44)}=11,51$; $p < 0,001$; TAS: $F_{(1,44)}=10,61$; $p < 0,01$; hígado: $F_{(1,44)}=8,262$; $p < 0,01$; Figura 54).

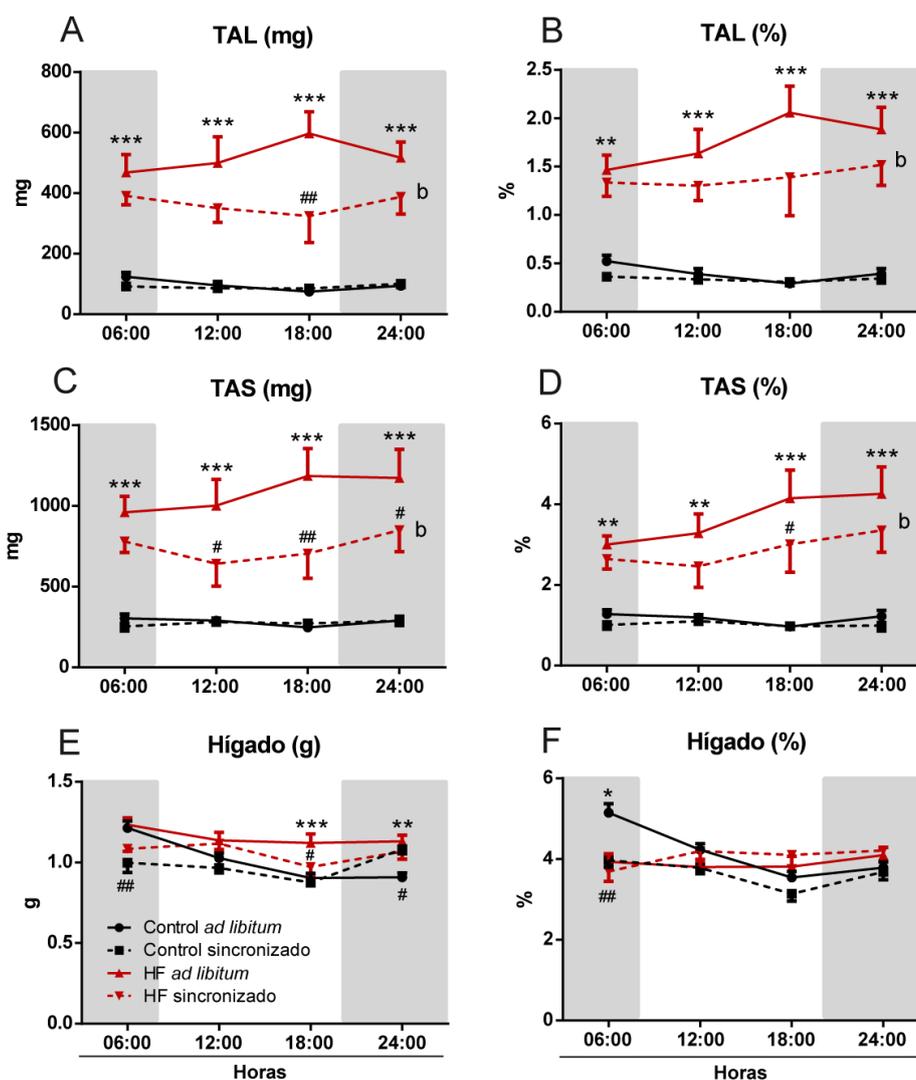


Figura 54. Evolución del peso absoluto y relativo del TAS, TAL e hígado tras 8 semanas de dieta HF. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 6-7 animales. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ *ad libitum* vs. sincronizado pareado. ^b $p < 0,05$ HF *ad libitum* vs. HF sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

4.3.2. Determinación de los parámetros plasmáticos

La Figura 55 muestra los valores plasmáticos de glucosa, TG y NEFA, observándose que, independientemente de la sincronización, el tratamiento con la dieta HF causó un aumento de los niveles de glucosa (ANOVA-2, $F_{(1,43)}=15,25$; $p < 0,001$) y de NEFA (ANOVA-2, $F_{(1,41)}=14,48$; $p < 0,001$). También se detectó una variación circadiana en los niveles de TG (ANOVA-2, $F_{(3,42)}=10,33$; $p < 0,001$) y de NEFA ($F_{(3,41)}=4,020$; $p < 0,05$). Además, en el caso de los TG se observó una interacción significativa entre el tratamiento dietético y la hora del día ($F_{(3,42)}=3,860$; $p < 0,05$). Se determinó el efecto de la sincronización forzada para cada tratamiento dietético por separado. En este caso, se detectó un incremento de los niveles de NEFA por la sincronización ($F_{(1,43)}=11,04$; $p < 0,01$), dependiente de la hora del día ($F_{(3,43)}=6,537$; $p < 0,001$) y una interacción significativa entre

ambos factores ($F_{(3,43)}=4,858$; $p<0,01$) en los animales del grupo con dieta control, no detectándose en el HF.

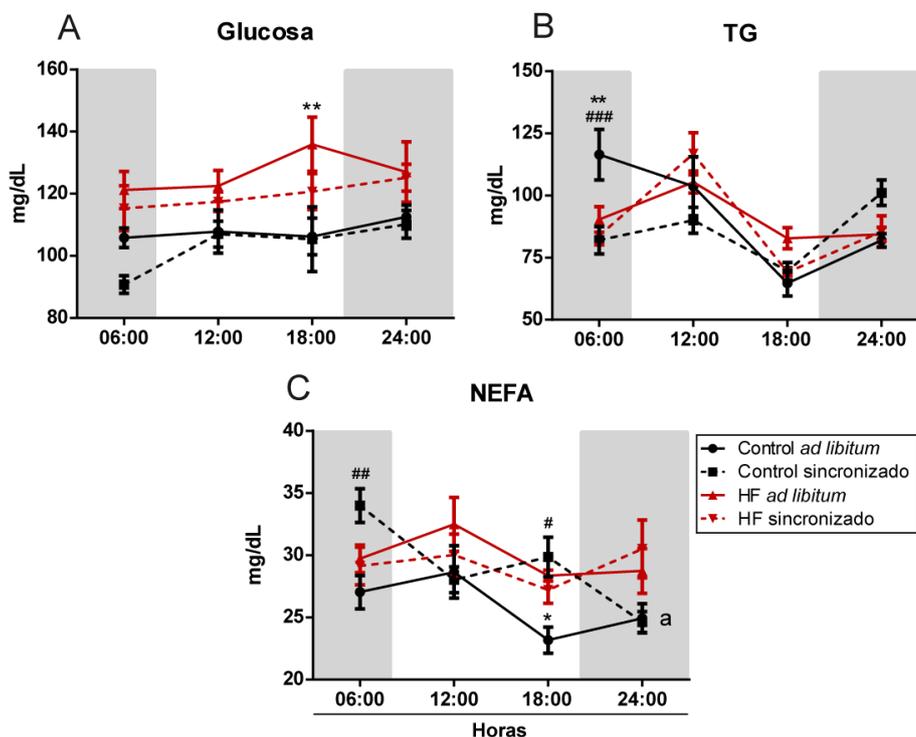


Figura 55. Niveles plasmáticos de glucosa (A), triglicéridos (B), y NEFA (C). Los valores son las medias \pm E.E.M. de 6-7 animales. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado pareado. ^a $p<0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

En el caso de los animales *ad libitum* el tratamiento con la dieta HF provocó un aumento de los niveles plasmáticos de insulina (ANOVA-2, $F_{(1,43)}=13,34$; $p<0,001$), dependiendo de la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,43)}=3,158$; $p<0,05$). Al analizar el efecto de la sincronización, el ANOVA-2 reveló un efecto tanto en los controles ($F_{(1,42)}=15,57$; $p<0,001$) como en los animales HF ($F_{(1,43)}=15,10$; $p<0,001$).

Los niveles plasmáticos de leptina se encontraron incrementados por la dieta HF (ANOVA-2, $F_{(1,42)}=67,94$; Figura 56B) independientemente de la hora del día. Además, la sincronización tendió a normalizarlos en el grupo HF (ANOVA-2, $F_{(1,42)}=11,65$; $p<0,01$). En el caso de la IL-6 y del TNF- α , no hubo ningún efecto del tratamiento, aunque la sincronización aumentó los niveles de IL-6 en el grupo dieta control (ANOVA-2, $F_{(3,78)}=3,441$; $p<0,05$) (Figura 56C y D).

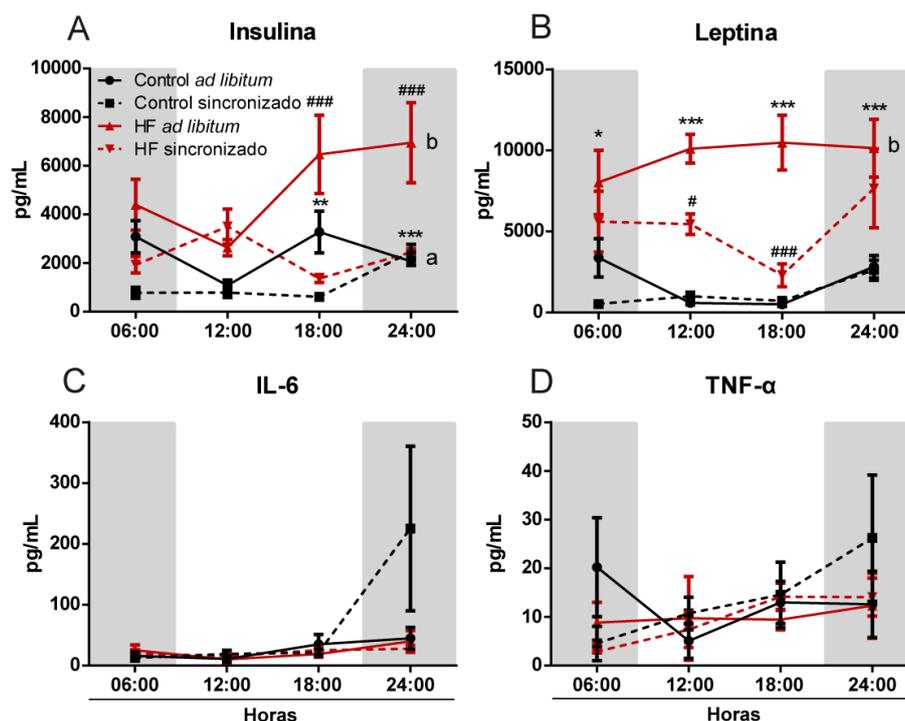


Figura 56. Determinaciones plasmáticas de insulina (A), leptina (B), IL-6 (C) y TNF-α (D). Los valores son las medias \pm E.E.M. de 6-7 animales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ HF *ad libitum* vs. HF sincronizado pareado. ^a $p < 0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado. ^b $p < 0,05$ HF *ad libitum* vs. HF sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

4.3.3. Efecto de 8 semanas de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en el hipotálamo

La expresión de *Bmal1* no sufrió alteraciones significativas como consecuencia de la dieta. El ANOVA-2 solo reveló un efecto significativo de la hora del día (ANOVA-2, $F_{(3,76)}=7,739$; $p < 0,001$; Figura 57A). El análisis independiente posterior de los grupos control y HF mostró la existencia de una variación circadiana en el grupo control (ANOVA-1, $F_{(3,19)}=3,173$; $p < 0,05$), pero no en el HF. Sin embargo, la sincronización forzada de la ingesta hizo que estos animales recuperasen el ritmo circadiano (ANOVA-1, $F_{(3,19)}=4,306$; $p < 0,05$). El perfil de expresión de *Clock* fue similar al de *Bmal1*, aunque en este caso no se modificó por la dieta ni por la sincronización (Figura 57B).

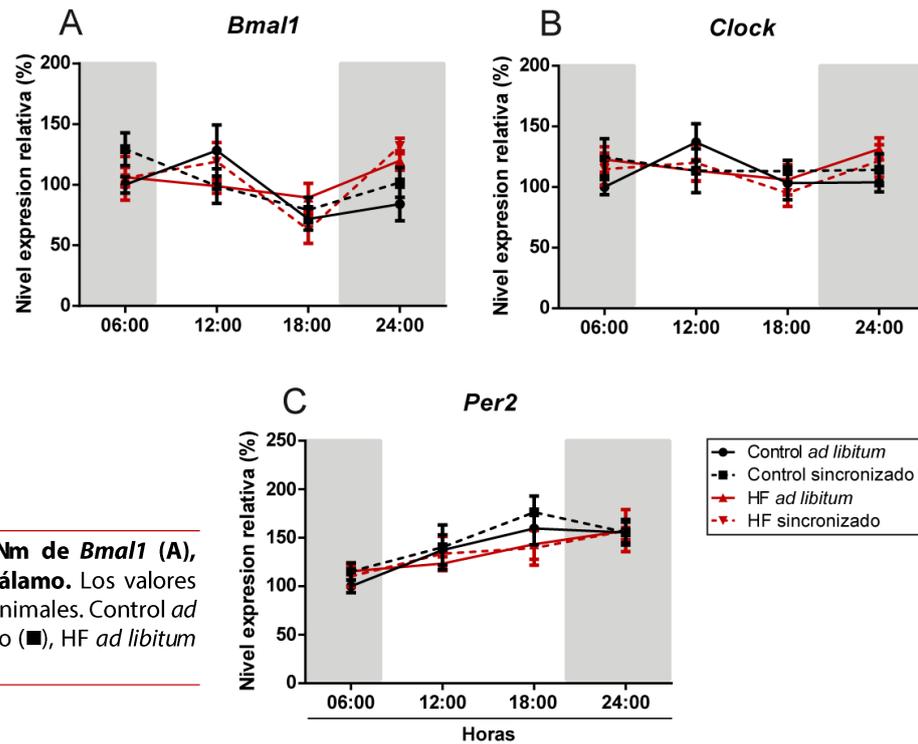


Figura 57. Expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en hipotálamo. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

En el caso de *Per2* (Figura 57C), el ANOVA-2 mostró la existencia de un ritmo circadiano ($F_{(3,76)}=8,847$; $p<0,001$) tanto en el grupo control *ad libitum* (ANOVA-1, $F_{(3,19)}=4,262$; $p<0,05$) como en el HF *ad libitum* (ANOVA-1, $F_{(3,20)}=3,188$; $p<0,05$). En cualquier caso no se observó ningún efecto significativo del tratamiento ni de la sincronización forzada de la conducta alimentaria.

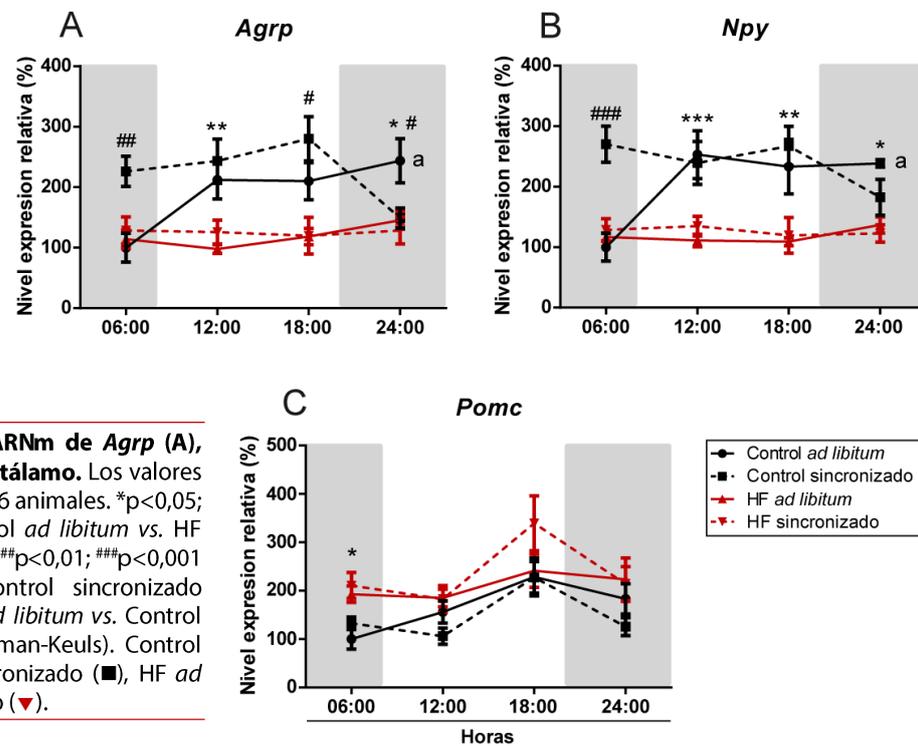


Figura 58. Expresión de ARNm de *Agrp* (A), *Npy* (B) y *Pomc* (C) en hipotálamo. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado pareado. $\#p<0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

Como se observa en la Figura 58, la expresión de *Agrp* y de *Npy* siguió un patrón similar. En ambos casos, el tratamiento dietético tuvo un efecto significativo (ANOVA-2, *Agrp*: $F_{(1,39)}=19,45$; $p<0,001$ y *Npy*: $F_{(1,37)}=23,35$; $p<0,001$), que fue dependiente de la hora del día (ANOVA-2, *Agrp*: $F_{(3,39)}=4,811$; $p<0,01$ y *Npy*: $F_{(3,37)}=3,978$; $p<0,05$). En el caso de estos genes, la sincronización tuvo solo efecto en los animales control (ANOVA-2, *Agrp*: $F_{(3,36)}=4,367$; $p<0,05$ y *Npy*: $F_{(3,36)}=4,065$; $p<0,05$). En cuanto al neuropéptido anorexigénico *Pomc* (Figura 58C), observamos un efecto tanto de la dieta ($F_{(1,38)}=4,343$; $p<0,05$) como de la hora del día ($F_{(3,38)}=3,367$; $p<0,05$). Este efecto fue significativo, indicando la existencia de un ritmo circadiano en los animales del grupo control (ANOVA-1, $F_{(3,18)}=3,609$; $p<0,05$). En relación con el efecto de la sincronización de la ingesta, lo más llamativo fue la aparición del ritmo circadiano en los animales del grupo HF sincronizado (ANOVA-1, $F_{(3,18)}=3,189$; $p<0,05$).

Se midieron los niveles hipotalámicos de ARNm de *Il-1 β* e *Il-6* (Figura 59). En ambos casos, el ANOVA-2 reveló una interacción significativa entre la dieta y la hora del día (*Il-1 β* : $F_{(9,70)}=2,170$; $p<0,05$ e *Il-6*: $F_{(9,74)}=2,191$; $p<0,05$). El tratamiento dietético redujo la expresión de *Il-1 β* e *Il-6* a las 18:00 h y 24:00 h respectivamente ($p<0,05$).

Los niveles de expresión de *Fas*, *Me1* y *G6pdx* no se vieron afectados por la hora del día, la dieta, ni por la sincronización forzada de la ingesta (Figura 60).

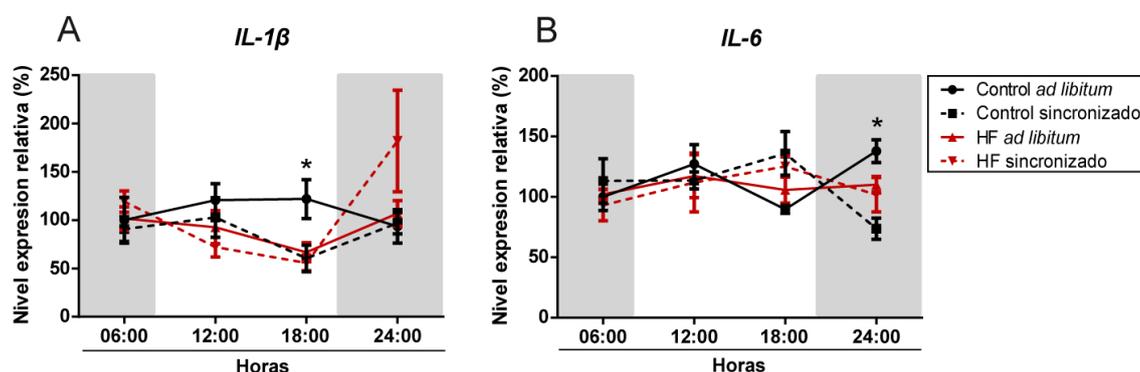


Figura 59. Expresión de ARNm de *IL-1 β* (A) e *IL-6* (B) en hipotálamo. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. * $p<0,05$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

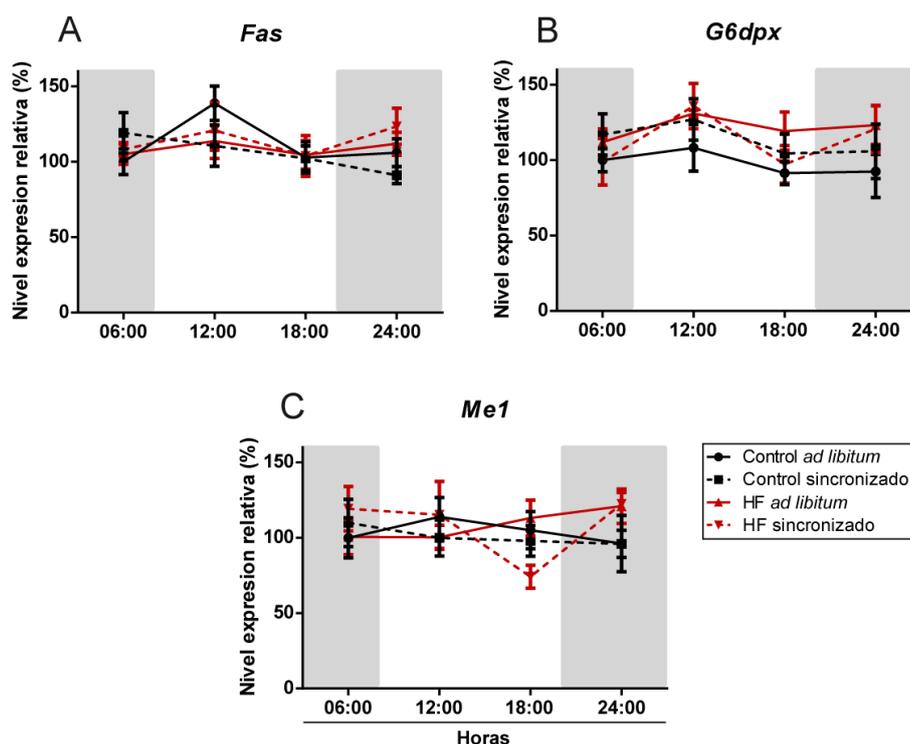


Figura 60. Expresión de ARNm de *Fas* (A), *G6pdx* (B) y *Me1* (C) en hipotálamo. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

4.3.4. Efecto de 8 semanas de dieta HF sobre la expresión de diversos genes en el TAS

Se determinaron los valores de *Bmal1*, *Clock* y *Per2* (Figura 61). En los tres casos, independientemente de la sincronización, se detectó una variación circadiana (ANOVA-2, *Bmal1*: $F_{(3,32)}=11,61$; $p<0,001$; *Clock*: $F_{(3,40)}=4,844$; $p<0,01$ y *Per2*: $F_{(3,37)}=7,175$; $p<0,01$). Se determinó el efecto de la sincronización forzada para cada tratamiento dietético de manera independiente. Así, en el caso de *Bmal1* y *Clock*, no se detectó ningún efecto de la sincronización, mientras que para *Per2*, la sincronización forzada indujo un incremento de la expresión en los grupos dieta control (ANOVA-2, $F_{(1,35)}=4,673$; $p<0,05$) y HF (ANOVA-2, $F_{(1,38)}=7,883$; $p<0,01$), con respecto a sus controles *ad libitum* (Figura 61C). Además, es interesante destacar que la desaparición del ritmo circadiano detectado en el grupo HF *ad libitum*, se recuperó en los animales HF con sincronización forzada (ANOVA-1, $F_{(3,18)}=4,434$; $p<0,05$).

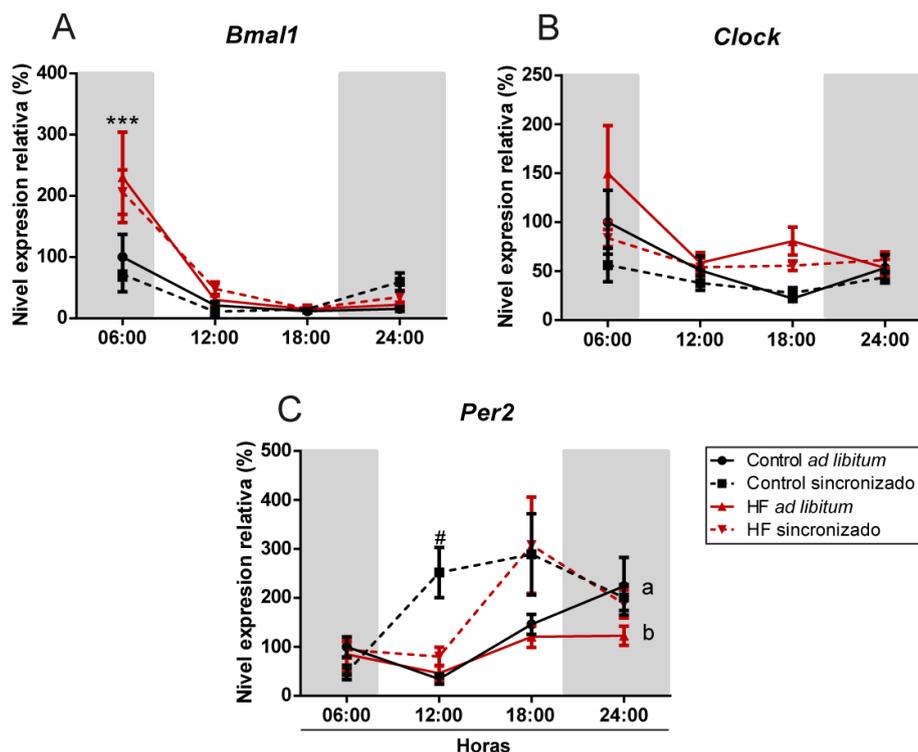


Figura 61. Expresión de ARNm de *Bmal1* (A), *Clock* (B) y *Per2* (C) en el TAS. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. *** $p < 0,001$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. # $p < 0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado pareado. ^a $p < 0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado. ^b $p < 0,05$ HF *ad libitum* vs. HF sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

Al analizar la *Fas* (Figura 62A), el ANOVA-2 reveló una inhibición de la expresión debida al tratamiento dietético ($F_{(1,40)}=12,14$; $p < 0,01$) en los animales HF *ad libitum* respecto de los controles *ad libitum*. En este caso, la sincronización incrementó los niveles de expresión solamente en los animales alimentados con dieta control (ANOVA-2, $F_{(1,38)}=36,11$; $p < 0,001$), que fue además el único grupo en mostrar un ritmo circadiano (ANOVA-1, $F_{(3,18)}=8,677$; $p < 0,01$). Al analizar la expresión de *G6pdx* (Figura 62B) se observó un incremento en la expresión debida al tratamiento dietético (ANOVA-2, $F_{(1,34)}=24,15$; $p < 0,001$) que fue independiente de la hora del día. En este caso, los niveles de expresión no se modificaron por la sincronización forzada. Los niveles de expresión de ARNm de *Me1* mostraron una variación circadiana ($F_{(3,38)}=3,755$; $p < 0,05$) que fue independiente del tratamiento dietético. En este caso, de manera similar a la *Fas*, se detectó un incremento de los niveles de *Me1* por la sincronización ($F_{(1,37)}=21,17$; $p < 0,01$), dependiente de la hora del día ($F_{(3,37)}=6,406$; $p < 0,01$) en los animales del grupo control, no detectándose en el grupo HF (Figura 62C).

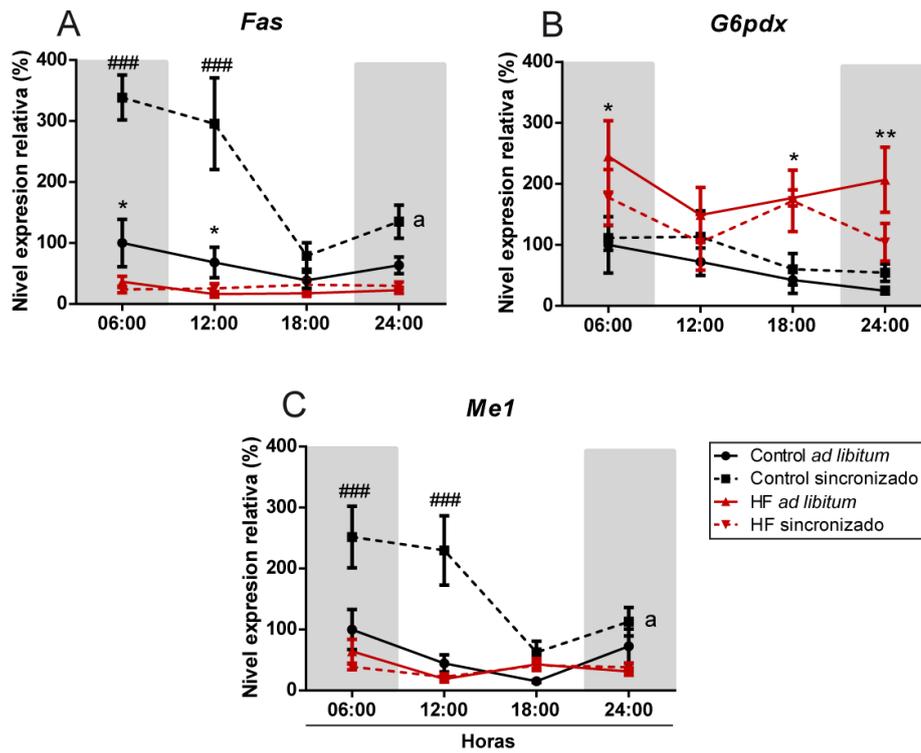


Figura 62. Expresión de ARNm de Fas (A), G6pdx (B) y Me1 (C) en TAS. Los valores son las medias \pm E.E.M. de 5-6 animales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Control *ad libitum* vs. HF *ad libitum* pareado. ### $p < 0,001$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado pareado. ^a $p < 0,05$ Control *ad libitum* vs. Control sincronizado (Test de Newman-Keuls). Control *ad libitum* (●), Control sincronizado (■), HF *ad libitum* (▲) y HF sincronizado (▼).

5. Discusión

Podemos considerar la obesidad como una enfermedad compleja, resultado de la interacción de múltiples factores, tanto genéticos como ambientales (Barness *et al.* 2007). Aunque no de manera exclusiva, el incremento de la incidencia/prevalencia de la obesidad se relaciona en gran medida con cambios en el estilo de vida que se caracterizan por el consumo de alimentos hipercalóricos, generalmente de alta palatabilidad y ricos en grasas (Malik *et al.* 2013; Bray *et al.* 2004). Estas dietas producen una desorganización del patrón de ingesta, incrementando la ingesta de alimentos durante el periodo de descanso, lo que favorece un flujo permanente de nutrientes y energía con consecuencias sobre los niveles plasmáticos de glucosa y de ácidos grasos y de hormonas como la insulina y la leptina (Stucchi *et al.* 2012; Pendergast *et al.* 2013; Kohsaka *et al.* 2007).

Tradicionalmente, el estudio de la obesidad y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento se han centrado principalmente en la reducción de la ingesta calórica y en el aumento del gasto energético, pero cada vez son más los estudios que proponen la normalización de los ritmos biológicos como herramienta eficaz para el tratamiento de la obesidad (Sherman *et al.* 2012; Salgado-Delgado *et al.* 2010; Hatori *et al.* 2012). En este sentido, la alteración de la maquinaria molecular que regula los ritmos circadianos podría jugar un papel importante en la regulación del metabolismo. Por ello, en los últimos años se está prestando mayor atención al papel que tienen las alteraciones de los genes *clock* en el desarrollo de obesidad.

En el presente capítulo de esta tesis se han investigado las implicaciones fisiopatológicas de la desincronización entre el ciclo luz/oscuridad y el ritmo circadiano de la ingesta causada por el consumo de dietas HF, así como su repercusión sobre la expresión génica y aspectos del metabolismo energético. Para ello se han caracterizado los efectos observados tanto a nivel hipotalámico como a nivel del tejido adiposo subcutáneo.

5.1. Caracterizar el efecto de una dieta HF sobre la variación circadiana de parámetros biométricos

El consumo de dietas HF induce alteraciones metabólicas que pueden afectar a la maquinaria molecular del reloj biológico, lo que origina un desajuste de los ritmos circadianos de los procesos biológicos, afectando entre otros parámetros, al peso corporal, adiposidad y patrón de ingesta (Stucchi *et al.* 2012). Además, las dietas HF también originan cambios en los ritmos diarios de expresión génica y niveles hormonales (P. Cano *et al.* 2008; Cha *et al.* 2000; Kohsaka *et al.* 2007). Aunque son numerosos los estudios realizados que evalúan el efecto a medio y largo plazo de una dieta HF sobre el metabolismo, hasta el momento no ha habido ningún estudio que evalúe los efectos del tratamiento durante 48 h sobre la oscilación circadiana del peso corporal y de la cantidad de tejido adiposo blanco antes de que se produzcan alteraciones metabólicas importantes.

En primer lugar, analizamos la evolución del peso corporal, así como la evolución del peso de los tejidos adiposos (lumbar y subcutáneo) y del hígado. Como se observa en la Figura 33, el aumento del peso corporal y de la adiposidad de los animales alimentados durante 48 h con dieta HF fue coherente con el incremento de la ingesta calórica. Los resultados obtenidos indican que la ganancia de peso está vinculada al aumento de la

ingesta calórica. Estos resultados apoyan la idea de que cuando se introduce una dieta HF en los ratones se produce una fase inicial de hiperfagia que explicaría el incremento de peso en tan solo 48 h (Gomez *et al.* 2005; Stucchi *et al.* 2012; Somoza *et al.* 2007). Todo esto induce a pensar que este tipo de dieta podría desencadenar una alteración de los patrones de ingesta (hiperfagia) que junto con el elevado aporte energético proporcionado por estas dietas, podría contribuir al incremento global del peso corporal y adiposidad (Hatori *et al.* 2012; Stucchi *et al.* 2012).

En segundo lugar, analizamos el efecto de 12 h de ayuno en estos parámetros en animales sacrificados a las 06:00 h. Según lo esperado, el ayuno provocó una pérdida de peso corporal y adiposidad en todos los animales. Asimismo, se observó una menor pérdida de peso, expresada en gramos, en los animales alimentados con dieta HF. Estos datos están en concordancia con experimentos realizados en seres humanos, donde se observa una menor pérdida de peso en los pacientes obesos ayunados durante 60 h respecto de los pacientes con normopeso (Scobie 1998). Este hecho puede deberse a un incremento de la proteólisis en los sujetos delgados ayunados respecto de los obesos (Umpleby *et al.* 1995). La insulina es una hormona anabólica que promueve el almacenamiento de nutrientes, por lo que aumenta la síntesis proteica y disminuye la proteólisis (Fulks *et al.* 1975). Nuestros resultados muestran que el tratamiento dietético provocó un incremento en los niveles plasmáticos de insulina en los animales HF, lo que sugiere que la menor pérdida de peso detectada por el ayuno en esta cohorte podría deberse al incremento de la síntesis proteica y disminución de la proteólisis en los animales HF.

En tercer lugar, analizamos los cambios producidos en el peso corporal y los tejidos tras 4 semanas de reorganización de la ingesta en los ratones previamente sometidos a 4 semanas de dieta HF *ad libitum*. Tras 4 semanas de sincronización forzada de la ingesta, los animales del grupo HF sincronizados mostraron un incremento de peso inferior al de los animales del grupo HF *ad libitum*. El hecho de que la ingesta diaria de alimentos fuera la misma en los grupos HF (*ad libitum* y sincronizado) parece indicar que el principal factor que interviene en la regulación del peso corporal es la redistribución de las comidas, la cual regula, al menos en parte, los cambios en los procesos metabólicos producidos por los ciclos de ayuno-alimentación. Nuestros datos confirman los estudios epidemiológicos y experimentales anteriores que indican que el consumo de alimentos durante el periodo de descanso (que se corresponde con la noche en humanos y el día en roedores) conduce a una alteración en el ritmo de los procesos metabólicos que puede favorecer el desarrollo de sobrepeso y obesidad (Arble *et al.* 2009; Salgado-Delgado *et al.* 2013; Berg *et al.* 2009).

Es importante destacar que el protocolo de sincronización forzada de la ingesta podría activar el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, como consecuencia del estrés provocado por la ausencia de alimento durante la fase de luz (Akana *et al.* 1994). Asimismo, tampoco se puede descartar el efecto diferencial de la dieta sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Diversos autores han demostrado que los animales alimentados con dieta HF presentan niveles de corticosterona menores que los alimentados con una dieta estándar, lo que indica que la dieta HF podría proteger selectivamente contra los efectos del estrés (Finger *et al.* 2011; Ortolani *et al.* 2011). Por lo tanto, el incremento del estrés debido a la restricción podría verse disminuido, al menos en parte, por el tratamiento con dietas HF. Por otra

parte, no se puede descartar la posibilidad de una disminución de la actividad locomotora causada por la dieta HF (Kohsaka *et al.* 2007). En cualquier caso, se requieren estudios encaminados a evaluar la influencia del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y la actividad locomotora en la pérdida de peso originada por la sincronización forzada en los animales HF en este modelo.

5.2. Investigar los cambios en los ritmos de los parámetros plasmáticos inducidos por el tratamiento con una dieta HF de manera aguda y a largo plazo

El reloj biológico tiene un papel importante en la regulación del metabolismo y la homeostasis de la energía, como muestran distintos estudios en los que se ha visto que muchas de las hormonas implicadas en el control del metabolismo (como es el caso de la insulina y la leptina) presentan una oscilación circadiana (Kalsbeek *et al.* 2001; Gavrila *et al.* 2003; La Fleur *et al.* 1999). En el caso de la insulina, se ha demostrado en ratones que durante el periodo de luz presentan resistencia a esta hormona, y consecuentemente, niveles plasmáticos más altos de glucosa; mientras que durante el periodo de oscuridad (cuando su metabolismo se encuentra activo) no se observa (Shi *et al.* 2013). En el caso de leptina, se ha demostrado una marcada fluctuación circadiana, aumentando progresivamente durante las horas de luz en humanos y reduciéndose en el caso de roedores (Kalsbeek *et al.* 2001; Gavrila *et al.* 2003; Saad *et al.* 1998). Además, se ha demostrado que el reloj biológico es capaz de controlar la expresión y la actividad de SREBP1C y de sus dianas FAS y ACC, regulando el metabolismo lipídico (Le Martelot *et al.* 2009). Las lesiones en el NSQ causan alteraciones en los ritmos circadianos de la tasa de utilización de glucosa y de la producción hepática de glucosa endógena, reforzando la importancia del reloj biológico sobre la regulación del metabolismo y su influencia en el control de la homeostasis de la glucosa (Kalsbeek *et al.* 2006). Igualmente, los niveles en sangre de ácidos grasos libres, triglicéridos y glicerol muestran un marcado ritmo circadiano en los seres humanos y en ratones. Estos cambios no se deben exclusivamente a la ingesta de alimentos, sino que son regulados por el reloj biológico, probablemente a través de la regulación de los ritmos de transcripción a nivel adiposo (Shostak *et al.* 2013).

En cuanto a la bioquímica plasmática tras 48 h de tratamiento dietético, cabe destacar las variaciones observadas en los niveles plasmáticos de glucosa y TG (Figura 35). Puesto que los niveles de glucosa y TG aumentan en los periodos posprandiales, estas diferencias entre el grupo control y el HF podrían deberse a un cambio en el patrón circadiano de la ingesta en los animales HF. En el caso de los NEFA, se observó la existencia de un patrón rítmico diario mostrando valores elevados durante el periodo de luz debido al incremento de la lipólisis, tal y como se ha descrito previamente (Shostak *et al.* 2013). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dietéticos. También observamos que la dieta HF incrementó los niveles circulantes de insulina y leptina, desapareciendo el ritmo circadiano normal de los niveles de leptina (Cano *et al.* 2009). Debe tenerse en cuenta que la variabilidad observada en los parámetros plasmáticos en estos experimentos podría deberse al hecho de que los animales no estuvieron en condiciones de ayuno en el momento del sacrificio. Del mismo modo, es posible que esta variabilidad pudiera ser (al menos parcialmente) consecuencia de la alteración del patrón de

alimentación, que junto con un estado de hiperfagia podría estar produciendo una perturbación en las vías metabólicas sincronizadas por los ritmos circadianos (Kohsaka *et al.* 2007).

Es sabido que el ayuno lleva asociada una respuesta adaptativa hormonal y metabólica, consistente en una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, insulina y leptina, así como un incremento de los NEFA (Kmiec *et al.* 2005). En el experimento con animales ayunados se observó esta reducción en los niveles de glucosa, TG, insulina y leptina, y un incremento en los niveles de NEFA. Además, de manera coherente con el experimento anterior, la dieta HF incrementó los niveles plasmáticos de glucosa e insulina.

Las alteraciones observadas en los parámetros plasmáticos tras 8 semanas de dieta HF (Figura 55 y Figura 56), junto con la modificación del patrón de ingesta causado por la dieta HF (Figura 53) revelan que 8 semanas de dieta HF son suficientes para producir importantes alteraciones en el ritmo circadiano de la ingesta y en el metabolismo. De esta forma, el reajuste del ritmo circadiano de la ingesta hacia un patrón más fisiológico mejoraría dichas alteraciones (Hatori *et al.* 2012; Stucchi *et al.* 2012). Este hecho es coherente con la disminución de insulina y leptina detectada en los animales HF sincronizados. Estos hallazgos están en consonancia con estudios clínicos en los que se ha demostrado que la desalineación entre el marcapasos circadiano central y los ritmos de ayuno/alimentación y de sueño/vigilia (imitando lo que sucede en el *jet-lag* y en trabajadores nocturnos) da lugar a un descenso en los niveles de leptina, así como un deterioro de la tolerancia a la glucosa y menor sensibilidad a la insulina. Este hecho sugiere que, además de responder a los ciclos de ayuno/alimentación, los niveles de leptina y la insulina también responden a las variaciones del reloj biológico interno (Scheer *et al.* 2009). Asimismo, se han encontrado receptores para leptina e insulina en el NSQ, sugiriendo que, además de estar reguladas estas hormonas por el reloj biológico interno, podrían regular de manera directa el marcapasos central (Prosser & Bergeron 2003; Anhé *et al.* 2004). Por lo tanto, especulamos que ambas hormonas podrían ser el vínculo de unión entre la alimentación, el metabolismo y el reloj biológico.

5.3. Estudiar la influencia de los ritmos biológicos y las dietas HF sobre la producción de mediadores inflamatorios circulantes e hipotalámicos

Una de las características de la obesidad es el desarrollo de un estado crónico de inflamación leve en el que se produce un aumento de las citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Trayhurn & Wood 2004; Kern *et al.* 2001). Existe una importante evidencia científica de que la inflamación mediada por el sistema inmune es el mecanismo que une la obesidad con la resistencia a la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (Lumeng & Saltiel 2011). Estudios realizados en modelos de obesidad inducida por la dieta en roedores muestran que el aumento de los mediadores inflamatorios en el hipotálamo mediobasal favorece el incremento de peso y la resistencia a leptina (Thaler & Schwartz 2010). Además, se ha descrito en roedores que la exposición a una dieta HF induce un incremento en la expresión hipotalámica de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que contribuye a la aparición de alteraciones metabólicas, como obesidad, resistencia a insulina, hipertensión y dislipemias (De Souza *et al.* 2005; Ouchi *et al.* 2011).

En nuestro estudio hemos analizado la variación circadiana de los niveles de ARNm de *Il-6* e *Il-1 β* . Los resultados obtenidos indican que no existe inflamación hipotalámica tras 48 h de dieta HF e incluso se observó una disminución de la expresión de estos genes en algunos momentos del día. Nuestros resultados están en contraposición con trabajos previos que indican que el consumo de dietas HF provoca un incremento de los niveles hipotalámicos de ARNm de *Il-6* y *Tnf- α* , perceptible tras 24 h de tratamiento (Thaler *et al.* 2012). Después de 8 semanas de tratamiento y en concordancia con lo sucedido tras 48 de dieta HF, se detectó una disminución en los niveles de ARNm de *Il-1 β* y de *Il-6* en el hipotálamo en determinados momentos del día. A pesar de que existen estudios que demuestran que las dietas HF incrementan los niveles hipotalámicos de citoquinas proinflamatorias, en nuestros experimentos los animales HF no presentaron un incremento en los niveles hipotalámicos de ARNm de *Il-6* e *Il-1 β* ni de la concentración plasmática de IL-1 β y TNF- α . Este hecho está probablemente relacionado con la composición de la dieta HF utilizada. En este contexto, se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados, como el oleico y el linoleico entre otros, disminuyen la producción de mediadores proinflamatorios, como IL-6, IL-1 β y TNF- α (Baer *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2005). Por lo tanto, el hecho de que no obtengamos los mismos resultados podría deberse a que nuestra dieta, rica en ácido palmítico, contiene además cantidades elevadas de ácidos oleico y linoleico, lo que sugiere que la disminución de la expresión génica de *Il-6* e *Il-1 β* podría ser una consecuencia de la acción de estos ácidos grasos insaturados. Otra posible razón que explique la discrepancia entre nuestros resultados y los de otros autores podría estar relacionada con el hecho de que la variación de la expresión de estas citoquinas depende de la hora del día (Seres *et al.* 2004). Existen estudios que demuestran la existencia de un patrón circadiano en el ritmo de secreción de IL-6, sugiriendo que la secreción y actividad de esta citoquina está regulada por los ritmos circadianos (Sothorn *et al.* 1995; Domínguez Rodríguez *et al.* 2003; Agorastos *et al.* 2014). Por lo que no podemos descartar que el efecto del tiempo pueda ser otro de los mecanismos implicados en la reducción de la expresión génica en nuestro modelo. Además, es necesario mencionar que en estos modelos animales no se detectó un incremento de los marcadores de inflamación circulantes y que los datos obtenidos en hipotálamo confirman este resultado.

5.4. Evaluar el efecto del tratamiento dietético sobre los mecanismos hipotalámicos reguladores de la ingesta

Los neuropéptidos AGRP y NPY (orexigénicos) y POMC (anorexigénico) están implicados en la regulación de la homeostasis energética (Gao & Horvath 2008). En nuestro estudio observamos que la dieta HF disminuyó la expresión de *Agrp* y *Npy* tras 48 h y tras 8 semanas de tratamiento, mientras que los niveles de *Pomc* solamente aumentaron al cabo de 8 semanas. Estos datos están en concordancia con estudios previos, que sugieren que el consumo de dietas HF se asocia con un descenso de la expresión de *Agrp* y *Npy*, así como con un incremento de la de *Pomc* como parte de los mecanismos compensatorios que se ponen en marcha para contrarrestar el consumo de dietas de alta densidad calórica (Dziedzic *et al.* 2007; Archer & Mercer 2007; Lin *et al.* 2000). Cabe destacar que tras 48 h de tratamiento dietético se produjo una disminución de la expresión de *Agrp* y *Npy* acompañado de un incremento de la ingesta calórica (hiperfagia). Estos resultados

coinciden con otros estudios que muestran que la hiperfagia inicial causada por las dietas HF no se asocia a un aumento de la expresión de *Agrp* y *Npy* (Ziotopoulou *et al.* 2000).

Por otro lado, el incremento de la expresión de *Agrp* y *Npy* detectado en los animales HF ayunados, podría deberse a la restricción calórica y formar parte de mecanismos adaptativos de supervivencia. Así, el hecho de que esta regulación no se observe con los animales con dieta control sería consecuencia de que la restricción calórica en este grupo es menos severa, a pesar de que la alteración de la bioquímica plasmática no es diferente a la que se observa en el grupo HF ayunado. Otra posible explicación a este hecho sería la composición de la dieta. Se ha descrito que algunos ácidos grasos disminuyen la expresión hipotalámica de estos genes (Wang *et al.* 2002).

La sincronización forzada de la ingesta afectó al patrón circadiano de expresión de *Agrp* y *Npy* únicamente en los animales con dieta control, lo que pone de manifiesto que, a nivel central, las dietas HF podrían interferir en los mecanismos reguladores de la ingesta, independientemente de factores circadianos. Puesto que estos ensayos se han llevado a cabo asegurando que el aporte calórico diario y nutricional es similar en los grupos *ad libitum* y sometidos a restricción temporal de la ingesta, podemos especular que la expresión de estos genes dependería en mayor medida de la composición y de la cantidad ingerida de determinados ácidos grasos que de la propia distribución circadiana de la ingesta.

La POMC es el péptido precursor de la MSH (α , β y γ), la β -endorfina y la ACTH (Millington 2007). El aumento de la expresión hipotalámica de *Pomc*, que da lugar a una mayor concentración de α -MSH (el cual actúa como mediador implicado en la saciedad), podría formar parte de los mecanismos encargados de mantener la homeostasis energética en las condiciones de balance energético positivo generado por las dietas HF. Nuestros resultados demuestran que la dieta HF incrementó la expresión de *Pomc* tras 8 semanas de tratamiento, pero no lo hizo en 48 h, lo que parece indicar que la administración de una dieta rica en grasa podría estar contribuyendo a un desajuste de los mecanismos reguladores de la ingesta en los periodos iniciales, que podría justificar, al menos parcialmente, la hiperfagia detectada. Se ha descrito que el ayuno disminuye la expresión hipotalámica de *Pomc*, estimulando la ingesta de alimentos (Huo *et al.* 2006). El consumo de una dieta rica en grasa durante 48 horas seguida de 12 horas de ayuno redujo la expresión de *Pomc* en los animales control (como cabría esperar) pero la incrementó en los HF, lo que indicaría una pérdida de funcionalidad de los mecanismos que regulan la homeostasis energética en los animales HF, contribuyendo al posterior desarrollo de obesidad en este grupo.

En resumen, la exposición a una dieta rica en grasa ocasionó una disminución en la expresión de los neuropéptidos orexigénicos. Esta disminución en la expresión de *Agrp* y *Npy* sugiere que se podrían estar induciendo cambios tempranos en los circuitos hipotalámicos que regulan el control metabólico de la ingesta, que se mantendrían en estadios más avanzados. Dos de los posibles candidatos a inducir estos cambios podrían ser la insulina y la leptina, ya que sus niveles se encuentran incrementados por efecto de la dieta y/o la ganancia de peso. Tanto la leptina como la insulina activan las neuronas anorexigénicas POMC e inhiben las neuronas orexigénicas NPY/AGRP, disminuyendo la ingesta (Schwartz *et al.* 2000). No debemos olvidar que la regulación de la ingesta es un

proceso complejo en el que intervienen otras regiones cerebrales además del hipotálamo, como son la amígdala y el NTS. Además, otros péptidos como son la ghrelina, leptina, insulina, CCK y péptido YY, entre otros, también están implicados en la regulación de la ingesta (Crowley 2008).

5.5. Determinar los efectos inducidos en la expresión de los genes *clock* por la ingesta de una dieta rica en grasa

Estudios previos han demostrado que las dietas HF producen cambios en el patrón circadiano de la ingesta, acompañados de alteraciones en el ritmo de expresión de los genes *clock* y de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (Stucchi *et al.* 2012; Kohsaka *et al.* 2007). Aunque se ha avanzado considerablemente en el estudio del papel de los ritmos circadianos en la obesidad, solo recientemente se ha prestado atención al efecto de la distribución circadiana de la ingesta en la ganancia de peso. En este sentido, los ratones cuya ingesta se limita al periodo de oscuridad (acceso restringido a la comida), sin reducción de la ingesta calórica diaria total, no desarrollan obesidad/sobrepeso, o corrigen el sobrepeso preexistente. Igualmente, en estas condiciones se normalizan los valores de insulina circulante y se reducen los parámetros indicadores de inflamación. Además de no ganar peso, estos animales presentan una mayor amplitud en la variación circadiana de expresión de los genes *clock* (Hatori *et al.* 2012).

Aunque se conoce desde hace tiempo la importancia que tienen los ritmos circadianos en la regulación del metabolismo, solo en los últimos años, tras el descubrimiento de las proteínas que componen el reloj biológico (ej.: CLOCK, BMAL1 y PER2), se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios con animales transgénicos que demuestran de un modo rotundo que las mutaciones de estos genes dan lugar a alteraciones metabólicas importantes (Turek *et al.* 2005; Guo *et al.* 2012; Rudic *et al.* 2004; S. Yang *et al.* 2009). Además, la dieta HF origina variaciones en el ritmo circadiano de los niveles de hormonas que intervienen en el metabolismo energético tales como leptina, TSH (hormona estimulante de tiroides) y corticosterona (P. Cano *et al.* 2008; Cha *et al.* 2000). En este contexto, resulta interesante resaltar el hecho de que en nuestras condiciones se producen alteraciones en la expresión y/o el ritmo de expresión originadas por el tratamiento dietético, tanto en las fases iniciales como en periodos más prolongados, lo que indicaría que la dieta HF podría contribuir a la alteración de los mecanismos moleculares que regulan los ritmos circadianos desde el inicio del tratamiento, por lo que se podría asumir que algún componente de la dieta estaría implicado directamente en la regulación de la expresión génica de los genes *clock*. Se ha demostrado que algunas señales nutricionales, como la glucosa y algunos aminoácidos, podrían estar implicadas en la regulación transcripcional de los genes *clock* en hígado (Hirao *et al.* 2009; Oike *et al.* 2011). De hecho, algunos autores han demostrado que las dietas altas en proteínas y bajas en hidratos de carbono influyen en los relojes circadianos periféricos en ratones sin afectar al NSQ. Este tipo de dieta, además de provocar cambios en la homeostasis de la glucosa, ocasionó modificaciones en la expresión de genes *clock* (Oishi *et al.* 2012). Este es el primer estudio que demuestra como el consumo de una dieta rica en grasa provoca un efecto a corto plazo sobre las alteraciones en la expresión de los genes *clock* y el metabolismo, ya que la mayoría de los estudios

utilizan estas dietas durante largos tiempos de administración (Kohsaka *et al.* 2007; Stucchi *et al.* 2012; Sherman *et al.* 2012; Hatori *et al.* 2012).

También es importante destacar la robusta oscilación en fases opuestas observada en la expresión de *Bmal1* y *Per2* a nivel central y periférico, así como la casi nula oscilación circadiana de los ARNm de *Clock* en hipotálamo, que concuerda con lo publicado anteriormente (Reppert & Weaver 2002; Dunlap 1999).

Los resultados obtenidos demuestran que el ayuno tras 48 h de dieta HF provoca alteraciones en la expresión de los genes *clock* diferentes en función del tejido. Una posible razón que explique estos cambios podría ser que el ayuno actúe regulando la expresión de algunos genes *clock*, permitiendo la sincronización entre el reloj biológico interno y los procesos metabólicos (Hatori *et al.* 2012). En este sentido, nuestros resultados indican que el ayuno tiene un efecto diferente a nivel central y periférico, puesto que las mayores variaciones detectadas se producen a nivel del TAS, sugiriendo que los cambios en el reloj biológico producidos por el ayuno se producen con mayor intensidad a nivel periférico que a nivel central, tal y como han sugerido otros autores (Schibler *et al.* 2003; Damiola *et al.* 2000).

Tras 8 semanas de dieta HF encontramos algunas variaciones en la expresión de los genes *clock* en comparación con lo observado tras 48 h, que podrían explicarse por la disminución y cambios de fase de la expresión circadiana de muchos genes debidos a la edad (Gibson *et al.* 2009; Hofman & Swaab 2006). Los resultados obtenidos demuestran que la sincronización forzada de la ingesta incrementa la expresión de *Per2* en el TAS. En nuestro protocolo, los animales ingieren aproximadamente un 10% del aporte calórico diario durante el periodo de luz, por lo que se podría asumir que durante este periodo los animales están en una situación fisiológica próxima al ayuno. Por lo tanto, estos resultados, junto con la regulación al alza de la expresión de *Per2* provocada por el ayuno, parecen indicar que la expresión de *Per2* a nivel periférico está determinada por el horario de la ingesta y no por el tipo de dieta utilizado, lo que favorecería la sincronización entre los ritmos circadianos y el metabolismo. Estos hallazgos son consistentes con los hallazgos previos acerca del efecto de la restricción temporal de la ingesta sobre la expresión de *Per2* y otros genes *clock* en cerebro y periferia (Damiola *et al.* 2000; Hara *et al.* 2001; Wakamatsu *et al.* 2001; Waddington Lamont *et al.* 2007).

En definitiva, dado que la alimentación (ya sea a través de los componentes de los alimentos o mediante el horario de alimentación) influye en los ritmos circadianos y ya que estos a su vez influyen en el metabolismo, es de suma importancia seguir investigando la relación entre la alimentación y el reloj biológico a nivel molecular. Nuestros resultados sugieren que la sincronización forzada de la ingesta podría contrarrestar los efectos sobre los ritmos circadianos de las dietas HF, y por consiguiente, conducir a un mejor funcionamiento fisiológico y así disminuir los trastornos metabólicos causados por el consumo de estas dietas.

5.6. Analizar y comparar el efecto de la dieta HF sobre la FAS y enzimas implicados en la síntesis de NADPH

En nuestros estudios observamos que 48 h de dieta HF disminuyeron los niveles de ARNm de *Fas*, *Me1* y *G6pdx* tanto a nivel central como periférico, sugiriendo que el aumento de la adiposidad provocado por la dieta HF no va asociado a un incremento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, de manera coherente con el elevado aporte de ácidos grasos en la dieta.

La disminución de la expresión de la *Fas* a nivel hipotalámico tras 48 h podría entenderse como una señal de saciedad, tendente a compensar la sobrecarga de lípidos. La implicación de las rutas metabólicas que participan en el metabolismo local de los ácidos grasos en la regulación hipotalámica de la ingesta se considera un hecho indiscutible (Gao *et al.* 2007; Chakravarthy *et al.* 2007), sustentado en numerosos estudios que han demostrado el papel crucial del malonil-CoA (López *et al.* 2006; Loftus *et al.* 2000). En este sentido, se ha comprobado que el incremento de malonil-CoA asociado a la inhibición de la FAS induce la expresión de péptidos anorexigénicos y disminuye la de orexigénicos (Shimokawa *et al.* 2002), de forma que el malonil-CoA actúa indirectamente como regulador de la ingesta. De acuerdo con estos antecedentes, nuestros datos serían compatibles con un incremento de los niveles de malonil-CoA. Por otro lado, niveles elevados de leptina circulante son también compatibles con niveles elevados de malonil-CoA hipotalámico (Wolfgang *et al.* 2007). Finalmente, la disminución de los niveles de ARNm de *Fas* y *Me1* únicamente en los animales con dieta control sometidos a ayuno tanto a nivel hipotalámico como adiposo, podría deberse a los bajos niveles de insulina que presentan estos animales, mientras que los niveles más altos de insulina detectados en el grupo HF estarían enmascarando el efecto del ayuno en esta cohorte (Sul & Wang 1998; Goodridge & Adelman 1976).

Nuestro estudio demuestra que el aumento de la adiposidad provocado por la dieta HF durante 8 semanas es independiente de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, ya que la expresión de *Fas* estaba disminuida. Es interesante destacar que la dieta HF incrementó los niveles de *G6pdx*, lo que indicaría un incremento de la síntesis de NADPH en el tejido adiposo, el cual incrementa el estrés oxidativo y la producción de citoquinas inflamatorias, promoviendo el desarrollo de resistencia a la insulina (J. Park *et al.* 2005; Park *et al.* 2006).

Se ha demostrado que los ciclos de ayuno-alimentación incrementan la lipogénesis en el tejido adiposo blanco (Kochan *et al.* 1997). En nuestro experimento, la sincronización forzada de la ingesta obliga a los animales a ingerir la mayor parte de la ingesta calórica diaria durante el periodo de oscuridad, mientras que durante el periodo de luz la ingesta es mínima, imitando parcialmente lo que sucede en el ayuno. Según lo esperado, la sincronización forzada de la ingesta incrementó los niveles de *Fas* y *Me1* en el tejido adiposo de los animales del grupo control, mientras que en los HF los niveles no aumentaron. Estos resultados podrían estar relacionados con factores nutricionales que estén afectando a la lipogénesis. De hecho, algunos autores han demostrado que las dietas HF inhiben la lipogénesis, lo que explicaría que los niveles de estas enzimas se mantengan invariables en esta cohorte (Crozier *et al.* 1987; Stucchi *et al.* 2012; Salati & Amir-Ahmady 2001).

Por lo tanto, la sincronización forzada de la ingesta en los animales HF redujo la cantidad de tejido adiposo lumbar y subcutáneo y los niveles de insulina y leptina, al mismo tiempo que no modificó la expresión de *Fas*, *G6pdx* y *Me1*. Cabría pensar que la expresión de estas enzimas es más sensible a la composición de la dieta que a un anormal ritmo circadiano de la ingesta.

5.7. Consideraciones finales

En conclusión, en nuestro experimento la dieta HF produce una alteración dependiente de la hora del día en la expresión de la mayoría de los genes estudiados, que además puede ir acompañada de la pérdida de la variación circadiana de su expresión, tanto a nivel central como periférico. Este hecho parece indicar que la administración de una dieta HF podría estar contribuyendo a un desajuste entre el metabolismo y los ritmos circadianos. Por lo tanto, los cambios detectados en la expresión génica estarían encaminados a modular los procesos fisiológicos para favorecer la adaptación del organismo al exceso de energía ingerida.

Tradicionalmente se ha asumido que el aumento de la adiposidad producida en la obesidad se debe principalmente al incremento de la ingesta calórica, sin tener en cuenta otros factores igualmente importantes como la distribución de esta ingesta a lo largo del día. En nuestro trabajo hemos comprobado que la alimentación con dietas HF *ad libitum* altera el patrón temporal de la ingesta calórica (Figura 53). Cuando los ratones tienen acceso *ad libitum* a una dieta HF, alteran la distribución circadiana de la ingesta, disminuyendo los periodos de ayuno e incrementando el tiempo de alimentación. Esta modificación de la conducta alimentaria provoca cambios en aquellas vías metabólicas que están reguladas por los ritmos diarios de ayuno-alimentación. Esta alteración en el tiempo de los procesos metabólicos, junto con el tipo de dieta ingerido, predispone al organismo a la obesidad y al desarrollo de enfermedades metabólicas. De hecho, nuestros datos muestran que la dieta HF *ad libitum* modifica la expresión circadiana y hace que desaparezca el ritmo de varios de los genes estudiados en este trabajo (incluidos los genes implicados en el reloj biológico). Sin embargo, la sincronización forzada de la ingesta recuperó la expresión y/o el ritmo de varios genes. Además, este protocolo disminuyó la ganancia de peso corporal, así como los niveles de insulina y leptina provocados por la alimentación con dietas HF.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la modificación del ritmo circadiano de la ingesta podría utilizarse como herramienta de trabajo para el desarrollo de programas de prevención y/o tratamientos alternativos de la obesidad y de las complicaciones metabólicas asociadas a esta patología.

Conclusiones

A continuación se resumen las conclusiones más relevantes de esta Tesis Doctoral:

1. La CCK tiene un efecto paradójico sobre el equilibrio energético en ratas obesas ya que, a pesar de disminuir la ingesta y el peso corporal, causa un aumento de los depósitos de tejido adiposo blanco.
2. Este efecto de la colecistoquinina está relacionado con un aumento de la actividad de la lipoproteína lipasa del tejido adiposo y una disminución de la expresión de *Angptl-4*.
3. El efecto diferencial de la CCK entre las ratas obesas y las ratas con normopeso podría deberse a diferentes niveles de expresión del receptor CCK-2 en el tejido adiposo blanco de estos animales.
4. La administración de una dieta con alto contenido en grasa (HF) provoca cambios en el patrón circadiano de la ingesta y en la variación circadiana de los niveles plasmáticos de insulina, leptina, glucosa, TG y NEFA.
5. Las dietas HF provocan alteraciones en la expresión de los genes *clock* desde el inicio del tratamiento, lo que podría contribuir al desarrollo de alteraciones metabólicas.
6. El consumo de dietas HF modifica los patrones de expresión génica de *Agrp*, *Npy* y *Pomc* en el hipotálamo, alterando sus niveles de expresión circadianos, lo que podría explicar, al menos en parte, las alteraciones de la ingesta y la ganancia de peso causadas por estas dietas.
7. La sincronización forzada de la ingesta (sin restricción calórica diaria) limita la ganancia de peso provocada por la dieta HF y reduce los niveles plasmáticos de insulina y leptina.
8. La dieta HF disminuye la expresión de la *Fas* a nivel adiposo indicando que el incremento de la adiposidad es independiente de la lipogénesis.
9. El consumo de dietas HF modifica la expresión de la mayoría de los genes analizados y/o su variación circadiana, independientemente de la duración del tratamiento dietético.
10. Nuestros resultados sugieren que la sincronización forzada de la ingesta podría contrarrestar los efectos sobre los ritmos circadianos de las dietas HF, y por consiguiente, conducir a un mejor funcionamiento fisiológico y así disminuir los trastornos metabólicos causados por el consumo de estas dietas.

Bibliografía

- Agorastos, A. et al., 2014. Circadian rhythmicity, variability and correlation of interleukin-6 levels in plasma and cerebrospinal fluid of healthy men. *Psychoneuroendocrinology*, 44, pp.71–82.
- Ahima, R.S. et al., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382(6588), pp.250–2.
- Ahima, R.S. & Flier, J.S., 2000. Leptin. *Annual Review of Physiology*, 62, pp.413–37.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D. & Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(5), pp.1020–7.
- Ahrén, B., Holst, J.J. & Efendic, S., 2000. Antidiabetogenic action of cholecystokinin-8 in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), pp.1043–8.
- Akana, S. et al., 1994. Regulation of Activity in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis is integral to a larger hypothalamic system that determines caloric flow. *Endocrinology*, 135, pp.1125–1134.
- Akashi, M. & Nishida, E., 2000. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes & Development*, 14(6), pp.645–9.
- Ando, H. et al., 2011. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology*, 152(4), pp.1347–54.
- Anhê, G.F. et al., 2004. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *Journal of Neurochemistry*, 90(3), pp.559–66.
- Arble, D.M. et al., 2009. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(11), pp.2100–2.
- Archer, Z.A. & Mercer, J.G., 2007. Brain responses to obesogenic diets and diet-induced obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 66(1), pp.124–30.
- Argente, J. et al., 1997. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *The Journal of Pediatrics*, 131(6), pp.833–838.
- Arita, Y. et al., 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), pp.79–83.
- Arner, P., 2003. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 14(3), pp.137–45.
- Attoub, S. et al., 1999. Physiological role of cholecystokinin B/gastrin receptor in leptin secretion. *Endocrinology*, 140(10), pp.4406–10.
- Bado, A. et al., 1991. Cholecystokinin-A receptor mediation of food intake in

- cats. *The American Journal of Physiology*, 260(4 Pt 2), pp.R693–7.
- Baer, D.J. et al., 2004. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), pp.969–73.
- Balsalobre, A. et al., 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289(5488), pp.2344–7.
- Barnes, L.A., Opitz, J.M. & Gilbert-Barnes, E., 2007. Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(24), pp.3016–3034.
- Barrachina, M.D. et al., 1997. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), pp.10455–60.
- Barsh, G.S. & Schwartz, M.W., 2002. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews. Genetics*, 3(8), pp.589–600.
- Bastard, J.P. et al., 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(9), pp.3338–42.
- Beigneux, A.P. et al., 2007. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metabolism*, 5(4), pp.279–91.
- Bellinger, L.L. & Bernardis, L.L., 2002. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiology & Behavior*, 76(3), pp.431–42.
- Bełtowski, J., 2003. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 9(2), pp.RA55–61.
- Benarroch, E.E., 2010. Neural control of feeding behavior: Overview and clinical correlations. *Neurology*, 74(20), pp.1643–50.
- Berg, C. et al., 2009. Eating patterns and portion size associated with obesity in a Swedish population. *Appetite*, 52(1), pp.21–6.
- Bergö, M. et al., 2002. Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(14), pp.11927–32.
- Bergö, M., Olivecrona, G. & Olivecrona, T., 1996. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *The Biochemical Journal*, 313(Pt 3), pp.893–8.
- Bernardis, L.L. & Bellinger, L.L., 1987. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Research*, 434(3), pp.321–81.

- Bernardis, L.L. & Bellinger, L.L., 1996. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(2), pp.189–287.
- Berndt, J. et al., 2007. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(7), pp.1472–80.
- Beutler, E., 1994. G6PD deficiency. *Blood*, 84(11), pp.3613–36.
- Bi, S., 2013. Dorsomedial hypothalamic NPY modulation of adiposity and thermogenesis. *Physiology & Behavior*, 121, pp.56–60.
- Billington, C.J. et al., 1994. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *The American Journal of Physiology*, 266(6 Pt 2), pp.R1765–70.
- Bjørbaek, C. et al., 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), pp.32686–95.
- Blevins, J.E., Stanley, B.G. & Reidelberger, R.D., 2000. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Research*, 860(1-2), pp.1–10.
- Boivin, D.B. et al., 1996. Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. *Nature*, 379(6565), pp.540–2.
- Bolles, R.C. & Stokes, L.W., 1965. Rat's anticipation of diurnal and a-diurnal feeding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 60(2), pp.290–4.
- Bonetto, V. et al., 1999. Isolation and characterization of sulphated and nonsulphated forms of cholecystokinin-58 and their action on gallbladder contraction. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 264(2), pp.336–40.
- Boulamery-Velly, A. et al., 2005. Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiology International*, 22(3), pp.489–98.
- Bray, G.A., 1977. The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proceedings*, 36(2), pp.148–53.
- Bray, G.A., Paeratakul, S. & Popkin, B.M., 2004. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & Behavior*, 83(4), pp.549–55.
- Broadwell, R.D. & Brightman, M.W., 1976. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *The Journal of Comparative Neurology*, 166(3), pp.257–83.
- Brobeck, J.R., 1946. Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiological Reviews*, 26(4), pp.541–59.
- Brownsey, R.W. et al., 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 2), pp.223–7.

- Bunney, W.E. & Bunney, B.G., 2000. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology*, 22(4), pp.335–45.
- Burdakov, D. & Ashcroft, F.M., 2002. Cholecystokinin tunes firing of an electrically distinct subset of arcuate nucleus neurons by activating A-Type potassium channels. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), pp.6380–7.
- Cannon, B. & Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), pp.277–359.
- Cano, P. et al., 2008. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine*, 33(2), pp.118–25.
- Cano, P. et al., 2009. Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating adipocytokines in rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(10), pp.1866–71.
- Cano, V. et al., 2008. A cholecystokinin-1 receptor agonist (CCK-8) mediates increased permeability of brain barriers to leptin. *British Journal of Pharmacology*, 154(5), pp.1009–15.
- Cano, V., Ezquerra, L., et al., 2003a. Characterization of the role of endogenous cholecystokinin on the activity of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), pp.964–70.
- Cano, V., Ezquerra, L., et al., 2003b. Regulation of leptin distribution between plasma and cerebrospinal fluid by cholecystokinin receptors. *British Journal of Pharmacology*, 140(4), pp.647–52.
- Cano, V., Caicoya, E. & Ruiz-Gayo, M., 2003. Effect of peripheral cholecystokinin receptor agonists on c-Fos expression in brain sites mediating food consumption in rats. *Neuroscience Letters*, 343(1), pp.13–6.
- Cha, M.C., Chou, C.J. & Boozer, C.N., 2000. High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(4), pp.503–7.
- Cha, S.H. et al., 2005. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), pp.14557–62.
- Chakravarthy, M. V et al., 2007. Brain fatty acid synthase activates PPARalpha to maintain energy homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9), pp.2539–52.
- Chan, J.L. et al., 2002. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*, 51(7), pp.2105–12.
- Chang, G.-G. & Tong, L., 2003. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*, 42(44), pp.12721–33.

- Chen, A.S. et al., 2000. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature Genetics*, 26(1), pp.97–102.
- Chen, H., Kent, S. & Morris, M.J., 2006. Is the CCK2 receptor essential for normal regulation of body weight and adiposity? *The European Journal of Neuroscience*, 24(5), pp.1427–33.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), pp.156–9.
- Chou, T.C. et al., 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *The Journal of Neuroscience*, 23(33), pp.10691–702.
- Cinti, S., 2006. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 16(8), pp.569–74.
- Ciriello, J. et al., 2003. Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 991(1-2), pp.133–41.
- Clerc, P. et al., 2007. Involvement of cholecystokinin 2 receptor in food intake regulation: hyperphagia and increased fat deposition in cholecystokinin 2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 148(3), pp.1039–49.
- Coleman, D.L., 1992. The influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes (db) locus in the mouse. VI: Hepatic malic enzyme activity is associated with diabetes severity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 41(10), pp.1134–6.
- Cone, R., 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience*, 8(5), pp.571–8.
- Cone, R. et al., 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 25 Suppl 5, pp.S63–7.
- Conti, M. et al., 2004. High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(4), pp.R793–800.
- Corwin, R.L., Gibbs, J. & Smith, G.P., 1991. Increased food intake after type A but not type B cholecystokinin receptor blockade. *Physiology & Behavior*, 50(1), pp.255–8.
- Cottone, P. et al., 2007. Feeding microstructure in diet-induced obesity susceptible versus resistant rats: central effects of urocortin 2. *The Journal of Physiology*, 583(Pt 2), pp.487–504.
- Covasa, M. & Ritter, R.C., 1998. Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. *Peptides*, 19(8), pp.1407–15.
- Cowley, M.A., 2003. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals

- of energy state. *European Journal of Pharmacology*, 480(1-3), pp.3–11.
- Cowley, M.A. et al., 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836), pp.480–4.
- Crawley, J.N. et al., 1991. Centrally administered cholecystokinin suppresses feeding through a peripheral-type receptor mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257(3), pp.1076–80.
- Crawley, J.N. & Corwin, R.L., 1994. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 15(4), pp.731–55.
- Crawley, J.N. & Schwaber, J.S., 1984. Abolition of the behavioral effects of cholecystokinin following bilateral radiofrequency lesions of the parvocellular subdivision of the nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 295(2), pp.289–99.
- Crowley, V.E.F., 2008. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45(Pt 3), pp.245–55.
- Crozier, G. et al., 1987. Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 36(8), pp.807–14.
- Dallman, M.F. et al., 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(4), pp.303–47.
- Damiola, F. et al., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14(23), pp.2950–61.
- Date, Y. et al., 2005. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, 146(8), pp.3518–3525.
- Daughters, R.S. et al., 2001. Ondansetron attenuates CCK induced satiety and c-fos labeling in the dorsal medulla. *Peptides*, 6(8), pp.1331–8.
- Davies, B.S.J. et al., 2010. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metabolism*, 12(1), pp.42–52.
- Davis, A.M. et al., 2004. Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neurobiology*, 60(4), pp.424–36.
- Davis, S. & Mirick, D.K., 2006. Circadian disruption, shift work and the risk of cancer: a summary of the evidence and studies in Seattle. *Cancer Causes & Control: CCC*, 17(4), pp.539–45.
- Dessi, S. et al., 1986. Hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase, cholesterologenesis, and serum lipoproteins in liver regeneration after partial hepatectomy. *Experimental and Molecular Pathology*, 44(2), pp.169–76.
- Dessi, S. et al., 1992. Serum lipoprotein pattern as modified in G6PD-deficient children during haemolytic anaemia induced by fava bean ingestion.

- International Journal of Experimental Pathology*, 73(2), pp.157–60.
- Dhillon, H. et al., 2006. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, 49(2), pp.191–203.
- Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, pp.517–49.
- Doi, M., Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P., 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125(3), pp.497–508.
- Domínguez Rodríguez, A. et al., 2003. Circadian variations in proinflammatory cytokine concentrations in acute myocardial infarction. *Revista Española de Cardiología*, 56(6), pp.555–60.
- Dornonville de la Cour, C. et al., 2004. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regulatory Peptides*, 120(1-3), pp.23–32.
- Drel, V.R. et al., 2006. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*, 55(12), pp.3335–43.
- Duca, F.A., Zhong, L. & Covasa, M., 2013. Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet. *Hormones and Behavior*, 64(5), pp.812–7.
- Dunlap, J.C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), pp.271–90.
- Dutton, S. & Trayhurn, P., 2008. Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (Angptl4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *The British Journal of Nutrition*, 100(1), pp.18–26.
- Dziedzic, B. et al., 2007. Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(5), pp.364–73.
- Eder, K. et al., 2009. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research*, 58(11), pp.727–36.
- Eide, E.J., Kang, H., et al., 2005. Casein kinase I in the mammalian circadian clock. *Methods in Enzymology*, 393, pp.408–18.
- Eide, E.J., Woolf, M.F., et al., 2005. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(7), pp.2795–807.
- Eisenberg, S. et al., 1992. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(5), pp.2013–21.
- Elmqvist, J.K. et al., 1998. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial

- hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), pp.741–6.
- Elmqvist, J.K. et al., 1997. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, 138(2), pp.839–42.
- Emond, M. et al., 1999. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *The American Journal of Physiology*, 276(5 Pt 2), pp.R1545–9.
- Erren, T.C. & Reiter, R.J., 2008. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. *Neuroendocrinology Letters*, 29(6), pp.815–21.
- Everitt, B.J. & Hökfelt, T., 1990. Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochirurgica Supplementum*, 47, pp.1–15.
- Fain, J.N. et al., 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 145(5), pp.2273–82.
- Fasshauer, M. et al., 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), pp.1045–50.
- Figlewicz, D.P. et al., 1995. Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behavioral Neuroscience*, 109(3), pp.567–9.
- Finger, B.C., Dinan, T.G. & Cryan, J.F., 2011. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. *Neuroscience*, 192, pp.351–60.
- Fitch, W.M. & Chaikoff, I.L., 1960. Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets high in glucose and fructose. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, pp.554–7.
- La Fleur, S.E. et al., 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(8), pp.643–52.
- Frayn, K.N., 2002. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, 45(9), pp.1201–10.
- Frayn, K.N. et al., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 27(8), pp.875–88.
- Frühbeck, G. et al., 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(6), pp.E827–47.
- Fu, L. et al., 2002. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111(1), pp.41–50.

- Fulks, R.M., Li, J.B. & Goldberg, A.L., 1975. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(1), pp.290–8.
- Galic, S., Oakhill, J.S. & Steinberg, G.R., 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), pp.129–39.
- Gao, Q. & Horvath, T.L., 2008. Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Letters*, 582(1), pp.132–41.
- Gao, S. et al., 2007. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), pp.17358–63.
- Garaulet, M. et al., 2010. CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. *International Journal of Obesity*, 34(3), pp.516–23.
- Garaulet, M. et al., 2009. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), pp.1466–75.
- Gavrila, A. et al., 2003. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(6), pp.2838–43.
- Geerling, J.C. et al., 2010. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(9), pp.1460–99.
- Georgiadi, A. et al., 2010. Induction of cardiac Angptl4 by dietary fatty acids is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta and protects against fatty acid-induced oxidative stress. *Circulation Research*, 106(11), pp.1712–21.
- Gery, S. et al., 2006. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Molecular Cell*, 22(3), pp.375–82.
- Gibbs, J., Young, R.C. & Smith, G.P., 1973a. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 84(3), pp.488–95.
- Gibbs, J., Young, R.C. & Smith, G.P., 1973b. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature*, 245(5424), pp.323–5.
- Gibson, E.M., Williams, W.P. & Kriegsfeld, L.J., 2009. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Experimental Gerontology*, 44(1-2), pp.51–6.
- Giovannini, M. et al., 2008. Breakfast: a good habit, not a repetitive custom. *The Journal of International Medical Research*, 36(4), pp.613–24.
- Glowinski, J. & Iversen, L.L., 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the

- brain. *Journal of Neurochemistry*, 13(8), pp.655–69.
- Gomez, F. et al., 2005. Decreased gonadotropin-releasing hormone neuronal activity is associated with decreased fertility and dysregulation of food intake in the female GPR-4 transgenic rat. *Endocrinology*, 146(9), pp.3800–8.
- Goodridge, A.G. & Adelman, T.G., 1976. Regulation of malic enzyme synthesis by insulin triiodothyronine, and glucagon in liver cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(10), pp.3027–32.
- Gooley, J.J., Schomer, A. & Saper, C.B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature Neuroscience*, 9(3), pp.398–407.
- Goumidi, L. et al., 2013. Impact of REV-ERB alpha gene polymorphisms on obesity phenotypes in adult and adolescent samples. *International Journal of Obesity*, 37(5), pp.666–72.
- Greenberg, A.S. et al., 1992. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research*, 52(15), pp.4113–6.
- Gubler, U. et al., 1984. Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(14), pp.4307–10.
- Guinding, C. & Piggins, H.D., 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *The European Journal of Neuroscience*, 25(11), pp.3195–216.
- Guo, B. et al., 2012. The clock gene, brain and muscle Arnt-like 1, regulates adipogenesis via Wnt signaling pathway. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(8), pp.3453–63.
- Gupte, R.S. et al., 2009. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(3), pp.219–28.
- Guzmán-Ruiz, R. et al., 2010. Sensitivity of cardiac carnitine palmitoyltransferase to malonyl-CoA is regulated by leptin: similarities with a model of endogenous hyperleptinemia. *Endocrinology*, 151(3), pp.1010–8.
- Hagan, S. & Niswender, K.D., 2012. Neuroendocrine regulation of food intake. *Pediatric Blood & Cancer*, 58(1), pp.149–53.
- Hahn, T.M. et al., 1998. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, 1(4), pp.271–2.
- Hamamura, M. et al., 1991. Electrical activation and *c-fos* mRNA expression in rat neurosecretory neurones after systemic administration of

- cholecystokinin. *The Journal of Physiology*, 444, pp.51–63.
- Hara, R. et al., 2001. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(3), pp.269–78.
- Harmer, S.C. & Bicknell, A.B., 2004. The role of the melanocortin 3 receptor in mediating the effects of gamma-MSH peptides on the adrenal. *Endocrine Research*, 30(4), pp.629–35.
- Harrold, J.A., Widdowson, P.S. & Williams, G., 2003. beta-MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? *Peptides*, 24(3), pp.397–405.
- Hatori, M. et al., 2012. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metabolism*, 15(6), pp.848–60.
- Hattar, S. et al., 2003. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*, 424(6944), pp.76–81.
- Van Heek, M. et al., 1997. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(3), pp.385–90.
- Herrera, E. & Ayanz, A., 1972. Calculation of lipolysis and esterification from glycerol metabolism in rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 13(6), pp.802–9.
- Hetherington, A.W. & Ranson, S.W., 1942. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 76(3), pp.475–499.
- Higami, Y. et al., 2004. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(2), pp.415–7.
- Hileman, S.M. et al., 2002. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*, 143(3), pp.775–83.
- Hill, D.R. et al., 1987. Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK antagonists. *The Journal of Neuroscience*, 7(9), pp.2967–76.
- Hill, D.R. et al., 1990. Autoradiographical detection of cholecystokinin-A receptors in primate brain using 125I-Bolton Hunter CCK-8 and 3H-MK-329. *The Journal of Neuroscience*, 10(4), pp.1070–81.
- Hirao, A. et al., 2009. A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock. *PLoS One*, 4(9), p.e6909.
- Hirosue, Y. et al., 1993. Cholecystokinin octapeptide analogues suppress food intake via central CCK-A receptors in mice. *The American Journal of Physiology*, 265(3 Pt 2), pp.R481–6.

- Hofman, M.A. & Swaab, D.F., 2006. Living by the clock: the circadian pacemaker in older people. *Ageing Research Reviews*, 5(1), pp.33–51.
- Hommel, J.D. et al., 2006. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*, 51(6), pp.801–10.
- Ter Horst, G.J. et al., 1989. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A *Phaseolus vulgaris* lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*, 31(3), pp.785–97.
- Hotamisligil, G.S., 1999. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of Internal Medicine*, 245(6), pp.621–5.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. & Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), pp.87–91.
- Houston, R.D. et al., 2006. A polymorphism in the 5'-untranslated region of the porcine cholecystokinin type a receptor gene affects feed intake and growth. *Genetics*, 174(3), pp.1555–63.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, pp.677–736.
- Hummel, K.P., Dickie, M.M. & Coleman, D.L., 1966. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153(3740), pp.1127–8.
- Huo, L., Grill, H. & Bjørbaek, C., 2006. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. *Diabetes*, 55(3), pp.567–73.
- Huszar, D. et al., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), pp.131–41.
- Huupponen, R., Karvonen, I. & Sotaniemi, E., 1989. Activity of hepatic glucose phosphorylating and NADPH generating enzymes in Zucker rats. *Diabetes Research*, 10(3), pp.143–6.
- Innis, R.B. & Snyder, S.H., 1980. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), pp.6917–21.
- Irwin, N., Montgomery, I.A. & Flatt, P.R., 2013. Comparison of the metabolic effects of sustained CCK1 receptor activation alone and in combination with upregulated leptin signalling in high-fat-fed mice. *Diabetologia*, 56(6), pp.1425–35.
- Ivy, A.C. & Oldberg, E., 1928. A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. *Am J Physiol -- Legacy Content*, 86(3), pp.599–613.
- Le Jan, S. et al., 2003. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 162(5), pp.1521–8.
- Josephs, T. et al., 2007. Fasting-induced adipose factor identified as a key

- adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *The Journal of Endocrinology*, 194(2), pp.305–12.
- Kalra, S.P. et al., 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, 20(1), pp.68–100.
- Kalsbeek, A. et al., 2006. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Progress in Brain Research*, 153, pp.283–307.
- Kalsbeek, A. et al., 2001. The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology*, 142(6), pp.2677–85.
- Kamilaris, T.C. et al., 1992. Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 130(4), pp.1764–74.
- Kandel, E., Schwartz, J. & Jessell, T., 2000. *Principles of Neural Science*, McGraw-Hill Medical.
- Kanoski, S.E., 2012. Cognitive and neuronal systems underlying obesity. *Physiology & Behavior*, 106(3), pp.337–44.
- Karastergiou, K. & Mohamed-Ali, V., 2010. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318(1-2), pp.69–78.
- Karlsson, B., Knutsson, A. & Lindahl, B., 2001. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(11), pp.747–52.
- Karlsson, C. et al., 1998. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(11), pp.3925–9.
- Karlsson, S. & Ahrén, B., 1992. CCK-8-stimulated insulin secretion in vivo is mediated by CCKA receptors. *European Journal of Pharmacology*, 213(1), pp.145–6.
- Katsurada, A. et al., 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of malic enzyme synthesis by insulin and triiodothyronine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 950(2), pp.113–7.
- Kawano, J. & Arora, R., 2009. The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome*, 4(1), pp.44–9.
- Kern, P.A. et al., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(5), pp.E745–51.
- Kersten, S. et al., 2009. Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(6), pp.969–74.
- Kersten, S. et al., 2000. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-

- activated receptor target gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), pp.28488–93.
- Kim, H.K. et al., 2010. Hypothalamic *Angptl4/Fiaf* is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes*, 59(11), pp.2772–80.
- Kim, K.H. et al., 2001. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pp.11252–6.
- Kim, K.W. et al., 2011. Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), pp.10673–8.
- Kishi, T. et al., 2003. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 457(3), pp.213–35.
- Kissileff, H.R. et al., 2003. Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(5), pp.R992–8.
- Kletzien, R.F., Harris, P.K. & Foellmi, L.A., 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(2), pp.174–81.
- Kmiec, Z. et al., 2005. Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology*, 51(6), pp.357–62.
- Knutson, K.L. et al., 2007. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*, 11(3), pp.163–78.
- Ko, C.H. & Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15 Spec No, pp.R271–7.
- Kobayashi, Y., Nakajima, T. & Inoue, I., 2002. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 269(18), pp.4701–10.
- Kobelt, P. et al., 2005. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(3), pp.R751–8.
- Kochan, Z., Karbowska, J. & Swierczyński, J., 1997. Unusual increase of lipogenesis in rat white adipose tissue after multiple cycles of starvation-refeeding. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 46(1), pp.10–7.
- Koh, H.-J. et al., 2007. Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. *The Biochemical Journal*, 403(3), pp.473–81.

- Kohsaka, A. et al., 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metabolism*, 6(5), pp.414–21.
- Koliwad, S.K. et al., 2009. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4, fasting-induced adipose factor) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38), pp.25593–601.
- Kontani, Y. et al., 2005. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell*, 4(3), pp.147–55.
- Kopecky, J. et al., 1995. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), pp.2914–23.
- Kopin, A.S. et al., 1997. Inter- and intraspecies polymorphisms in the cholecystokinin-B/gastrin receptor alter drug efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.11043–8.
- Kopin, A.S. et al., 1999. The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(3), pp.383–91.
- Köster, A. et al., 2005. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*, 146(11), pp.4943–50.
- Kraft, M. & Martin, R.J., 1995. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Disease-a-month: DM*, 41(8), pp.506–75.
- Krahn, D.D. et al., 1988. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Research*, 443(1-2), pp.63–9.
- Kriegler, M. et al., 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53(1), pp.45–53.
- Kroupa, O. et al., 2012. Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue. *BMC Physiology*, 12, p.13.
- Krügel, U. et al., 2003. Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *European Journal of Pharmacology*, 482(1-3), pp.185–7.
- Kudo, N. et al., 1995. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29), pp.17513–20.
- Kusakabe, T. et al., 2000. Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*:

- Official Journal of the Histochemistry Society*, 48(5), pp.613–22.
- Kusminski, C.M. et al., 2007. The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(1), pp.270–6.
- Lafontan, M., 2005. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, pp.119–46.
- Lafontan, M. & Langin, D., 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 48(5), pp.275–97.
- Lambert, P.D. et al., 1995. c-fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following intracerebroventricular infusions of neuropeptide Y. *Brain Research*, 670(1), pp.59–65.
- Langin, D. et al., 2009. Obesity. Science to practice. In G. Williams & G. Frühbeck, eds. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 78–108.
- Laposky, A.D. et al., 2008. Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Letters*, 582(1), pp.142–51.
- Lavine, J.A. et al., 2010. Cholecystokinin is up-regulated in obese mouse islets and expands beta-cell mass by increasing beta-cell survival. *Endocrinology*, 151(8), pp.3577–88.
- Lawrence, C.B. et al., 2002. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology*, 143(1), pp.155–62.
- Leak, R.K., Card, J.P. & Moore, R.Y., 1999. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transsynaptic transport. *Brain Research*, 819(1-2), pp.23–32.
- De Lecea, L. et al., 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), pp.322–7.
- Lechan, R.M. & Fekete, C., 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*, 153, pp.209–35.
- Lee, H., Lee, I.S. & Choue, R., 2013. Obesity, Inflammation and Diet. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 16(3), pp.143–152.
- Lehman, M.N. et al., 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *The Journal of Neuroscience*, 7(6), pp.1626–38.
- Lei, X. et al., 2011. Proteolytic processing of angiotensin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(18), pp.15747–56.
- Lennernäs, M., Hambraeus, L. & Akerstedt, T., 1995. Shift related dietary intake in

- day and shift workers. *Appetite*, 25(3), pp.253–65.
- Levin, B.E. et al., 1997. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *The American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), pp.R725–30.
- Levin, B.E. & Dunn-Meynell, A.A., 2002. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(4), pp.R941–8.
- Levin, B.E. & Keesey, R.E., 1998. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *The American Journal of Physiology*, 274(2 Pt 2), pp.R412–9.
- Lewy, A.J. et al., 1980. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210(4475), pp.1267–9.
- Lichtenstein, L. et al., 2007. Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(11), pp.2420–7.
- Liddle, R.A. et al., 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *The Journal of Clinical Investigation*, 75(4), pp.1144–52.
- Liddle, R.A. et al., 1988. Physiological role for cholecystokinin in reducing postprandial hyperglycemia in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 81(6), pp.1675–81.
- Liddle, R.A. et al., 1986. Regulation of gastric emptying in humans by cholecystokinin. *The Journal of Clinical Investigation*, 77(3), pp.992–6.
- Lin, S., Storlien, L.H. & Huang, X.F., 2000. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Research*, 875(1-2), pp.89–95.
- Lindström, P., 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *The Scientific World Journal*, 7, pp.666–85.
- Liu, H. et al., 2010. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), pp.69–89.
- Lo, C.M. et al., 2007. Interaction of apolipoprotein AIV with cholecystokinin on the control of food intake. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(4), pp.R1490–4.
- Lo, C.-M. et al., 2010. Cholecystokinin knockout mice are resistant to high-fat diet-induced obesity. *Gastroenterology*, 138(5), pp.1997–2005.
- Loftus, T.M. et al., 2000. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288(5475), pp.2379–81.
- López, M. et al., 2006. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and

- accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes*, 55(5), pp.1327–36.
- Lumeng, C.N. & Saltiel, A.R., 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp.2111–7.
- Lyons, W.E. et al., 1999. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), pp.15239–44.
- MacDonald, M.J., 1995. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(34), pp.20051–8.
- MacPhee, C.E. et al., 2000. Apolipoprotein C-II39-62 activates lipoprotein lipase by direct lipid-independent binding. *Biochemistry*, 39(12), pp.3433–40.
- Maffei, M. et al., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1(11), pp.1155–61.
- Majdic, G. et al., 2002. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143(2), pp.607–14.
- Malik, V.S., Willett, W.C. & Hu, F.B., 2013. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(1), pp.13–27.
- Mandard, S. et al., 2004. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), pp.34411–20.
- Mantzoros, C.S. et al., 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(4), pp.E567–84.
- Mårin, P. et al., 1992. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 41(11), pp.1242–8.
- Le Martelot, G. et al., 2009. REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biology*, 7(9), p.e1000181.
- Matson, C.A. et al., 2000. Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(4), pp.R882–90.
- Mattijssen, F. & Kersten, S., 2012. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(5), pp.782–9.
- McLaughlin, J. et al., 1999. Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology*, 116(1), pp.46–53.

- Mercer, L.D. et al., 2000. Direct visualization of cholecystokinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. *Neuroscience Letters*, 293(3), pp.167–70.
- Merino, B. et al., 2008. Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats. *Endocrinology*, 149(4), pp.1994–2000.
- Millington, G.W., 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & Metabolism*, 4, p.18.
- Minokoshi, Y. et al., 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415(6869), pp.339–43.
- Mistlberger, R.E., 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18(2), pp.171–95.
- Miyasaka, K. et al., 2004. Enhanced gastric emptying of a liquid gastric load in mice lacking cholecystokinin-B receptor: a study of CCK-A,B, and AB receptor gene knockout mice. *Journal of Gastroenterology*, 39(4), pp.319–23.
- Mohamed-Ali, V. et al., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), pp.4196–200.
- Mooney, R.A. et al., 2001. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), pp.25889–93.
- Moore, R.Y. & Lenn, N.J., 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 146(1), pp.1–14.
- Moran, T.H. & Bi, S., 2006. Hyperphagia and obesity of OLETF rats lacking CCK1 receptors: developmental aspects. *Developmental Psychobiology*, 48(5), pp.360–7.
- Moran, T.H. & Kinzig, K.P., 2004. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(2), pp.G183–8.
- Moran, T.H. & Schwartz, G.J., 1994. Neurobiology of cholecystokinin. *Critical Reviews in Neurobiology*, 9(1), pp.1–28.
- Morley, J.E., 1987. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine Reviews*, 8(3), pp.256–87.
- Morton, G.J. et al., 2005. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), pp.703–10.
- Motosugi, Y. et al., 2011. Tissue-dependent alterations of the clock gene expression rhythms in leptin-resistant Zucker diabetic fatty rats. *Chronobiology International*, 28(10), pp.968–72.
- Mukaddam-Daher, S. et al., 2003. Cardiac effects of moxonidine in spontaneously hypertensive obese rats. *Annals of the*

- New York Academy of Sciences*, 1009, pp.244–50.
- Mutt, V. & Jorpes, E., 1971. Hormonal polypeptides of the upper intestine. *The Biochemical Journal*, 125(3), p.57P–58P.
- Nelson, D.L. & Cox, M., 2006. *Lehninger: Principios de Bioquímica* 4th ed., Barcelona: Omega.
- Nishikawa, S. et al., 2007. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 56(4), pp.263–72.
- Noble, F. et al., 1999. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacological Reviews*, 51(4), pp.745–81.
- OECD, 2010. Obesity and the Economics of Prevention: Fit not Fat. , p.268.
- OECD, 2014. Obesity and the Economics of Prevention: Fit not Fat. Key facts – Spain update. Available at: <http://www.oecd.org/els/health-systems/obesity-update.htm>.
- Ogden, C.L. et al., 2012. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, 307(5), pp.483–90.
- Oike, H. et al., 2011. Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver. *PloS One*, 6(8), p.e23709.
- Oishi, K., Uchida, D. & Itoh, N., 2012. Low-Carbohydrate, High-Protein Diet Affects Rhythmic Expression of Gluconeogenic Regulatory and Circadian Clock Genes in Mouse Peripheral Tissues. *Chronobiology International*, 29(7), pp.799–809.
- Ortolani, D. et al., 2011. Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiology & Behavior*, 103(5), pp.487–92.
- Osborne, J.C. et al., 1985. Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry*, 24(20), pp.5606–11.
- Otarod, J.K. & Goldberg, I.J., 2004. Lipoprotein lipase and its role in regulation of plasma lipoproteins and cardiac risk. *Current Atherosclerosis Reports*, 6(5), pp.335–42.
- Ouchi, N. et al., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology*, 11(2), pp.85–97.
- Panda, S. et al., 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632), pp.525–7.
- Panda, S., Hogenesch, J.B. & Kay, S.A., 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), pp.329–35.
- Park, A., Kim, W.K. & Bae, K.-H., 2014. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal

- stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), pp.33–42.
- Park, J. et al., 2006. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes*, 55(11), pp.2939–49.
- Park, J. et al., 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), pp.5146–57.
- Park, S.-Y. et al., 2005. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes*, 54(12), pp.3530–40.
- Parker, K.L. et al., 2002. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, pp.19–36.
- Parrott, R.F., 1993. Peripheral and central effects of CCK receptor agonists on operant feeding in pigs. *Physiology & Behavior*, 53(2), pp.367–72.
- Patel, L. et al., 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), pp.472–6.
- Pendergast, J.S. et al., 2013. High-fat diet acutely affects circadian organisation and eating behavior. *The European Journal of Neuroscience*, 37(8), pp.1350–6.
- Penev, P.D. et al., 1998. Chronic circadian desynchronization decreases the survival of animals with cardiomyopathic heart disease. *The American Journal of Physiology*, 275(6 Pt 2), pp.H2334–7.
- Peraldi, P. et al., 1996. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(22), pp.13018–22.
- Pérez Rodrigo, C., 2013. Current mapping of obesity. *Nutrición Hospitalaria*, 28 Suppl 5, pp.21–31.
- Pérez-Farinós, N. et al., 2013. The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *BioMed Research International*, 2013, p.163687.
- Peters, J.H. et al., 2005. Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(4), pp.R879–84.
- Peyron, C. et al., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience*, 18(23), pp.9996–10015.
- Pittas, A.G., Joseph, N.A. & Greenberg, A.S., 2004. Adipocytokines and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(2), pp.447–52.
- Preitner, N. et al., 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian

- circadian oscillator. *Cell*, 110(2), pp.251–60.
- Prosser, R.A. & Bergeron, H.E., 2003. Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Neuroscience Letters*, 336(3), pp.139–42.
- Qiu, X. et al., 2005. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*, 433(7027), pp.745–9.
- Qu, D. et al., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(6571), pp.243–7.
- Raj, M. & Kumar, R.K., 2010. Obesity in children & adolescents. *The Indian Journal of Medical Research*, 132, pp.598–607.
- Randle, P.J., 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 14(4), pp.263–83.
- Rebuffé-Scrive, M. et al., 1993. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 42(11), pp.1405–9.
- Rehfeld, J.F., 1978. Immunochemical studies on cholecystokinin. II. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and hog. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(11), pp.4022–30.
- Rehfeld, J.F. & Hansen, H.F., 1986. Characterization of preprocholecystokinin products in the porcine cerebral cortex. Evidence of different processing pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(13), pp.5832–40.
- Reidelberger, R.D., 1992. Abdominal vagal mediation of the satiety effects of exogenous and endogenous cholecystokinin in rats. *The American Journal of Physiology*, 263(6 Pt 2), pp.R1354–8.
- Reppert, S.M. et al., 1981. Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. *The Journal of Neuroscience*, 1(12), pp.1414–25.
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), pp.935–41.
- Richard, D. & Baraboi, D., 2004. Circuitries involved in the control of energy homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Treatments in Endocrinology*, 3(5), pp.269–77.
- Riganti, C. et al., 2012. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(3), pp.421–36.
- Ronnett, G. V et al., 2005. Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiology & Behavior*, 85(1), pp.25–35.

- Rossetti, L., Shulman, G.I. & Zawulich, W.S., 1987. Physiological role of cholecystokinin in meal-induced insulin secretion in conscious rats. Studies with L 364718, a specific inhibitor of CCK-receptor binding. *Diabetes*, 36(10), pp.1212–5.
- Rossi, M. et al., 1997. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*, 138(1), pp.351–5.
- Roytblat, L. et al., 2000. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obesity Research*, 8(9), pp.673–5.
- Ruan, H. et al., 2002. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes*, 51(5), pp.1319–36.
- Ruderman, N. et al., 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 1), pp.E1–E18.
- Rudic, R.D. et al., 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*, 2(11), p.e377.
- Ruge, T. et al., 2005. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase in humans: effects of fasting. *European Journal of Clinical Investigation*, 35(3), pp.194–200.
- Ruiz-Gayo, M., Garrido, M.M. & Fuentes, J.A., 2000. Inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in food-deprived rats by a CCK-A receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 129(5), pp.839–42.
- Saad, M.F. et al., 1998. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), pp.453–9.
- Saeb-Parsy, K. et al., 2000. Neural connections of hypothalamic neuroendocrine nuclei in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(7), pp.635–48.
- Saha, A.K. et al., 1997. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *The American Journal of Physiology*, 272(4 Pt 1), pp.E641–8.
- Sakurai, T. et al., 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), pp.573–85.
- Salati, L.M. & Amir-Ahmady, B., 2001. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annual Review of Nutrition*, 21, pp.121–40.
- Salgado-Delgado, R. et al., 2010. Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*, 151(3), pp.1019–29.
- Salgado-Delgado, R.C. et al., 2013. Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption

- and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One*, 8(4), p.e60052.
- Sánchez-Lasheras, C., Könner, A.C. & Brüning, J.C., 2010. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(1), pp.4–15.
- Saper, C.B., 2006. Staying awake for dinner: hypothalamic integration of sleep, feeding, and circadian rhythms. *Progress in Brain Research*, 153, pp.243–52.
- Sato, T.K. et al., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), pp.527–37.
- Scheer, F.A.J.L. et al., 2009. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp.4453–8.
- Schibler, U., Ripperger, J. & Brown, S.A., 2003. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), pp.250–60.
- Schibler, U. & Sassone-Corsi, P., 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell*, 111(7), pp.919–22.
- Van Schothorst, E.M. et al., 2006. Adipose gene expression response of lean and obese mice to short-term dietary restriction. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(6), pp.974–9.
- Schroeder, M. et al., 2009. Development of obesity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(6), pp.R1749–60.
- Schwartz, G.J., 2000. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*, 16(10), pp.866–73.
- Schwartz, G.J. & Moran, T.H., 1994. CCK elicits and modulates vagal afferent activity arising from gastric and duodenal sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 713, pp.121–8.
- Schwartz, M.W. et al., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), pp.661–71.
- Schwartz, M.W. et al., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(5), pp.1101–6.
- Sclafani, A., 1971. Neural pathways involved in the ventromedial hypothalamic lesion syndrome in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 77(1), pp.70–96.
- Scobie, I.N., 1998. Weight loss will be much faster in lean than in obese hunger strikers. *BMJ: British Medical Journal*, 316(7132), p.707.
- Scott, E.M., Carter, A.M. & Grant, P.J., 2008. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *International Journal of Obesity*, 32(4), pp.658–62.

- Segal, J.P. et al., 2005. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 25(16), pp.4181–8.
- Semenkovich, C.F., 1997. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Progress in Lipid Research*, 36(1), pp.43–53.
- Senn, J.J. et al., 2003. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp.13740–6.
- Seres, J. et al., 2004. Evidence for daily rhythms of the expression of proopiomelanocortin, interleukin-1-beta and interleukin-6 in adenopituitaries of male long-evans rats: effect of adjuvant arthritis. *Neuroimmunomodulation*, 11(5), pp.316–22.
- Sethi, J.K. & Hotamisligil, G.S., 1999. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(1), pp.19–29.
- Sherman, H. et al., 2012. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(8), pp.3493–502.
- Shi, S. et al., 2013. Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Current Biology: CB*, 23(5), pp.372–81.
- Shimokawa, T., Kumar, M. V & Lane, M.D., 2002. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), pp.66–71.
- Shostak, A., Husse, J. & Oster, H., 2013. Circadian regulation of adipose function. *Adipocyte*, 2(4), pp.201–6.
- Simmons, R.D. et al., 1998. ARL 15849: a selective CCK-A agonist with anorectic activity in the rat and dog. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 59(2), pp.439–44.
- Simón, E. & Del Barrio, A.S., 2002. Leptina y obesidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 25 Suppl 1, pp.53–64.
- Simpson, K.A., Martin, N.M. & Bloom, S.R., 2009. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 53(2), pp.120–8.
- Sinha, M.K. et al., 1996. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(5), pp.1344–7.
- Smith, G.P. & Gibbs, J., 1992. Role of CCK in satiety and appetite control. *Clinical Neuropharmacology*, 15 Suppl 1, p.476A.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A.K., 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*, 42(4), pp.289–317.

- Somoza, B. et al., 2007. Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity in mice. *Endocrinology*, 148(3), pp.924–31.
- Sonnenburg, W.K. et al., 2009. GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *Journal of Lipid Research*, 50(12), pp.2421–9.
- Sothorn, R.B. et al., 1995. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 95(5 Pt 1), pp.1029–35.
- De Souza, C.T. et al., 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), pp.4192–9.
- Stanley, B.G., Chin, A.S. & Leibowitz, S.F., 1985. Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Research Bulletin*, 14(6), pp.521–4.
- Stapleton, P. a et al., 2008. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, 15(2), pp.79–89.
- Stephan, F.K., 2002. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, 17(4), pp.284–92.
- Steppan et al., 2005. Activation of SOCS-3 by resistin. *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), pp.1569–75.
- Steppan et al., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818), pp.307–12.
- Stucchi, P. et al., 2012. Circadian feeding drive of metabolic activity in adipose tissue and not hyperphagia triggers overweight in mice: is there a role of the pentose-phosphate pathway? *Endocrinology*, 153(2), pp.690–9.
- Stunkard, A.J. & Allison, K.C., 2003. Two forms of disordered eating in obesity: binge eating and night eating. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 27(1), pp.1–12.
- Sugden, M.C., Holness, M.J. & Howard, R.M., 1993. Changes in lipoprotein lipase activities in adipose tissue, heart and skeletal muscle during continuous or interrupted feeding. *The Biochemical Journal*, 292(Pt 1), pp.113–9.
- Sukonina, V. et al., 2006. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), pp.17450–5.
- Sul, H.S. & Wang, D., 1998. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annual Review of Nutrition*, 18, pp.331–51.
- Surwit, R.S. et al., 1995. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J

- and A/J mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 44(5), pp.645–51.
- Szkudelski, T., 2007. Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 56(5), pp.503–12.
- Tartaglia, L.A. et al., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83(7), pp.1263–71.
- Thaler, J.P. et al., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1), pp.153–62.
- Thaler, J.P. & Schwartz, M.W., 2010. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*, 151(9), pp.4109–15.
- Tian, W.N. et al., 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), pp.10609–17.
- Trayhurn, P. et al., 1999. Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 23 Suppl 1, pp.22–8.
- Trayhurn, P. & Wood, I.S., 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*, 92(3), pp.347–55.
- Tsigos, C. et al., 1997. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), pp.4167–70.
- Turek, F.W. et al., 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), pp.1043–5.
- Ueda, H.R. et al., 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics*, 37(2), pp.187–92.
- Umpleby, A.M. et al., 1995. The effect of starvation on leucine, alanine and glucose metabolism in obese subjects. *European Journal of Clinical Investigation*, 25(8), pp.619–26.
- Unger, R.H. et al., 2010. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(3), pp.209–14.
- Unger, R.H., 2003. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), pp.5159–65.
- Unger, R.H., Zhou, Y.T. & Orci, L., 1999. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), pp.2327–32.
- Vainio, P. et al., 1983. Action of lipoprotein lipase on phospholipid monolayers. Activation by apolipoprotein C-II. *Biochemistry*, 22(9), pp.2270–5.

- Vanderhaeghen, J.J. et al., 1992. Cholecystokinin in animal and human brain. *Clinical Neuropharmacology*, 15 Suppl 1, p.474A–475A.
- Vanderhaeghen, J.J., Signeau, J.C. & Gepts, W., 1975. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigestrin antibodies. *Nature*, 257(5527), pp.604–5.
- Vázquez-Vela, M.E.F., Torres, N. & Tovar, A.R., 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of Medical Research*, 39(8), pp.715–28.
- Veech, R.L., Eggleston, L. V & Krebs, H.A., 1969. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *The Biochemical Journal*, 115(4), pp.609–19.
- Verbalis, J.G. et al., 1991. Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 3(2), pp.205–13.
- Virtanen, K.A. et al., 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine*, 360(15), pp.1518–25.
- Vojarova, B. et al., 2001. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity Research*, 9(7), pp.414–7.
- Waddington Lamont, E. et al., 2007. Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. *Neuroscience*, 144(2), pp.402–11.
- Wajchenberg, B.L., 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 21(6), pp.697–738.
- Wakamatsu, H. et al., 2001. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *The European Journal of Neuroscience*, 13(6), pp.1190–6.
- Wakil, S., 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, 28(11), pp.4523–30.
- Wakil, S. & Abu-Elheiga, L.A., 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, pp.S138–43.
- Wang, H. & Eckel, R.H., 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 297(2), pp.E271–E288.
- Wang, H., Storlien, L.H. & Huang, X.-F., 2002. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 282(6), pp.E1352–9.
- Wang, Y. et al., 2011. Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca²⁺-sensing receptor. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(4), pp.G528–37.

- Wang, Z.W. et al., 2001. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(1), pp.108–114.
- Wank, S.A., 1995. Cholecystokinin receptors. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 1), pp.G628–46.
- Wasim, H. et al., 2006. Relationship of serum adiponectin and resistin to glucose intolerance and fat topography in South-Asians. *Cardiovascular Diabetology*, 5, p.10.
- Watts, A.G., Swanson, L.W. & Sanchez-Watts, G., 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 258(2), pp.204–29.
- Weaver, D.R., 1998. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Journal of Biological Rhythms*, 13(2), pp.100–12.
- Webber, J. & Macdonald, I.A., 2000. Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3), pp.397–404.
- Weiland, T.J., Voudouris, N.J. & Kent, S., 2004. The role of CCK2 receptors in energy homeostasis: insights from the CCK2 receptor-deficient mouse. *Physiology & Behavior*, 82(2-3), pp.471–6.
- Weinstock, P.H. et al., 1995. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), pp.2555–68.
- Weisberg, S.P. et al., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp.1796–808.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S. & Kay, S.A., 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72, pp.551–77.
- West, D.B., Fey, D. & Woods, S.C., 1984. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *The American Journal of Physiology*, 246(5 Pt 2), pp.R776–87.
- Whited, K.L., Tso, P. & Raybould, H.E., 2007. Involvement of apolipoprotein A-IV and cholecystokinin1 receptors in exogenous peptide YY3 36-induced stimulation of intestinal feedback. *Endocrinology*, 148(10), pp.4695–703.
- WHO, 2013. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- Wiesner, G. et al., 2006. Increased expression of the adipokine genes resistin and fasting-induced adipose factor in hypoxic/ischaemic mouse brain. *Neuroreport*, 17(11), pp.1195–8.
- Williams, J.R., 2000. The effects of dehydroepiandrosterone on carcinogenesis, obesity, the immune

- system, and aging. *Lipids*, 35(3), pp.325–31.
- Wilson, C. et al., 1995. Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *The Journal of Neuroscience*, 15(7 Pt 2), pp.5169–78.
- Witters, L.A. et al., 1988. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), pp.5473–7.
- Wolfgang, M.J. et al., 2007. Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), pp.19285–19290.
- Wong, H. et al., 1997. A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp.5594–8.
- Woods, S.C. & D'Alessio, D.A., 2008. Central control of body weight and appetite. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 Suppl 1), pp.S37–50.
- Wozniak, S.E. et al., 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(9), pp.1847–56.
- Wyatt, J.K. et al., 2006. Sleep-facilitating effect of exogenous melatonin in healthy young men and women is circadian-phase dependent. *Sleep*, 29(5), pp.609–18.
- Xu, B. et al., 2003. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, 6(7), pp.736–42.
- Xu, Y., Osborne, B.W. & Stanton, R.C., 2005. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(5), pp.F1040–7.
- Yamada, T. et al., 2006. Insulin downregulates angiotensin-like protein 4 mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(4), pp.1138–44.
- Yang, S. et al., 2009. The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. *Endocrinology*, 150(5), pp.2153–60.
- Yang, X. et al., 2009. Validation of candidate causal genes for obesity that affect shared metabolic pathways and networks. *Nature Genetics*, 41(4), pp.415–23.
- Yen, T.T. et al., 1976. An analysis of the relationships among obesity, plasma insulin and hepatic lipogenic enzymes in “viable yellow obese” mice (Avy/a). *Hormone and Metabolic Research*, 8(3), pp.159–66.
- Yeo, G.S.H. et al., 2004. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nature Neuroscience*, 7(11), pp.1187–9.

- Yi, C.-X. et al., 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 147(1), pp.283–94.
- Yin, W. et al., 2009. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(19), pp.13213–22.
- Yokosuka, M. et al., 1998. Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiology & Behavior*, 64(3), pp.331–8.
- Yoo, S.-H. et al., 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), pp.5339–46.
- Yoshida, K. et al., 2002. Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *Journal of Lipid Research*, 43(11), pp.1770–2.
- Yu, K.T. et al., 1990. An insulin-sensitive cytosolic protein kinase accounts for the regulation of ATP citrate-lyase phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 268(3), pp.539–45.
- Yu, Y.-H. & Ginsberg, H.N., 2005. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research*, 96(10), pp.1042–52.
- Zarbin, M.A. et al., 1981. Cholecystokinin receptors: presence and axonal flow in the rat vagus nerve. *Life Sciences*, 29(7), pp.697–705.
- Zhang, Y. et al., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), pp.425–32.
- Zhao, G. et al., 2005. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), pp.909–17.
- Zhong, H. et al., 2010. Liver and adipose expression associated SNPs are enriched for association to type 2 diabetes. *PLoS Genetics*, 6(5), p.e1000932.
- Zhou, Y.T. et al., 1997. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6386–90.
- Ziotopoulou, M. et al., 2000. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279(4), pp.E838–45.

