

**Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica  
Facultat de Medicina  
Universitat de Barcelona**

**IMPLICACIÓ DE LA LEPTINA  
EN L'EFECTE DEL TUNGSTAT  
SÒDIC SOBRE EL PES  
CORPORAL**

**IGNASI CANALS ALMAZÁN**

**Barcelona, 2007**



**PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOLOGIA I  
PATOLOGIA CEL·LULAR, BIENNI 2002-2004, DEL  
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I  
ANATOMIA PATOLÒGICA, FACULTAT DE MEDICINA,  
UNIVERSITAT DE BARCELONA.**

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN  
BIOQUÍMICA

Presentada per:

**IGNASI CANALS ALMAZÁN**

Vist i plau del director:

L'interessat

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Ignasi Canals Almazán



*A MONTSE I A SERGI*

*A MIS PADRES*



Al final de tot, toca fer balanç. Han estat un xic més de cinc anys, en els que hi ha hagut moments per tot, dies en els que els resultats han acompanyat, i molts més en els que hagués estat millor no aixecar-se del llit, però sembla ser que la ciència és això. Afortunadament, he estat envoltat de molta gent amb qui he gaudit en els dies bons, i m'han recolzat quan he patit els danys col·laterals de la ciència. Així doncs, és de rebut un reconeixement públic a tots ells (al cèsar el que és del cèsar).

En primer lloc vull agrair molt especialment al Dr. Ramon Gomis, el concedir-me l'oportunitat d'entrar a formar part del seu laboratori, i de fer-me dipositari, d'un ampli marge de confiança i de llibertat per desenvolupar el projecte. També vull agrair-li l'excel·lent direcció d'aquesta tesi, així com els seus comentaris i les seves idees que ha estat fonamentals per assolir les fites que ens hem anat marcant en tot aquest temps.

Gràcies als “obesos”. A l'Helena i al Marc, per haver-me acollit i format tant bé quan vaig arribar. A la Moreno per la capacitat infinita de treball, per l'alegria que has donat al lab cada dia i per donar-me sempre la raó. A la Marta Amigó, per aquest aire fresc, tant bo, que ha entrat amb tu. A la Mamen, per donar-me l'empenta final i per compartir sense miraments el teu temps i els teus infinits coneixements sobre la despesa energètica. I per, en sentit literal i figurat, fer-nos respirar a tots!! A la Sílvia i a la Yaiza, pels vostres comentaris que sempre han aportat quelcom.

A tots els companys de trinxera, Palau, Maria, Jordi, i Laura, per l'ajuda i els consells. Us desitjo que el vostre pas per l'univers dels becaris sigui breu.

A la Marta Julià, segur que en el fons em trobaràs a faltar, jo si. Espero que les factures, els jefes, els investigadors, els tècnics i tot ésser viu que es mou pel lab, no t'atabalin excessivament.

Als Doctors. Rosa, Felip, Eugènia, Conxi, Albert, Belen, Imma, Sílvia Casas, i a la nova fornada la Melina i la Marzo, tots heu aportat amb els vostres consells. Gràcies Albert per ser la referència històrica del tungstat i per saber tant sobre tot. Evidentment, gràcies Belen pel teu suport, el teu humor, la teva manera de fer i la teva sapiència, poques vegades valorades. El reconeixement està en el dia a dia.

A tots els tècnics que tant m'heu aportat, Isabel, Josep, Lúdia i Ainhoa.

Sandra, m'he esforçat, però al final no he aconseguit ubicar-te, així que tens una altre categoria per tu soleta, la becaria-tècnic-pluriprojecte, ja te mèrit això. Gràcies per acompanyar-me i portar-me de la maneta, aquests anys (al final ja gairebé he caminat sol). Sempre m'has donat un cop de mà o un suggeriment, tot i que la feina et desbordés, i a més, amb un somriure a la cara, així em toca treure'm el barret.

A la Roser Casamitjana, per l'ajut en les diverses determinacions bioquímiques. A l'Analía i al Paco Artigas per iniciar-me en el camí del cervell, un camí que haurem de continuar.

A la M<sup>a</sup> Jesús, per posar-me en contacte amb en Ramon. Al meu tiet Antonio, per aquell primer “Cheminova”, potser l'inici de tot això.

A tothom que m'hagi pogut descuidar, no és mala fe, és mala memòria. Espero que com a mínim us ho hagués agraït en el seu moment.

Al “*témpano de hielo*”, que m'ha permès afrontar els moments complicats, a l'Earvin pel “*show-time*”, i als *midiclorians* per mantenir-me en el límit del revers tenebrós de la força.

A mis amigos. A Óscar y a Virginia, con quien hemos compartido momentos muy especiales, ¡seguro que les ha tocado sufrir parte de los problemas derivados de la tesis. A la quinta de Sant Quirze, David, Yolanda, Iratxe, Marc, Vanesa, Judith, Jacobo, Mireia, Jose, Anna, Eva, Isabel y Roger, es un placer haberos reencontrado años después, y pasarlo como antaño o mejor. (Y no me olvido del Max y la Sapa, que son como uno más).

A mi familia, gracias a mis padres, que siempre me lo han dado todo y muchas veces han sido ellos quienes más han empujado, a pesar de recibir escasos agradecimientos y reconocimiento. Ahora es el momento de mi redención, gracias por todo, mi pequeño “éxito” es vuestro. A mi hermano, por ser tan “excepcional”, quizás, en parte, todo esto ha sido para intentar seguir tu estela y evitar que no fueses tú el único que hacía bien las cosas. En el fondo has sido un ejemplo para mí (pero nunca se lo diré a nadie).

A mi familia “política”, por el interés y el inmenso apoyo.

A ti, Montse, porque contigo sobran los motivos.

A tu, Sergi Canals Roldán, per ser l’alegria i la joia. Per canviar-ho tot i per ser, junt amb la teva mare, la meva força impulsora.

I a tu, que tard o d’hora arribaràs, no se d’on, però ja dones empenta.



# ÍNDEX



<b><u>I. ABREVIATURES</u></b>	1
<b><u>II. INTRODUCCIÓ</u></b>	5
<b>1. OBESITAT</b>	5
1.1. Etiologia multifactorial de l'obesitat	5
1.1.1. <i>factors genètics</i>	6
1.1.2. <i>factors ambientals</i>	9
1.2. Criteris per la definició d'obesitat	10
1.3. Estudis epidemiològics	14
1.4. Patologies associades a l'obesitat	16
1.5. Tractament de l'obesitat	24
1.6. Models experimentals d'obesitat	27
1.6.1. <i>Models genètics</i>	27
1.6.2. <i>Models d'obesitat induïda mitjançant la dieta</i>	31
1.7. Aspectes econòmics relacionats amb l'obesitat	32
<b>2. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA: CONTROL DEL PES CORPORAL</b>	33
2.1. Regulació de la ingesta	37
2.2. Despesa energètica	45
2.2.1. <i>Activitat física</i>	46
2.2.2. <i>Termogènesi</i>	47
2.2.2.1. <i>Regulació de la termogènesi</i>	48
2.2.2.2. <i>Regulació de la termogènesi adaptativa</i>	49
2.2.2.3. <i>Proteïnes desacobllants</i>	51
2.2.2.4. <i>Senyals reguladores de la termogènesi adaptativa</i>	57
2.2.2.5. <i>Regulació del gen Ucp1</i>	59

<b>3. LEPTINA: HORMONA REGULADORA DE L'HOMEÒSTASI ENERGÈTICA</b>	60
3.1.La leptina	60
3.2.El receptor de la leptina	64
3.3.Mecanismes de senyalització del receptor de la leptina	65
3.4.Efectes centrals i perifèrics de la leptina	68
3.5.Regulació central de la ingesta i de la despesa energètica per la leptina: via de transducció del senyal	69
<b>4. TUNGSTAT SÒDIC</b>	71
4.1.Efecte del tungstat en l'obesitat	73
4.2.Efecte del tungstat en la diabetis mellitus	75
4.3.Toxicitat del tungstat	77
<b><u>III. MATERIALS I MÈTODES</u></b>	79
<b>1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ</b>	79
1.1.Models animals	79
1.2.Dietes	80
1.3.Tractament amb tungstat	81
1.4.Tractament amb leptina	82
1.5.Monitoratge del pes i de la ingesta	82
<b>2. TRASPLANTAMENT DE TEIXIT ADIPÓS EN RATOLINS <i>ob/ob</i></b>	82
2.1.Trasplantament del teixit adipós	83
2.2.Extirpació del teixit adipós	84

<b>3. PROTOCOLS D'EXTRACCIÓ I OBTENCIÓ DE FLUIDS I TEIXITS</b>	<b>84</b>
3.1.Obtenció de sang i plasma	84
3.2.Obtenció de teixits	85
<b>4. MESURES METABÒLIQUES</b>	<b>85</b>
<b>5. ANÀLISI HISTOLÒGICA I MORFOMÈTRICA DEL TEIXIT ADIPÓS</b>	<b>87</b>
<b>6. AILLAMENT DE L'RNA I ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA</b>	<b>89</b>
6.1.Obtenció de l'RNA de teixits	89
6.2.Quantificació de la concentració i de la puresa de l'RNA	91
6.3.Integritat de l'RNA	91
6.4.Retrotranscripció de l'RNA	93
6.5.PCR quantitativa	94
<b>7. TEST DE PREFERÈNCIA GUSTATIVA</b>	<b>101</b>
<b>8. CALORIMETRIA INDIRECTE</b>	<b>103</b>
<b>9. RESPIROMETRIA D'ALTA RESOLUCIÓ</b>	<b>105</b>
9.1.Principis de la respirometria d'alta resolució	105
9.2.Aïllament i manteniment de les mostres	106
9.3.Mesures de mostres	107
9.3.1. Mesura de biòpsies de teixit adipós marró	107
9.3.2. Mesura d'adipòcits marrons	108

10. TAMPONS I SOLUCIONS	109
<b><u>IV. PRESENTACIÓ I OBJECTIUS</u></b>	111
<b><u>V. RESULTATS</u></b>	113
<b>1. RESULTATS PRÈVIS AL DISSENY DE LA HIPÒTESI I DELS OBJECTIUS</b>	113
1.1. Efecte del tungstat sobre la termogènesi en rates Wistar	114
1.2. Efectes del tungstat sobre la palatabilitat de la solució de beguda en rates Wistar i ratolins C57BL/6	117
<b>2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE EL PES CORPORAL I EL BALANÇ ENERGÈTIC EN MODELS AMB DEFICIÈNCIES EN EL SISTEMA DE LA LEPTINA</b>	120
2.1. Rata Zucker <i>fa/fa</i>	120
2.1.1. <i>Efecte del tungstat sobre el pes corporal i l'adipositat</i>	120
2.1.2. <i>Efecte del tungstat sobre el balanç energètic</i>	124
2.1.3. <i>Efecte del tungstat sobre els paràmetres bioquímics</i>	127
2.2. Ratolí <i>ob/ob</i>	129
2.2.1. <i>Efecte del tungstat sobre el pes corporal i l'adipositat</i>	129
2.2.2. <i>Efecte del tungstat sobre el balanç energètic</i>	131
2.2.3. <i>Efecte del tungstat sobre els paràmetres bioquímics</i>	135
2.3. Trasplantament de teixit adipós en ratolins <i>ob/ob</i>	137
2.3.1. <i>Validació del protocol de trasplantament</i>	138
2.3.2. <i>Efecte del tungstat en ratolins ob/ob trasplantats amb teixit adipós</i>	140

<b>3. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE ELS NIVELLS D'EXPRESSION DE mRNA DE NEUROPEPTIDS HIPOTALÀMICS EN RATOLINS <i>ob/ob</i></b>	149
<b><u>VI. DISCUSSIÓ</u></b>	153
<b><u>VII. CONCLUSIONS</u></b>	165
<b><u>VIII. BIBLIOGRAFIA</u></b>	167





# I. ABBREVIATURES



- Acac $\alpha$*** : gen codificant per a l'acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$ .
- AGRP**: Pèptid relacionat amb la proteïna agouti.
- AMPc**: monofosfat d'adenina cíclic.
- aP2**: proteïna d'unió a àcids grassos.
- ARC**: nucli arcuat.
- ATP**: trifosfat d'adenina.
- BMI**: índex de massa corporal.
- C/EBP**: CCAAT/ proteïna d'unió a *enhancer* (amplificador).
- CART**: transcrit regulat per cocaïna i amfetamina.
- CCK**: colecistocinina.
- CO-I i IV**: subunitats I i IV de la citocrom oxidasa.
- CRE**: element de resposta a AMPc.
- CREB**: proteïnes d'unió a elements de resposta a l'AMPc.
- CRF**: factor alliberador de corticotropina.
- CT-1**: cardiotropina 1.
- DM1**: diabetis mellitus tipus 1.
- DM2**: diabetis mellitus tipus 2.
- DMH**: hipotàlem dorsomedial.
- ERK**: cinasa regulada per senyal extracel·lular.
- FADH<sub>2</sub>**: dinucleòtid de flavina i adenina.
- Fasn***: gen codificant per a l'àcid gras sintasa.
- GDP**: difosfat de guanidina.
- GLP1**: pèptid similar al glucagó 1.
- HDL**: lipoproteïna d'alta densitat.
- HSL**: lipasa sensible a hormona.
- ICV**: intracerebroventricular.
- IGF**: factor de creixement de la insulina
- IGFBP**: proteïna d'unió a IGF.
- IL-6/11/12**: interleucina 6/11/12.

## Abreviatures

**IRS:** substrat del receptor de la insulina.

**JAK:** cinasa janus.

**LDL:** lipoproteïna de baixa densitat.

**Lepr:** gen codificant pel receptor de la leptina.

**LH:** hipotàlem lateral.

**LPL:** lipoproteïna lipasa.

**MC3R /MC4R:** receptor  $\frac{3}{4}$  de la melanocortina.

**MCH:** hormona concentradora de melanina.

**mCPT-1:** isoforma muscular de la carnitina-palmitoiltransferasa.

**mRNA:** àcid ribonucleic missatger.

**NA:** noradrenalina.

**NAc:** nucli accumbens.

**NADH:** dinucleòtid de nicotina i adenina.

**NEAT:** termogènesi associada a l'activitat física no programada.

**NEFA:** àcids grassos no esterificats.

**NO:** òxid nítric.

**NPY:** neuropèptid Y.

**NTS:** nucli del tracte solitari.

**Ob:** gen codificant per a la leptina.

**OB-R:** receptor de la leptina.

**OB-Rb:** forma llarga del receptor de la leptina.

**ODC:** rata obesa induïda mitjançant dieta de cafeteria.

**PC1:** prohormona convertasa 1.

**PDX-1:** proteïna *homeobox* pancreàtica/duodenal 1.

**PGC1 $\alpha$ :** coactivador de PPAR $\gamma$  1 $\alpha$ .

**PKA:** proteïna cinasa A

**POMC:** proopiomelanocortina.

**PPAR:** receptor activador de la proliferació de peroxisomes.

**PPRE:** element de resposta a PPAR.

**PTP:** fosfotirosina fosfatasa.

**PVN:** nucli paraventricular.

**RAAS:** sistema renina-angiotensina-aldosterona

**RAR:** receptor de l'àcid retinoic 11-trans.

**RARE:** element de resposta a l'àcid retinoic.

**RNA:** àcid ribonucleic.

**ROS:** espècies reactives de l'oxigen.

**RXR:** receptor de l'àcid retinoic 9-cis.

**RZL:** rata *Zucker lean*.

**RZO:** rata *Zucker fa/fa*.

**SNC:** sistema nerviós central.

**SNS:** sistema nerviós simpàtic.

**SOCS3:** supressor del senyal de citocines 3.

**STAT:** senyal transductor i activador de la transcripció.

**STZ:** estreptozotocina.

**TA:** teixit adipós.

**TAB:** teixit adipós blanc.

**TAM:** teixit adipós marró.

**TG:** triglicèrids.

**TH:** hormona tiroïdal.

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosi tumoral  $\alpha$ .

**TRE:** element de resposta a l'hormona tiroïdal.

**TRH:** hormona alliberadora de tirotropina.

**UCP:** proteïna desacobladora.

**VEGF:** factor de creixement vascular endotel·lial.

**VLDL:** lipoproteïna de molt baixa densitat.

**VMH:** hipotàlem ventromedial.

**VTA:** area tegmental ventral.

**ZDF:** rata *Zucker diabètica*.

## Abreviatures

**$\alpha$ MSH:** hormona estimuladora del melanòcit.

**$\beta$ -AR:** receptor  $\beta$ -adrenèrgic.

## II. INTRODUCCIÓ





## **1. L'OBESITAT**

L'obesitat, tal i com descriuen els estudis realitzats per la WHO (*World Health Organization*), ha esdevingut una pandèmia de proporcions alarmants, més de 1000 milions d'adults pateixen sobrepès i 250 milions són clínicament obesos [1]. A més aquesta patologia és la que causa més malalts crònics i minusvalies.

El progressiu augment en el consum de dietes amb un alt contingut calòric, juntament amb la disminució de l'activitat física, tan present en les societats industrialitzades, ha triplicat el nombre de casos d'obesitat des dels anys 80. Però l'obesitat no queda restringida a les zones més desenvolupades del planeta, ans al contrari, són els països en vies de desenvolupament els que estan augmentant més ràpidament el seu nombre d'afectats.

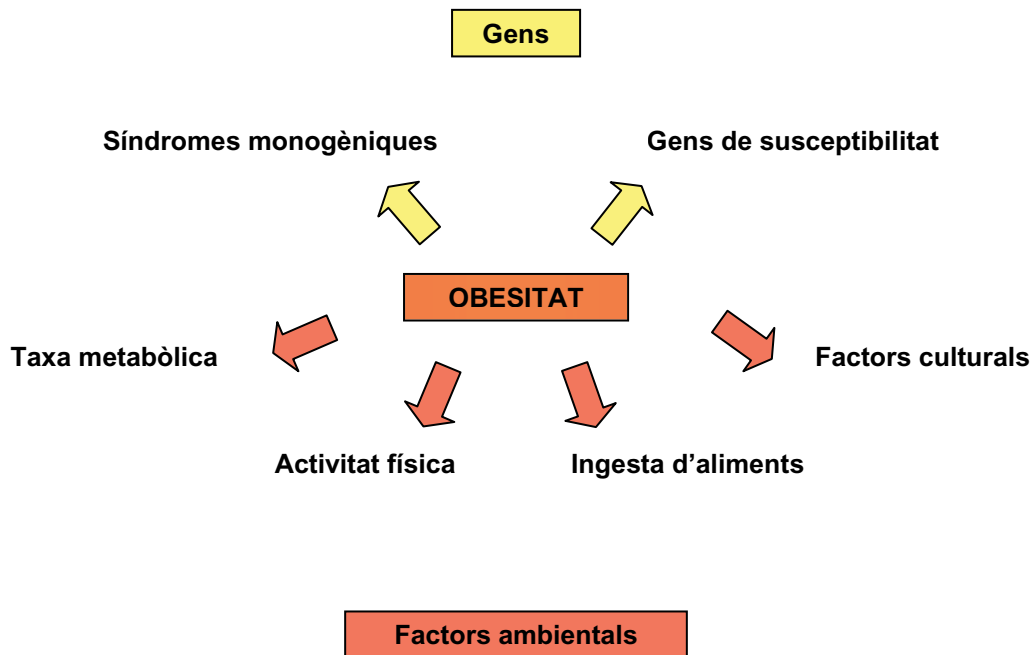
L'obesitat és doncs, un problema global, que el componen múltiples factors com els econòmics, els socials i, evidentment, factors sanitaris. En conseqüència es fa imperatiu trobar solucions a aquesta epidèmia, que incloguin tots aquests factors.

Aquesta tesi pretén fer un cop d'ull a la fisiopatologia de l'obesitat, i centrar-se en l'estudi del mecanisme d'acció del tungstat sòdic, una substància que recentment s'ha demostrat eficaç en la lluita contra l'obesitat [2].

### **1.1. ETIOLOGIA MULTIFACTORIAL DE L'OBESITAT**

L'aparició de l'obesitat és el resultat d'interaccions entre factors genètics, ambientals, psicològics, socials i culturals que condueixen a un desequilibri energètic i, en conseqüència, a una excessiva acumulació de greix. La

contribució relativa de cada factor ha estat estudiada intensament i, malgrat que les diferències genètiques són de vital importància, està àmpliament acceptat que són els factors ambientals i els de comportament els responsables principals de l'actual epidèmia d'obesitat.



**Figura 1.** Factors implicats en el desenvolupament de l'obesitat (figura traduïda de P.G. Kopelman [3])

### 1.1.1. Factors genètics

La vessant genètica ha estat fonamental en el recent avenç que s'ha realitzat en el camp de la regulació del pes corporal. La majoria de mutacions detectades en rosegadors, que es segreguen com a trets mendelians, han estat clonades i han permès la identificació de mutacions homologues que, en humans, són responsables del desenvolupament de l'obesitat. Aquestes mutacions han permès descriure o ampliar el

coneixement de certes vies bioquímiques implicades en la regulació de la homeòstasi energètica.

La percepció actual de l'obesitat, molt influenciada per estereotips populars, fa que aquesta sigui considerada com a un problema de golafreria i una manca de voluntat. Això evidencia la importància dels factors ambientals i psicològics en la patologia. No obstant, la importància en l'etiopatogènia de l'obesitat de certs factors genètics dins d'un context ambiental determinat, està ja, fora de tot dubte [4]. La contribució genètica en el desenvolupament de l'obesitat es fonamenta en diverses observacions i determinacions realitzades en individus amb diversos vincles familiars i de conducta. Aquestes observacions han descrit l'existència de famílies amb predominança d'obesitat [5]. A més, s'ha observat una major concordança de l'índex de massa corporal (BMI) entre bessons monozigòtics que entre dizigòtics que comparteixen ambients similars [4, 6]. Fins i tot, s'ha determinat que el BMI de fills adoptats es relaciona linealment amb el dels pares biològics, inclús quan no hi ha contacte directe entre ells, i en canvi no hi ha relació amb el dels pares adoptius, amb els que comparteixen hàbits alimentaris i estil de vida [7]. Aquestes evidències, juntament amb d'altres, han permès estimar l'heretabilitat de l'obesitat en un 50-90% [4]. No obstant, l'augment desmesurat de l'obesitat en els darrers anys, demostra que la relació entre la patologia i la genètica és més complexa, i que es fa evident la presència de quelcom més que els paràmetres genètics. Les evidències indiquen que l'obesitat és una patologia oligogènica, que pot ser modulada per múltiples gens que estableixen una complexa xarxa de comunicació entre ells i amb factors ambientals, com poden ser la dieta i l'activitat física entre d'altres [8]. Aquestes conclusions es reafirmen en les observacions realitzades en rosegadors, on l'efecte del *background* genètic sobre l'adipositat en

resposta a dietes hipercalòriques és superior al que s'observa al comparar diferents *backgrounds* genètics sotmesos a una dieta d'igual contingut calòric, és a dir, que les diferències d'adipositat en soques congèniques s'incrementen amb les aportacions calòriques de les dietes, indicant les relacions entre l'ambient i els gens [4].

A banda de les síndromes de rara prevalença associades a l'obesitat (Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alström o Coehn, entre d'altres), les influències genètiques semblen actuar, en la immensa majoria de casos, a través de gens de susceptibilitat. Aquests gens poden conferir una predisposició a patir la malaltia, però no són, ni essencials, ni suficients per desenvolupar-la. Els estudis de Bouchard [9] realitzats en germans bessons, recolzen aquesta hipòtesi, suggerint l'existència d'una susceptibilitat genètica a desenvolupar l'obesitat sota unes circumstàncies ambientals concretes.

Durant els darrers anys s'han dut a terme nombrosos estudis amb l'objectiu d'identificar la base genètica d'aquesta predisposició i determinar gens candidats. En aquest sentit, l'avenç més espectacular ha estat el descobriment del gen *ob* i del seu producte, la leptina. La hipòtesi immediata, que postulava que l'obesitat humana podria ser producte d'una deficiència d'aquesta proteïna, va ser truncada en comprovar-se que l'obesitat humana transcorre amb elevades concentracions d'aquesta hormona [10]. Tot i haver estat identificat el gen *ob* en humans, les alteracions genètiques d'aquest gen són extremadament rares [11, 12], i causen un fenotip d'hiperfàgia, hipogonadisme i obesitat mòrbida. La cerca d'una hipòtesi per tal d'explicar els elevats valors de leptina en humans obesos, va permetre descobrir el gen codificador del receptor de la leptina (*Lepr*) [13]. La mutació d'aquest gen també s'ha descrit excepcionalment [14], causant un fenotip similar al descrit per la deficiència de la leptina. Altres mutacions monogèniques descrites en humans, que causen obesitat,

són les mutacions sobre els gens de POMC [15] i de PC1 [16], ambdues amb pocs casos descrits, i sobre el gen del MC4R, aquest últim força més prevalent, ja que es detecta entre el 3 i el 5 % d'individus amb obesitat mòrbida [17-19].

Els gens candidats exposats codifiquen, majoritàriament, per proteïnes implicades en la regulació de la ingesta a través del sistema de la leptina i de la via de la melanocortina. Les vies de regulació del pes corporal descrites a partir de les formes monogèniques d'obesitat, han permès el desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques. Així ho demostra, per exemple, l'èxit de l'administració de leptina en pacients amb deficiència en aquesta hormona [20]. Malgrat tot, les mutacions comentades únicament poden explicar un percentatge ínfim de la prevalença de l'obesitat. En la majoria de casos, el desenvolupament de l'obesitat obeeix a una raó poligènica, on la combinació d'aquests i/o altres gens, conjuntament amb factors ambientals, incrementa la susceptibilitat a desenvolupar obesitat a través de diferents mecanismes. Són diversos els gens que han estat associats amb alteracions de la taxa metabòlica, el metabolisme lipídic, la funció de l'adipòcit, la termogènesi i/o la ingesta.

### **1.1.2. Factors ambientals**

Però, com és que el genoma humà conté una bateria gènica tan àmplia que permet una acumulació de greix que esdevé excessiva i, fins i tot, patològica?. La resposta pot estar en la teoria del gen estalviador (*thrifty gene*) formulada per Neel [21]. En ella, es suggereix que la gran capacitat d'emmagatzemar energia en forma de greix és un mecanisme de defensa que hauria facilitat la supervivència dels nostres antecessors en els primers temps de la presència humana a la terra. La successió de diversos períodes en el que l'aliment escassejava, va afavorir la supervivència d'aquells

individus que eren capaços d'emmagatzemar més eficientment les calories ingerides durant períodes d'excés d'aliments, en detriment d'aquells individus desproveïts d'aquesta capacitat. Aquestes èpoques de fam s'han repetit periòdicament durant la història de la humanitat, fent possible la selecció d'una raça amb un alt potencial d'emmagatzemar energia. Desafortunadament, dos successos claus en la història recent han fet manifestar la tendència a desenvolupar obesitat en aquesta raça seleccionada. Per una banda, la revolució industrial, on els humans van desenvolupar màquines capaces de realitzar les tasques que fins aquell moment feien els homes, causant una disminució important de la despesa energètica diària. En segon lloc, i més recentment, la globalització de la cultura occidental, caracteritzada per un fàcil accés a dietes d'elevada palatabilitat i d'alt contingut calòric, i per una vocació sedentària activitats lúdiques dominades per la televisió i pels ordinadors [22]. Tot això ha provocat que l'avantatge genètic que ens aportava el "gen estalviador" s'hagi tornat en contra fent que allò que en principi era un caràcter genètic adaptatiu, hagi deixat de ser-ho [23, 24].

### **1.2. CRITERIS PER LA DEFINICIÓ D'OBESITAT:**

L'obesitat es defineix com un excés en la acumulació de teixit adipós. El greix corporal és difícil de mesurar, no obstant, s'han establert diversos índexs que correlacionen l'obesitat amb paràmetres antropomètrics i/o físics. El fet de que aquests índexs hagin estat elaborats a partir d'estudis realitzats en poblacions caucasianes, en major o menor mesura limiten el seu ús en certs grups ètnics [25, 26]. No obstant, l'inassolible cost de les determinacions rutinàries del greix corporal mitjançant tècniques com la

tomografia o la ressonància magnètica [27, 28], fan d'aquests índex les eines més útils en la pràctica clínica.

L'obesitat, el pes, l'alçada i el contingut de teixit adipós són paràmetres continus, i en conseqüència, és difícil determinar el punt on comença el sobrepès o l'obesitat, i identificar els individus o grups amb risc de morbiditat i els casos on cal la intervenció clínica. Per tant és útil establir classificacions a partir de valors discrets dels índexs d'obesitat. En aquesta línia, la WHO i el NIH (*National Institutes of Health*), han proposat uns criteris de classificació del sobrepès en funció del BMI (*Body Mass Index*) aplicables a adults de qualsevol edat i sexe [29] [taula 1].

- **BMI**: es defineix com la relació entre el pes i l'alçada al quadrat. Aquest és l'índex més emprat per la seva facilitat de càlcul i la bona correlació amb la proporció de teixit adipós [30].

$$\mathbf{BMI = pes (Kg) / Alçada (m)^2}$$

S'han descrit estretes relacions entre el BMI i la incidència de certes malalties cròniques causades per l'excés de greix, com la diabetis mellitus tipus 2, hipertensió, malalties coronaries i osteoartritis [31-33]. Aquestes relacions són aproximadament lineals per a valors de BMI menors de 30 (Kg/m<sup>2</sup>), però el risc de patir aquestes malalties s'incrementen molt en persones amb BMI superior a 30, independentment del gènere [3].

Taula 1: Definició dels diferents graus de sobrepès (adaptat de Kopelman PG [3])

<b>BMI (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classificació WHO</b>	<b>Descripció popular</b>
< 18.5	Pes insuficient	Prim
18.5 - 24.9	Normopes	Normal, saludable
25.0 - 29.9	Sobrepès grau 1	Sobrepès
30.0 – 39.9	Sobrepès grau 2	Obesitat
> 40.0	Sobrepès grau 3	Obesitat mòrbida

Aquest índex presenta altres inconvenients a més de les diferències poblacionals abans esmentades. Les mesures en les que es basa el BMI no distingeixen entre la massa greixosa i la massa magre, això provoca interpretacions equivocades en certes patologies on la relació de teixits es desvia dels paràmetres normals, com lesions de la medul·la espinal [34], patologies relacionades amb l'alteració de la densitat òssia [35] o la dismòrfia muscular, més popularment coneguda com complex d'Adonis o vigorèxia [36].

- **Circumferència de la cintura:** és la mesura, en centímetres, de la circumferència del cos a l'alçada del punt mig entre el final de les costelles i la part superior de la pelvis. Determina principalment el greix abdominal, i es correlaciona bé amb el risc de malaltia coronària, hipertensió, diabetis mellitus tipus 2 i els nivells de lípids en sang [37, 38]. Aquesta mesura presenta com a major complicació, la diferent distribució del greix entre gèneres, és per això, que s'han d'establir punts de tall diferents entre homes i dones per definir el risc de complicacions metabòliques. S'ha determinat



que amb una circumferència igual o superior a 94 cm, en el cas dels homes, i de 80 cm en les dones, s'arriba al nivell 1 en el risc a patir malalties metabòliques. En mesures superiors a 102 cm en homes i 88 cm en dones s'arriba al nivell 2. El nivell 1 indica risc potencial de patir malalties coronaries, mentre que al nivell 2 s'han d'iniciar accions terapèutiques. Aquest índex també presenta l'inconvenient de no mesurar amb precisió el greix intrabdominal.

- **Relació entre el perímetre de la cintura i del maluc:** Aquest índex permet establir l'existència d'obesitat intrabdominal, presenta una alta correlació amb el BMI [39, 40] i s'ha correlacionat amb complicacions metabòliques independents del sobrepès o obesitat [38, 41].

- **Plecs cutanis:** Aquest índex s'obté del valor mesurat, en centímetres, amb l'ajut de *calipers* en els plecs subescapulars, suprailíacs, del bíceps i del tríceps. Aquesta mesura, presenta com a principal desavantatge els problemes d'homogeneïtzació de mesures entre els diferents observadors, a més de no donar informació sobre el greix intrabdominal ni intramuscular.

- **Bioimpedància:** Aquesta mesura es basa en el principi que la massa magra és millor conductor del corrent elèctric que el greix. Amb aquesta tècnica es mesura la impedància o resistència al pas d'un corrent de baix voltatge aplicat en les extremitats del cos, i mitjançant equacions empíriques, es pot estimar el contingut de greix corporal en funció de la impedància [42]. Aquest índex no presenta massa avantatges respecte les mesures antropomètriques, ja que tampoc mesura directament el teixit adipós.

Existeixen altres mètodes menys comuns o que s'està determinant la seva correlació amb l'obesitat. Aquests són: la mesura del volum abdominal [37], el desplaçament d'aire [43] o la ultrasonografia [44].

### **1.3. ESTUDIS EPIDEMIOLÒGICS**

Per definir l'obesitat com a pandèmia i com a problema de salut pública capdavanter, només cal que ens fixem en la seva evolució en els darrers anys, i en el fet que la malaltia es troba estesa tant en països industrialitzats com en països en vies de desenvolupament. Es calcula que entre el 50 i el 60% de la població pateix sobrepès o obesitat [45].

Als Estats Units de Nord-Amèrica, les quotes de sobrepès i obesitat s'alcen fins al 60% en adults i el 30% en infants i adolescents [46]. Les morts relacionades amb aquesta patologia ascendeixen anualment a 300 000, esdevenint una de les primeres causes de mortalitat en aquest país. El cost anual relacionat amb la malaltia s'ha estimat que ascendeix a 117 000 milions de dòlars, el que representa entre un 5% i un 7% dels costos mèdics totals dels Estats Units de Nord-Amèrica [47]. Totes aquestes dades conjuntament amb l'evidència de la progressió de la malaltia, fan esdevenir aquest país el paradigma de l'obesitat.

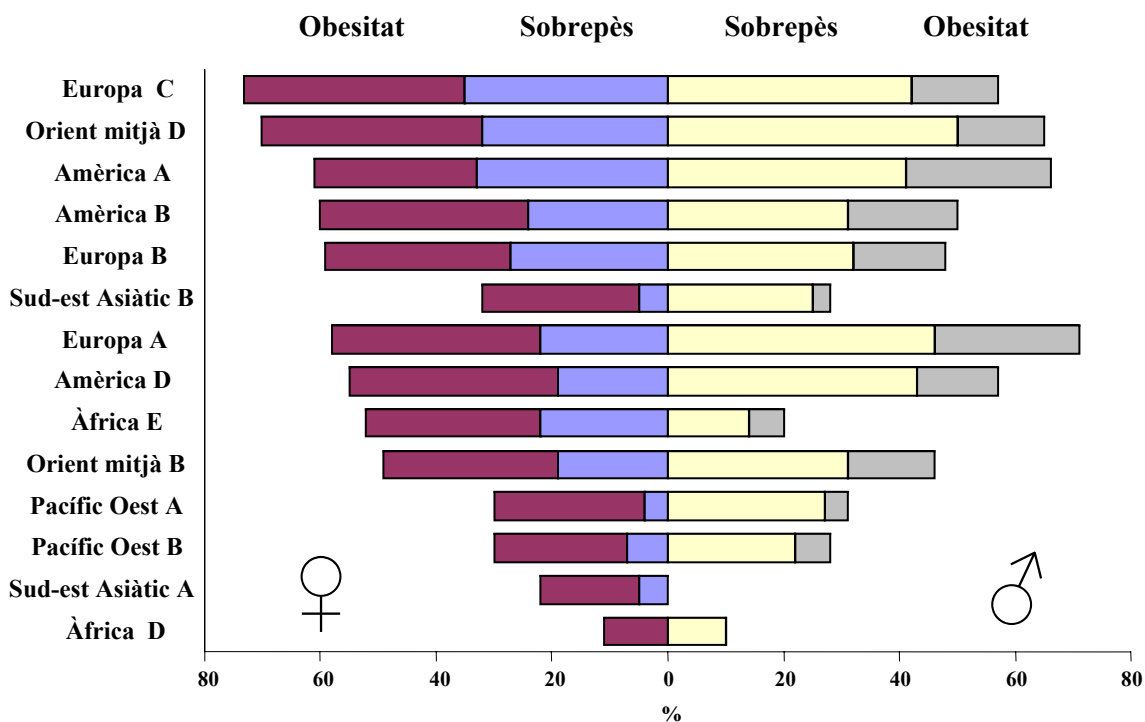
Els estudis NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) [48, 49] han recollit dades antropomètriques a nivell dels Estats Units de Nord-Amèrica durant els anys 1960-2002. En ells s'observa que, als darrers quaranta anys, s'ha produït un increment progressiu tant de pes corporal com de BMI en tota la població, accelerant-se l'increment en les dues últimes dècades. També s'ha constatat que no hi ha diferències de tendències entre sexes, entre rangs d'edats ni tampoc entre grups ètnics [45, 50]. Així doncs, la mitja de pes entre els nord-americans ha incrementat un

14% en el cas dels homes i un 17% en les dones, arribant a nivells de BMI de 27.9 i 28.2 respectivament [50, 51].

A nivell mundial, la WHO ha desenvolupat un projecte per monitoritzar el risc de malaltia cardiovascular, l'estudi MONICA (*Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease*). Aquest estudi ha estat útil per determinar els valors d'obesitat a nivell mundial en els anomenats països desenvolupats. Les dades que recull aquest estudi descriuen el comportament de l'obesitat entre els anys 1980 i 1995 en persones d'edat compresa entre els 35 i 64 anys. L'estudi presenta uns nivells menors d'obesitat que als Estats Units de Nord-Amèrica. No obstant lluny de mantenir-se aquests nivells, existeix la mateixa tendència a l'increment del pes i del BMI que al país nord-americà. Així doncs, Regne Unit presenta un percentatge de població adulta obesa del 24%, Espanya i Alemanya del 14.5% , i Itàlia, França i Suècia presenten nivells menors amb un 7%. Si considerem conjuntament l'obesitat i el sobrepès, la major prevalença s'observa a Grècia, Espanya, Alemanya i Regne Unit amb valors al voltant del 35%, afectant més a les dones que als homes [52-54].

Però l'augment de la prevalença de l'obesitat no és exclusiu dels països desenvolupats, ja que és als països considerats en vies de desenvolupament on s'està registrant un major augment en la incidència de la malaltia [Fig. 2] i està esdevenint un important problema sanitari [3, 55, 56]. L'estudi dels components de la dieta en aquests països, són reveladors de la causa de l'augment de l'obesitat, ja que existeixen correlacions positives entre l'increment de consum de greixos, de carbohidrats i de volum total de ingesta amb el BMI [57]. A nivell d'Espanya les dades més recents que es disposen són del 2001, resultants dels estudis realitzats per la SEEDO (*Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad*) [58], d'ells es desprèn que el 45,0 % dels homes i el 32,3 % de les dones presenten sobrepès, mentre que el 13.4% dels homes i el 15.7% de les dones són obesos.

Resulta també alarmant l'increment de la incidència en l'obesitat infantil, que ha passat de ser del 5% al 1984 al 15% actual.



**Figura 2.** Estimació de la prevalença d'obesitat en persones d'edat compresa entre 45 i 49 anys en diferents zones del món. L'estudi ha inclòs un total de 191 països. Per il·lustrar la naturalesa de cada regió, els tres països de major població s'especificuen en la següent llista: *Àfrica D*: Nigèria, Algèria i Ghana. *Àfrica E*: Etiòpia, Congo i Sud-àfrica. *Amèrica A*: Estat Units de Nord-Amèrica, Canada i Cuba. *Amèrica B*: Brasil, Mèxic i Colòmbia. *Amèrica D*: Perú, Equador i Guatemala. *Orient mitjà B*: Iran, Emirats Àrabs i Aràbia Saudita. *Orient mitjà D*: Pakistan, Egipte i Sudan. *Europa A*: Alemanya, França i Regne Unit. *Europa B*: Turquia, Polònia i Uzbekistan. *Europa C*: Rússia, Ucraïna i Kazakhstan. *Sud-est asiàtic B*: Indonèsia, Tailàndia i Sri Lanka. *Sud-est asiàtic D*: India, Bangladesh, and Myanmar. *Pacífic oest A*: Japó, Austràlia i Singapur. *Pacífic oest B*: Xina, Vietnam i Filipines. (Adaptat de James P.T. [55])

#### 1.4.PATOLOGIES ASSOCIADES A L'OBESITAT

L'obesitat esdevé clínicament important pel fet de ser un condicionant de la salut del pacient i per associar-se amb diverses patologies de pronòstic greu. Aquestes patologies associades a l'obesitat poden estar causades pels canvis metabòlics vinculats a l'excés d'adipositat, o per l'increment d'adipositat *per se*. L'obesitat pot afectar a la majoria dels òrgans, des del

cervell fins a les extremitats inferiors, causant múltiples alteracions clíniques.

### **Resistència a la insulina i diabetis mellitus tipus 2:**

La relació entre l'obesitat i la resistència a la insulina s'ha descrit en tots els grups ètnics. La insulina i l'adipòcit estableixen una estreta relació, per una banda, l'adipòcit és un dels tipus cel·lulars de l'organisme amb major resposta a aquesta hormona, per l'altre, la insulina regula processos claus de la biologia de l'adipòcit: promou la diferenciació dels preadipòcits a adipòcits, estimula la lipogènesi i inhibeix la lipòlisis [59]. La resistència a la insulina es defineix com un decrement en l'efecte de la insulina enfront el metabolisme, l'emmagatzemament i la captació de glucosa. Aquesta patologia es caracteritza per una disminució de la captació de glucosa en múscul i en teixit adipós, a més d'una fallida en la supressió de la secreció de glucosa hepàtica [60-64]. El greix intrabdominal està relacionat més fortament amb la resistència a la insulina que el greix subcutani [65]. Això es degut a una major secreció d'adipocitocines i d'àcids grassos per part dels dipòsits de greix intrabdominal. S'han descrit relacions entre certes adipocitocines i el descens de sensibilitat a la insulina en múscul i en fetge. De fet, s'ha descrit que TNF- $\alpha$  redueix l'acció de la insulina en múscul [66], i que els àcids grassos alliberats pels adipòcits incrementen la resistència a la insulina en fetge i múscul mitjançant mecanismes que afecten a la senyalització intracel·lular de la insulina [67]. A més s'ha observat que l'adiponectina, que provocaria una millora en la sensibilitat a la insulina [68], veu disminuïts els seus nivells circulants en pacients obesos [69, 70]. En l'informe presentat pel National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III [71, 72], es defineixen els criteris que s'han de complir per diagnosticar resistència a la insulina. El diagnòstic és

positiu per la resistència a la insulina, quan es donen alhora tres o més dels següents criteris:

	<b>HOMES</b>	<b>DONES</b>
<b>Circumferència de la cintura</b>	>102 cm	>88 cm
<b>Concentració colesterol-HDL</b>	< 40 mg/dl	< 50 mg/dl
<b>Concentració triglicèrids</b>	≥ 150 mg/dl	
<b>Concentració de glucosa en dejú</b>	≥ 110 mg/dl	
<b>Pressió sanguínia</b>	≥ 130 / ≥ 85 mm Hg	

En el cas dels obesos, aquest valors són comuns en la majoria de casos, evidenciant la relació existent entre l'obesitat i la resistència a la insulina.

En els estadis inicial de la resistència a la insulina, el pàncrees és capaç de respondre a aquest conjunt d'anomalies produint més insulina, i assolint el que s'anomena estat d'hiperinsulinèmia compensatòria [3]. Tanmateix, aquesta sobrecàrrega secretora acaba per provocar la fallida de la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica i l'aparició de diabetis de tipus 2 (DM2), que representa el 90% dels individus diabètics, i afecta a la majoria d'obesos. Per una altre banda, l'obesitat s'ha reconegut com a factor de risc per desenvolupar diabetis [73, 74], i malgrat que no tots els obesos desenvolupen la malaltia, s'ha associat l'augment de la prevalença d'obesitat amb l'augment de la prevalença de la diabetis [75].

**Dislipèmia:**

La dislipèmia es defineix com l'alteració de la taxa hemàtica dels lípids. Les anomalies en el perfil lipídic observades en l'obesitat, principalment en l'obesitat central, consisteixen en l'augment dels nivells circulants de triglicèrids i de colesterol, a més de l'augment del nombre de partícules de VLDL i LDL i una disminució de les HDL [73, 76, 77]. El primer defecte causat per l'obesitat en el metabolisme lipídic, sembla ser la sobreproducció de VLDL en fetge, causada per la disminució de la capacitat de la insulina per reduir la secreció de glucosa i dels NEFA en el teixit adipós. Paral·lelament a aquesta sobreproducció, es redueix l'aclariment de lipoproteïnes riques en TG, per una disminució de l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL) [78] que provoca la disminució de la transferència d'apolipoproteïnes i fosfolípids dels TG, reduint els nivells de HDL. Un altre punt clau en la regulació dels nivells de lípids en sang és el receptor de LDL, responsable de l'aclariment de les partícules VLDL, i que, en pacients obesos, es troba parcialment desactivat. A resultes d'aquests processos el perfil lipídic dels obesos esdevé aterogen i es correlaciona amb risc de malaltia cardiovascular [79] i de resistència a la insulina [78].

**Hipertensió**

La hipertensió és la patologia associada a l'obesitat més coneguda, tot i que els mecanismes concrets que lliguen ambdues patologies encara no s'han aconseguit descriure. S'ha demostrat l'existència d'una associació lineal entre el BMI i el percentatge de gent amb hipertensió arterial [49]. El percentatge d'hipertensos entre la població obesa es situa al voltant d'un 35% [80]. En dones, aquesta correlació es fa més evident, arribant a multiplicar-se per quatre el risc de patir hipertensió en dones amb BMI  $\geq 30$  mg/Kg<sup>2</sup> respecte les dones amb BMI de 21 mg/Kg<sup>2</sup> [81]. S'han observat

alteracions a nivell hemodinàmic en la hipertensió lligada a obesitat, són l'increment del volum intravascular i la resistència vascular perifèrica, aquesta última conseqüència de la incapacitat que té l'organisme de donar resposta a l'increment del volum intravascular. L'increment d'aquest volum, tal i com mostren els estudis realitzats en diferents models animals, podria estar causat per alteracions a nivell renal que provocarien alteracions en la natrúria [82, 83]. El sistema renina–angiotensina–aldosterona (RAAS), en pacients obesos, s'ha observat hiperactivat [84], suggerint un plausible paper clau del RAAS en la hipertensió lligada a l'obesitat. A més, no es pot deixar de banda la predisposició genètica dels individus a patir aquestes alteracions, que sembla rellevant, tal i com suggereix el fet de que no tots els hipertensos siguin obesos i que s'observi una alta prevalença d'hipertensió entre els membres d'una mateixa família [24].

### **Malalties coronàries**

L'obesitat s'ha relacionat amb diverses anomalies del cor. En un estudi realitzat en la població nord-americana s'ha observat un increment significatiu en la prevalença de malalties coronàries, diabetis, hipertensió i hipercolesterolèmia amb l'increment del pes corporal en qualsevol gènere, grup ètnic i grup socioeconòmic [85]. La infiltració de greix en el miocardi, la hipertròfia ventricular dreta, l'excés de greix epicàrdic, l'augment de la pressió del ventricle dret i les anomalies en la funció ventricular, són alteracions de l'estructura i la funció cardíaca recurrents en pacients amb un historial de llarga durada d'obesitat [86]. L'obesitat també pot ser causant d'arítmies i d'interval·ls perllongats de QT, que són factors que predisposen a la mort sobtada [87]. En casos d'obesitat mòrbida s'ha demostrat que, tot i tenir una capacitat cardiopulmonar normal, la capacitat per realitzar esforços físics està reduïda respecte els individus prims [88].



**Alteracions renals**

Les disfuncions renals associades a l'obesitat inclouen canvis del ronyó a nivell morfològic i estructural. La glomerulomegàlia i la glomerulesclerosi s'han associat no tan sols amb obesitat, sinó també amb el sobrepès [24, 89]. Les adaptacions funcionals més importants del ronyó en una situació d'obesitat són l'augment de la filtració glomerular, l'increment del flux sanguini al ronyó i la hipertrofia renal. L'obesitat té els mateixos efectes que la diabetis sobre el ronyó, amb una fase inicial de hiperfiltració glomerular seguida de microalbuminúria. A aquesta fase l'hi segueix una fallida progressiva de la filtració glomerular i un augment en l'excreció d'albúmina que desemboca en proteïnúria i en certs casos en una fallida renal [90]. Això suggereix que la hiperfiltració glomerular és la causa principal de la glomerulopatia relacionada amb l'obesitat [91].

**Hiperuricèmia:**

La hiperuricèmia s'observa freqüentment en pacients obesos degut a una sobreproducció d'àcid úric i una deficient excreció renal lligada a la síntesi d'àcids grassos a fetge [92]. També s'ha proposat la hiperinsulinèmia com un factor que contribueix a aquesta anomalia, mitjançant una disminució en l'eficiència excretora del ronyó, que limita l'aclariment de l'àcid úric. S'ha descrit que amb millores en la resistència a la insulina causades per dietes hipocalòriques o per fàrmacs que augmenten la sensibilitat de la insulina, la concentració en sang d'àcid úric en pacients obesos i hipertensos es redueix [93, 94].

**Càncer**

Les evidències de l'existència d'algun tipus de relació causal entre l'obesitat i certs tipus de càncer augmenten amb la publicació de nous estudis. Els estudis realitzats per Calle i col·laboradors [95, 96] sobre una

població superior a 900 000 individus a Nord-Amèrica i amb un seguiment de 16 anys, mostren clarament que l'obesitat augmenta el risc de patir qualsevol tipus de càncer, i augmenta la mortalitat en alguns tipus específics de càncer com de ronyo, còlon, recte [97], pit (en dones postmenopàusiques) [98], ovari, pàncrees [99], pròstata i endometri [100]. Estudis en altres poblacions mostren resultats similars [101]. En els estudis de Moore i col·laboradors [102], s'ha observat que el grau d'obesitat central és el millor indicatiu de risc de càncer de còlon, el que implica la distribució de greix corporal com a element a tenir en compte a l'hora de fer l'estudi de la relació entre obesitat i càncer. El mecanisme que relaciona l'obesitat amb el càncer encara no s'ha arribat a dilucidar, no obstant hi ha diverses hipòtesis que relacionen ambdós patologies a través de processos inflamatoris, estrès oxidatiu i resistència a la insulina. L'IGF1 (*insulin-like growth factor*) es troba en el centre d'aquestes hipòtesis, ja que nivells elevats d'IGF1 s'han associat amb diversos tipus de càncer (pit, ovari, pròstata i bufeta) [103]. L'obesitat central i la insulina promouen l'augment i l'activació d'IGF1, que, en estats de sobrenutrició, promou la proliferació cel·lular i inhibeix l'apoptosi [104]. Tot i que no hi ha increments d'IGF1 en pacients amb un BMI elevat, els investigadors accepten que hi ha una major proporció d'IGF1 lliure capaç de promoure la diferenciació cel·lular [105]. Augments en la proteïna IGFBP-3, que uneix IGF1 impedit la seva unió al receptor i per tant la seva activitat proliferativa, s'han mostrat eficaços en la prevenció de diversos tipus de càncers [106, 107].

### **Alteracions respiratòries**

És freqüent la disfunció pulmonar en pacients obesos que desemboca en un menor volum de reserva expiratori degut a dipòsits de greix subcutanis que causen alteracions en la musculatura pulmonar. Els pacients obesos tendeixen a ventilar exclusivament els camps aeris superiors el que provoca

episodis de disminució de la concentració d'oxigen en sang (hipoxèmia) i d'increment de la concentració de diòxid de carboni (hipercàpnia). En pacients amb un BMI molt alt, a més s'uneixen problemes d'hipoventilació, el que provoca el desenvolupament del síndrome de Pickwick, caracteritzat per hipersomnolència diürna en persones obeses [24, 108]. Una alteració força comú entre els obesos és l'apnea obstructiva de la son, de fet la prevalença de l'apnea en pacients obesos és del 40%, i arriba al 98% en obesos mòrbids [109, 110]. La causa d'aquesta anomalia escau en que els pacients tenen dipòsits de greix adjacents a la faringe, al paladar i a la úvula, el que provoca l'estenosi de la via nasofaríngia [111]. També hi ha una implicació del SNC, ja que decau la seva activitat durant certes fases del son provocant la disminució del to muscular del diafragma, contribuint al col·lapse de les vies respiratòries [24].

### **Malalties osteoarticulars**

Limitacions en la funció locomotora, com la pèrdua de flexibilitat i el dolor articular, així com l'osteoartritis, han estat relacionades amb l'obesitat [112-114]. Si bé, moltes d'aquestes alteracions es localitzen en les articulacions de les extremitats inferiors (coxofemoral, genoll i turmell) i en les intervertebrals, que són responsables de suportar el pes del cos en major mesura, també s'han observat en d'altres articulacions que no han de suportar pes, suggerint la presència d'altres mecanismes de l'obesitat que alteren el cartílag i el metabolisme ossi independentment del pes.

### **Complicacions psicològiques**

Els prejudicis i la discriminació contra els obesos persisteix, tot i l'increment mundial de la prevalença d'obesitat i el coneixement del component genètic. La causa d'aquestes actituds negatives es troben en la idealització d'un físic prim en la nostra cultura [115-117], i una de les

conseqüències és l'estrès crònic de les persones que pateixen obesitat. No obstant, l'assumpció de que l'obesitat està fortament relacionada amb trastorns psicològics i emocionals, no està totalment acceptada entre la comunitat científica per la manca de mostres representatives de la societat, de l'ús d'eines de validació clínica, de definicions poc concretes de sobrepès i obesitat, així com la utilització de grups controls inadequats en els primers estudis realitzats [115, 118, 119]; a més d'altres evidències, com que a la majoria dels pacients obesos no se'ls diagnostica depressió [120], dificulten l'acceptació de l'existència de complicacions psicològiques associades a l'obesitat. S'han realitzat noves generacions d'estudis en els que s'ha intentat relacionar els aspectes psicològics amb l'obesitat [49, 121-127], però el problema de l'heterogeneïtat en la personalitat dels pacients obesos esdevé un escull que, de moment, no s'ha aconseguit eludir. Les conclusions d'aquests darrers estudis, a falta de fer-ne més i millors, han determinat una relació entre l'obesitat i depressió en dones, essent la depressió en l'edat adolescent la desencadenant de l'obesitat en posteriors etapes de la vida adulta [126]. En homes obesos no s'estableix cap relació entre el BMI i la depressió, en canvi, en dones obeses la depressió és un 37% superior que en dones primes. Aquesta diferència en la incidència de trastorns psicològics entre gèneres, s'explica per la major pressió social que reben les dones per assolir els canons estètics actuals, i no per una relació causal amb l'obesitat, que encara no s'ha demostrat empíricament.

### **1.5. TRACTAMENT DE L'OBESITAT**

La disminució de pes en pacients obesos millora, i fins i tot elimina les patologies associades a l'obesitat [128]. Un objectiu realista en el tractament contra l'obesitat es basa en aconseguir una disminució d'entre el

5 i e 10 % del pes corporal en un període de 6 a 12 mesos, seguit d'un control a llarg termini per mantenir el pes aconseguit. Els tractaments no farmacològics inclouen teràpies de conducta, exercici físic i dieta. L'objectiu d'aquestes teràpies de conducta consisteix en inculcar al pacient una sèrie de canvis en l'estil de vida beneficiosos per al bon desenvolupament del programa de tractament [129]. L'activitat física és un component fonamental en qualsevol programa de disminució o manteniment del pes corporal. La intensitat de l'activitat física s'ha de regular en funció de les capacitats del pacient, però el punt de major incidència és l'assiduitat en la seva pràctica. S'ha de tenir en compte que el tractament de l'obesitat mitjançant l'activitat física provoca un increment de la ingesta com a resposta compensatòria del desequilibri en el balanç energètic. Això provoca una eficàcia relativa en la pèrdua de pes en períodes d'activitat física moderada i perllongats [130], i, en conseqüència, es recomana l'associació de dietes hipocalòriques a l'exercici. Aquestes dietes hipocalòriques, han de garantir l'equilibri dels micro i dels macronutrients, i per tant cal que aquestes estiguin dissenyades per especialistes que l'adeqüin a les necessitats de cada pacients

El tractament farmacològic de l'obesitat esdevé necessari en aquells casos en els que els canvis en l'estil de vida, amb increment de l'activitat física i la reducció de la ingesta calòrica, no esdevé satisfactori, o no provoca una pèrdua de pes sostinguda, causant, en conseqüència, un guany després d'un determinat temps.

Actualment es disposa de dos fàrmacs amb llicència pel tractament de l'obesitat.

### **Orlistat (*Xenical*)**

L'orlistat és un derivat de la lipostatina aïllada de la bactèria *Streptomyces toxytincini*, que actua com inhibidor de lipases intestinals bloquejant el

centre actiu d'aquestes, evitant la hidròlisi dels TG a àcids grassos i monoglicèrids, que són molècules capaces de ser absorbides a nivell intestinal. Així doncs, l'orlistat causa un descens del 30% en l'absorció intestinal de lípids [131, 132]. Els efectes secundaris descrits per a aquest fàrmac inclouen diarrees, incontinència fecal, dolor abdominal i elevat contingut lipídic fecal. A més, s'ha descrit un increment en la hiperfàgia, com a conseqüència de l'increment en l'alliberació de colecistocinina (CCK) [133]. Associat a la malabsorció causada pel fàrmac, els pacients també disminueixen l'absorció de vitamines liposolubles (vitamines A, D, E i K), per la qual cosa, normalment s'associa una suplementació de la dieta amb vitamines al tractament.

El tractament amb orlistat s'ha mostrat eficaç en pacients obesos, ja que aquests perden un 10,3 % de pes corporal en un any, mentre que els tractats amb placebo només redueixen el pes corporal un 6,3 % [134]. La pèrdua de pes causada pel tractament s'observa que és significativa després de quatre anys de tractament.

### **Sibutramina (*Meridia, Reductil*)**

La sibutramina és una  $\beta$ -fenetilamina que actuant sobre receptors monoaminèrgics inhibeix la recaptació de serotonina i noradrenalina [135, 136]. Aquesta inhibició provoca una disminució de la ingesta en els pacients tractats [137] i causa un increment en la termogènesi [136]. Els efectes secundaris descrits per aquest fàrmac inclouen alteracions cardiovasculars com l'increment en la pressió sistòlica i diastòlica, increment del ritme cardíac, taquicàrdia, palpitations i vasodilatació. El tractament amb sibutramina en pacients obesos causa una baixada de pes corporal durant els sis primers mesos (11,3 Kg), seguida d'un lleuger guany de pes durant els 12 mesos següents, però menor que els pacients tractats amb placebo [138].

A més d'aquests dos fàrmacs, n'hi ha un altre que està en fase clínica III, amb unes molt bones perspectives, és el rimonabant (*Acomplia*, *SR141716*). Aquest fàrmac és una neuroquinina antagonista i selectiva del receptor endocannabinoid CB1, responsable de la reducció de la ingesta, de la sensació de gana i del pes corporal [139-142]. Els resultats descrits en l'estudi RIO, mostren una reducció del pes corporal de 8,2 Kg en 1 any, el que representa una pèrdua significativament superior a la del grup tractat amb placebo que és de 5,8 Kg en el mateix període [143]. La millora d'aquest fàrmac respecte als altres dos anteriorment descrits, és que l'efecte reductor de pes continua 9 mesos després d'arribar a l'estabilització, un període superior al de l'orlistat i la sibutramina.

## **1.6. MODELS EXPERIMENTALS D'OBESITAT**

Els models experimentals d'obesitat han esdevingut una eina essencial per a l'estudi d'aquesta patologia. La seva utilització ha permès aprofundir en el coneixement dels diferents aspectes de la malaltia, alhora que realitzar aproximacions difícilment viables en humans. Actualment existeixen múltiples models d'obesitat, cadascun d'ells amb determinades característiques útils per a l'abordatge d'objectius concrets. A grans trets, els models experimentals d'obesitat es poden classificar en genètics o en induïts per dieta. A continuació es detallen algunes de les característiques més rellevants d'aquests models d'experimentació emprats en recerca.

### **1.6.1. Models genètics d'obesitat**

**Ratolí *ob/ob*:** Aquest model experimental es va descobrir l'any 1949 al Jackson Laboratory (Maine, EEUU). Els ratolins presenten una mutació

autosòmica recessiva en el gen *ob*, la qual provoca perturbacions neuroendocrines que els hi confereixen una capacitat conversió de l'energia en greix inusualment eficient. Al 1994 es va caracteritzar que aquesta mutació corresponia al gen de la leptina [144]. En els ratolins homozigots, aquesta mutació produeix obesitat, resistència a la insulina a nivell hepàtic i muscular a partir de la 4<sup>a</sup> setmana d'edat, i hiperglicèmia transitoria entre la 8<sup>a</sup> i la 12<sup>a</sup> setmana, que es reverteix a conseqüència d'una hiperplàsia i hipertròfia compensatòria de la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica entre les setmanes 12 i 16 [145]. A més presenten intolerància a la glucosa, infertilitat, defectes en la regulació de la temperatura corporal, hiperfàgia i disregulació d'enzims glicolítics i gluconeogènics. Els ratolins heterozigots, *ob/+* i els *+/+*, no desenvolupen aquestes anomalies.

**Ratolí *db/db*:** la mutació *db* (*diabetes*), de caràcter autosòmic recessiu provoca, com a resultat final, el truncament de la isoforma llarga del receptor de la leptina [146]. Aquesta alteració evita la transducció correcta del senyal a través d'aquest receptor. El fenotip del ratolí *db/db* es caracteritza per hiperfàgia, aparició prematura d'obesitat, resistència a la insulina i hiperleptinèmia. La severitat d'aquestes alteracions estan determinades pel *background* genètic de la soca en qüestió.

**Ratolí fat (*Cpe<sup>fat</sup>*):** Aquest és un model d'obesitat d'aparició progressiva i tardana, essent evident entre la 8<sup>a</sup> i 12<sup>a</sup> setmana i severa a partir de la 16<sup>a</sup>. El gen *fat* codifica per a la carboxipeptidasa E [147], l'enzim encarregat de processar la proinsulina. El fenotip que presenta aquest model es caracteritza per obesitat i per hiperproinsulinèmia, a més de manifestar hiperglicèmies transitòries en mascles.



**Ratolí tubby (*tub/tub*):** Aquest ratolí fenotípicament és similar al ratolí *fat*, es a dir, presenta aparició tardana d'obesitat associada a hiperinsulinèmia progressiva sense hiperglicèmia. La mutació que presenta és autosòmica recessiva, i consisteix en una transversió que resulta en la transcripció aberrant d'un gen que codifica per un factor de transcripció activat per receptors acoblats a proteïna-G [148].

**Ratolí Agouti (*A<sup>y</sup>/a*):** Aquest va ser el primer model identificat d'obesitat causada per una mutació monogènica en ratolí [149]. La proteïna agoutí regula la pigmentació del pèl, i la mutació (autosòmica dominant) en aquest gen provoca l'aparició de pelatge groguenc, a més de la seva expressió ectòpica. En el SNC antagonitza principalment el receptor 4 de la melanocortina (MC4R), provocant obesitat, hiperfàgia, DM2 i augment del creixement.

**Rata Zucker (*fa/fa*):** Des de la seva descripció l'any 1961, aquest model ha esdevingut el més popular per a l'estudi de diversos aspectes de l'obesitat en rata. Fenotípicament es caracteritza per presentar hiperfàgia, aparició prematura d'obesitat, termogènesi alterada, resistència a la insulina i hiperlipèmia sense alteracions en la glicèmia. Aquest conjunt d'anomalies estan causades per una mutació en el gen *fa* que codifica pel receptor de leptina [150]. El model ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*), aparegut espontàniament de la soca Zucker *fa/fa*, presenta les mateixes alteracions fenotípiques, a més de DM2.

**Rata Koletsky (*fa<sup>k</sup>/fa<sup>k</sup>*):** Aquest model experimental, és força similar a la rata Zucker *fa/fa*, i presenta un fenotip pràcticament indistingible. La diferència entre ambdós models radica en la mutació del gen *fa*, essent en el cas de la rata Koletsky, causant de la deficiència de tots els subtipus de

receptors de leptina, mentre que la rata Zucker únicament presenta deficiències en la isoforma llarga del receptor [151, 152].

**Ratolí ( $db^{3j}/db^{3j}$ ):** Aquest ratolí presenta, al igual que la rata Koletsky, la deficiència de tots els subtipus de receptors de la leptina [153], i estableix la mateixa relació amb els ratolins  $db/db$ , que la rata Koletsky amb la rata Zucker  $fa/fa$ .

Existeixen altres models animals amb formes poligèniques d'obesitat com els ratolins New Zealand Obese, BSB, AKR o la rata *Psammomys obesus* [149]. Aquests es caracteritzen per una aparició d'obesitat tardana i menys severa en comparació a les formes monogèniques. Habitualment, en aquests tipus de models experimentals, el desenvolupament de l'obesitat està associat a determinades manipulacions de tipus dietètiques.

Un altre grup de models animals emprats en recerca són els models manipulats genèticament, ja sigui a través de la sobreexpressió o la deleció total o parcial de determinats gens. Emprar tècniques de manipulació genètica, ha permès l'estudi focalitzat de la implicació d'un o de diversos gens en l'obesitat. Aquest ha estat el cas dels gens que codifiquen per a les UCPs [154-156], els receptors  $\beta$ -AR [157-160] o NPY [161] entre d'altres, que s'han mostrat importants en la patologia. En aquest sentit, les aproximacions transgèniques conformen un ampli i expansiu grup de models experimentals que, no només, han permès ampliar el coneixement sobre la funció de determinats gens, sinó que a més, s'han convertit en eines útils per a estudis més concrets de l'obesitat.

### 1.6.2. Models d'obesitat induïda mitjançant dieta

Experimentalment s'han portat a terme una gran quantitat de manipulacions dietètiques amb l'objectiu d'induir obesitat en diferents models animals. Aquestes manipulacions han anat des de dietes forçades, canvis en la disponibilitat de nutrients, fins a canvis en la composició de la dieta [149]. Aquesta darrera aproximació ha estat la més emprada, donant lloc a múltiples dietes per a l'estudi de l'obesitat, com dietes riques en greixos, riques en carbohidrats o dietes de cafeteria, cadascuna amb les seves característiques especials i amb diferents efectes sobre el pes i la composició corporal.

Les dietes de cafeteria, que s'han emprat en diversos protocols experimentals en aquesta tesi, van ser descrites a mitjans dels anys 70 com un sistema alimentari alternatiu per a la inducció d'obesitat [162]. Aquestes consisteixen en l'administració d'aliments d'alta palatabilitat i d'elevat contingut lipídic disponibles en qualsevol establiment d'alimentació per a humans. La seva semblança amb les dietes consumides pels humans, ha convertit aquest tipus de dieta en una òptima opció per a l'estudi de l'obesitat.

La gran variabilitat de dietes sorgides al voltant del concepte de dieta de cafeteria, ha provocat una elevada heterogeneïtat d'efectes descrits, però de forma genèrica, es pot concloure que les dietes de cafeteria administrades a rosegadors provoca l'aparició d'obesitat [162] i d'hiperfàgia [163], acompanyats d'un augment en la deposició de greix [164] i en la termogènesi [165]. Addicionalment, també s'ha descrit que la dieta de cafeteria provoca hiperleptinèmia, hiperinsulinèmia i hipercortisolisme [166], així com una disminució en la secreció de l'hormona del creixement (GH) [167] i un desenvolupament en la hipertensió [168]. A nivell

molecular, s'han demostrat canvis en l'expressió de les proteïnes desacobladores [169-171], en el receptor  $\beta_3$ -AR [172] i en el PPAR $\gamma$  [173]. L'anàlisi del patró alimentari demostra una elevada preferència pel consum d'aliments de la dieta de cafeteria en comparació amb el pinso estàndard [174], fet que demostra la gran apetibilitat d'aquesta dieta. A més, l'eficàcia en l'inducció d'obesitat d'aquestes dietes és força superior a les dietes descrites anteriorment, fins al punt d'aconseguir desenvolupar obesitat en soques resistents als efectes de les dietes convencionals riques en greixos o carbohidrats [162].

Tanmateix, les dietes de cafeteria presenten certes limitacions. La varietat d'aliments i composició d'aquestes dietes dificulta una quantificació precisa en les mesures d'ingesta alimentària. D'altre banda, existeixen preferències individuals per a determinats aliments, fet que provoca certa heterogeneïtat en la ingesta nutricional a nivell individual, tot i que, com s'ha demostrat, la proporció de lípids, de proteïnes i de carbohidrats ingerida es manté constant entre els diferents animals [175].

### **1.7. ASPECTES ECONÒMICS RELACIONATS AMB L'OBESITAT**

Tot i que no es l'objectiu d'aquesta tesi estudiar les relacions entre l'obesitat i els aspectes socioeconòmics, és imprescindible tenir una visió el més ampla possible, amb la finalitat d'obtenir un perfil més acurat de la població afectada per la patologia. És evident que en aquesta malaltia incideixen negativament, a més dels factors genètics, les males conductes alimentaries i el sedentarisme. Ambdues conductes evidencien forts lligams amb el nivell socioeconòmic i cultural. Estudis actuals han demostrat que les franjes socials més desfavorides i amb ocupacions laborals de menor

qualificació presenten un major índex d'obesitat [176]. Queda així palès que l'obesitat és una malaltia que té com a agent causant aspectes molt diversos, que la solució és complexa i que s'ha d'afrontar des de diversos fronts.

## **2. HOMEÒSTASI ENERGÈTICA: CONTROL DEL PES CORPORAL**

Una altre definició d'obesitat, és que aquesta és resultant dels desequilibris en l'homeòstasi energètica causats per una ingesta calòrica que sobrepassa les necessitats de l'organisme. Si visualitzem l'organisme des d'una perspectiva més termodinàmica, veurem que la energia emmagatzemada (greix) és igual la energia administrada (nutrients) menys la despesa energètica realitzada per l'organisme, entenent com a despesa energètica la conversió de nutrients i oxigen en diòxid de carboni, aigua i calor, més el treball realitzat per l'organisme sobre el medi. Així doncs, aplicant les lleis de la termodinàmica, podem descriure l'obesitat amb la següent equació:

$$\text{Energia acumulada (adipositat)} = \text{Energia administrada (íngesta)} - \text{Despesa energètica (treball + calor)}$$

D'aquesta forma, la ingesta i la despesa energètica són els punts essencials en la regulació del balanç energètic i l'obesitat. El coneixement de la regulació d'ambdós processos esta esdevenint prioritari des de fa varies

dècades, amb la finalitat d'esbrinar els mecanismes d'actuació per aturar l'obesitat.

La regulació del balanç energètic resulta força complexa, i està controlada per múltiples factors genètics i ambientals, com la diversitat de les dietes, l'activitat física, alguns fàrmacs o productes químics, i fins i tot per agents infecciosos, que actuen sobre un o ambdós extrems de la balança energètica. Tothom és conscient del fet que el nostre organisme té capacitat per rectificar els petits desequilibris que es produeixen en el balanç energètic. Es pot observar que ningú s'engreixa per un àpat copios o per romandre un període curt sense activitat física. Així doncs, l'organisme reacciona modificant els nivells de despesa energètica o d'ingesta, en funció de la situació energètica d'un moment determinat. El problema de l'obesitat esdevé quan aquests desequilibris es mantenen per un temps perllongat. De fet no cal que aquests desequilibris entre la energia administrada i la despesa energètica siguin elevats per augmentar el pes corporal amb el temps. Tal i com demostrà Weigle [177] només cal una variació del 0.17% en el balanç energètic durant un període de 10 anys perquè una persona incrementi modestament el pes corporal. Més recentment s'ha calculat el guany ponderal causat per les petites desviacions diàries en el balanç energètic en persones adultes. El promig de calories ingerides per un adult es de 2000 Kcal/dia, en canvi la despesa energètica es situa entre 1850 i 1950 Kcal/dia, provocant un desequilibri aproximat de 50 – 150 Kcal/dia (un 2.5 – 7.5 % del total de calories ingerides). Aquestes diferències mantingudes per un període d'1 any provoquen un guany de pes de 2.5 Kg, en el cas de la mínima desviació, i de fins a 7.5 Kg en el cas de la major desviació [178]. Aquestes dades impliquen la necessitat d'un sistema de regulació del balanç energètic pel control del pes corporal amb un elevadíssim grau de precisió, alhora que amb un nivell de robustesa màxima. Establert fa més de 50 anys, el model

de “regulació negativa d’adipositat” es fonamenta en la premissa que senyals circulants informen al sistema nerviós central (SNC) dels canvis en la composició i en la quantitat de teixit adipós, i, que en resposta a aquestes senyals, el cervell organitza els canvis adaptatius en el balanç energètic necessaris per corregir i per estabilitzar els nivells corporals de teixit adipós [179]. El criteris proposats per a les senyals de regulació negativa de l’adipositat són: i) han de circular a nivells proporcionals a la massa adiposa, i han de poder traspasar la barrera hematoencefàlica; ii) han de promoure la pèrdua de pes corporal mitjançant l’acció sobre els sistemes neuronals implicats en el control de la homeòstasis energètica; iii) el blocatge d’aquestes accions neuronals incrementen la ingesta i el pes corporal. Tot i que múltiples nutrients (p.ex. àcids grassos i glucosa), citocines (p.ex. IL-6 i TNF $\alpha$ ) i hormones (p.ex. glucocorticoides) compleixen alguns d’aquests criteris, fins al moment només s’ha descrit la leptina i la insulina com úniques molècules que compleixen íntegrament els tres criteris [180]. La insulina, que es va observar que entrava a cervell des de la circulació sistèmica [181] i que produïa una disminució de la ingesta [182], va ser la primera hormona que es va implicar en el control del pes corporal mitjançant el SNC. Posteriorment i arrel de la demostració de l’obesitat i la hiperfàgia severa que presentaven els ratolins *ob/ob* com a conseqüència de la mutació en el gen codificant per la leptina [144], es va determinar aquesta hormona com a segona senyal d’adipositat. Ambdues hormones circulen a nivells proporcionals a l’adipositat corporal [183, 184], traspassen la barrera hematoencefàlica [181, 185], presenten receptors en neurones involucrades en la ingesta [186-188], la seva administració directa en cervell redueix la ingesta [182, 189, 190] mentre que la deficiència d’aquestes hormones produeix l’efecte oposat [144, 191]. Els estudis realitzats en organismes primitius, com el nematode *Caenorhabditis elegans*, o la mosca de la fruita, *Drosophila melanogaster*,

han implicat la insulina com a molècula clau en el control ancestral en la regulació negativa dels dipòsits energètics corporals [192, 193]. En comparació, la leptina no s'ha descrit en animals invertebrats, indicant que probablement, l'hormona, ha evolucionat posteriorment [194]. No obstant, el *cross-talk* entre les vies de senyalització d'ambdues hormones en les subpoblacions neuronals on actuen, ofereixen una evidència d'una evolució compartida [195]. Diverses observacions en estudis genètics i farmacològics [20, 144] han suggerit un rol més crític de la leptina que no pas de la insulina en el control de la homeòstasis energètica a nivell de SNC. Per exemple, la deficiència en leptina provoca obesitat severa i hiperfàgia, tot i l'elevada concentració d'insulina dels individus. Per contra, la deficiència en insulina no induïx obesitat. No obstant, aquesta comparació entre ambdues hormones no es pot simplificar tant, ja que, per exemple, la insulina juga un paper clau en la síntesis de leptina en els adipòcits, incorporant així, un nou grau de complexitat en l'elecció de l'hormona responsable de la senyalització d'adipositat.

Existeix en ampli consens en considerar l'hipotàlem com el principal centre integrador de les senyals reguladores d'adipositat del SNC, i per tant el principal lloc de control de la ingesta i de la despesa energètica. Aquest sistema inclou diverses àrees (hipotalàmiques i extrahipotalàmiques) i complexes interconnexions entre elles. Els sistemes neuronals permeten determinar els requeriments energètics de l'organisme i, en conseqüència, regular la ingesta a nivell de la durada i la quantitat dels àpats, així com el control de la composició de la dieta en certes circumstàncies, i l'ajust dels processos termogènics que controlen la despesa energètica.

El paper de l'hipotàlem com centre regulador de la ingesta i del pes corporal va ser establert l'any 1940 per Hetherington i Ranson mitjançant experiments de lesió [196]. Anys més tard, Anand i Brobeck [197] van



precisar la funció de diferents parts de l'hipotàlem, atribuïnt a l'hipotàlem lateral (LH) i a l'hipotàlem ventromedial (VMH) els qualificatius de “centre de la gana” i “centre de la sacietat”, respectivament. La intensa recerca desenvolupada en aquest camp, ha contribuït a identificar diversos neurotransmissors i receptors, i a descriure d'altres circuits de control, que han obligat a abandonar aquest concepte dual, alhora que excessivament simplista, a favor d'un concepte més complex en el que els sistemes de regulació impliquen altres regions.

L'hipotàlem, anatòmicament i histològicament, és una regió altament complexa i crítica per a la regulació de l'homeòstasi energètica en els organismes superiors. La precisió i l'efectivitat en l'elaboració de respostes no seria possible sense l'existència d'un elevat grau d'especialització i interconnexió entre les diferents regions que el formen. En aquest sentit, s'han descrit diverses regions hipotalàmiques implicades en la regulació de l'homeòstasi energètica, com el nucli arcuat (ARC), el VMH, l'LH, l'hipotàlem dorsomedial (DMH) i l'hipotàlem paraventricular (PVN), entre d'altres. Aquestes regions es caracteritzen per la presència de determinades subpoblacions neuronals que expressen diferents receptors per a les diferents senyals integradores dels sistemes de regulació, així com per a les connexions amb d'altres regions hipotalàmiques i extrahipotalàmiques.

## **2.1. REGULACIÓ DE LA INGESTA**

La regulació de la ingesta és important, ja que modula la part del balanç energètic corresponent a l'aportació energètica. La ingesta inclou diversos aspectes com els patrons d'ingesta (tamany i freqüència dels àpats), la tria entre dietes d'elevat o de baix contingut lipídic, la densitat energètica dels nutrients consumits, la varietat d'aliments acceptats, la palatabilitat de la

dieta i la variabilitat d'aquesta entre els diferents àpats. La ingesta està controlada per senyals hormonals de curta durada, senyals psicològiques i senyals neurals que es deriven del tracte gastrointestinal com la colecistocinina (CCK) o la ghrelina, hormona de recent descoberta. Altres senyals hormonals com la insulina i la leptina, conjuntament amb els nutrients circulants, indiquen els nivells de reserves energètiques de l'organisme, i, per tant, són senyals de llarga durada. Totes aquestes senyals actuen a nivell del SNC, convergint en l'hipotàlem, que expressa un elevat nombre de pèptids i neurotransmissors que influencien la ingesta [taula 2].

Taula 2: pèptids involucrats en la regulació de la ingesta (adaptat d'Arora S [198])

	Orexigènics	Anorexigènics
<b>Centrals</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Neuropeptid Y</li> <li>2. Hormona Concentradora de Melanina (MCH)</li> <li>3. Orexines o hipocretines</li> <li>4. AGRP</li> <li>5. Galanina</li> <li>6. Opioides endògens</li> <li>7. Endocannabinoids</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. CART</li> <li>2. POMC</li> <li>3. GLP1</li> <li>4. Factor alliberador de corticotropina (CRF)</li> <li>5. Insulina</li> <li>6. Serotonina</li> <li>7. Neurotensina</li> </ol>
<b>Perifèrics</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ghrelina</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Leptina</li> <li>2. CCK</li> <li>3. Pèptid YY</li> <li>4. Amilina</li> <li>5. Insulina</li> <li>6. Bombesina</li> </ol>

Les regions hipotalàmiques involucrades en el control de la ingesta són:

**Nucli ARC:** actua com a centre de control de la gana i integra senyals hormonals que controlen l'homeòstasi energètica [199]. El nucli ARC inclou el tercer ventricle i està en contacte amb el nucli de l'eminència arquada, amb qui conjuntament, estableixen una de les àrees del cervell on la barrera hematoencefàlica està especialment modificada per permetre l'entrada de pèptids i proteïnes perifèriques, incloent-hi la leptina i la insulina [200-202]. El nucli ARC conté subpoblacions neuronals que expressen el neuropèptid Y (NPY), l'*agouti-related peptide* (AGRP), el precursor de la melanocortina, proopiomelanocortina (POMC) i el transcrit relacionat amb cocaïna i amfetamina (CART), essent tots ells neuropèptids importants en la regulació de l'homeòstasi energètica. Així, el nucli ARC és una àrea del cervell privilegiada que pot permetre la transmissió de les senyals hormonals perifèriques que controlen la homeòstasi energètica.

**Nucli PVN:** es situa proper a la part superior del tercer ventricle. És el lloc de major secreció de les hormones alliberadores de corticotropina (CRH) i tirotròpina (TRH), ambdues importants en la regulació de l'homeòstasi energètica. En aquest nucli convergeixen múltiples vies i senyals neuronals implicades en el balanç energètic, incloent-hi projeccions de neurones NPY del nucli ARC, orexines, hormona estimuladora de melanòcit o melanocortina ( $\alpha$ -MSH) derivada de POMC, i la galanina, pèptid estimulador de la ingesta. Així doncs, el PNV té un rol important en la integració de senyals nutricionals en l'eix hipotalàmic-hipofisari-tiroideu [203].

**Nucli VMH:** actua principalment com centre de sacietat i s'ha identificat com un altre lloc clau d'actuació de la leptina. Satoh i col·laboradors van

demostrar que lesionant aquesta zona de l'hipotàlem, es provoca hiperfàgia i obesitat [204].

**Nucli DMH:** té connexions amb altres nuclis medials de l'hipotàlem i amb l'LH. S'implicant en funcions d'integració i processament de la informació provinent d'aquests nuclis [205].

**Area LH:** aquest és el centre clàssic de la gana. Conté neurones sensibles a glucosa que són estimulades per episodis d'hipoglicèmies. A més, és crucial en la mediació de la hiperfàgia causada per aquest episodis [206].

**Bulb raquidi:** Existeixen múltiples interconnexions recíproques entre l'hipotàlem i el bulb raquidi, particularment amb el nucli del tracte solitari (NTS) [207-209]. El NTS presenta una alta densitat de receptors per NPY, en concret el Y<sub>1</sub> i el Y<sub>5</sub> [210-212]. Els nivells de NPY en el NTS fluctuen amb la ingesta [213], i les neurones NPY d'aquesta regió tenen projeccions cap al PNV [214]. També hi han evidències d'una actuació del sistema de la melanocortina en el NTS independent del nucli ARC [215]. Aquesta regió també regula la quantitat d'aliments ingerits en cadascun dels àpats, incrementant-la quan es redueix la freqüència d'ingestes diàries [216]. Aquestes senyals de sacietat causades pels àpats, estan conduïdes per les fibres aferents del nervi vague des del tracte gastrointestinal al bulb raquidi [217].

Tal i com es descriu en la taula 2, hi ha un elevat nombre de neuropèptids que regulen positivament o negativament la ingesta. Òbviament no podem descriure tots els aspectes de cadascun d'ells, no obstant existeixen articles de revisió que realitzen una descripció exhaustiva d'aquests neuropèptids [198, 218-220]. En aquesta tesi ens limitarem a descriure aquells

neuropèptids de major rellevància i que es relacionen notablement amb la leptina.

**NPY:** és un dels neuropèptids més abundants de l'hipotàlem [221], alhora que un dels factors orexigènics més potents [222, 223]. L'administració ICV d'aquest neuropèptid en rata causa un increment potent i perllongat de la ingesta [224], a més, l'administració crònica provoca hiperfagia, reducció de la despesa energètica i obesitat [225]. Aquest neuropèptid també està implicat en processos com la regulació de la termogènesi, la funció cardiovascular, el control d'eixos neuroendocrins, els desordres afectius i en els processos relacionats amb la memòria [226]. El nucli ARC és el lloc de major expressió de neurones que contenen NPY en l'hipotàlem. Aquestes neurones, que expressen NPY, tenen projeccions cap a altres nuclis com PVN, DMH i LH. L'expressió de NPY a hipotàlem s'ha descrit que està augmentada en diversos models animals amb obesitat i/o alteracions en la ingesta [227, 228]. NPY actua unint-se a un receptor de membrana acoblat a proteïna-G, del que es coneixen cinc isoformes ( $Y_1, Y_2, Y_4, Y_5$  i  $Y_6$ ), per mitjançar les seves funcions amb un decrement de l'adenilat ciclase que provoca la reducció dels nivells d'AMPc [229]. Aquests receptors de NPY es troben distribuïts amb diferents patrons en les diverses àrees de l'hipotàlem, la qual cosa, esdevé un punt de regulació de les diverses funcions del neuropèptid. A nivell del control de la ingesta, NPY actua a través del receptor  $Y_1$  i  $Y_5$ , expressats principalment en el nucli ARC, en l'LH i en el PVN [223, 230]. Les neurones NPY son una diana hipotalàmica potencial per a la leptina, que causa la inhibició de la síntesis del neuropèptid. El circuit neuronal que implica la leptina i el NPY es descriurà exhaustivament amb posterioritat.

**AGRP:** és un pèptid que s'expressa en tot l'organisme i, que a més de ser un factor orexigènic, exerceix múltiples funcions com el control de la coloració del pelatge, l'obesitat, la resistència a la insulina, la glicèmia i la taxa creixement. A nivell hipotalàmic AGRP està expressat exclusivament en el nucli ARC, i, més concretament, en neurones que coexpressen NPY [231-235]. Al igual que NPY, l'increment en l'expressió d'aquest neuropèptid també es relaciona amb un increment de la ingesta, i la seva expressió també està inhibida per la leptina [236]. AGRP actua sobre el balanç energètic, antagonitzant de forma potent i selectiva MC3R i MC4R, que són els receptors sobre els que actua la melanocortina per disminuir la ingesta i incrementar la despesa energètica [237]. A diferència del curt temps d'acció del NPY, AGRP té un temps d'acció perllongat, una única dosi d'AGRP administrada a nivell central es capaç d'incrementar la ingesta per un període superior a una setmana [238].

**$\alpha$ -MSH:** és un neurotransmissor amb funció anorèctica. Està englobat en el grup de les melanocortines, que són pèptids bioactius derivats de la molècula precursora POMC, a través d'un procés de segmentació post-translacional específic de teixit. El gen de POMC s'expressa de forma fisiològica en diversos teixits de mamífers com en la pell, en el sistema immune, en la hipòfisi i en les neurones hipotalàmiques [239-241]. El repertori de productes derivats de POMC depèn de l'especificitat de les endonucleases (o convertases) que s'expressen en cada teixit [242, 243]. El pèptid bioactiu generat a partir de POMC en les neurones hipotalàmiques, l' $\alpha$ -MSH, actua com lligand del MC4R, que s'ha demostrat clau en el control de la ingesta i de l'homeòstasi energètica [244]. Sobre els receptors MC3R i MC4R, alhora que actuen els seus agonistes, és capaç d'actuar un antagonista endogen (AGRP) [203]. La relació entre l' $\alpha$ -MSH i la disminució de la ingesta, s'ha demostrat mitjançant l'administració ICV del

pèptid, que provoca la disminució de la ingesta i una reducció del pes corporal [245]. A més, s'ha observat que l' $\alpha$ -MSH provoca una inhibició dels efectes orexigènics de l'AGRP, indicant que existeix un sistema dinàmic en el control de la ingesta en el que intervenen les neurones AGRP i POMC [238]. POMC es coexpressa amb CART en neurones del nucli ARC, i aquestes neurones poden ser estimulades directament per la leptina [246]. Recentment, ha incrementat l'interès en el rol dels receptors perifèrics i dels circulants de la melanocortina en la regulació del pes corporal. La presència del MC4R en adipòcits de rata, recolzen la implicació d'aquest receptor en aquesta interacció. L'administració de leptina en ratolins *ob/ob* incrementa l'alliberament de l' $\alpha$ -MSH al torrent circulatori, suggerint un *loop* de regulació entre la leptina i l' $\alpha$ -MSH [236].

**CART:** és un neuropèptid de relativament nova descripció que sembla ser una potent senyal anorèctica. L'elevada conservació d'aquest neuropèptid entre organismes superiors, suggereix que ha de tenir una funció rellevant en la fisiologia dels mamífers [247]. El transcrit de l'RNA de CART va ser identificat pel seu increment en rates tractades amb cocaïna o amfetamines [248]. Els pèptids de CART es localitzen en àrees específiques de l'hipotàlem com el PVN, el DMH, la LH i el nucli ARC, que estan relacionades amb ingesta [249], processos de recompensa i reforçament de la conducta, processos sensorials [250], estrès i regulació endocrina [251]. La funció anorèctica de CART queda palesa amb les següents evidències: i) l'administració de sèrums anti-CART incrementa la ingesta nocturna [251], ii) el dejú causa una reducció dels nivells de mRNA de CART en el nucli ARC [252], iii) l'administració de CART és capaç de bloquejar la ingesta en resposta a NPY [253]. Existeixen evidències que relacionen les vies de senyalització de la leptina i de CART [254], a més, les neurones hipotalàmiques que expressen CART també expressen el receptor de la

leptina. Els ratolins *ob/ob* tenen els nivells de CART reduïts en el nucli ARC, però en administrar leptina, els nivells de CART es normalitzen [251, 253, 255].

En el cas d'aquests quatre neuropèptids s'ha establert una clara relació amb la regulació de la ingesta mitjançada per la leptina, a més d'una regulació en la despesa energètica. Així, aquests neuropèptids esdevenen la base de la regulació de l'homeòstasi energètica [195]. No obstant hi ha altres mecanismes de regulació de la ingesta com els mecanismes de recompensa i els de percepció de la sacietat. La regulació d'aquests mecanismes també ens regula la ingesta, però en canvi, no intervenen en la regulació de la despesa energètica, a diferència de la regulació neuronal per senyals d'adipositat.

La majoria de vertebrats consumeixen els aliments en àpats discrets. L'inici d'aquests àpats pot estar influenciat per múltiples variables ambientals, en canvi la finalització d'aquests implica processos biològics determinats i predicibles [256], desencadenats per la distensió gàstrica causada pels nutrients i per l'alliberament de diversos factors per part del tracte gastrointestinal com la colecistocinina (CCK) [257]. Moltes d'aquestes senyals de "sacietat" es transmeten al SNC via les fibres aferents del nervi vague fins al NTS, on es controlen les sensacions de sacietat, de palatabilitat i les sensacions visceral. Les causes motivacionals de la ingesta o la percepció de recompensa de la ingesta, comencen amb la informació generada pels receptors orals del gust, que transmeten el senyal al NTS que distribueix el senyal a diverses zones del romboencèfal, del mesencèfal i del prosencèfal que col·lectivament perceben i discriminen els diversos sabors i textures, assignant una recompensa determinada a cadascun d'ells. L'avaluació de la recompensa involucra l'alliberament de dopamina en l'àrea tegmental ventral (VTA) que es projecta cap al nucli



accumbens (NAc) i altres àrees del cervell [258, 259]. Actuant en aquestes àrees, la dopamina activa de forma potent l'impuls per obtenir un estímul de recompensa (es a dir, incrementa la sensació de necessitat d'un determinat aliment o droga [258]), però, en canvi, no és responsable de l'experiència hedònica *per se*, tot i que, ordinàriament, ambdós processos succeeixen alhora. Molt recentment s'ha descrit que les neurones secretores de dopamina del mesencèfal expressen el receptor de la leptina i regulen la ingesta [260], també s'ha descrit que en el NAc la leptina és capaç de regular la via de senyalització de la dopamina [261], indicant ambdues troballes, una implicació directe de la leptina sobre els sistemes de recompensa de la ingesta.

## **2.2.LA DESPESA ENERGÈTICA**

A l'altre banda de la balança energètica es situa la despesa energètica, que té una importància en el manteniment del pes corporal comparable a la ingesta, esdevenint la combinació dels dos factors el que, finalment, determina el pes corporal dels individus, i per tant el grau d'obesitat. Evidències experimentals posen de manifest la importància de la regulació de la despesa energètica en el control del pes corporal. En aquest sentit, diversos models experimentals obesos presenten taxes de despesa energètica marcadament disminuïda [262]. D'una altre banda, els estudis realitzats en humans també suggereixen que el desenvolupament de l'obesitat és conseqüència, en part, a les deficiències en aquest paràmetre [263, 264].

La despesa energètica es pot dividir en tres components bàsics:

- L'activitat física
- La termogènesi obligatòria, producte de tots aquells processos essencials per a la cèl·lula i els teixits.
- La termogènesi adaptativa, que es refereix a les alteracions en la dissipació de calor en resposta a canvis ambientals, l'estat nutricional, a les infeccions i a diverses drogues i/o aliments.

### 2.2.1. L'ACTIVITAT FÍSICA

L'activitat física és un procés regulable per l'individu. La seva incidència sobre la despesa energètica ens és fàcilment comprensible, no obstant hi ha consideracions a tenir presents en el tractament de l'obesitat mitjançant l'activitat física. La més important és l'increment de les senyals orexigèniques que, actuant com a resposta compensatòria del balanç energètic en front a l'increment de la demanda energètica, causen un increment en la ingesta.

Un altre concepte relacionat amb la pèrdua de pes mitjançant l'activitat física, és l'efecte que Levine i col·laboradors han anomenat *non-exercise activity thermogenesis* (NEAT) [265-267], que podríem traduir com la despesa energètica generada per l'activitat física no programada (estar en peus, caminar, parlar, tics, canvis posturals, etc...). Els treballs de Levine han demostrat que l'increment en el NEAT pot mitjançar fins a dos terços de l'increment en la despesa energètica, i la reducció de fins a deu vegades en l'acumulació de greix que s'aconseguiria en una etapa d'excés d'ingesta. El NEAT pot arribar a provocar un increment addicional en la despesa energètica de 350 Kcal/dia. No obstant l'increment de l'activitat física en el tractament de l'obesitat, no sempre és suficient per resoldre el problema, i

per això cal actuar sobre altres mecanismes reguladors de la despesa energètica.

### 2.2.2. LA TERMOGÈNESI

La despesa energètica consta de dos components, el treball realitzat per l'organisme sobre el medi (activitat física) i la calor produïda. Quan l'organisme es troba en repòs, no es realitza cap treball sobre el medi, aleshores la despesa energètica és causada exclusivament per la calor produïda, o termogènesi, i tots els processos que tenen lloc en aquest moment s'anomenen processos termogènics.

La termogènesi està relacionada amb a la fosforilació oxidativa que té lloc en la matriu mitocondrial. Fruit de la glicòlisis i de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos, el cicle de l'àcid cítric genera un potencial reductor en forma de NADH i de FADH<sub>2</sub>. Aquestes molècules, a l'oxidar-se, cedeixen electrons a la cadena de transport electrònic de la membrana mitocondrial interna, que durant el seu transport per ser cedits a l'oxigen per formar aigua, generen un gradient electroquímic de protons entre l'espai intermembrana i la matriu mitocondrial. Aquest gradient o força protomotriu, proveeix l'energia necessària per a la síntesi d'ATP mitjançant la reentrada de protons a la matriu mitocondrial a través de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa. Aquest procés s'anomena fosforilació oxidativa acoblada. No obstant, hi ha d'altres mecanismes que no fan servir la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa per permetre el reflux de protons a la matriu mitocondrial, aquest mecanismes es denominen desacoblament mitocondrial i n'hi ha de dos tipus:

- Desacoblament mitjançat per proteïnes: El consum del gradient de protons es fa mitjançant una via proteica, com el cas de les UCPs o els transportadors glutamat/aspartat
- Desacoblament no mitjançat per proteïnes o *proton leak*: En aquest cas el gradient de protons es consumeix via porus de membrana no proteics. Aquest fenomen és constitutiu de tots els teixits del cos i contribueix significativament a la taxa metabòlica basal [268].

Si ens fixem amb la funció realitzada pels processos termogènics, els podem classificar en dos tipus diferents:

- La termogènesi obligatòria: És el resultat de dos processos diferents, el *proton leak* i la calor despesa per l'organisme en repòs, producte de reaccions metabòliques indispensables per al manteniment de les estructures i les funcions cel·lulars dels diferents òrgans.
- La termogènesi adaptativa o facultativa: És la calor produïda per sobre del nivell basal. El mecanisme generador de calor s'activa en resposta a la temperatura ambiental, a la dieta o als processos febrils, per a la protecció de l'organisme en front l'exposició al fred, a les infeccions [269] o a la regulació de desequilibris energètics després de canvis en la dieta [270].

### **2.2.2.1. Regulació de la termogènesi**

En aquest context, és raonable pensar en l'existència, fonamentalment, de dos mecanismes responsables de l'augment de la despesa energètica: l'increment del consum d'ATP i el desacoblament de la seva producció. La despesa d'ATP, independentment de la seva utilització en processos de

termogènesi obligatòria, es pot incrementar mitjançant l'activació de cicles fútils. Aquests cicles consisteixen en reaccions enzimàtiques que comporten una despesa energètica sense producció neta de treball, i són entre d'altres els cicles de síntesi-degradació de proteïnes o d'esterificació-lipòlisi de lípids.

D'una altre banda, també existeixen mecanismes de control de la despesa energètica a través del desacoblament de la fosforilació oxidativa. Aquests processos tenen lloc principalment en els mitocondris del TAM i estan mediat per les proteïnes desacobladores, principalment la UCP-1 (o temogenina). Aquests processos estan regulats de forma complexa, i a més, constitueixen el component principal de la termogènesi adaptativa, és per això que hi dedicarem un apartat especial.

#### **2.2.2.2. Regulació de la termogènesi adaptativa.**

Tal i com el seu nom indica, la termogènesi adaptativa pot ser activada o desactivada per l'organisme en funció dels requeriments propis.

Hi ha diversos factors que influeixen a la termogènesi adaptativa, un d'ells és la temperatura ambiental. Ja en la dècada dels 60 es van descriure mecanismes de termogènesi adaptativa en resposta a la temperatura. Es va descriure un augment en el consum d'oxigen en rosegadors exposats a baixes temperatures (4 °C) [271, 272]. Aquest increment en el consum d'oxigen era provocat, en part, per la tremolor per tal de respondre a la baixa temperatura, i en conseqüència, aquest procés no es pot considerar com termogènesi adaptativa, sinó com un mecanisme d'activitat física. No obstant, quan els animals s'adaptaven a la temperatura ambiental, desapareixia la tremolor i s'activaven altres mecanismes, incloent-hi la termogènesi adaptativa, que continuaven augmentant el consum d'oxigen i

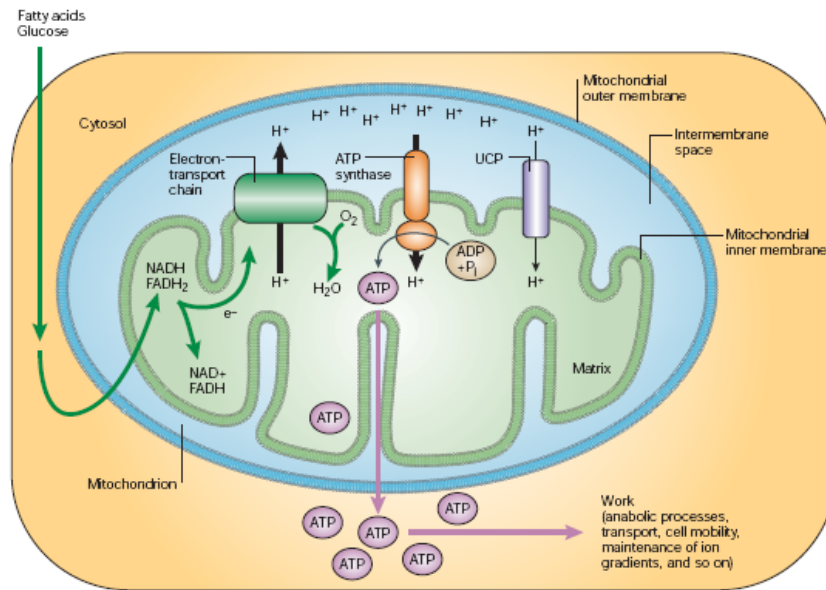
produint calor. Estudis més actuals han determinat que aquests processos termogènics tenen lloc principalment en el TAM [154, 273-275], tot i que no es descarta la participació d'altres teixits [276]. En humans també té lloc aquest fenomen, tal i com va demostrar Dauncey. En els seus experiments va observar un increment del 7% en la producció de calor al reduir la temperatura ambiental de 28 a 22 °C [277].

La dieta també es presenta com un factor important en la regulació de la termogènesi. El dejú perllongat pot arribar a disminuir l'estat metabòlic basal fins un 40%, i la reducció calòrica necessària per reduir el 10 % del pes corporal, s'associa amb un decrement en la despesa energètica [278]. De fet, aquest efecte en la disminució de l'estat metabòlic basal és ben conegut en l'àmbit clínic, i és la principal causa de la escassa eficiència en la pèrdua de pes en les dietes de llarga duració, ja que l'organisme en situació de dietes hipocalòriques redueix la despesa energètica com mecanisme adaptatiu. Contràriament, les dietes hipercalòriques provoquen un increment en la despesa energètica de manera aguda i crònica. La ingesta aguda incrementa la despesa energètica en un 25 – 40 % tant en models animals com en humans [279, 280], i la sobreingesta, durant un període perllongat, també provoca un increment en la despesa energètica [265]. Aquest mecanisme esdevé una protecció essencial contra l'obesitat, i és interessant observar que aquesta adaptació està influenciada pel *background* genètic, tal i com van demostrar Bouchard i col·laboradors en estudis en bessons humans [9], i que quan es produeixen anomalies en aquests mecanismes es contribueix al desenvolupament de l'obesitat. La inducció de la termogènesi en resposta a la dieta és particularment evident en els casos de dietes pobres en proteïnes. Amb aquestes dietes l'organisme ha d'incrementar molt el volum d'ingesta per tal de satisfer la demanda d'aminoàcids per mantenir els nivells mínims de síntesi proteica requerida per l'organisme. Inherent a l'increment en el volum d'ingesta, hi ha un

increment en les calories ingerides, i si l'organisme no es capaç de reduir l'excés de calories pot desenvolupar obesitat. En models animals alimentats amb aquest tipus de dieta s'ha observat una reducció del 40 % en la capacitat d'emmagatzemar les calories ingerides, aquest efecte pot estar mediat en part per l'estimulació de la termogènesi en TAM.

### **2.2.2.3. Proteïnes desacoblants (UCPs)**

El TAM és essencial per a la termogènesi induïda, i s'ha demostrat que en models on no hi ha un TAM funcional no existeix aquest procés [281]. El TAM és un òrgan exclusiu de mamífers, que probablement és producte d'un desenvolupament evolutiu que va succeir en les primeres etapes de l'evolució dels mamífers. El TAM va ser descrit en diversos mamífers al 1951 per Gessner, però no va ser fins la dècada dels 60 que es va descriure que la producció de calor era una de les seves principals funcions [282], i que estava involucrat diversos tipus d'ineficiència metabòlica [163]. L'identificació de la UCP1 com a proteïna mitocondrial responsable de la funcionalitat del teixit, també ha estat relativament tardana [283, 284]. La UCP1 és una proteïna situada en la membrana interna mitocondrial dels adipòcits del TAM que permet una reentrada a la matriu mitocondrial dels protons del gradient generat per la cadena de transport electrònic. Aquesta reentrada es fa d'una manera desacoblada de la producció d'ATP, es a dir, evitant que els protons retornin a la matriu mitocondrial mitjançant la  $F_0F_1$ -ATP sintasa, i això és conseqüència de la menor impedància causada per la UCP1.



**Figura 3.** Esquema de l'oxidació de substrats i de la fosforilació oxidativa en cèl·lules de mamífers [285].

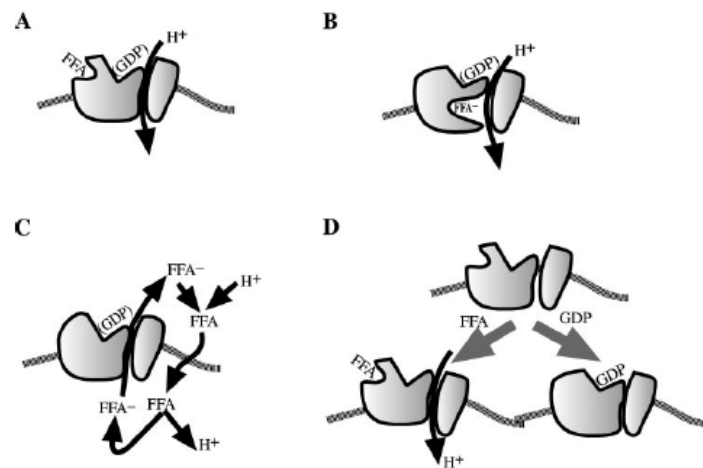
A nivell estructural, aquesta proteïna es classifica com membre de la família de proteïnes mitocondrials transportadores, presentant una elevada homologia amb la majoria de membres de la família. Com característiques estructurals principals, la UCP1 presenta un àrea amb aminoàcids relacionats amb la unió de nucleòtids de base purínica, aquests residus també es troben en les proteïnes homòlogues UCP2 i UCP3. Existeixen també dues regions de la UCP1 que es conserven en totes les espècies. L'elevadíssim grau de conservació d'aquestes seqüències implica una funció rellevant per a la proteïna [286-292], amb tot, encara no s'ha definit la funció d'aquestes. El mecanisme de translocació de protons de la UCP1 implica la participació d'àcids grassos (o derivats) com cofactors, reguladors al·lostèrics, o com molècules que actuen com a llançadores de protons. Actualment es debaten quatre models proposat pel mecanisme de translocació dels protons mitjançant la UCP1:

- **Model d'interacció al·lostèrica:** en aquest model, els àcids grassos interactuen amb un lloc de la UCP1 per activar-la i perquè permeti el



transport dels protons. No s'han identificat encara aquests possibles llocs d'interacció entre la proteïna i els àcids grassos, i les teories que l'acil CoA (derivat del àcids grassos) sigui el responsable de la interacció, tampoc presenten evidències convincentes d'una rellevància fisiològica.

- **Teoria del cofactor:** en aquesta teoria els llocs d'unió de la UCP1 als àcids grassos es localitzarien en l'interior del canal transportador de protons, on actuarien com grup funcional amb càrrega negativa, que provocarien l'atracció dels protons a l'interior del canal, permetent la seva translocació [293]. Novament, els llocs d'interacció amb àcids grassos dins del canal no s'han identificat.
- **Teoria de la llançadora:** en aquesta teoria, formulada per Garlid i Jezek [287], els protons no són transportats lliurement per la UCP1, sinó que la proteïna fa una extrusió de la forma aniònica dels àcids grassos cap a l'espai intermembranós del mitocondri, on se li uneixen els protons per tornar a formar una molècula neutra capaç de travessar la membrana lipídica i, en la matriu mitocondrial, tornar a dissociar-se per alliberar el protó i tornar a començar el cicle. Existeixen evidències de que aquest procés pot tenir lloc en sistemes experimentals [287, 294]. En contra d'aquesta teoria està el fet de que el procés no és específic de UCP1, ja que altres transportadors mitocondrials són capaços de realitzar-lo en les mateixes condicions, el que no explicaria quin avantatge evolutiu representaria la UCP1 pels mamífers.
- **Model del canvi conformacional:** aquest model va ser formulat per Rial i Nicholls [295], i en ell es suggereix que la unió d'àcids grassos o GDP provoquen dos estats conformacionals de la UCP1, que permeten, en el cas dels àcids grassos, i eviten, en el cas del GDP, l'obertura del canal protèic i la consegüent translocació del protó.



**Figura 4.** Esquema dels mecanismes de translocació de protons per UCP-1. Model d'interacció al·lostèrica (a), teoria del cofactor (b), teoria de la llançadora (c) i model del canvi conformacional (d) [296].

La UCP1 és només una de les proteïnes desacoblants d'una família que poc a poc ha anat augmentant en membres. De l'anàlisi del cDNA de llibreries de *ESTs* (*expressed sequence tags*), han sorgit els nous membres [297]. La UCP2 i la UCP3, són proteïnes d'elevada homologia amb la UCP1, 59 % i 57% respectivament, el que representa major homologia que amb d'altres transportadors mitocondrials. A diferència de la UCP1, que només s'expressa de forma fisiològica en el TAM, la UCP2 s'expressa de forma força ubiqüa, i la UCP3 s'expressa predominantment en el múscul esquelètic, en el TAM i en el cor. No obstant els nivells d'expressió no sempre concorden amb l'expressió a nivell proteic [298, 299]. Uns nous gens, expressats a cervell, s'han identificat i anomenat UCP4 i UCP5 [297, 300], però aquestes proteïnes no presenten raons filogenètiques per considerar-les com a membres de la família de les UCPs, com a mínim, pel que fa a l'homologia de les seqüències gèniques, ja que aquestes no són més homologues que altres seqüències de transportadors mitocondrials, com és el cas del transportador d'oxoglutarat. Per aquesta raó, a nivell

funcional, la UCP1, la UCP2 i la UCP3 són les úniques proteïnes desacobladores amb interès.

Quan UCP2 i UCP3 van ser identificades, es va postular immediatament una funció reguladora de la termogènesi i del pes corporal d'aquestes proteïnes [301-305] en relació a les semblances estructurals amb la UCP1. No obstant, no van trigar massa en aparèixer les primeres evidències en contra d'aquestes suposades funcions: i) els nivells de mRNA de la UCP2 i la UCP3 i la concentració proteica estaven elevades en el múscul de rates en repòs, mentre que la termogènesi d'aquest animals estava disminuïda [155, 306-309]. ii) Tant la UCP2 com la UCP3 es van trobar en teixits de peixos [310], en plantes [311] i en ectoderms, organismes en els que no hi ha processos de termogènesi adaptativa. I iii) l'argument més persuasiu prové del ratolins *knock-out* per a la UCP2 i la UCP3, que tenen una resposta normal a l'exposició al fred i no són obesos [156, 312, 313]. Altres causes metabòliques també són factors limitants per implicar la UCP2 i la UCP3 en la funció termogènica, per exemple, el fet que els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes a la membrana mitocondrial es situïn al voltant d'un 1% dels nivells en que s'expressa la UCP1 en TAM [298, 314]. No obstant, hem de considerar que el múscul té una massa molt superior al TAM i que la seva contribució a la taxa metabòlica podria arribar ser significativa en situacions de màxima capacitat funcional de la UCP3. La estimulació de la despesa energètica i la disminució del pes corporal observada en ratolins amb sobreexpressió de la UCP3 en múscul [315], es deguda a un desacoblament artefactual. En aquesta mateixa línia de treball, Cadenas i Echtay van mostrar que en mitocondris aïllats de múscul, es produïa una estimulació de la conductància de protons mitjançada per la UCP3 i causada per l'adició de superòxids o d'alquenals [316-318], suggerint que l'activació de la UCP3 *in vivo* per senyals fisiològiques o fàrmacs, podrien incrementar significativament la capacitat

termogènica. A favor d'aquesta hipòtesi, s'ha observat que en ratolins knock-out per a la UCP3 hi ha una resposta disminuïda en la hipertèrmia muscular en resposta a la 3,4-Metilendioximetamfetamina (MDMA o èxtasi) [319]. Així doncs la UCP2 i la UCP3, en situacions fisiològiques no serien termogèniques ni estarien involucrades en la resposta adaptativa al fred. No obstant, la UCP3 podria ser significativament termogènica en resposta a estímuls específics, aspecte que deixa oberta una possibilitat de tractament de l'obesitat mitjançant aquesta proteïna.

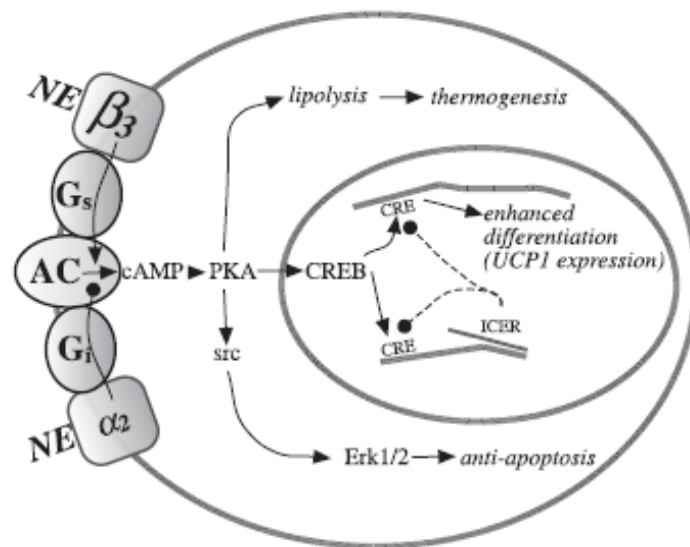
La funció d'aquestes dues proteïnes sembla estar més lligada a la protecció cel·lular contra els danys causats per les espècies reactives de l'oxigen (ROS). Els mitocondris són la major font de producció de ROS de l'organisme, i aquestes ROS es relacionen amb diverses patologies degeneratives com el Parkinson, l'Alzheimer, l'atàxia de Friederich, la diabetis i en l'envelliment *per se* [320, 321]. La producció mitocondrial de ROS és molt sensible a la força protomotriu creada per la cadena de transport electrònic. L'activació de la UCP2 i la UCP3 causa una disminució d'aquesta força protomotriu, permetent una acceleració de la cadena de transport electrònic, disminuint, d'aquesta manera, el temps que romanen els electrons en els diversos complexos de la cadena i evitant la formació de ROS en els complexos I i III [155, 313, 318, 322-332]. Alguns autors han predit altres funcions per a aquestes proteïnes, com és el cas de la UCP2 en la senyalització de la secreció d'insulina, on una activació d'aquesta proteïna disminuiria la secreció de l'hormona en les cèl·lules  $\beta$ -pancreàtiques [333-335]; o la UCP3 en la protecció del múscul en front la lipotoxicitat, emprant-se aquesta proteïna per a l'exportació d'àcids grassos del citoplasma a la matriu mitocondrial per a la seva ràpida  $\beta$ -oxidació [336-338].

#### **2.2.2.4. Senyals reguladores de la termogènesi adaptativa**

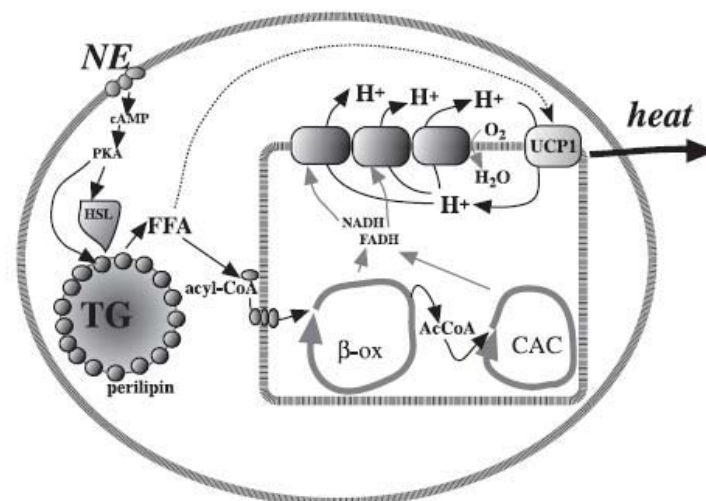
Dels diversos factors que influeixen en els adipòcits del TAM, la noradrenalina (NA) és el més important i el més ben estudiat. Aquest efector no actua exclusivament a nivell del procés termogènic, sinó que també actua a nivell del control de la proliferació i la diferenciació cel·lular, així com en l'apoptosi. En els adipòcits madurs, la NA interactua amb els tres tipus de receptor adrenèrgics ( $\beta$ ,  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ ). D'aquests tres tipus de receptors, els  $\beta$ -adrenèrgics ( $\beta$ -AR) són els que mantenen una relació més estreta en el control de la termogènesi i, més concretament, el subtipus 3 ( $\beta_3$ -AR). De fet, el receptor  $\beta_2$ -AR no s'expressa en els adipòcits del TAM [339] i el  $\beta_1$ -AR, tot i expressar-s'hi, no està significativament acoblat al procés termogènic [340].

El receptor  $\beta_3$ -AR està acoblat a proteïna-G (del subtipus s) [341, 342], i en resposta a la NA activa la seva cascada de senyalització activant l'adenilat ciclase (AC) que provoca la formació de l'AMPc. Aquesta activació s'ha mostrat exclusiva del  $\beta_3$ -AR en els adipòcits del TAM [343, 344]. El següent pas en la cascada de senyalització suposa l'activació de la proteïna cinasa A (PKA) mitjançada per l'AMPc [345]. Aquesta cinasa és la responsable d'activar una sèrie de processos que globalment activen la termogènesi. Per una banda, PKA fosforila el factor de transcripció CREB [346], que s'uneix a dues zones dels promotors proximal i distal del gen UCP1 per a la seva regulació. D'una altra banda, PKA indueix l'activació de la MAP cinasa p38 [347] capaç d'activar tant l'expressió, com la fosforilació de PGC-1 $\alpha$ , que actua com cofactor de PPAR $\alpha$  i  $\gamma$  per modular l'expressió de la UCP1 [348]. A més de la regulació gènica de la UCP1, en la que seguidament entrarem en més detall, la PKA en resposta a la NA és capaç d'activar de forma aguda la UCP1, això ho aconsegueix amb dos

processos. El primer és un increment de la lipòlisi mitjançada per una activació de la lipasa sensible a hormona (HSL), hormona limitant en la lipòlisi [349]. El segon procés és una desactivació, per fosforilació, de la perilipina, proteïna responsable de la protecció dels TG en front la HSL [350, 351]. La lipòlisi incrementa la producció d'àcids grassos que entren en els mitocondris en forma d'acil-CoA, on s'oxiden i proveeixen de poder reductor a la cadena de transport electrònic que genera el gradient de protons responsable de l'activació del procés termogènic.



**Figura 5.** Esquema de la senyalització adrenèrgica en adipòcits madurs de teixit adipós marró [296]



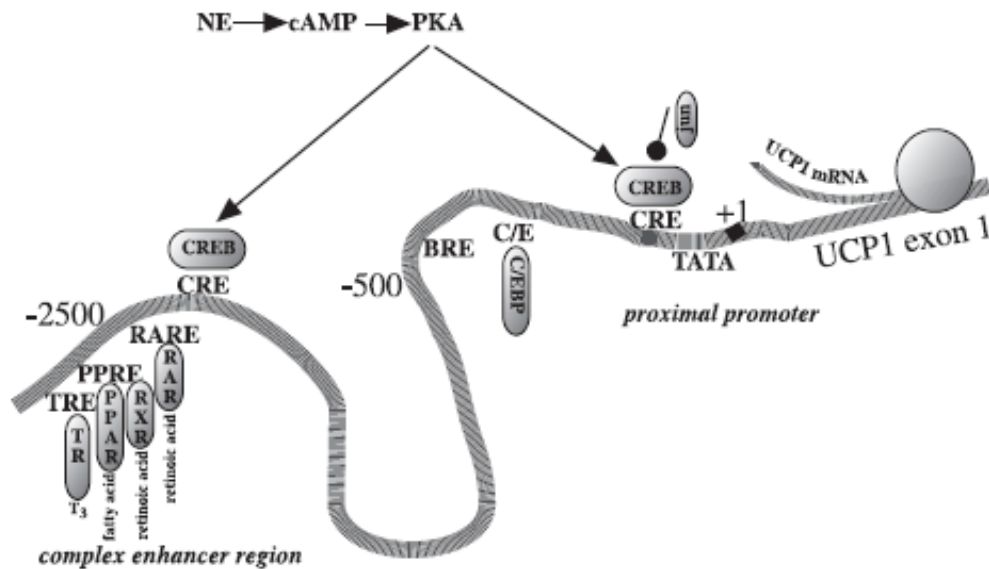
**Figura 6.** Esquema de l'estimulació de la termogènesi en resposta a l'activació de la via β-adrenèrgica [296]

La via adrenèrgica està fortament regulada per leptina, tal i com es revisarà en aquesta tesi en el capítol dedicat a aquest tema. Tot i que aquesta via és considerada com la principal controladora de l'activitat i de l'expressió de la UCP1 en situacions fisiològiques, una altre sèrie de factors són capaços d'influenciar l'expressió de la UCP1. S'ha postulat que l'hormona tiroïdal (TH) és important per a la regulació de la termogènesi, tal i com s'observa en humans i en animals amb hipotiroïdisme o hipertiroïdisme, que presenten hipotèrmia i hipertèrmia associada respectivament [352]. Activadors de PPAR $\gamma$ , com la pioglitazona [353] i els àcids grassos essencials [354], activen el gen de la UCP1, com també ho fan els àcids retinoics a través dels receptors RXR i RAR [355, 356].

#### **2.2.2.5. Regulació del gen *Ucp1***

Els factors descrits anteriorment, així com aquells que esdevenen de la via adrenèrgica, presenten un o diversos llocs d'unió en les zones promotores del gen de la UCP1, que, de forma força simplificada, comentarem en aquest apartat. En el gen de la UCP1 s'han identificat dues regions promotores, una proximal i un altra distal. La regió promotora proximal conté diverses regions consens per a la unió d'elements reguladors, una caixa TATA i una CCAAT, que són elements del promotor basal, un element de resposta a AMPc (CRE) i dos llocs d'unió C/EBP (C/E) [357]. La regió distal situada a -3500 pb en humans [358] i -2500 en rosegadors, és una regió relativament curta amb múltiples llocs d'unió per elements de resposta, algun dels quals es troben superposats [359]. Un CRE es situa en aquesta regió i és funcional [360, 361]. A més, en aquesta regió existeixen elements de resposta a l'àcid retinòic (RARE), a PPAR (PPRE) [362, 363] i a TH (TRE) (112). En el RARE s'uneix el receptor d'àcid retinòic 11-*trans* (RAR) i el receptor d'àcid retinòic 9-*cis* (RXR). En el PPRE s'uneix

indistintament PPAR $\gamma$  i PPAR $\alpha$ , i en el TRE s'uneix el receptor de TH, permetent així la regulació de l'expressió de la UCP1 per l'àcid retinòic, els àcids grassos i l'hormona tiroïdal.



**Figura 7.** Factors reguladors de l'expressió gènica d'UCP-1 [296]

## 3. LEPTINA: HORMONA REGULADORA DE L'HOMEOSTASI ENERGÈTICA

### 3.1. LA LEPTINA

Els treballs relacionats amb l'existència d'un sistema fisiològic regulador del pes corporal, de l'alimentació i de la despesa energètica es van iniciar aproximadament fa quatre dècades. El fet que en la majoria del mamífers l'adipositat presenti una tendència a mantenir-se constant durant llargs períodes de temps, va fer sospitar de l'existència d'algun mecanisme homeostàtic capaç de regular les variacions en el balanç energètic, en



funció dels requeriments energètics de cada moment. Aquesta hipòtesi es va veure reforçada per les observacions experimentals descrites per Harris, on veia que, després d'una disminució important de l'adipositat causada per dietes hipocalòriques o intervencions quirúrgiques, el pes corporal es restaurava en un període de temps relativament curt, si no hi havia limitacions a l'accés al menjar. El fenomen invers també succeïa, de forma que quan un individu era forçat a ingerir aliments, augmentava de pes, i en retirar la ingesta forçada la gana li disminuïa fins la recuperació del pes inicial [364].

Les observacions clàssiques de Hetherington i Ransom [196] i les de Hervey [365], suggerien que el sistema regulador proposat havia d'estar relacionat amb l'hipotàlem, ja que les rates amb lesions en l'àrea ventromedial del cervell, desenvolupaven obesitat mòrbida a més d'increments en la ingesta. D'una altre banda, les rates control sotmeses a circulació creuada amb els animals amb aquestes lesions, perdien la gana completament i morien d'innanició. Aquests fets demostraven l'existència d'un factor circulant que estava elevat en animals amb lesions hipotalàmiques i que produïa el descens de la ingesta en animals sans.

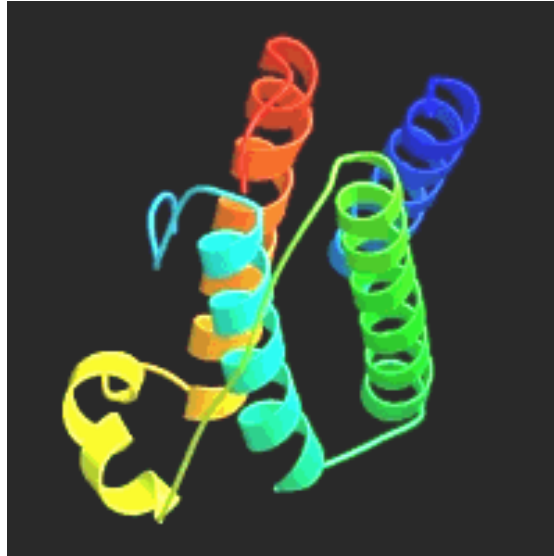
Altres investigacions relacionades amb el concepte de "factor de sacietat circulant" van portar al descobriment de dues mutacions en ratolí denominades *ob* (per *obese*) i *db* (per *diabetes*) responsables de produir alteracions com obesitat, hiperfàgia, hiperinsulinèmia, hiperglicèmia, reducció de la despesa energètica, hipogonadisme i infertilitat [366]. Quan els ratolins *ob/ob* eren sotmesos a una circulació creuada amb ratolins normals, aquests no guanyaven pes, en canvi, el mateix procediment entre ratolins *db/db* i ratolins controls, provocava una severa hipofàgia dels animals controls. Aquestes observacions van permetre a en Coleman en la dècada dels 70 concloure que els ratolins *ob/ob* no produïen un "factor de sacietat humoral" i que els ratolins *db/db* no sintetitzaven el producte

addicional necessari per donar resposta a aquest factor [145, 367]. Finalment, el gen responsable de la mutació *ob* va ser descrit tant en ratolí com en humans al 1994 per Zhang [144], i el producte de gen *ob* es va denominar leptina, del grec *leptos* o prim. Aquesta descoberta va obrir un nou camp de perspectives en l'estudi del rol de les diverses adipocitocines en el control del balanç energètic [368-373].

La leptina és un polipèptid produït i secretat al sistema circulatori principalment pels adipòcits del teixit adipós blanc, no obstant, aquest no és l'únic teixit capaç de produir l'hormona, la placenta, la mucosa gàstrica, la medul·la, l'epiteli mamari, el teixit adipós marró, el múscul esquelètic, la glàndula pituïtària, l'hipotàlem i l'os, també són teixits que en certes circumstàncies tenen capacitat productora de leptina tot i que en quantitats molt inferiors al teixit adipós blanc [374-377].

La leptina es produeix a partir d'un precursor de 167 aminoàcids, amb una seqüència senyal de 21 aminoàcids que s'escindeix abans que la leptina es secreti al torrent circulatori, donant lloc a la forma activa de 147 aminoàcids i d'un pes molecular de 16 KDa. Mitjançant tècniques de determinació de l'estructura cristal·lina i de ressonància magnètica nuclear, s'han observat similituds estructurals amb diversos membres de la família de les citoquines helicoïdals de cadena llarga com, entre d'altres, la CT-1 (cardiotropina-1) i les interleucines IL-6, IL-11 i IL-12, així com un plegament similar al de la subfamília de les citocines de cadena curta [378-380]. L'estructura tridimensional de la forma activa de molècula està composta per quatre hèlix  $\alpha$  antiparal·leles amb tres girs  $\beta$ , a més d'un pont disulfur entre dos residus de cisteïna (C96 i C144) que s'han mostrat importants per al manteniment tant de l'estructura, com de l'activitat de la leptina [144, 381, 382]. Així doncs, a partir de la seva estructura, podem classificar la leptina com itocina de classe I. Aquesta estructura és molt similar entre les diferents espècies, en conseqüència, la leptina humana

presenta un 84 % d'homologia amb la leptina murina i un 83% amb la de rata [144].



**Figura 8.** Model de l'estructura tridimensional de la leptina.

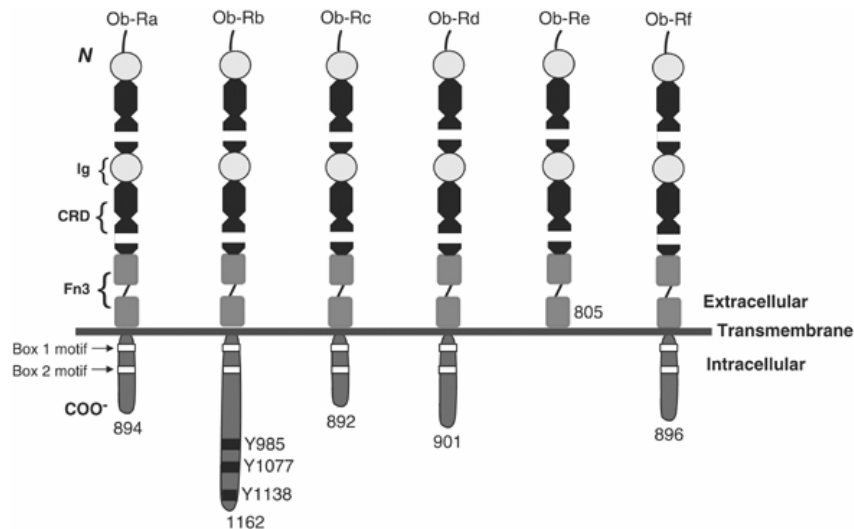
Les concentracions de leptina circulants es correlacionen amb el BMI i amb el total de greix acumulat [368, 381, 383]. El temps de vida mitja de la leptina circulant és força curt a causa de l'elevada eficiència del procés de depuració renal que es du a terme per un mecanisme d'alta capacitat no saturable, consistent en una filtració glomerular de la leptina lliure, seguida d'una degradació metabòlica efectuada en els túbuls renals [384, 385]. No obstant en humans, aquesta leptina circulant ho fa majoritàriament unida a macromolècules del sèrum que modulen la bioactivitat i la biodisponibilitat de l'hormona [386]. El ràtio de leptina lliure respecte a la forma unida a macromolècules està augmentada en el sèrum d'individus obesos, esdevenint així un primer punt de control dels nivells circulants de leptina [386, 387].

### **3.2.EL RECEPTOR DE LA LEPTINA**

La naturalesa pleiotròpica de la leptina és deguda principalment a la distribució ubiqua del receptor de leptina OB-R. La leptina actua a través d'aquests receptors transmembrana que presenten una estructura similar a la família dels receptors de citocines de classe I, caracteritzats per tenir un domini intracel·lular, un extracel·lular i un domini transmembrana [13, 146, 388-390]. Existeixen múltiples isoformes del receptor de leptina, totes elles producte d'un sol gen *Lepr* i resultat del *splicing* alternatiu del mRNA i/o processament proteolític [13, 391]. Actualment es coneixen sis isoformes que es poden classificar en tres classes [146, 392]:

- Isoformes curtes : OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd, i OB-Rf,
- Isoformes llargues: OB-Rb
- Isoformes secretades: OB-Re

La isoforma secretada conté únicament el domini extracel·lular d'unió a la leptina, i certs autors han descrit una possible funció en la regulació dels nivells circulants de leptina lliure, mitjançant la complexació de l'hormona [393]. La isoforma llarga i les isoformes curtes contenen un domini extracel·lular, el transmembrana i els primers 29 aminoàcids de la seqüència intracel·lular idèntics, les diferències es troben a la zona C-terminal del domini intracel·lular de 300 residus del receptor, on a causa del *splicing* alternatiu dels exons de la regió 3', donen lloc a diferents llargades d'aquest domini, ometent la transcripció de motius imprescindibles per a la correcta senyalització del receptor en les isoformes més curtes [13, 391].



**Figura 9.** Isoformes el receptor de la leptina [394]

Les funcions de les isoformes curtes del receptor no estan ben establertes, però s'ha demostrat que la isoforma llarga OB-Rb és crítica per a l'acció de la leptina. De fet, el ratolí *db/db* en el que únicament manca la isoforma OB-Rb, té un fenotip indistingible del ratolí *db<sup>3J</sup>/db<sup>3J</sup>* al que li manquen totes les isoformes del receptor [13, 200, 391].

### 3.3. MECANISMES DE SENYALITZACIÓ DEL RECEPTOR DE LA LEPTINA

En els darrers anys, l'estudi de la senyalització derivada de la unió de la leptina al seu receptor, han provocat un increment en el coneixement dels mecanismes bioquímics i moleculars de la funció de la leptina. La similitud estructural del OB-R amb altres membres de la família de receptors de citocines de classe I, van suggerir inicialment la possibilitat de que la leptina mitjances l'activació de les cinases JAKs (*janus kinases*) i STATs (*signal transducers and activators of transcription*) [395-398]. Posteriorment a la clonació del OB-Rb es van identificar els motius necessaris per a la unió de JAK/STAT al domini intracel·lular del receptor, i que aquests únicament eren presents a la forma llarga del receptor [389,

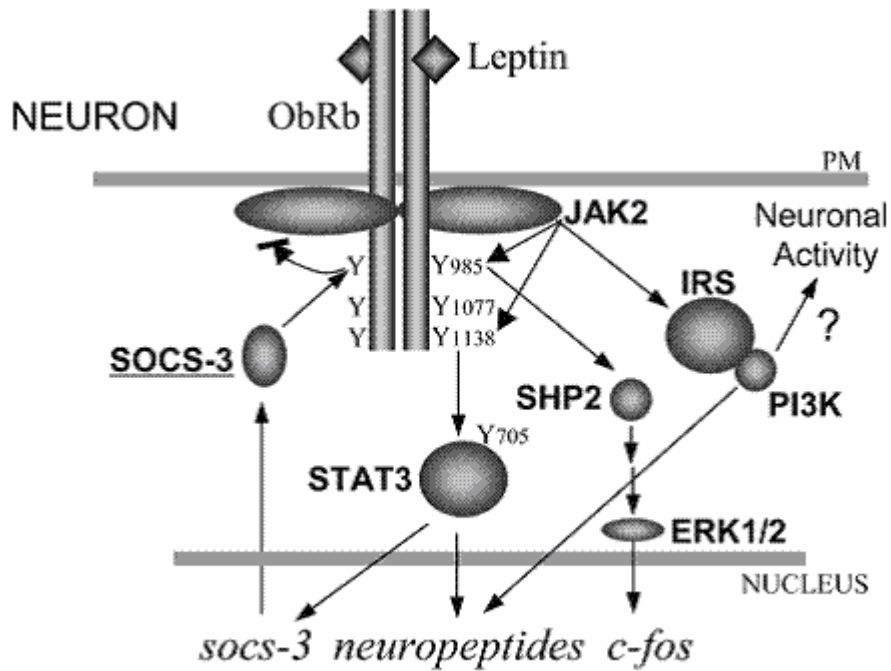
399-404]. Actualment la cascada de transducció de senyal JAK/PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) està centrant l'atenció de molts investigadors, però la via millor caracteritzada continua essent la de JAK/STAT. A nivell general, quan leptina s'uneix a la forma llarga del receptor, aquest es dimeritza i permet la unió de JAK, que inicia les fosforilacions en tirosines del receptor permetent la unió de STAT i la seva activació per fosforilació. La forma fosforilada de STAT dimeritza i es transloca a nucli on s'uneix al DNA i regula la transcripció gènica [405-407]. Aquest esquema general d'activació de la via, té diferències entre els diversos teixits on s'activi en funció de les isoformes de JAK i STAT presents. A hipotàlem, on s'ha descrit més exhaustivament aquesta via de senyalització, el receptor en resposta a la leptina dimeritza i permet la unió de JAK2 al box-1, una seqüència molt conservada i rica en prolina, i al box-2, una seqüència menys conservada [408, 409]. Durant el procés d'unió, JAK2 s'activa per autofosforilació en múltiples residus de tirosina i promou la fosforilació de dos residus Y<sup>985</sup> i Y<sup>1138</sup> del receptor [408, 410-412]. A partir d'aquest punt la senyalització es divideix en tres branques [Fig.10], una que implica la fosforilació de Y<sup>985</sup>, una altre que implica la fosforilació de Y<sup>1138</sup> i una última causada directament per l'autofosforilació de JAK2 [413]. La fosforilació del residu Y<sup>985</sup> promou la unió de la tirosina fosfatasa SHP-2, que causa l'activació ERK1/2 via p21RAS. Tot i que la majoria de l'activació de ERK1/2 és dependent de Y<sup>985</sup>, hi ha una part regulada amb independència del receptor i que presumiblement es causada per la fosforilació de tirosines del propi JAK2 [410, 414].

La fosforilació de Y<sup>1138</sup>, promou la unió de la forma latent de STAT3 al complex OB-R/JAK2, provocant la fosforilació en tirosines de STAT3 i la seva translocació a nucli, on actua com regulador de la transcripció [410, 412]. STAT3 inhibeix la transcripció de NPY i activa la de POMC, així com la del inhibidor de senyalització SOCS3 (*suppressor of cytokine*

*signaling* 3) [405, 410, 415-417] i altres gens. SOCS3 s'uneix a Y<sup>985</sup> del OB-R per inhibir la senyalització de STAT3 [418], també s'uneix al OB-R de forma independent a JAK2 [419, 420] per inhibir la senyalització. La importància de la unió de SOCS3 en aquests dos llocs, al igual que la via de senyalització Y<sup>1138</sup>-STAT3 per la generació del supressor, està desembocant en una interessant area d'investigació científica, evidenciant la importància d'aquesta regió del receptor per regular la senyalització de la leptina, així com la resistència a l'hormona [418, 419, 421-423].

La fosforilació en tirosines de JAK2 durant la seva unió a OB-R, mitjança algunes senyals independents que provenen de la fosforilacions del receptor [410]. Els llocs individuals de fosforilació de JAK2 tot just es comencen a caracteritzar [424-428], però encara resten alguns residus per determinar, a més de les molècules que s'hi uneixen i de les senyals que actuen a cada lloc. Així doncs, aquestes llacunes en la comprensió dels mecanismes mitjançats per JAK2 eviten la comprensió total de la via de senyalització de la leptina.

Existeix, a més, un lligam entre la senyalització de la leptina i altres vies de senyalització en diversos teixits, establint comunicacions entre l'hormona i altres factors de senyalització, com és el cas de la insulina mitjançant les proteïnes IRS i influint en el metabolisme de la glucosa [429-433], de l'òxid nítric (NO) per controlar la pressió sanguínia [434-436], de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) per mitjançar processos relacionats amb l'angiogènesi [437] o de les GTPases per controlar processos d'apoptosi i regulació del citoesquelet [404].



**Figura 10.** Esquema de la via de senyalització de la leptina en neurones hipotalàmiques [399]

### **3.4. EFECTES CENTRALS I PERIFÈRICS DE LA LEPTINA**

Inicialment, es va pensar que els efectes de la leptina estaven controlats a nivell central, però de manera semblant a altres membres de la família de citocines helicoïdals, la leptina també presenta una elevada pleiotropia funcional relacionada amb la distribució ubíqua del seu receptor [13, 146, 388-390]. S'han descrit múltiples funcions de la leptina controlades tant a nivell central com perifèric [383, 399, 438-441]. Les funcions més ben caracteritzades s'atribueixen al efectes realitzats sobre el SNC, especialment en l'hipotàlem que és el lloc de major expressió de OB-Rb [249, 442]. Entre aquestes accions destaca la regulació de l'homeòstasi energètica i del pes corporal, que són els punts de major interès en aquesta tesi. Les observacions fetes per Scarpace [443] i Commins [444-446] descarten qualsevol efecte de la leptina sobre la expressió de UCP1 a nivell perifèric. Tant la denervació del TAM, com l'ús de models animals



deficients en la producció de NA (producte final de la senyalització simpàtica) o de receptors  $\beta$ -adrenèrgics, han demostrat que la leptina actua a través del sistema nerviós simpàtic per produir una alliberació local de NA a TAM i activar la cascada de senyalització  $\beta$ -adrenèrgica, i finalment modular l'activitat i l'expressió de la UCP1.

Però a més dels efectes centrals, la leptina també té efectes a nivell exclusivament perifèric com per exemple l'acció sobre el sistema immune, que és resultat d'un efecte directe sobre les cèl·lules T que expressen el OB-Rb [447], la regulació de l'homeòstasi de la glucosa independentment dels efectes sobre l'adipositat, que s'aconsegueix en part per una regulació central, però també per la regulació directe de teixits participants en el metabolisme de la glucosa [439, 448-452]. Altres efectes perifèrics de la leptina són l'estimulació de la lipòlisi en teixit adipós i en múscul [452], la inhibició de la lipogènesi, la inhibició de la secreció de la insulina [439], els efectes sobre la funció respiratòria, la reproducció, el control del creixement i el desenvolupament [400, 435, 453-462]

### **3.5. REGULACIÓ CENTRAL DE LA INGESTA I DE LA DESPESA ENERGÈTICA PER LA LEPTINA: VIA DE TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL**

Com ja s'ha comentat amb anterioritat, el nucli ARC presenta dues subpoblacions neuronals que expressen el receptor de la leptina, són, d'una banda neurones que coexpressen NPY i AGRP, i, de l'altra, una subpoblació de neurones que coexpressa POMC i CART. Ambdues subpoblacions tenen projeccions neuronals cap a altres zones de l'hipotàlem importants en la regulació de la ingesta i la despesa energètica, com el PVN, l'LH i el DMH, on són secretats NPY, AGRP, CART i  $\alpha$ -MSH. La senyalització del circuit neuronal que controla la ingesta

mitjançant leptina, s'inicia en les neurones NPY/AGRP i POMC/CART. La leptina inhibeix la secreció de NPY evitant l'activació de neurones del PVN, que expressen el receptor  $Y_5$ , on s'alliberen neuropèptids responsables de l'augment de la ingesta. La leptina també inhibeix la secreció de AGRP en les projeccions del nucli ARC a l'LH, evitant el bloqueig de receptors MC4R i, en conseqüència, fent permissiva l'activació produïda per  $\alpha$ -MSH [463]. L'activació del receptor MC4R provoca el descens en la ingesta [464].

El circuit neuronal implicat en l'activació de la termogènesis mitjançada per la leptina no està tan definit, no obstant això, s'ha determinat que la leptina augmenta l'expressió de UCP1 en TAM mitjançant l'activació del sistema nerviós simpàtic (SNS) [443]. L'activació del SNS provoca un increment dels nivells de catecolamines circulants a causa de l'estimulació de la medul·la adrenal, que és la major font de producció d'adrenalina de l'organisme. Però també provoca un increment de secreció de NA en les cèl·lules ganglionars de les terminacions dels nervis simpàtics que innerven el TAM [290]. Aquestes catecolamines són les responsables de l'increment de la UCP1 mitjançant els receptors  $\beta$ -adrenèrgics ( $\beta$ AR) [465]. L'activació de la termogènesis i de la ingesta per la leptina comparteixen el mateix inici, el nucli ARC, que mitjançant la secreció de NPY, AGRP,  $\alpha$ -MSH i CART en les projeccions a PVN, LH i DMH activen el SNS. No es coneixen les localitzacions ni els transmissors responsables del senyal de neurones del PVN i LH fins a les neurones simpàtiques premotrius de TAM, tot i això, s'ha determinat l'activació de l'activitat nerviosa simpàtica en TAM després de l'administració ICV d'agonistes del MC4R [466, 467]. L'activació de la zona DMH provoca una estimulació de les neurones simpàtiques premotrius del TAM en el nucli del raphe, seguit de l'estimulació de les neurones preganglionars. Aquestes neurones, mitjançant l'impuls colinèrgic, estimulen les cèl·lules ganglionars

simpàtiques que alliberen NA en el TAM activant els  $\beta$ -AR i iniciant la seva via de senyalització fins a modular l'activitat i l'expressió de la UCP1.

## 4. TUNGSTAT SÒDIC

El tungstè o wolframi ( $^{74}W$ ), metall de transició del grup VIa, amb nombre atòmic de 74 i pes molecular de 183.85 g/mol, esdevé un cas particular entre els elements de la taula periòdica. Els elements amb pes molecular superior al del brom ( $^{35}Br$ ) que presenten activitat biològica són escassos, i les excepcions més notables són el molibdè ( $^{42}Mo$ ), el iode ( $^{53}I$ ), l'estronci ( $^{38}Sr$ ), el niobi ( $^{41}Nb$ ), el bari ( $^{56}Ba$ ) i el tàntal ( $^{73}Ta$ ) [468, 469]. El tungstè presenta similituds amb alguns d'aquests elements, fins al punt d'arribar a parlar del tungstè com anàleg del molibdè. El tungstè i el molibdè presenten estructures atòmiques i radis iònics similars, a més d'exhibir una química de coordinació semblants, això ha suposat que fins el descobriment de proteïnes funcionals que contenen tungstè, se li assignés com única funció la d'antagonitzar els molibdoenzims mitjançant la substitució dels àtoms de molibdè [470]. L'avanç en el coneixement del tungstè en biologia, ha permès demostrar l'existència de tungstoenzims en organismes procariotes actuant com catalitzadors en reaccions claus del metabolisme del carboni, el nitrogen i el sulfur o mimetitzant els molibdoenzims. S'evidencia d'aquesta manera una similitud funcional d'ambdós elements en els sistemes biològics, de fet, les úniques formes de vida que no requereixen molibdè, són organismes termòfils anaeròbics obligats i utilitzen el tungstè en el seu lloc [471, 472].

El tungstè, és un element escàs a la natura, en la classificació d'elements més abundants el tungstat es troba en el lloc 54, amb una proporció de 1.1 ppm en pes, el que el defineix com element traça [473, 474]. Es troba normalment en forma de oxoanions en minerals com la *scheelita* ( $\text{CaWO}_4$ ) o wolframita ( $[\text{Fe/Mn}]\text{WO}_4$ ), i més rarament com tungstenita ( $\text{WS}_2$ ). A nivell industrial, les aleacions de tungstè, amb una duresa comparable a la del diamant, esdevenen el producte de major ús de l'element. També s'empra en filaments per a bombetes, com catalitzador en la indústria petrolera i com agent lubricant [475]. La química del tungstè és complexa i versàtil, ja que l'element pot adquirir múltiples estats d'oxidació (de -2 a +6) i formar complexos polinuclears, però, a nivell biològic, només s'han identificat complexos mononuclears i en estats d'oxidació +4, +5 i +6 [476-478]. La elevada capacitat de cessió d'electrons, típica dels metalls, permet la formació de polianions, donant lloc a la formació de diverses sals entre les que destaca pel nostre interès el tungstat sòdic.

El tungstat sòdic és una sal neutra de tungstè, de color blanc amb textura fina i cristal·lina. En solució aquosa es dissocia formant l'anió tungstat ( $\text{WO}_4^{-2}$ ), d'estructura tetraèdrica similar a la presentada per el fosfat ( $\text{PO}_4^{-2}$ ), i fonamental per exercir una de les seves funcions biològiques més importants, l'activitat inhibidora de fosfatases. Els processos de fosforilació i defosforilació de proteïnes esdevenen en moltes vies metabòliques importants punts de regulació, arribant a ser en certs casos els processos limitants de la senyalització intracel·lular, i, per tant, d'interès biomèdic per a la intervenció terapèutica en certes patologies. El tungstat conjuntament amb d'altres oxoanions metàl·lics, com el vanadat, molibdat o el cromat han despertat interès per la seva capacitat inhibidora de fosfatases i d'altres enzims com les sulfatases [479]. Dels estudis realitzats amb la proteïna tirosina fosfatasa (PTP) de *Yersina pestis* es desprèn que el mecanisme

d'inhibició del tungstat es degut al canvi conformacional patit pel centre actiu de l'enzim al donar-se la substitució del pirofosfat ( $P_2O_7^{-4}$ ) per part del tungstat, d'estructura similar [480]. Estudis més recents, en els que s'apliquen eines bioinformàtiques per dilucidar l'estructura dels centres actius de les fosfatases durant la interacció amb inhibidors selectius, estan permetent comprendre millor el mecanisme d'inhibició del tungstat [481].

#### **4.1.EFECTES DEL TUNGSTAT EN L'OBESITAT**

La prevalença de l'obesitat i les malalties associades, així com les limitacions en eficàcia i seguretat dels fàrmacs antiobesitat de que actualment es disposen [482], obliguen a cercar noves teràpies més eficaces i segures per tractar la malaltia. La reducció de pes en rates sanes tractades amb tungstat en l'estudi d'aquesta substància com agent antidiabètic [483-486], van dirigir els estudis de Claret i col·laboradors [487] a examinar l'efecte del tungstat sòdic en el tractament de l'obesitat. En aquest estudis van emprar un model de rata obesa induïda per dieta [175]. L'administració d'aquesta dieta va provocar un augment en la ingesta respecte a les rates alimentades amb pinso estàndard, i un increment de pes proper al 24% sense afectar a la taxa de creixement. A més d'augmentar els nivells plasmàtics de TG, NEFA i leptina, i desenvolupar intolerància a la glucosa. L'administració oral de diferents dosis de tungstat durant un període de 30 dies, van mostrar que la dosi més efectiva en la pèrdua de pes, era de 2 mg/ml en la beguda, corresponent a una ingesta mitja de 227 mg/Kg/dia. Amb aquesta dosi es va produir una disminució del guany ponderal, sense disminuir la ingesta ni la taxa de creixement, a més d'observar-se l'absència dels efectes secundaris associats a fàrmacs que inhibeixen l'absorció intestinal de greixos. També es va observar que després d'un període de suspensió del tractament, els animals recuperaven

progressivament el pes, indicant que el tungstat no provocava un estat persistent de pèrdua de pes. A l'efecte de la disminució de guany ponderal, li acompanyava una millora en el perfil metabòlic associat al fenotip obès (disminució de nivells circulants de TG, NEFA, leptina i insulina), una millora en la sensibilitat a la insulina i una disminució de l'adipositat. El tungstat va induir un increment coordinat en l'expressió en el teixit adipós de gens involucrats en el transport (LPL i aP2) i en l'oxidació (mCPT1) d'àcids grassos. LPL catalitza el pas clau en la hidròlisi de TG, i és important en la regulació del metabolisme i dels nivells circulants dels TG [488]. aP2 és una proteïna citosòlica responsable del transport dels NEFA a orgànuls oxidatius [489], i mCPT1 es l'enzim limitant de la  $\beta$ -oxidació en els mitocondris [490]. Els canvis d'expressió d'aquests enzims suggereixen que el tungstat augmenta l'entrada d'àcids grassos en els mitocondris per la seva posterior oxidació. El tractament també va provocar alteracions en els nivells d'expressió de proteïnes desacobladores, incrementant UCP1 en TAM i UCP2 i UCP3 en TAB epididimari i en múscul esquelètic, apuntant un possible increment en la termogènesi. Així doncs, per als autors, les variacions de UCPs i dels gens involucrats en el transport i en l'oxidació de lípids, podrien causar un increment en la dissipació d'energia i una reducció en el contingut de TG en el teixit adipós, que, conseqüentment, contribuiria a la disminució de l'adipositat i del pes corporal, i a la millora en la sensibilitat a la insulina. Els estudis no van mostrar diferències en l'expressió de PPARs, en canvi s'ha demostrat un fort increment en la fosforilació de PPAR $\gamma$  en teixit adipós en resposta al tractament amb tungstat [491]. Aquest factor de transcripció, que és crític en la coordinació del ritme d'oxidació i emmagatzematge d'àcids grassos, regula la expressió de UCPs i enzims involucrats en l'homeòstasi lipídica [492, 493], que també estan regulats pel tungstat. A més, l'activació de PPAR $\gamma$  pot donar-se a través de la via de les MAP cinases [494-496], i s'ha observat un

augment d'activació de ERK 1/2 en resposta al tungstat en diferents línies cel·lulars, incloent-hi la línia 3T3-L1 [497]. D'aquests resultats es pot inferir que el tungstat exerceix el seu efecte antiobesitat a través de l'activació de MAPK, que modularia l'activitat de PPAR $\gamma$ , que actuaria en la regulació de l'expressió de gens involucrats en la termogènesi i en la oxidació de lípids.

#### **4.2.EFECTES DEL TUNGSTAT EN LA DIABETIS MELLITUS**

En el darrer segle la literatura científica ha fet referència a l'efectivitat de diversos compostos metàl·lics en el tractament de la diabetis mellitus. Aquest és el cas del vanadat de sodi (NaVO<sub>3</sub>), del qual l'any 1899 se'n van descriure, per primera vegada els seus efectes beneficiosos. Ha estat, però, en els darrers anys, quan l'estudi d'aquestes sals metàl·liques han rebut un major impuls, en particular, en el camp de la diabetis mellitus per presentar certa capacitat mimètica de la insulina *in vivo* i *in vitro*, com és el cas de les sals de vanadat [498-501], el selenat [502], i les sals de liti [503, 504]. Els primers estudis en els que s'indagava l'efectivitat del tungstat com agent antidiabètic, van ser realitzats per Barberà i col·laboradors en el model de rata diabètica STZ, model de DM1. Aquests estudis van evidenciar que el tractament oral amb tungstat provocava una reducció dels valors de glicèmia i la reversió de les alteracions hepàtiques del metabolisme de la glucosa, aconseguint incrementar la capacitat del fetge per utilitzar glucosa a través de la glicòlisi i de la síntesi de glicogen [484]. Els estudis realitzats a llarg termini van demostrar que el tungstat, a més de reduir el nivells de glucosa en sang sense provocar episodis d'hipoglucèmies, prevenien l'aparició d'alteracions renals i oculars induïdes per la diabetis, i reduïen la mortalitat. També descartaven efectes adversos del tractament a llarg termini [505].

Estudis realitzats en models experimentals de DM2, la rata nSTZ i la rata obesa Zucker diabètica (ZDF), també van demostrar l'eficàcia del tractament oral amb tungstat a l'arribar a normalitzar els nivells de glicèmia [483, 486]. En el model nSTZ el tungstat també va ser capaç de restaurar la secreció d'insulina per part de la cèl·lula  $\beta$  en resposta a la glucosa. Paral·lelament, es va observar una recuperació parcial del contingut d'insulina, així com un augment en l'expressió del RNA de la preproinsulina. Aquests efectes es fonamenten en la restauració de la funció de l'illot pancreàtic, on es va observar un augment en la massa  $\beta$  cel·lular pancreàtica. Aquest augment de massa han d'estar lligats a processos proliferatius o neogènics (producció de cèl·lules  $\beta$  noves a partir de precursors ductals), i en el cas del tungstat els estudis van mostrar la presència de cèl·lules que expressaven insulina en zones properes als ductes i en el teixit exocrí cèl·lules que expressaven PDX-1, suggerint activitat neogènica [485]. Els mateixos estudis van demostrar la capacitat del tungstat per activar el factor de transcripció PDX-1, responsable de la regulació del desenvolupament pancreàtic. Per una altra banda, en el model ZDF, es va observar una reducció considerable de la glicèmia i de la hipertrigliceridèmia associada al model experimental. L'absència de canvis significatius en el perfil de fosforilació en proteïnes tirosines, suggerien que l'efecte del tungstat estava mitjançat per una millora parcial del metabolisme hepàtic de la glucosa mitjançada per l'activació de la síntesi de glicogen [497], juntament amb una reducció de la lipotoxicitat en el fetge [486].



### **4.3. TOXICITAT DEL TUNGSTAT**

Els estudis realitzats per Le Lamer-Dechamps i col·laboradors sobre la farmacocinètica del tungstat sòdic en rata i gos [506-509], van descriure que l'administració de tungstat seguia una cinètica de primer ordre i la seva concentració en relació al temps va coincidir amb un model de dos compartiments. Els resultats van mostrar una alta absorció quan es va administrar en solució ( $t_{\max} = 1-2$  h) i una alta biodisponibilitat (92% en rata i 65% en gos), el que beneficia al tungstat com a agent terapèutic, ja que una baixa biodisponibilitat s'associa amb l'aparició d'efectes secundaris, com és el cas del vanadat (5-30%). El  $t_{1/2}$  d'eliminació va determinar-se en 1.7 h en el cas de la rata i 4 h en el cas del gos, això representa un procés ràpid d'eliminació, el que minimitza l'acumulació en teixits, i és únicament en testicle, ronyó i os on s'han observat nivells detectables [510]. Els estudis del toxicitat de tungstat van demostrar, que no era un compost amb toxicitat severa i que únicament provocava efectes nocius o letals en dosis molt elevades [498], i molt llunyanes de les dosis terapèutiques com a agent antiobesitat, essent la  $DL_{50}$  en rata 1928 mg/kg i la dosi terapèutica 227 mg/Kg. A més, tractaments de curta i de llarga durada en rosegadors, no han demostrat en cap cas efectes adversos com diarrea, hepatotoxicitat o nefrotoxicitat [483-486, 498, 506-509]. Així doncs, el tungstat presenta un ample marge de bioseguretat en el tractament contra l'obesitat.



# III. MATERIALS I MÈTODES

*“El mestre va preguntar desplegant un ventall:*

*-Que és això?*

*Un deixeble responguè:*

*- És un ventall.*

*Un altre deixeble el va agafar i plegar, i es va  
gratar l’esquena.”*



## 1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

### 1.1. Models d'animals d'experimentació

Tots els animals emprats en aquesta tesi van ser subministrats per l'empresa Charles River Laboratories Inc. (Santa Perpètua de la Mogoda, Espanya) i es van mantenir a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els animals es van mantenir estabulats individualment i en condicions ambientals controlades (cicles de llum i foscor de 12h, temperatura de  $21 \pm 2$  °C i humitat relativa del 50-60 %). Tots els protocols experimentals que es van realitzar durant aquesta tesi es van portar a terme seguint les normes de manipulació d'animals per a experimentació, i van estar prèviament autoritzats pel comitè ètic d'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.

Els animals emprats en aquesta tesi van ser:

- **Rates Wistar**

*Rattus norvegicus* mascles de la soca Wistar de 10 setmanes d'edat.

- **Rates Zucker *fa/fa***

*Rattus norvegicus* mascles de la soca Zucker obeses *fa/fa* (RZO) i rates control Zucker lean +/- (RZL) de 10 setmanes d'edat.

- **Ratolí *ob/ob***

*Mus musculus* mascles de la soca *ob/ob* i ratolins control +/- (*lean*) de 10 setmanes d'edat.

Tots els experiments, excepte els realitzats amb rates Wistar alimentades amb dieta de cafeteria, es van iniciar o realitzar amb animals de 12 setmanes d'edat, mantenint-los un període previ de 1-2 setmanes en l'estabulari per permetre una correcta aclimatació dels animals. En els cas de les rates Wistar alimentades amb dieta de cafeteria, es va fer un període previ de 4 setmanes d'inducció d'obesitat amb la dieta, pel que els animals van ser subministrats amb 7 setmanes d'edat.

## 1.2. Dietes

Els animals van ser alimentats ad libitum amb una dieta de pinso estàndard (tipus AO4, Panlab, Barcelona, Espanya) o bé amb una dieta de cafeteria, segons s'indica en cada cas. L'accés a l'aigua de beguda va ser lliure durant tot el procés experimental per ambdós grups dietètics. El protocol de la dieta de cafeteria aplicat va consistir en l'administració diària (a primera hora del matí) i en excés, d'un ventall d'aliments d'elevada palatabilitat i d'elevat contingut en lípids i carbohidrats. La composició d'aquesta dieta va ser, prèviament, descrita per Prats [175], i per a aquest protocol es va modificar lleugerament:

- Pinso estàndard (AO4, Panlab) [3,0 Kcal/g]
- Galetes tipus "Maria" [4,7 Kcal/g]
- Paté de fetge de porc [3,6 Kcal/g]
- Cansalada [6,6 Kcal/g]
- Llet sencera suplementada amb 333 g/l de sucre i 10 g/l d'un suplement vitamínic i mineral amb sabor de xocolata (Gevral, Cynamid Ibèrica, Madrid, Espanya) [1,98 Kcal/ml]

Diàriament es va mesurar el consum de cadascun dels components alimentaris de la dieta (corregit per la pèrdua d'aigua) de tots els animals.

Les composicions a nivell de nutrients i energia derivada de cada nutrient, de les dues dietes emprades van ser:

	Dieta pinso estàndard		Dieta de cafeteria	
	Composició (%)	Energia derivada (%)	Composició (%)	Energia derivada (%)
Proteïnes	15,5	21	12,7	9
Lípids	3,3	8	38,7	65
Carbohidrats	68,8	71	36,1	25
Altres	10,4	-	13,0	-
Energia total (Kcal/g)	3,0		5,5	

A les rates Wistar alimentades amb dieta de cafeteria, se les va sotmetre a un període previ d'inducció d'obesitat, en el que es va administrar durant 4 setmanes prèvies a qualsevol tractament o mesura, la dieta de cafeteria.

### 1.3. Tractament amb tungstat

Els diferents models animals alimentats amb la mateixa dieta, es van dividir en dos grups, tractats i no tractats. El tractament va consistir, si no s'explicita el contrari, en l'administració oral de tungstat sòdic

( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Carlo Erba, Milà, Itàlia) a la concentració de 2 mg/ml en l'aigua i/o la llet de beguda durant 28 o 30 dies segons l'experiment.

#### **1.4. Tractament amb leptina**

Ratolins *ob/ob* van ser tractats amb leptina recombinant de ratolí (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU). La pauta de tractament va ser la següent, dues injeccions intraperitoneals amb el volum necessari per administrar una dosi de 0,5 µg de leptina/g de pes corporal a partir d'una solució de leptina 0,125 mg/ml dissolta en NaCl 0,9 %. L'administració de leptina es va fer a les 8:00 i a les 20:00h durant cinc dies consecutius. Un grup addicional de ratolins, emprat com grup control, es va tractar amb NaCl 0,9 %, seguint la mateixa pauta d'administració i injectant el volum equivalent de la solució salina

#### **1.5. Monitoratge del pes i de la ingesta**

El monitoratge del pes i de la ingesta de cada animal es va realitzar diàriament, així com el consum d'aigua

## **2. TRASPLANTAMENT DE TEIXIT ADIPÓS EN RATOLINS *ob/ob*.**

Amb l'objectiu de recuperar la deficiència en leptina del ratolí *ob/ob* es van realitzar trasplantaments de teixit adipós de ratolins *lean* en ratolins *ob/ob*. La tècnica de trasplantament de teixit adipós no ha estat massa descrita, amb l'excepció de dos treballs publicats al 1978 [511] i al 1983 [512]. L'any 2000, Gavrilova va publicar un treball [513], citat i emprat per altres



per la realització del trasplantament de teixit adipós en models murins [514-518]. Aquest protocol de trasplantament amb diverses modificacions va ser l'emprat en els nostres experiments.

### **2.1. Trasplantament del teixit adipós**

A ratolins *ob/ob* de 12 setmanes d'edat, se'ls va administrar buprenorfina 30 minuts abans de la intervenció, com analgèsic, amb una dosi de 0,025 mg/Kg de pes corporal mitjançant injecció subcutània. Posteriorment, van ser anestesiats per inhalació d'isofluorà (Forane, Abbot Laboratories, Kent, Anglaterra) al 2% mitjançant un vaporitzador (Ohmeda, Madison, Wiconsin, EEUU). A cadascun d'aquest animals se'ls va realitzar, a nivell de la dermis, quatre incisions de 0,5 cm en la zona dorsal, dos a la zona escapular i dos més a la zona lumbar. Simultàniament, es van sacrificar per dislocació cervical dos ratolins *lean* per cada ratolí *ob/ob* a trasplantar, i immediatament es va extreure el teixit adipós epididimari dels ratolins sacrificats i es va rentar amb una solució estèril de NaCl 0,9 %, i es van disseccionar trossos de 100-150 mg. Es va trasplantar un tros d'aquest teixit adipós en cada incisió del ratolí receptor fins trasplantar un total de 500 mg de teixit, i seguidament es va suturar amb fil de seda trenada no absorbible de 26 mm (Laboratorio Aragón S.A., Barcelona, Espanya) i es van tractar les zones intervingudes amb una solució de povidona iodada al 10 % (laboratorios betamadrileño S.L., Getafe, Espanya) per mantenir la zona asèptica. Els ratolins trasplantats es van mantenir sota escalfor fins la plena recuperació de l'anestèsia. Els animals plenament recuperats van ser estabulats individualment en les condicions estandarditzades de temperatura, humitat i cicles de llum, i van ser alimentats amb la dieta estàndard prèviament descrita. El tractament amb tungstat va ser el descrit prèviament.

Un grup addicional de ratolins *ob/ob* va ser trasplantat amb teixit adipós epididimari de ratolí *ob/ob*, seguint el mateix protocol. Aquest grup de ratolins es va emprar com control de trasplantament amb deficiència en leptina.

## **2.2. Extirpació del teixit adipós**

Quatre setmanes després de realitzar el trasplantament de teixit adipós, es va realitzar l'extirpació del teixit trasplantat en els ratolins *ob/ob*. 30 minuts abans de la intervenció es va administrar buprenorfina (0,025 mg/Kg de pes corporal) mitjançant injecció subcutània. Posteriorment, van ser anestesiats per inhalació d'isofluorà al 2% mitjançant un vaporitzador. Es van realitzar incisions de 1 cm a la zona on es van inserir els teixits trasplantats, i es van extreure mitjançant l'ús de pinces i bisturí. Després de l'extirpació les incisions es van suturar i tractar amb povidona iodada al 10 % . Els ratolins intervinguts es van mantenir sota escalfor fins la plena recuperació de l'anestèsia

## **3. PROTOCOL D'EXTRACCIÓ I OBTENCIÓ DE FLUIDS I TEIXITS.**

### **3.1. Obtenció de sang i plasma**

Les mostres de sang van ser obtingudes a partir de la vena caudal, realitzant un petit tall a l'extrem de la cua dels animals en dejú per un període de 5h a partir de les 9:00h, una hora després de l'entrada en la fase diürna. L'extracció es va portar a terme mitjançant un sistema capil·lar impregnat amb EDTA (Sarsted, Nümbrecht, Alemanya). Les mostres es van mantenir en gel des de l'instant immediatament posterior a la seva extracció, fins el

seu posterior processament per a l'obtenció de plasma. (1000g, 20 min a 4 °C). Les mostres es van conservar a -20 °C.

### **3.2. Obtenció de teixits**

Per l'extracció de teixits, els animals van ser anestesiats per inhalació d'isofluorà. Els diferents teixits (incloent-hi TAMi, TABsc, TABep, els trasplants subcutanis i l'hipotàlem) es van extreure, netejar amb una solució de NaCl 0,9% i pesar. Seguidament, una part dels teixits es van congelar ràpidament en N<sub>2</sub> líquid i posteriorment es va conservar a -80 °C fins a la seva utilització. L'altre part dels teixits es van fixar en formalina al 10% per al seu posterior tractament i inclusió en parafina, (protocol que es detallarà a continuació).

Al finalitzar l'extracció dels teixits, els animals van ser sacrificats mitjançant l'administració en excés d'isofluorà.

## **4. MESURES METABÒLIQUES.**

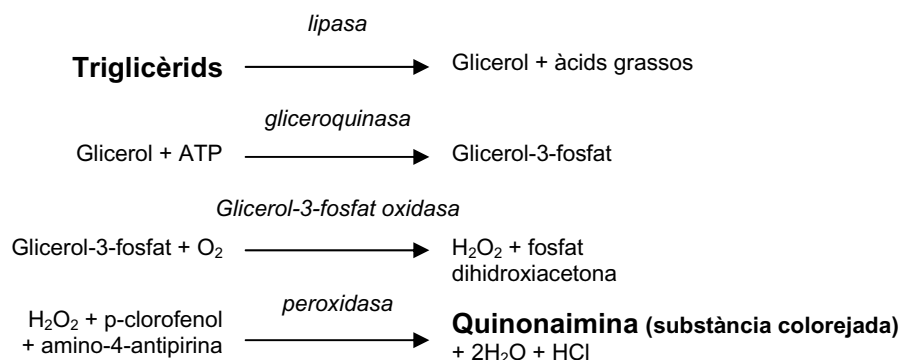
Per a la realització de les diverses mesures metabòliques, es van emprar mostres de sang o plasma provinent d'animals dejunats durant 5 hores. La determinació de la concentració circulat dels diversos paràmetres es va portar a terme mitjançant *Kits* comercials i seguint els protocols recomanats pels fabricants. A continuació es detalla la relació de les mesures realitzades:

#### 4.1. Determinació de la glicèmia

Per a la determinació dels nivells circulants de glucosa, es va emprar un sensor de glucosa AccuTrend (Roche, Mannheim, Alemanya), i es va fer la mesura directa en sang.

#### 4.2. Determinació dels TG

La determinació dels nivells plasmàtics de triglicèrids es va realitzar mitjançant un assaig colorimètric emprant el Kit comercial TG PAP-150 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Aquest assaig empra com a principi la següent seqüència de reaccions:



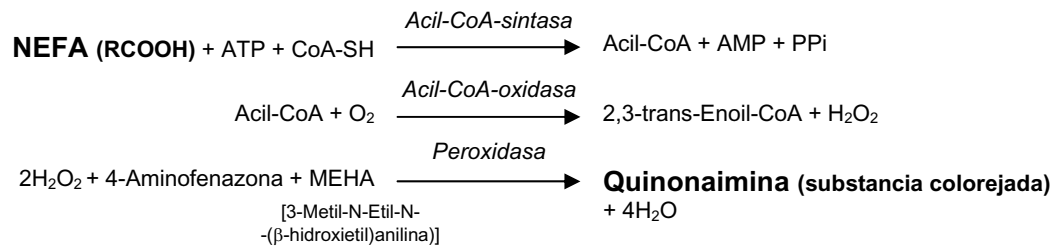
La intensitat de coloració de la quinonaimina, determinada per espectrofotometria a 505 nm de longitud d'ona, és proporcional a la quantitat de triglicèrids presents a la mostra.

La determinació quantitativa es va realitzar per la interpolació dels valors obtinguts en les mostres amb els valors obtinguts d'una recta patró.

#### 4.3. Determinació dels NEFAs

La determinació dels nivells plasmàtics d'àcids grassos no esterificats es va realitzar mitjançant un assaig colorimètric emprant el Kit comercial NEFA

C (ACS-ACOD method) (Wako, Neuss, Alemanya). Aquest assaig empra com a principi la següent seqüència de reaccions:



La intensitat de coloració de la quinonaimina és proporcional a la quantitat de NEFAs presents a la mostra. La intensitat de coloració es determina per espectrofotometria a 550 nm de longitud d'ona.

La determinació quantitativa es va realitzar per la interpolació dels valors obtinguts en les mostres amb els valors obtinguts d'una recta patró.

#### 4.4. Determinació de la leptinèmia

La determinació dels nivells plasmàtics de leptina es va realitzar mitjançant l'ús d'assaigs immunoenzimàtics amb un kit comercial Mouse Leptin ELISA Kit (Linco Research, St. Charles, Missouri, EEUU).

Aquest kit té una especificitat del 100 % per ratolí i del 70 % per rata, i es va fer servir indistintament per a les dues espècies.

### 5. ANÀLISI HISTOLÒGICA I MORFOMÈTRICA DEL TEIXIT ADIPÓS.

Per realitzar els estudis histològics, les mostres de teixit adipós es van fixar en formol al 10% (Sigma-Aldrich) immediatament després de la seva extracció. A continuació es va procedir a la seva inclusió en blocs de parafina.

### **5.1. Fixació i inclusió en parafina**

Els teixits es van mantenir en formalina al 10 % (Sigma-Aldrich) a temperatura ambient durant 4 hores. Posteriorment, les mostres es van deshidratar i incloure en parafina seguint el següent protocol:

1. Rentat amb PBS.
2. Submergir les mostres en etanol 50% durant 20 minuts (tres vegades).
3. Submergir les mostres en etanol 70% durant 20 minuts (tres vegades).
4. Submergir les mostres en etanol 100% durant 20 minuts (tres vegades).
5. Submergir les mostres en xilol durant 15 minuts (dues vegades).
6. Submergir en solució parafina-xilol (1:1) i mantenir durant tota la nit a temperatura ambient.
7. Escalfar les mostres fins dissolució de solució parafina-xilol (40 °C).
8. Submergir en parafina 1h a 60 °C.
9. Incloure en motlles amb parafina i deixar solidificar

Les mostres incloses en parafina es van conservar a temperatura ambient fins a la seva utilització

Les mostres van ser tallades en seccions de 10 µm de gruix amb un micròtom (Leica Instruments, Nussloch, Alemanya). Aquestes seccions es van fixar en portaobjectes prèviament submergits en polilisina 5 % (Sigma-Aldrich).

### **5.2. Tinció amb Hematoxilina/Eosina**

Les seccions es van tenyir amb hematoxilina (Sigma-Aldrich) i eosina (Sigma-Aldrich) seguint protocols estàndard:

1. Desparafinar les seccions en xilol durant 10 minuts (dues vegades).
2. Hidratar amb concentracions decreixents d'etanol (100; 75 i 50 %) durant 3 minuts.
3. Submergir en solució d'hematoxilina de Mayer durant 15 minuts.
4. Rentar amb aigua de l'aixeta durant 15 minuts.
5. Submergir en solució d'eosina durant 1 minut.
6. Deshidratar amb concentracions creixents d'etanol fins a xilol durant 3 minuts.

Les preparacions es van analitzar emprant un microscopi amb programa de digitalització i processament d'imatges Leica DMR (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanya).

## **6. AÏLLAMENT DE L'RNA I ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR QUANTITATIVA.**

### **6.1. Obtenció total de l'RNA de teixits.**

La purificació i la manipulació de l'RNA requereix certes precaucions que cal tenir presents. La principal font de degradació de l'RNA és la contaminació per ribonucleases (RNases), enzims molt actius i estables que poden generar importants problemes per a l'òptima obtenció de l'RNA. Per tant, és necessari treballar amb guants per evitar el contacte directe amb la pell, principal font de contaminació per RNases. A més cal treballar amb reactius i material d'ús específic lliures d'RNases. Les solucions s'han de preparar amb aigua tractada amb dietil pirocarbonat (DEPC) o lliure d'RNases.

L'aïllament de RNA es va realitzar mitjançant el mètode clàssic del tiocianat de guanidini, descrit per Chomczynski [519], amb certes adaptacions:

1. Per 1 g de teixit, homogeneïtzar amb 5 ml d'una solució de tiocianat de guanidini (Invitrogen Corp., Carlsbad, Califòrnia, EEUU) i 36 µl de β-mercaptoetanol, emprant un homogeneïtzador de tipus Potter-Elvehjein de vidre-teflon.
2. Afegir 5 ml de cloroform i remenar vigorosament durant 20 segons.
3. Centrifugar (1600 rpm, 15 minuts a 4 °C). Recollir el sobrenedant (fase aquosa) i transferir a un tub nou.
4. Afegir 250 µl d'acetat de sodi 2 M (pH = 4,0), 2,5 ml de fenol i 500 µl d'una solució de cloroform-alcohol isoamílic (49:1) a cada tub. Remenar vigorosament durant 20 segons i mantenir en gel durant 15 minuts.
5. Centrifugar (10.000 g, 20 minuts a 4 °C) i transferir el sobrenedant (fase aquosa) a un tub nou.
6. Afegir 2,5 ml d'isopropanol i remenar suaument.
7. Incubar almenys 1h a -80 °C, o bé, tota la nit a -20 °C per precipitar l'RNA.
8. Centrifugar (10.000 g, 30 minuts a 4 °C) i eliminar el sobrenedant.
9. Rentar el *pellet* amb 1 ml d'etanol al 70 %, centrifugar (10.000 g, 15 minuts a 4 °C) i eliminar sobrenedant.
10. Deixar assecar el pellet a temperatura ambient i resuspendre amb aigua DEPC.
11. Conservar les mostres a -80 °C.



## **6.2. Quantificació de la concentració i l'avaluació de la puresa de l'RNA.**

Una vegada aïllat i resuspès l'RNA, es va determinar la seva concentració mitjançant espectrofotometria, analitzant l'absorbància a 260 nm de longitud d'ona, tenint en compte que una unitat d'absorbància a aquesta longitud d'ona correspon a 40mg/ml d'àcid nucleic de cadena senzilla. La puresa de la preparació es va avaluar mesurant la relació entre l'absorbància a 260 nm i 280 nm de longitud d'ona. Es considera que la mostra presenta una puresa acceptable quan aquesta relació es troba entre 1,9 i 2,1.

## **6.3. Integritat de l'RNA.**

La integritat de l'RNA es va comprovar mitjançant gels de formaldehid/agarosa, un sistema d'electroforesi desnaturalitzant que permet una bona resolució de l'RNA de cadena senzilla [520]. En aquest estudi els gels emprats van ser de l'1 % (p/v) d'agarosa, indicats per a la separació de fragments compresos entre 0,4 i 6 Kb. La concentració final de formaldehid en el gel va ser de 2,2 M, permetent una adequada desnaturalització de les mostres en electroforesis llargues. El protocol de preparació dels gels i les mostres va ser el següent:

### Protocol per la preparació de gels d'electroforesi de formaldehid/agarosa:

1. Dissoldre 1,5 g d'agarosa en 109 ml d'aigua DEPC al forn microones.
2. Mantenir la solució a 60 °C en un bany. A continuació afegir 15 ml de MOPS 10X preescalfat, 27 ml de formaldehid al 37 % (12,3 M) i agitar suaument.

3. Deixar refredar lleugerament i abocar la solució en el motlle pertinent, on prèviament s'haurà col·locat la pinta per formar els pous de càrrega. Deixar solidificar el gel sobre una superfície plana a temperatura ambient.

Protocol per la preparació de gels d'electroforesi de formaldehid/agarosa:

1. Pipetejar el volum necessari de mostra per disposar de 5 µg d'RNA.
  - 1.1. Si el volum de mostra és superior a 5 µl, precipitar les mostres afegint 1/10 del volum inicial d'acetat de sodi 2 M (pH=4), 3 volums d'etanol 100 % i posant-les a -80 °C durant un temps superior a 15 minuts
  - 1.2. Centrifugar (14.000 rpm, 20 minuts a 4 °C) i eliminar el sobrenedant.
  - 1.3. Rentar el *pellet* amb 500 µl d'etanol al 70 %, centrifugar (14.000 rpm, 20 minuts a 4 °C) i eliminar sobrenedant.
  - 1.4. Deixar assecar el pellet a temperatura ambient i resuspendre amb 5 µl d'aigua DEPC.
2. Afegir 15 µl de tampó de càrrega desnaturalitzant amb formaldehid (Ambion Inc., Austin, Texas, EEUU) i 1 µl de bromur d'etidi (10 µg/µl; Invitrogen Corp.) i remenar.
3. Desnaturalitzar les mostres incubant-les 15 minuts a 65 °C i, a continuació, mantenir en gel.
4. Carregar les mostres en el gel d'agarosa, incloent un carril amb marcadors de pes molecular (Ambion Inc.), i córrer l'electroforesi amb tampó MOPS 1X a un voltatge de 5 V/cm fins que el front ha migrat 2/3 del gel (per a un gel mitjà, 30V durant 4 hores aproximadament).

El gel es va visualitzar en un transil·luminador de llum U.V. i la integritat de l'RNA es va constatar amb la presència de dues bandes clarament definides corresponents als fragments de l'RNA 18S i 28S (1,8 Kb i 4,8 Kb respectivament). Per contra, si l'RNA es troba parcialment o totalment degradat, s'observaran múltiples bandes o un *smear*.

#### 6.4. Retrotranscripció de l'RNA

Per el posterior estudi de PCR quantitativa, cal prèviament fer una retrotranscripció de l'RNA. Aquest procés genera còpies de cDNA emprant com a motlle les seqüències de mRNA de la mostra. Aquestes còpies de cDNA seran emprades com motlle en la PCR.

Per a la realització de la retrotranscripció es va emprar el kit comercial First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen), fent servir com transcriptasa inversa la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). El protocol que es va seguir va ser el detallat pel fabricant:

##### 1. Preparació de les mostres:

2 µg d'RNA total	x µl
mescla de dNTP (10mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP)	1 µl
Encebadors (random hexamers 50 ng/µl)	1 µl
Aigua DEPC	fins a 10 µl

2. Incubar les mostres a 65 °C durant 5 minuts i immediatament després deixar en gel, almenys 1 minut

3. Preparar la mescla de reacció:

Tampó de RT 10X	2 µl / per mostra
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4 µl / per mostra
DTT (100 mM)	2 µl / per mostra
Inhibidor de la RNasa (RNase out)	2 µl / per mostra

4. Afegir a cada mostra 9 µl de la barreja de reacció i incubar durant 2 minuts a 42 °C.
5. Afegir a cada mostra 1 µl de l'enzim SuperScript II RT (50 U/ µl), mesclar bé i incubar a 42 °C durant 50 minuts.
6. Finalitzar la reacció amb un pas d'inactivació de l'enzim incubant a 70 °C i ràpidament posar en gel.

### 6.5.PCR quantitativa.

El mètode de PCR quantitativa o PCR en temps real, suposa una millora substancial respecte el mètode tradicional de PCR a punt final que en permet fer una valoració qualitativa de la presència d'un gen, però que no permet quantificar el nombre de còpies d'un gen present a la mostra. En canvi, la PCR quantitativa permet quantificar el nombre de còpies d'un gen present a la mostra a cada cicle d'amplificació mitjançant la utilització de fluorocroms. Existeixen dos sistemes de detecció, el primer està basat en la tecnologia *TaqMan* (Applied Biosystems), que es basa en la utilització d'una sonda consistent en un oligonucleòtid que porta unit dos tipus de molècules: un marcador fluorescent (*reporter*) al seu extrem 5' i un reductor de l'emissió (*quencher*) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es troba intacta, la proximitat del quencher redueix enormement la fluorescència emesa pel reporter pel fenomen de FRET (Förster resonance energy

transfer). A mesura que la polimerasa allarga el primer, l'activitat 5' nucleasa d'aquesta degrada la sonda, que es troba unida entre els dos primers. D'aquesta manera el reporter i el quencher es separen, incrementant així el senyal de fluorescència. A cada cicle hi ha més molècules de reporter alliberades, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó generat.

El segon sistema es basa en la tecnologia SYBR green (Applied Biosystems), basat en la incorporació al DNA de doble cadena d'un fluorocrom que es troba inactiu en la seva forma lliure, i que comença a emetre fluorescència en el moment que s'uneix al DNA. Així doncs, aquest fluorocrom emet fluorescència de forma proporcional als nombre d'amplicons generats en la reacció, i aquests són proporcionals al nombre de còpies del gen que hi havia a l'inici en la mostra.

El mètode que es va emprar, utilitza el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Pel procés d'amplificació i anàlisi es va emprar el kit comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que combina el fluorocrom *SYBR Green 1 Dye*, la polimerasa *AmpliTaQ Gold DNA Polymerase*, un mix de *dNTPs* amb *dUTP* i un tampó optimitzat per fer la reacció, o bé el kit *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) que conté una sonda i un parell d'encebadors específics per a la seqüència a estudiar, polimerasa *AmpliTaQ DNA Polymerase*, un mix de *dNTPs* amb *dUTP*, protector contra reamplificacions de productes de PCR *AmpErase UNG* i un tampó optimitzat per fer la reacció

El llindar de fluorescència o threshold, es va optimitzar per a cada gen estudiat, i en base a aquesta mesura, es va determinar en nombre de cicles (Ct) que li calia a cada mostra per arribar al valor del llindar de fluorescència. Així les mostres amb un menor nombre de còpies del gen estudiat a l'inici de la reacció, trigaran més cicles en assolir els nivells de

fluorescència lliurar. Per tant, la mesura del Ct ens permetrà determinar els nivells d'expressió d'un gen de forma relativa entre dues o més mostres.

Per a la mesura de cada gen es va procedir de la següent manera:

### 6.5.1. Validació de la linealitat de la PCR.

Aquest apartat de validació consisteix en comprovar, amb la concentració d'encebadors escollida, que la diferència d'amplificació entre les diferents quantitats de cDNA és constant i, per tant, la relació de Ct és lineal.

#### PROCEDIMENT

1. Es fan dilucions de cDNA per comprendre valors de 1 a  $1/10^5$ , amb aigua.
2. Preparar la mescla de reacció:

Per a experiments amb SYBR Green

Power SYBR Green Master Mix 2X	10 µl per reacció
Encebadors 3' (20 µM)	0,5 µl per reacció
Encebadors 5' (20 µM)	0,5 µl per reacció
Aigua	5 µl per reacció

Per a experiments amb TaqMan

TaqMan Universal Master mix 2X	10 µl per reacció
Pre-developed TaqMan Assay Reagents 18s RNA (20X)	1 µl per reacció
Aigua	5 µl per reacció

2. Es realitza l'amplificació amb 4 µl d'aquestes dilucions i afegint-hi 16 µl de la mescla de reacció. Les condicions d'amplificació son les següents:

- 50 °C durant 2 minuts
- 95 °C durant 10 minuts (activació o *hot start* de la polimerasa)
- 40 cicles de:
  - 95 °C durant 15 segons
  - 60 °C durant 1 minut

3. Un cop acabada la reacció de PCR cal representar els resultats com Ct enfront del logaritme de la concentració de cDNA, i es determina el rang de linearitat de les mostres. A més, es determina l'eficiència de la reacció amb la mesura del pendent, així, valors de pendent de -3,33 indiquen una eficiència de la PCR del 100%. Si el pendent és superior a -3,33 indica que no s'ha obtingut una eficiència del 100%, és a dir, que no totes les cadenes s'amplifiquen en el cicle següent.

A més, per a les reaccions en que s'empra SYBR Green al final de la seqüència de cicles de cada amplificació es realitza una corba de dissociació (un gradient de temperatura que augmenta un grau cada 15 segons des de 60 fins a 95 °C), a fi de comprovar que el producte amplificat és únic. En augmentar la temperatura a la qual està sotmesa la mostra, el DNA de doble cadena (dsDNA) que s'ha format es va separant. Com que el SYBR green només emet fluorescència quan està entre una doble cadena de DNA aquesta va disminuint en anar augmentant la temperatura. Així doncs, si en la reacció s'haguessin amplificat dos seqüències diferents, en el gràfics de dissociació obtindriem dos pics a diferent temperatura. Aquesta és una altre forma d'assegurar-nos el correcte funcionament de la reacció de PCR i poder validar els resultats.

### 6.5.2. Mesura de les mostres.

Aquest procés és idèntic al descrit per a la validació de la linealitat. L'únic que canvia és la quantitat de mostra que s'afegeix en el tub de reacció, que ha d'estar dins el rang de linealitat determinat prèviament. Per a tots els nostres experiments la quantitat de mostra de partida va ser de 4 µl d'una dilució 1/100 del producte de retrotranscripció. A cada experiment es va afegir una corba patró d'una mostra dil·luida des de 1 fins a 1/10<sup>5</sup>, per determinar l'eficiència de la reacció, i a més es va realitzar la corresponent corba de dissociació per tal de verificar l'amplificació d'un únic fragment. S'utilitza l'RNA ribosòmic 18S com control per normalitzar l'expressió gènica, la quantitat de 18S per a cada mostra d'RNA. Així mateix, s'introdueix un control negatiu de la PCR on es posa H<sub>2</sub>O enlloc de la mostra de cDNA, per comprovar que no hi ha contaminació per DNA de cap dels reactius.

Per tal de dissenyar els encebadors per *Ucp1*, es va utilitzar el programa Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems) a partir de la seqüència del mRNA obtinguda en PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)). Realitzant un Megablast en una altra aplicació de la mateixa pàgina web, es va assegurar l'especificitat dels primers dissenyats. Els encebadors emprats per a la determinació de les subunitats 1 i 4 de la citocrom oxidasa (CO-I i IV), co-activador 1α de PPAR (*Pgc1α*), acetil-CoA carboxilasa (*Acacα*) i sintasa d'àcids grassos (*Fasn*) van ser amablement cedits per la Dra. M.C. Carmona. Els encebadors emprats per la determinació de *Npy* i *AgRP*, es van obtenir a partir de les seqüències publicades per Heijboer [521].

Encebadors emprats:



***Ucp1***

- Encebador 5' : 5'-CGATGTCCATGTACCACAAGGAA-3'
- Encebador 3' : 5'-TCGCAGAAAAGAAGCCACAA-3'

**CO-I**

- Encebador 5' : 5'- CGCCATCATATTCGTAGGAGTAAA -3'
- Encebador 3' : 5'- TCTGAGTAGCGTCGTGGTATTCC -3'

**CO-IV**

- Encebador 5' : 5'- CCGACTGGAGCAGCCTTTC -3'
- Encebador 3' : 5'- TCGGCGAAGCTCTCGTTAAA -3'

***Pgc1 $\alpha$*** 

- Encebador 5' : 5'-TGATGACAGTGAAGATGAAAGTGATAAAC -  
3'
- Encebador 3' : 5'- GGCGACACATCGAACAATGA -3'

***Acaca***

- Encebador 5' : 5'- GACTTGCAGAAGAAATACGCCATA -3'
- Encebador 3' : 5'- CTTGTATCCCTTGTAGGGATCTTCA -3'

***Fasn***

- Encebador 5' : 5'- TGCTCCCAGCTGCAGGC -3'
- Encebador 3' : 5'- GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA -3'

***Npy***

- Encebador 5' : 5'- CGCTCTGCGACACTACATCAA-3'
- Encebador 3' : 5'- GGGCTGGATCTCTTGCCAT-3'

***Agrp***

- Encebador 5' : 5'- GGTGCTAGATCCACAGAACCG-3'
- Encebador 3' : 5'- CCAAGCAGGACTCGTGCAG-3'

***Pomc***

- Encebador 5' : 5'- AGAGGCCACTGAACATCTTTGTC-3'
- Encebador 3' : 5'- GCAGAGGCAAACAAGATTGGA-3'

**Cart**

- Encebador 5' : 5'- TTCTTTCCTCTTGAAGTGCTTGTG-3'
- Encebador 3' : 5'- GGAATATGGGAACCGAAGGT-3'

**18s RNA**

- Per a aquest gen es va emprar uns encebadors i sondes predissenyades per Applied Biosystems (18s rRNA Assay on Demand Gene Expression)

**6.5.3. Quantificació de les mostres**

La quantitat relativa d'RNA present a cada mostra es va expressar com  $\Delta\Delta Ct$ , el que representa el increment de la Ct respecte a la mostra amb que es vol comparar. El càlcul de  $\Delta\Delta Ct$  es va realitzar de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{mostra referència}} - Ct_{\text{mostra}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \frac{1}{10^{-\left(\frac{\Delta Ct}{\text{pendent}}\right)}}$$

El valor del gen el normalitzem amb el valor del  $\Delta\Delta Ct$  del 18s RNA.

## **7. TEST DE PREFERÈNCIA GUSTATIVA (TWO-BOTTLE PREFERENCE TEST).**

Un dels procediments per determinar l'aversió o la preferència d'un individu vers un estímul gustatori és el test de preferència gustativa, també anomenat "*Two-bottle preference test*" desenvolupat originalment per Ritcher [522] i més recentment perfeccionat per diversos investigadors [523-527]. Aquesta tècnica es basa en determinar la preferència que presenta l'animal, en funció de la quantitat consumida, quan se li presenten dues begudes diferents. Existeixen múltiples variacions del test, en els que es varien diversos paràmetres, entre d'altres, el temps d'oferiment o la simultaneïtat a l'hora d'oferir les begudes. El test que es va utilitzar va consistir en:

Es van establir aïlladament rates Wistar mascles de 12 setmanes d'edat, i ratolins C57Bl/6 també mascles de 12 setmanes d'edat. Durant un període d'una setmana, es va acostumar als animals a tenir dues ampolles de begudes (amb aigua durant tot aquest període) perquè hi beguessin indistintament. Abans de començar els test amb les solucions a mesurar, es va realitzar un test oferint exclusivament aigua en ambdues ampolles per determinar si, sense diferències gustatives, els animals bevien per igual de les dues ampolles. El resultat va mostrar una lleu preferència per una de les ampolles, aquest comportament s'assumeix com preferència dels animals per un determinat lloc per beure. Per resoldre aquesta desviació el test es va dividir en dos períodes no consecutius en els que s'invertia la localització de les ampolles.

Les substàncies a testar van ser:

- Solució de tungstat sòdic 2 g/l

## Materials i Mètodes

- Solució de sucrosa 100 mM
- Solució de quinina 0,002% (p/v)

La solució de quinina, amb un gust amarg, s'empra com control d'aversion, mentre que la solució de sucrosa amb un gust dolç s'empra com control de preferència.

A cada animal de manera aleatòria se li va oferir 250 ml d'una de les tres solucions a testar, alhora que se li oferia el mateix volum d'aigua en una altre ampolla. El temps d'assaig va ser de 24h, després de les quals es va deixar 24 hores de repòs amb 2 ampolles amb aigua. El test es va repetir, però invertint la posició de l'ampolla d'aigua i la de la substància a testar. Es va mesurar la quantitat total de beguda consumida durant els dos dies i es va calcular la raó de preferència de la següent manera:

$$\text{Raó de Preferència} = \frac{V_{\text{consumit de substància a testar}}}{V_{\text{consumit d'aigua}} + V_{\text{consumit de substància a testar}}}$$

Valors superiors a 0,5 indiquen preferència de la substància testada respecte a l'aigua, i valors inferiors a 0,5 aversion.

A cada animal se li va realitzar el test amb tungstat, sucrosa i quinina, canviant l'ordre d'administració entre els diferents animals, per evitar interferències degudes a l'aprenentatge del posicionament de les begudes aversives o preferides.

## 8. CALORIMETRIA INDIRECTE.

Per tal de mesurar la despesa energètica en els diferents models animals, es va realitzar mesures de consum d'oxigen mitjançant la tècnica de calorimetria indirecte. Aquesta tècnica permet conèixer la despesa energètica dels animals mitjançant mesures de consum d'oxigen i de producció de CO<sub>2</sub>, i aplicant uns algorismes matemàtics [528-530]. Per a la determinació d'aquestes mesures es va emprar el sistema de calorimetria indirecte de circuit obert MM-100 Metabolic Monitor System (CWE Inc., Ardmore, Pennsylvania, EEUU). Aquest aparell consta d'un analitzador paramagnètic d'O<sub>2</sub> i un detector d'infraroigs de CO<sub>2</sub>, que mesuren la composició de l'aire contingut en l'exterior i en l'interior de cambres metabòliques de mesura on s'estabulen els animals subjectes a l'anàlisi. L'aparell calcula les diferències de composició de l'aire d'entrada a la cambra (aire exterior) i el de l'aire "consumit" per l'animal (aire interior), i amb aquestes dades calcula el volum d'oxigen consumit i de diòxid de carboni produït per cada animal per unitat de temps.

El disseny experimental que es va fer amb les consideracions necessàries per tal d'evitar al màxim la variabilitat interassaig, ja que la fase del dia, les variacions en les condicions ambientals o l'estrès que pateix l'animal influeixen molt en la variabilitat de la mesura. Per tant, per estandarditzar al màxim l'experiment es van realitzar totes les mesures a unes hores determinades del dia, a més, les mesures es van realitzar sempre comparant un animal sense tractar i un animal tractat per tal d'evitar les variacions provocades per les condicions ambientals.

Per la mesura del consum d'oxigen amb els models de rata Wistar i Zucker alimentats amb dieta estàndard o amb dieta de cafeteria i en el model de

ratolí *ob/ob*, es van emprar animals mascles de 16 setmanes d'edat que havien estat alimentats les darreres 4 setmanes amb la dieta corresponent al seu grup. El procediment de mesura va ser el següent:

1. 24 hores abans de la mesura es va fer un període d'aclimatació a les condicions de l'assaig estabulant els animals en les cambres de mesura.
2. A les 8:00 a.m. es va retirar el menjar i la beguda dels animals.
3. A les 9:00 a.m. es va iniciar la mesura per determinar la respiració basal durant un període de 2 hores realitzant lectures cada 15 minuts.
4. A les 11:00 a.m. es va administrat mitjançant una sonda gàstrica una única dosis de tungstat diluït en aigua equivalent al total de tungstat ingerit durant vuit hores o un volum equivalent de NaCl 0,9 %. Les dosis a administrar es van calcular en base a les mesures realitzades durant el tractament crònic amb tungstat, aquestes van ser:

	Dosi de tungstat administrada	Volum d'administració
Wistar primes	150 mg/ Kg de pes	2 ml/ Kg de pes
Wistar ODC	150 mg/ Kg de pes	2 ml/ Kg de pes
Zucker dieta estàndard	75 mg/ Kg de pes	2 ml/ Kg de pes
Zucker dieta de cafeteria	90 mg/ Kg de pes	2 ml/ Kg de pes
<i>ob/ob</i> dieta estàndard	60 mg/ Kg de pes	4 ml/ Kg de pes

- 5. Des de les 11:00 a.m. fins les 19:00 es van continuar les mesures de consum d'oxigen amb determinacions cada 15 minuts.
6. Els valors de consum d'oxigen es van relativitzar respecte a la mitjana dels valors basals propis, i es van normalitzar respecte als valors relatius del grup d'animals no tractats. Els resultats es van expressar com percentatge de consum d'oxigen respecte al consum d'oxigen basal.

Per a l'experiment realitzat en el model de ratolí *ob/ob* trasplantat amb teixit adipós, es van realitzar variacions en el procediment. Els animals emprats en aquest experiment van ser:

- Ratolí *ob/ob* trasplantat amb TAB epididimari de ratolí *ob/ob*.
- Ratolí *ob/ob* trasplantat amb TAB epididimari de ratolí *lean*.
- Ratolí *ob/ob* trasplantat amb TAB epididimari de ratolí *lean* amb tractat crònicament amb tungstat.

Tots els experiment es van realitzar després de 4 setmanes d'haver realitzat el trasplantament i de l'inici del tractament en els animals tractats. El procediment de mesura va ser el següent:

1. 24 hores abans de la mesura es va fer un període d'acclimatament a les condicions de l'assaig de mesura estabulant els animals en les cambres de mesura.
2. A les 9:00 a.m. es va iniciar la mesura durant 24h, descartant la primera hora de mesura per realitzar la manipulació dels animals i la calibració de l'aparell.
3. El resultat es va representar com a volum d'oxigen per unitat de temps i estandarditzat per pes de l'animal.

## **9. RESPIROMETRIA D'ALTA RESOLUCIÓ**

### **9.1. Principis de la respirometria d'alta resolució**

El principi de la respirometria es basa en la determinació dels canvis de concentració d'oxigen en una cambra de mesura causats per una mostra

biològica, que permet una estimació del consum d'oxigen d'aquesta mostra. Els petits canvis en la respiració poden indicar alteracions o lesions en la maquinària mitocondrial o cel·lular. Per mesurar aquests petits canvis, no són útils les tècniques de mesura tradicionals amb elèctrodes de Clarke, sinó que es requereixen sistemes de respirometria d'alta resolució que empren sensors d'oxigen molt més sensibles i més estables [531-534].

## **9.2. Aïllament i manteniment de les mostres.**

Per a la realització de mesures de respirometria es va utilitzar dos tipus de mostra, biòpsies de TAM i adipòcits marrons, aïllats de rates Wistar mascle de 12 setmanes d'edat tractades durant 30 dies amb tungstat 2g/l en l'aigua de beguda. El procediment d'aïllament i manteniment de les biòpsies i dels adipòcits va ser el següent:

1. Anestesiàr els animals per inhalació d'isofluorà (Forane, Abbot Laboratories, Kent, Anglaterra), i posteriorment decapitar i exsanguinar.
2. Extreure el TAM interescapular, cervical i axil·lar, i mantenir en una solució de Krebs-Ringer-Fosfat (KRP) a temperatura ambient fins la mesura de biòpsies o l'aïllament d'adipòcits
3. Incubar la part del teixit destinat a l'aïllament d'adipòcits (tot excepte 10 mg de teixit) amb 3 ml d'una solució de col·lagenasa de tipus II de 1,3 mg/ml en KRP (Sigma-Aldrich) en un bany amb agitació a 37 °C durant 7 minuts fent un pols d'agitació vigorosa cada 2 minuts.
4. Treure el teixit i trossejar amb tisores.
5. Incubar amb 6 ml d'una solució de col·lagenasa de tipus II de 0,67 mg/ml en KRP (Sigma-Aldrich) en un bany amb agitació a 37 °C durant 30-45 minuts, fent un pols d'agitació vigorosa cada 5 minuts.



6. Filtrar el teixit digerit amb un filtre de niló de (Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU). Mantenir separat el filtrat del teixit no digerit.
7. Incubar el teixit no digerit amb 3 ml d'una solució de col·lagenasa de tipus II de 0,33 mg/ml en KRP (Sigma-Aldrich) en un bany amb agitació a 37 °C durant 30 minuts fent un pols d'agitació vigorosa cada 5 minuts. Filtrar amb filtre de niló de porus de 30 µm de diàmetre. Ajuntar els filtrats
8. Centrifugar (30 g, 8 minuts a temperatura ambient) i eliminar l'infranadant amb una cànula:
9. Afegir medi KRP fresc i mantenir 1h a temperatura ambient per permetre als adipòcits migrar a la superfície per flotació.
10. Eliminar infranadant fins que quedin 2 ml.
11. Agafar una alíquota per fer comptatge de cèl·lules.
12. Afegir medi KRP, si cal, per tenir una concentració de  $1-4 \times 10^6$  cèl·lules/ml
13. Els adipòcits es poden mantenir a temperatura ambient durant tot el dia.

### **9.3. Mesures de mostres**

Per fer la mesura es va utilitzar el respiròmetre d'alta resolució Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Àustria), emprant com medi de mesura un tampó de Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)

#### **9.3.1. Mesura de biòpsies**

Per realitzar aquesta mesura es va emprar una biòpsia de TAM de pes entre 4 i 8 mg. El procediment que es va seguir va ser:

1. Pesar el teixit i trossejar-lo en parts de 1-2 mg de pes

2. Afegir 2 ml de la solució KRB en la cambra de mesura i deixar equilibrar el flux d'O<sub>2</sub>.
3. Afegir el teixit i 20 µl d'una solució 1 M de glicerol-3-fosfat (Sigma-Aldrich).
4. Deixar evolucionar la mesura fins que s'estabilitzi, aquest serà el valor de respiració basal del teixit.
5. Representar el valor de respiració basal estandarditzat pel pes del teixit mesurat.

### **9.3.2. Mesura d'adipòcits**

Per realitzar aquesta mesura es va emprar 10<sup>6</sup> adipòcits de TAM. El procediment que es va seguir va ser:

1. Pipetejar el volum necessari de la suspensió de cèl·lules per obtenir 10<sup>6</sup> adipòcits.
2. Afegir el volum necessari de la solució KRB per tenir un volum final de 2 ml en la cambra de mesura, i deixar equilibrar el flux d' O<sub>2</sub>.
3. Afegir els adipòcits i 20 µl d'una solució 1 M de glicerol-3-fosfat (Sigma-Aldrich).
4. Deixar evolucionar la mesura fins que s'estabilitzi, aquest serà el valor de respiració basal del teixit.
5. Representar el valor de respiració basal estandarditzat pel nombre de cèl·lules.

**10. TAMPONS I SOLUCIONS.****10.1. PBS (*Phosphate Saline Buffer*)**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

Equilibrar el pH a 7,3.

**10.2. Aigua DEPC**

Afegir 0,1 % de dietil pirocarbonat (DEPC) en un litre d'aigua destil·lada.

Agitar tota la nit i autoclavar.

**10.3. Solució MOPS (àcid-3-(N-morfolino)propanesulfònic)**

MOPS	0,2 M
Acetat de sodi	0,5 M
EDTA	10 mM

Equilibrar el pH a 8,3 i guardar en fosc.

#### 10.4. TAMPÓ KREBS-RINGER-FOSFAT (KRP)

NaCl	110,9 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,7 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glucosa	10 mM
Sacarosa	10 mM
BSA lliure de àcids grassos lliures	4 %

Equilibrar el pH a 7,4 amb tris-OH.

#### 10.5. TAMPÓ KREBS-RINGER-BICARBONAT (KRB)

NaCl	118 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 mM
KCl	4,8 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,2 mM
EGTA	0,5 mM
Glucosa	10 mM
Sacarosa	10 mM
BSA lliure de àcids grassos lliures	4 %

Bombollejar amb un flux de CO<sub>2</sub> 5% durant 5 minuts i equilibrar el pH a 7,4 amb HCl.

Abans de cada ús, bombollejar amb un flux de CO<sub>2</sub> 5% durant 5 minuts.

# IV. PRESENTACIÓ I OBJECTIUS



L'obesitat en les darreres dècades ha esdevingut una pandèmia de proporcions alarmants. L'elevada prevalença de la malaltia amb independència de gènere, edat, raça o condició social, conjuntament amb multitud de patologies associades, l'alt índex de mortalitat i els elevats costos sanitaris derivats, esdevenen els principals motius per que aquesta malaltia esdevingui objecte de l'intens estudi que s'està desenvolupant al seu voltant, per intentar tractar la malaltia i pal·liar els seus efectes. El caràcter multifactorial de l'obesitat, en el que intervenen factors genètics, ambientals, socioeconòmics i psicològics, és el principal escull per esbrinar els mecanismes implicats en el desenvolupament de la malaltia, així com en el desenvolupament de teràpies o fàrmacs efectius en el seu tractament. En aquest sentit, el desenvolupament del coneixement dels diversos mecanismes que regulen la homeòstasi energètica, tant des de la vessant de la regulació de la ingesta, com des de la vessant de la regulació de la despesa energètica, està esdevenint fonamental en el desenvolupament de teràpies cada vegada més efectives.

El tungstat sòdic, tal i com han demostrat els diversos estudis desenvolupats en el nostre laboratori, és un fàrmac amb un gran potencial en el tractament de l'obesitat, que pot millorar substancialment els actuals tractaments farmacològics antiobesitat. Tot i haver-se descrit àmpliament els diversos efectes del tungstat en diferents models experimentals, el mecanisme d'acció, i en concret la o les molècules amb les que interacciona el tungstat per exercir els seus efectes sobre el guany ponderal ens són encara desconeguts.

Els resultats preliminars indiquen que el tractament amb tungstat manté els nivells d'expressió de les citocines clàssiques en la regulació de l'obesitat constants, amb l'excepció de la leptina. Donada la rellevància d'aquesta citocina en el control del pes corporal i de l'homeòstasi energètica, factors

que es veuen modificats amb el tractament amb tungstat en el model intacte de rata obesa, la nostre hipòtesi de treball és que la leptina és una molècula necessària per que el tungstat exerceixi el seu efecte reductor del guany ponderal.

Els objectius plantejats van ser els següents:

1. Demostrar que el tungstat no té efectes en la reducció del guany ponderal en el model de rata Zucker *fa/fa* deficient en el receptor de la leptina.
2. Demostrar que el tungstat no té efectes en la reducció del guany ponderal en el model murí *ob/ob* deficient en la leptina.
3. Demostrar que en recuperar la deficiència en la leptina en el model murí *ob/ob*, el tungstat restableix els seus efectes reductors del guany ponderal.
4. Determinar que en recuperar la deficiència en la leptina en el model murí *ob/ob*, es restableixen tots els mecanismes implicats en la reducció del guany ponderal causada pel tractament amb tungstat



## V. RESULTATS



## **1. RESULTATS PREVIS AL DISSENY DE LA HIPÒTESIS I DELS OBJECTIUS.**

Els resultats previs de Claret [2] van demostrar que l'administració oral de tungstat en rates Wistar obesas induïdes mitjançant una dieta de cafeteria (ODC), reduïa el guany ponderal sense reduir significativament la ingesta d'aquest animals. Es suggeria que la pèrdua de guany ponderal podria ser la conseqüència d'un augment de la despesa energètica atès que no hi havia canvis en la quantitat i qualitat de l'energia ingerida. Uns dels principals mecanismes responsables del control de la despesa energètica és la termogènesi, que mitjançant la UCP1 pot incrementar els nivells de despesa energètica de l'organisme [296, 535, 536]. Els resultats descrits en el model de rata ODC van mostrar un clar increment en l'expressió del mRNA de UCP1 a teixit adipós marró (TAM). Per confirmar que aquest increment d'expressió està lligat a un augment en la despesa energètica calia realitzar mesures de consum d'oxigen mitjançant calorimetria indirecta en rates ODC. En el cas de l'administració oral de tungstat en rates Wistar normopes, alimentades amb dieta estàndard, els resultats van mostrar un efecte reductor del guany ponderal semblant al model de rata ODC. Contràriament al que es va observar en les rates ODC, en les rates primes si que es va observar una disminució de la ingesta simultània a l'administració del tungstat, suggerint que la reducció del guany ponderal, en aquest model era, en part, conseqüència de la reducció de la ingesta. La disminució de la ingesta va anar acompanyada d'una reducció significativa de la quantitat d'aigua de beguda ingerida, que els autors van atribuir a possibles efectes aversius sobre la palatabilitat del tungstat, suggerint-se per part dels autors que el descens en el consum de beguda era el que limitava la ingesta, obviant-se els possibles efectes anorèctics del tungstat

*per se*. Així doncs, en el model de rata prima resta per determinar si la reducció de guany ponderal causada pel tractament amb tungstat és exclusivament conseqüència de la reducció de la ingesta, o si la despesa energètica també intervé en la regulació del pes corporal. Per tant cal determinar, per una banda, si existeix un increment en la despesa energètica, i per una altre si el tungstat té efectes anorèctics.

Aquesta tesi, s'inicia en aquest punt: posar a punt la tècnica de calorimetria indirecte per avaluar el consum d'oxigen en els models de rata Wistar prima i ODC, com un indicador del consum energètic; i determinar els efectes del tungstat sobre la palatabilitat de la beguda.

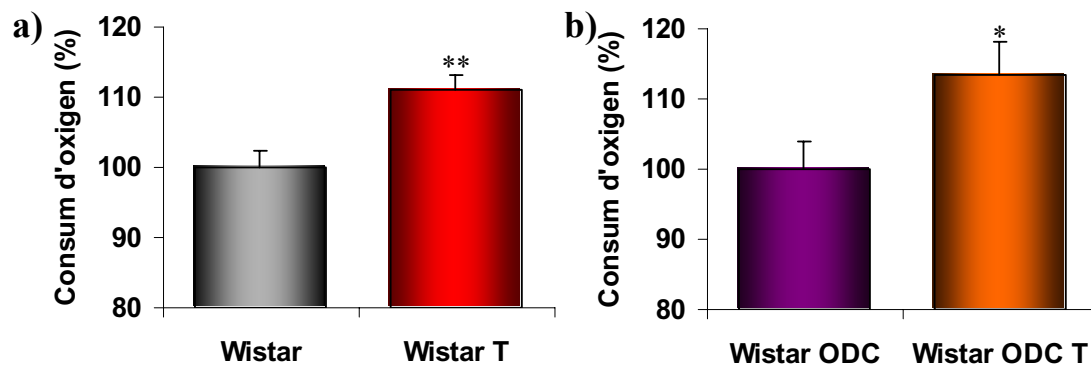
## **1.1.EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE LA TERMOGÈNESI EN RATES WISTAR.**

### **1.1.1. Efecte del tungstat sobre el consum d'oxigen de tot l'organisme en rates primes i ODC.**

Es va mesurar durant un període de dues hores (9:00 – 11:00h a.m.), el consum d'oxigen basal en rates primes o ODC aclimatades a les gàbies de mesura durant les 24 hores prèvies a la realització de l'experiment. Passades les dues hores de mesures basals, es va administrar a cadascun dels animals amb una sonda gàstrica una solució de tungstat equivalent a la quantitat que l'animal ingeriria lliurement amb l'aigua de beguda durant vuit hores, o un volum equivalent de salí. Posteriorment a l'administració es van mesurar els consums d'oxigen durant vuit hores.

L'administració oral d'una única dosi de tungstat va provocar un increment del consum d'oxigen del 11,0 % en rates primes tractades respecte a rates primes no tractades ( $100,00 \pm 2,27$  versus  $111,00 \pm 2,24$  %  $VO_2$ ,  $p < 0,01$  en rates primes NT versus T,  $n=8$ ) (fig. 1a). En el cas de rates

ODC l'augment en el consum d'oxigen es va incrementar un 13,4 % respecte a rates ODC sense tractament ( $100,00 \pm 4,82$  versus  $113,43 \pm 3,91$  %  $\text{VO}_2$ ,  $p < 0,05$  en rates ODC NT versus T,  $n=8$ ) (fig. 1b). Indicant així que el tungstat posseeix la capacitat d'induir un increment en la capacitat termogènica dels animals tractats.



**Figura 1.** Consum d'oxigen en rates Wistar primes (a) i Wistar ODC (b) després de l'administració per sonda gàstrica de tungstat (150 mg/Kg de pes corporal). Rates primes no tractades (■,  $n=8$ ) rates primes tractades (■,  $n=8$ ), rates ODC no tractades (■,  $n=8$ ) i rates ODC tractades (■,  $n=8$ ). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)

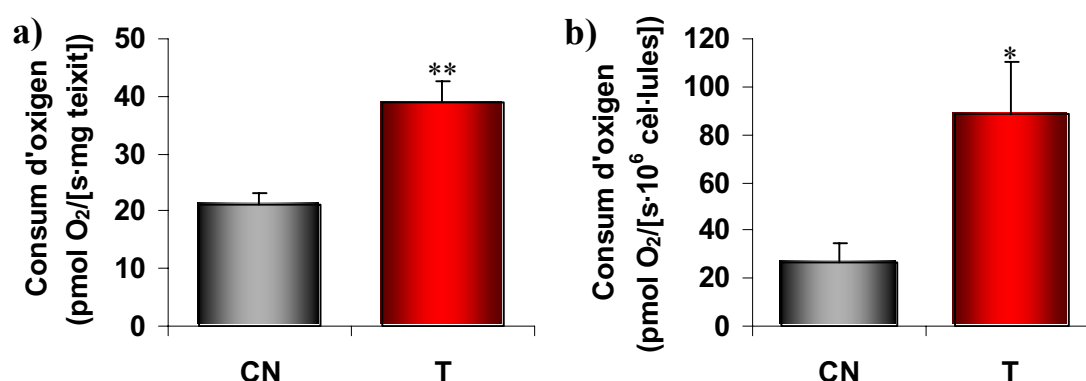
### **1.1.2. Efecte del tungstat sobre la respiració mitocondrial del TAM i els adipòcits marrons.**

Una vegada observat l'increment del consum d'oxigen en els animals tractats amb tungstat, es va voler confirmar que aquest increment era produït, en part, al TAM, i que per tant l'increment en l'expressió del gen *Ucp1* es veia reflectit en un increment de l'activitat d'aquesta proteïna. Per tal efecte es van emprar tècniques de respirometria d'alta resolució en biòpsies de TAM i en adipòcits marrons isolats de rates Wistar primes tractades amb tungstat durant 30 dies i els corresponents controls.

Els valors de consum d'oxigen mesurats en les biòpsies de TAM de rates sense tractar van ser significativament inferiors als de les rates tractades

## Resultats

amb tungstat ( $20,990 \pm 2,213$  versus  $38,902 \pm 3,806$  pmol O<sub>2</sub> x s<sup>-1</sup> x mg teixit<sup>-1</sup>, p<0,01) (fig. 2a). Al realitzar la mesura en adipòcits aïllats d'aquests teixits, els resultats van ser similars, els adipòcits de rates tractades presentaven una respiració basal superior al adipòcits d'animals sense tractar ( $26,885 \pm 8,086$  versus  $88,732 \pm 21.854$  pmol O<sub>2</sub> x s<sup>-1</sup> x 10<sup>6</sup> cèl·lules, p<0,05) (fig. 2b).



**Figura 2.** Consum d'oxigen de biòpsies (a) i d'adipòcits aïllats (b) de TAM de rates Wistar primes tractades durant un període de 30 dies amb tungstat. TAM o adipòcits rates no tractades (■, n=4) i TAM o adipòcits de rates tractades (■, n=4). Els resultats són la mitjana ± sem. \* p<0,05 i \*\* p<0,01 comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)

D'aquest resultats es desprèn que el tungstat causa un increment en el consum d'oxigen en el TAM i especialment en els adipòcits d'aquest teixit, suggerint que l'increment en el consum d'oxigen observat en el model animal és conseqüència, en part, a processos que tenen lloc als adipòcits del TAM. Els nostres resultats conjuntament amb els resultat previs de Claret [2] on s'observa un increment en la expressió del gen *Ucp1* en teixit adipós marró mitjançat per tungstat, en suggereixen que el tractament amb tungstat en el model ODC és capaç d'induir termogènesi. No obstant, Claret i col·laboradors observaven que les rates Wistar primes presentaven un comportament diferent al de les rates ODC. En aquests animals, el tungstat

evidència una disminució de la quantitat d'energia ingerida, per disminució d'ingesta. Si ens atenem als resultats anteriors observariem que en animals obesos (ODC) tota la pèrdua de guany ponderal hauria d'atribuir-se a un increment en la despesa energètica, però en els animals prims coexistirien els dos efectes descrits per Claret [491], l'anorèctic i el de dissipació de l'energia, en base als resultats que mostraven un increment en l'expressió d'UCP1 a TAM de rates ODC, i posteriorment confirmat per nosaltres a l'observar l'increment en el consum d'oxigen i l'increment en la respiració basal del TAM i dels seus adipòcits aïllats.

En aquest sentit i previ al desenvolupament de la tesi vaig intentar descartar que l'administració oral (en aigua de beguda) del tungstat no induís una reducció del consum d'aigua per efectes aversius sobre la palatabilitat i en conseqüència una disminució de la ingesta d'aliments.

### **1.2.EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE LA PALATABILITAT DE LA SOLUCIÓ DE BEGUDA EN RATES WISTAR I RATOLINS C57BL/6.**

Diversos estudis dissenyats per a l'estudi d'altres efectes metabòlics del tungstat [483, 485, 491, 505] han suggerit sense demostrar, un possible efecte anorèctic d'aquesta substància en animals alimentats amb dieta estàndard. En rates ODC tractades amb tungstat no es van observar diferències d'ingesta [2]. Aquesta resposta diferencial d'ingesta entre els grups dietètics, com ja hem assenyalat, no ha obtingut una argumentació clara, i la disminució s'havia atribuït a una reducció en el consum d'aigua a conseqüència d'un possible canvi en el seu sabor al dissoldre-hi el tungstat, postulant que la reducció en el consum d'aigua provocava una disminució en la ingesta. No obstant, quan el tungstat s'administrava per una via

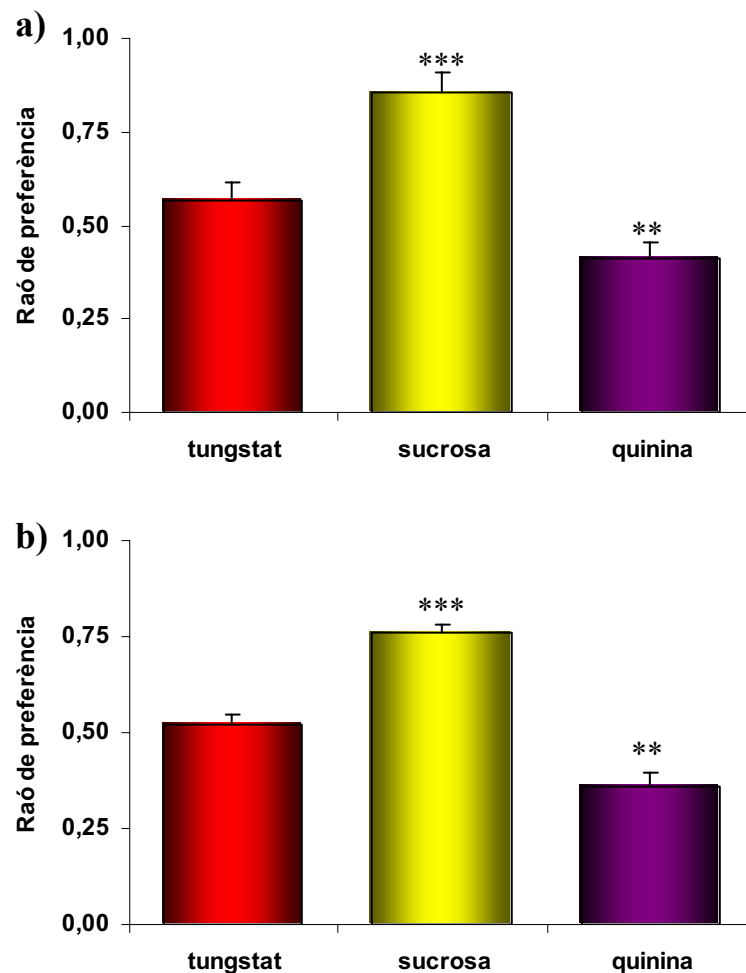
alternativa (ICV) [491], o mitjançant sondes intragàstriques o càpsules de gelatina, capaces de eliminar els possibles efectes gustatius atribuïts al tungstat (CIDASAL, Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado S.A.L., Barcelona. *Comunicació personal*), aquest efecte sobre la disminució de la ingesta en animals alimentats amb dieta estàndard es mantenien.

Per tal de determinar si el tungstat presenta efectes anorèctics *per se* o si per contra aquests són provocats pels efectes gustatius de l'administració de tungstat en l'aigua de beguda abans esmentats, es van realitzar tests de preferència gustativa en rates Wistar i en el model murí C57Bl/6 alimentats amb dieta estàndard. En aquest test, també anomenat "Two-bottle preference test" desenvolupat originalment per Ritcher [522] i més recentment perfeccionat per diversos investigadors [523-527], s'ofereix simultàniament a l'animal dues solucions de beguda per comparar la quantitat consumida de cadascuna i inferir el seu efecte gustatiu. En el nostre cas la solució analitzada ha estat el tungstat dissolt en aigua respecte l'aigua sense cap altre additiu. A més, com controls de preferència i d'aversion gustativa s'han emprat solucions de sucrosa i quinina, respectivament. Amb la finalitat d'evitar interferències en la mesura causades pel posicionament de les solucions o a l'aprenentatge per la col·locació de begudes a les que els animals presenten preferència o aversion, el test es va dividir en dues parts de 24 h no consecutives, intercanviant les posicions de les solucions testades, i distribuint aleatòriament l'ordre de les solucions a testar (veure apartat de mètodes per a una descripció més completa del procediment).

Els resultats obtinguts d'aquest test van mostrar que el tungstat no provoca cap tipus de preferència ni d'aversion respecte a l'aigua en rata (fig. 3a) ni en ratolí (fig. 3b), indicant que les reduccions en el consum d'aigua no són conseqüència d'efectes gustatius causats pel tungstat. Per tant,



contràriament al que s'havia postulat anteriorment, la reducció del consum d'aigua està associat a la reducció de la ingesta causada per efectes anorèctics del tungstat.



**Figura 3.** Test de preferència gustativa en rates Wistar (a) i ratolins C57Bl/6 (b) alimentats amb dieta estàndard. Valors de la raó de preferència de solucions de tungstat 2g/l (■, n=6), sucrosa 100 mM (■, n=6) i quinina al 0,002 % (p/v)(■, n=6) Els resultats són la mitjana ± sem. \*\* p<0,01 i \*\*\* p<0,001 comparat amb la raó de preferència de la solució de tungstat (test-t d'Student)

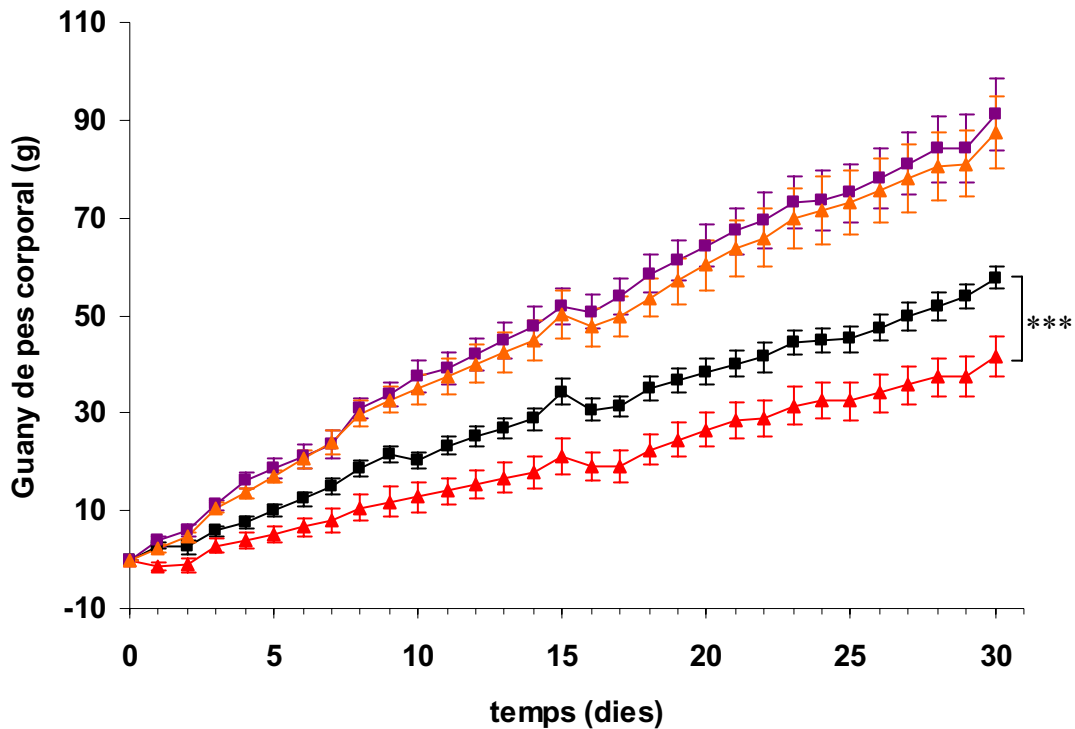
## **2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE EL PES CORPORAL I EL BALANÇ ENERGÈTIC EN MODELS AMB DEFICIÈNCIA EN EL SISTEMA DE LA LEPTINA.**

### **2.1. RATA ZUCKER *fa/fa*: MODEL DE DEFICIÈNCIA EN EL RECEPTOR DE LA LEPTINA.**

#### **2.1.1. Efectes sobre el pes corporal i l'adipositat.**

Tal i com es descriu prèviament en l'apartat de mètodes, es va administrar en l'aigua de beguda tungstat (2g/l) durant un període de 30 dies a rates Zucker *fa/fa* (RZO) i a rates heterozigòtiques per la mutació en el gen *fa* (RZL). Ambdós grups d'animals van ser alimentats amb dos tipus de dieta: una dieta normocalòrica (dieta estàndard) o una dieta hipercalòrica (dieta de cafeteria) [174].

L'administració de tungstat a RZO alimentades amb dieta estàndard, no va causar cap canvi en l'evolució del pes corporal respecte als animals no tractats, arribant, ambdós grups, al final del tractament amb un guany de pes corporal comparable ( $91,1 \pm 7,2$  versus  $87,4 \pm 7,2$  g de guany de pes corporal RZO NT versus T, n=9) . Les rates control RZL en el mateix període de tractament van reduir significativament el guany ponderal respecte les RZL no tractades, a conseqüència del tractament amb tungstat ( $57,8 \pm 2,4$  versus  $41,7 \pm 4,1$  g de guany de pes corporal RZL NT versus T, n=9) (fig. 4).



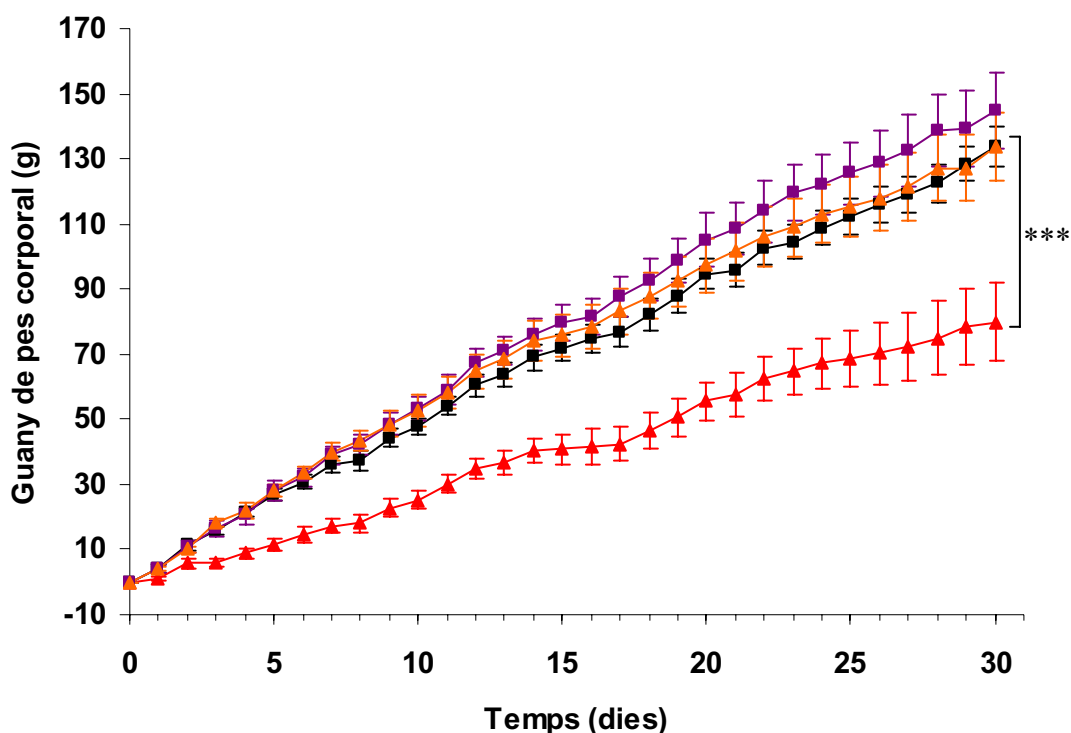
**Figura 4.** Evolució del guany ponderal en rates Zucker alimentades amb dieta estàndard durant el període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (■, n=9), RZL tractades (▲, n=9), RZO no tractades (■, n=9) i RZO tractades (▲, n=9). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*\*\*  $p < 0,0001$ , L'anàlisi de la varianza amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.

L'administració de la dieta de cafeteria en RZO i RZL va provocar un increment de pes corporal superior al de les mateixes rates alimentades amb dieta estàndard. Això va ser conseqüència, en part, per un canvi en la qualitat de l'energia ingerida que va incrementar el contingut calòric de la ingesta, i en part, per l'increment en la quantitat d'aquesta energia ingerida a causa de la hiperfagia induïda per l'alta palabilitat de la dieta [174].

La reducció de guany ponderal observada en les RZL tractades amb tungstat va ser significativament superior al del grup de RZL no tractades ( $134,0 \pm 6,2$  versus  $78,9 \pm 12,1$  g de guany de pes corporal RZL NT versus T, n=9). En les RZO, de forma similar al que ocorria en administrar la dieta estàndard, no es va observar cap canvi significatiu en el guany ponderal al

comparar els animals tractats amb tungstat amb els no tractats ( $144,7 \pm 11,8$  versus  $133,6 \pm 10,3$  g de guany de pes corporal RZO NT versus T,  $n=9$ ) (fig.5)

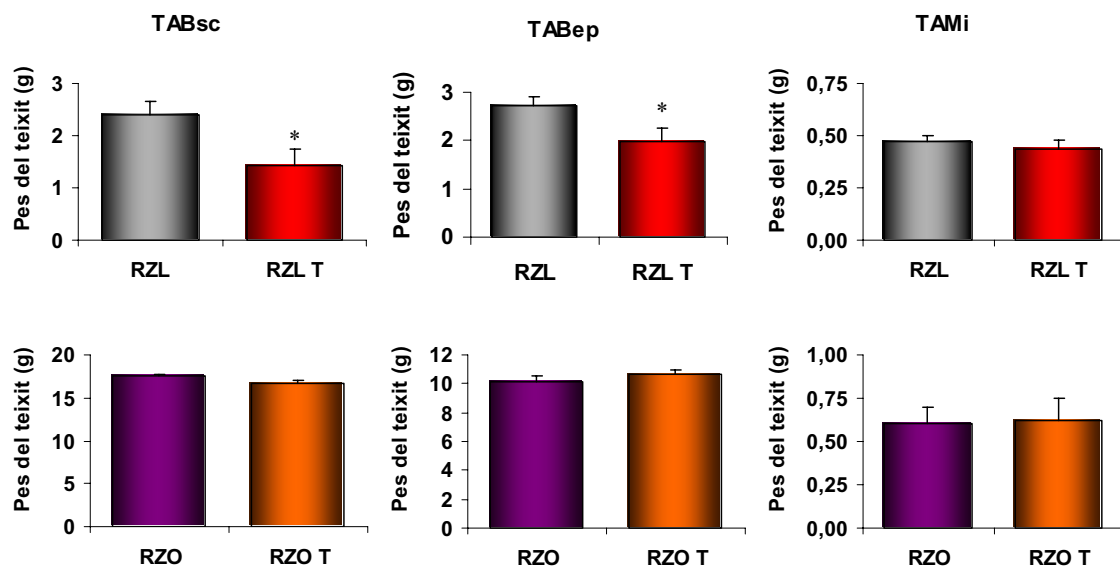
Així doncs, aquests resultats demostraven que el tractament amb tungstat no provoca canvis de pes en els animals amb deficiències en la senyalització de la leptina. A més es va observar que els canvis de pes corporal en animals RZL eren més pronunciats en aquells animals als que se'ls induïa un estat d'obesitat major, indicant una major eficiència del tractament amb tungstat sobre la reducció de guany ponderal en animals obesos.



**Figura 5.** Evolució del guany ponderal en rates Zucker alimentades amb dieta de cafeteria durant el període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (■,  $n=9$ ), RZL tractades (▲,  $n=9$ ), RZO no tractades (■,  $n=9$ ) i RZO tractades (▲,  $n=9$ ). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*\*\*  $p < 0,0001$ , L'anàlisi de la variança amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.

Aquesta reducció del guany ponderal en animals RZL va anar acompanyada d'una reducció de l'adipositat, tal i com demostra l'estudi gravimètric realitzat en diferents dipòsits de teixit adipós. Les rates RZL

tractades amb tungstat i alimentades amb una dieta estàndard van mostrar, respecte les RZL no tractades, una reducció significativa dels dipòsits de greix subcutani ( $2,41 \pm 0,24$  versus  $1,42 \pm 0,32$  g,  $p < 0,05$  en RZL NT vs T) i epididimari ( $2,72 \pm 0,19$  versus  $1,97 \pm 0,28$  g,  $p < 0,05$  en RZL NT vs T). En canvi, no es va observar cap diferència en el pes del TAM interescapular ( $0,47 \pm 0,03$  versus  $0,44 \pm 0,04$  g RZL NT vs T). D'una altre banda, les RZO amb i sense tractament de tungstat, no van mostrar diferències entre elles en el pes dels diferents dipòsits de greix estudiats ( $17,49 \pm 0,31$  versus  $16,73 \pm 0,33$  g T.A. subcutani;  $10,17 \pm 0,36$  versus  $10,64 \pm 0,34$  g T.A. epididimari;  $0,60 \pm 0,09$  versus  $0,62 \pm 0,13$  g T.A. marró interescapular en RZO NT vs T) (fig. 6).

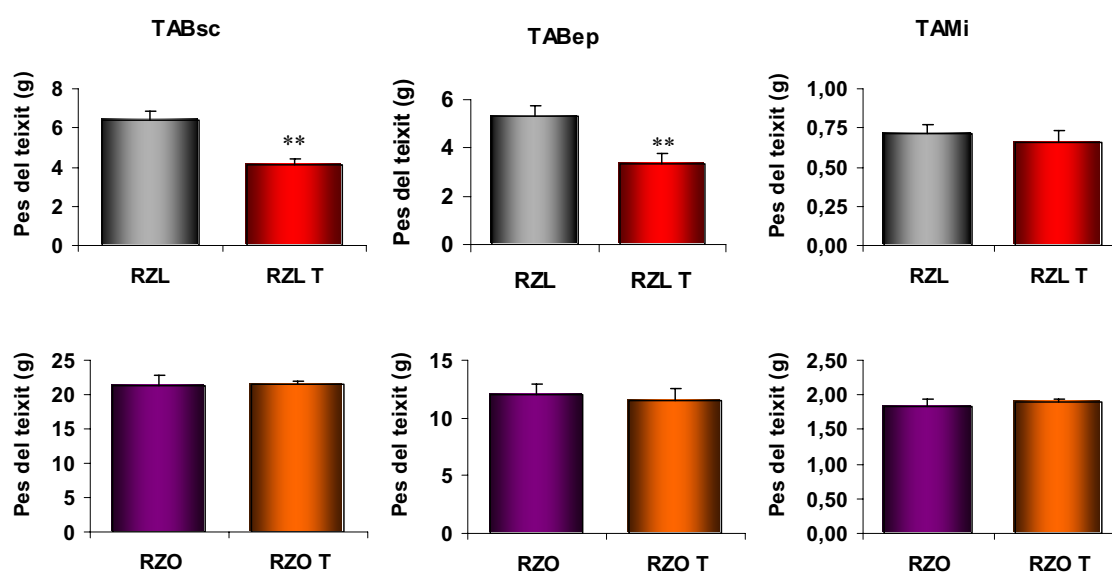


**Figura 6.** Valors gravimètrics tissulars en rates Zucker alimentades amb dieta estàndard al final del període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (■, n=9), RZL tractades (■, n=9), RZO no tractades (■, n=9) i RZO tractades (■, n=9). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  comparat amb les rates no tractades (test-t d'Student)

El resultat va ser similar en els grups d'animals alimentats amb dieta de cafeteria, observant-se diferències significatives únicament en els dipòsits subcutani i epididimari de les RZL tractades amb tungstat en comparació

## Resultats

amb les RZL no tractades ( $6,41 \pm 0,48$  versus  $4,09 \pm 0,29$  g T.A. subcutani,  $p < 0,01$ ;  $5,33 \pm 0,41$  versus  $3,33 \pm 0,41$  g T.A. epididimari,  $p < 0,01$ ;  $0,71 \pm 0,06$  versus  $0,65 \pm 0,08$  g T.A. marró interescapular en RZL NT vs T), i la manca d'efectes sobre els mateixos dipòsits entre els grups de RZO tractades i no tractades ( $21,36 \pm 1,48$  versus  $21,41 \pm 0,60$  g T.A. subcutani;  $12,06 \pm 0,90$  versus  $11,47 \pm 1,09$  g T.A. epididimari;  $1,84 \pm 0,09$  versus  $1,89 \pm 0,05$  g TAM interescapular en RZO NT vs T) (fig. 7).



**Figura 7.** Valors gravimètrics tissulars en rates Zucker alimentades amb dieta de cafeteria al final del període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (■, n=9), RZL tractades (■, n=9), RZO no tractades (■, n=9) i RZO tractades (■, n=9). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*\*  $p < 0,01$  comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)

### **2.1.2. Efectes sobre el balanç energètic.**

Amb la finalitat d'esbrinar les causes que indueixen els efectes del tungstat sobre el pes corporal, es va estudiar l'efecte del tractament sobre el balanç energètic. Quan es van analitzar els nivells d'ingesta en RZO i RZL, i es va observar que no hi havia diferències entre les RZO tractades i sense tractar

amb tungstat independentment de la dieta que se'ls administrava (taula I). Les RZL van presentar dos comportaments diferenciats quan van ser alimentades amb dieta estàndard, el grup de rates tractades amb tungstat va reduir significativament la seva ingesta comparat amb les rates sense tractament. En canvi, en el grup de rates alimentades amb dieta de cafeteria, no es van observar diferències significatives d'ingesta entre rates tractades amb tungstat i rates no tractades (taula II). Aquests resultats, conjuntament amb el que s'havia observat en els models de rata Wistar prima i ODC [491], i amb els resultats obtinguts en els tests de preferència gustativa, demostren que el tungstat exerceix efectes anorèctics sobre els animals tractats amb tungstat i alimentats amb dieta estàndard, i que probablement aquests efectes anorèctics estan emmascarats en les rates alimentades amb dieta de cafeteria a causa de la hiperfagia induïda per l'elevada palatabilitat d'aquesta dieta [174]. Tanmateix, la desaparició de l'efecte anorèctic en el cas de dietes d'alta palatabilitat, no evita la reducció del guany ponderal en animals sense deficiències en la senyalització de la leptina, tal i com s'observa en les RZL alimentades amb dieta de cafeteria, indicant que els efectes del tungstat sobre el pes corporal no estan regulats exclusivament per la ingesta. Globalment, aquests resultats ens indiquen que és imprescindible un sistema de senyalització de la leptina intacte per l'aparició de l'efecte anorèctic del tungstat.

	<b>DIETA ESTÀNDARD</b>	<b>DIETA DE CAFETERIA</b>
<b>RZO</b>	<b>2729 ± 82 Kcal/30 dies</b>	<b>5144 ± 140 Kcal/30 dies</b>
<b>RZO T</b>	<b>2762 ± 106 Kcal/30 dies</b>	<b>5002 ± 155 Kcal/30 dies</b>

**Taula I.** Valors d'ingesta acumulada en rates Zucker *fa/fa* al final del període de tractament amb tungstat. RZO no tractades (n=9) i RZO tractades (n=9). Els resultats són la mitjana ± sem.

	DIETA ESTÀNDARD	DIETA DE CAFETERIA
RZL	2276 ± 32 Kcall30 dies	4647 ± 143 Kcall30 dies
RZL T	2169 ± 44 Kcall30 dies (*)	4671 ± 120 Kcall30 dies

**Taula II.** Valors d'ingesta acumulada en rates Zucker *lean* al final del període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (n=9) i RZL tractades (n=9). Els resultats són la mitjana ± sem. \* p<0,05 comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)

També es va estudiar la despesa energètica de RZO i RZL mitjançant la tècnica de calorimetria indirecta. Els resultats van mostrar la ineficiència del tungstat per promoure canvis en el consum d'oxigen en els animals deficientes en la senyalització de la leptina amb independència del tipus de dieta consumida (taula III). En canvi, en les RZL, el tractament amb tungstat va induir un increment del consum d'oxigen del 9,8 % en rates alimentades amb dieta de estàndard, i del 8,3% en les rates alimentades amb dieta de cafeteria respecte els seus respectius controls (taula IV).

	DIETA ESTÀNDARD	DIETA DE CAFETERIA
RZO	100,00 ± 6,16 %	100,00 ± 8,26 %
RZO T	94,73 ± 6,69 %	101,99 ± 7,73 %

**Taula III.** Valors de consum d'oxigen en rates Zucker *falfa* tractades amb tungstat. RZO amb dieta estàndard (n=6) i RZO amb dieta de cafeteria (n=5). Els resultats són la mitjana ± sem.



	DIETA ESTÀNDARD	DIETA DE CAFETERIA
RZL	100,00 ± 2,47 %	100,00 ± 3,40 %
RZL T	109,85 ± 1,78 % (**)	108,31 ± 1,28 % (*)

**Taula IV.** Valors de consum d'oxigen en rates Zucker *lean* tractades amb tungstat. RZL amb dieta estàndard (n=6) i RZL amb dieta de cafeteria (n=5). Els resultats són la mitjana ± sem. \* p<0,05 i \*\* p<0,01 comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)

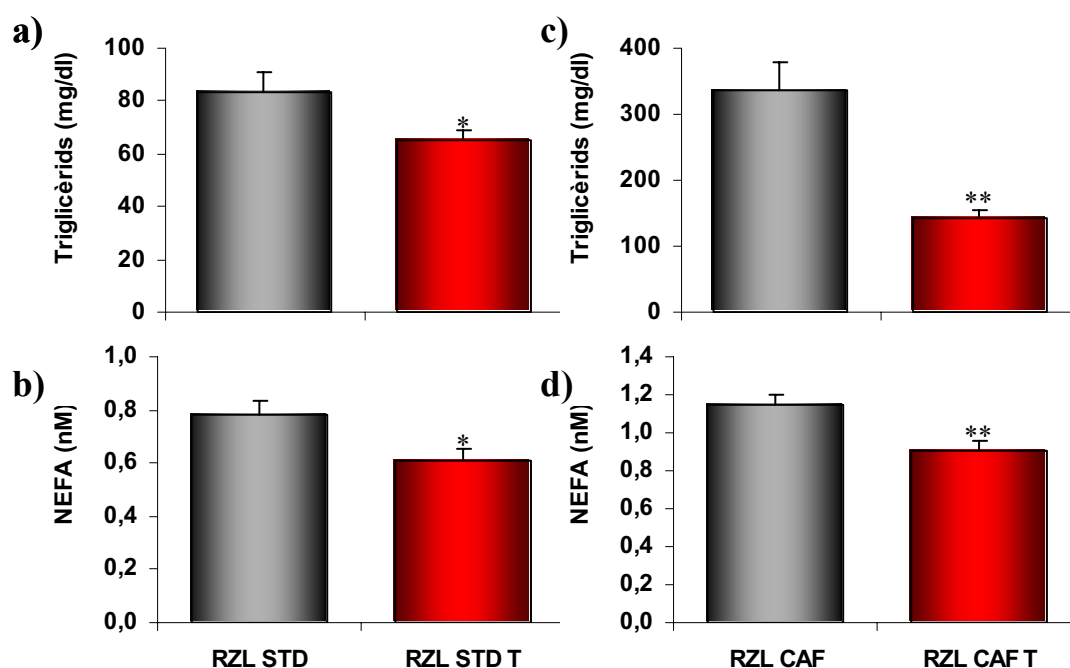
Així doncs, els resultats obtinguts demostren que el tractament amb tungstat en animals amb la senyalització de la leptina deficient no promou canvis en el balanç energètic, i en conseqüència, no apareixen els efectes reductors de guany ponderal observats en rates Wistar primes i ODC. Per contra, en els animals sense deficiències en la via de senyalització de la leptina, el tractament amb tungstat promou un balanç energètic negatiu, responsable de la disminució del guany ponderal, indicant que la leptina juga un paper clau en l'efecte del tungstat sobre el control de l'homeòstasis energètica.

### **2.1.3. Efectes sobre els paràmetres bioquímics.**

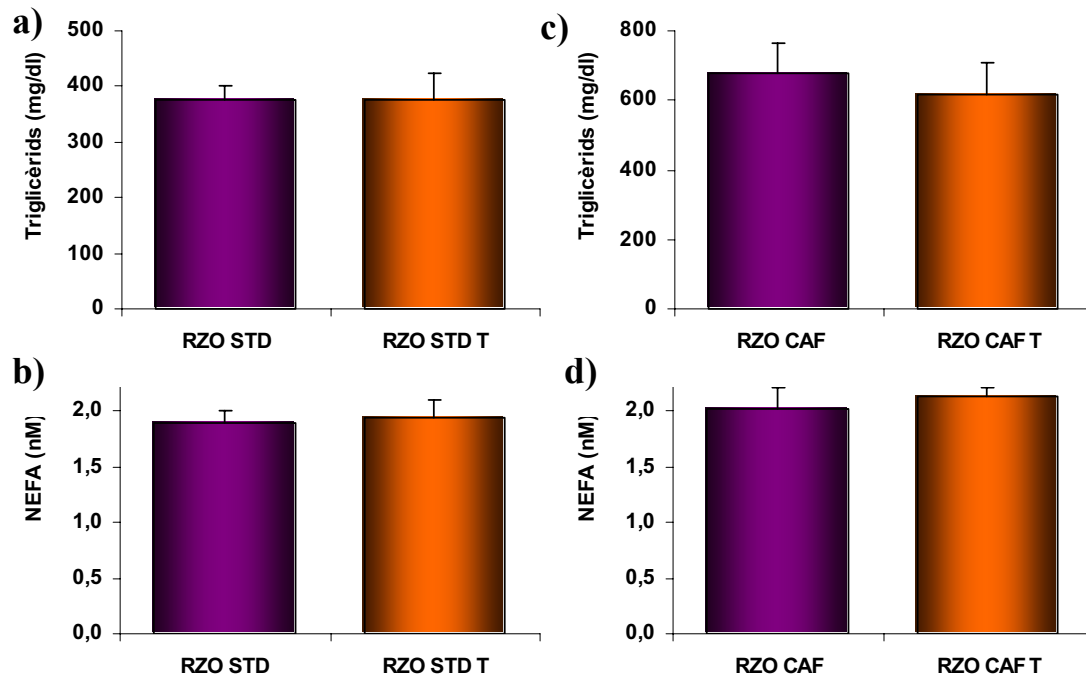
Es van realitzar mesures de diversos paràmetres bioquímics al final del tractament amb tungstat en RZO i RZL. El tractament va influir positivament en el perfil lipídic dels animals que no presentaven deficiències en la senyalització de la leptina, reduint els tant els nivells plasmàtics de triglicèrids com els dels NEFAs ( $83,52 \pm 7,60$  versus  $65,35 \pm$

## Resultats

3,77 mg/dl TG plasmàtics,  $p < 0,05$ ;  $0,784 \pm 0,054$  versus  $0,612 \pm 0,038$  mM NEFA plasmàtics,  $p < 0,05$ ; en RZL NT vs T alimentades amb dieta estàndard; i  $335,92 \pm 43,51$  versus  $140,93 \pm 12,61$  mg/dl TG plasmàtics,  $p < 0,01$ ;  $1,149 \pm 0,053$  versus  $0,901 \pm 0,058$  mM NEFA plasmàtics,  $p < 0,01$ ; en RZL NT vs T alimentades amb dieta de cafeteria) (fig. 8). En canvi, les RZO no van patir canvis en els nivells plasmàtics de triglicèrids ni NEFAs com a conseqüència del tractament amb tungstat ( $375,04 \pm 27,39$  versus  $375,35 \pm 47,58$  mg/dl TG plasmàtics;  $1,896 \pm 0,114$  versus  $1,939 \pm 0,156$  mM NEFA plasmàtics en RZO NT vs T alimentades amb dieta estàndard; i  $676,15 \pm 89,40$  versus  $615,22 \pm 93,39$  mg/dl TG plasmàtics;  $2,029 \pm 0,185$  versus  $2,141 \pm 0,075$  mM NEFA plasmàtics en RZO NT vs T alimentades amb dieta de cafeteria) (fig. 9)



**Figura 8.** Nivells plasmàtic de triglicèrids (a i b) i d'àcids grassos lliures (ci d) en rates Zucker *lean* alimentades amb dieta estàndard (STD) i dieta de cafeteria (CAF) al final del període de tractament amb tungstat. RZL no tractades (■, n=6), RZL tractades (■, n=6). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb rates no tractades (test-t d'Student)



**Figura 9.** Nivells plasmàtic de triglicèrids (a i b) i d'àcids grassos lliures (ci d) en rates Zucker *fa/fa* alimentades amb dieta estàndard (STD) i dieta de cafeteria (CAF) al final del període de tractament amb tungstat. RZO no tractades (■, n=6) i RZO tractades (■, n=6). Els resultats són la mitjana ± sem.

## 2.2. RATOLÍ *ob/ob*: MODEL DEFICIENT EN LA LEPTINA.

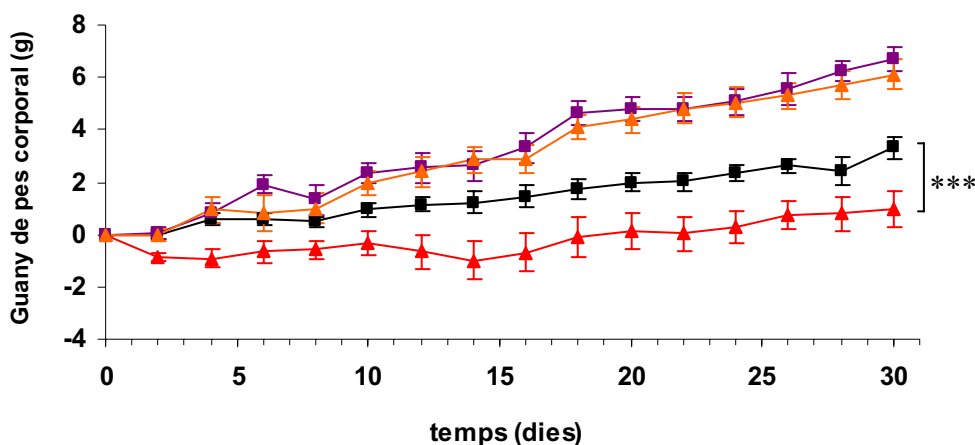
El següent model animal en el que es va estudiar els efectes del tungstat, va ser el model murí *ob/ob*, en el que la deficiència total en la síntesi de la pròpia hormona és la causa del fenotip obès que presenta aquest animal.

### 2.2.1. Efecte sobre el pes corporal i l'adipositat.

Es va administrar en l'aigua de beguda tungstat (2 g/l) durant un període de 30 dies a ratolins *ob/ob* i *lean* alimentats amb una dieta estàndard.

De forma similar al que es va observar en rates RZO, el tractament amb tungstat no va causar diferències significatives en el guany ponderal entre els ratolins *ob/ob* tractats i els no tractats ( $6,67 \pm 0,46$  versus  $6,11 \pm 0,56$  g de guany de pes corporal ratolins *ob/ob* NT versus T, n=7). En ratolins

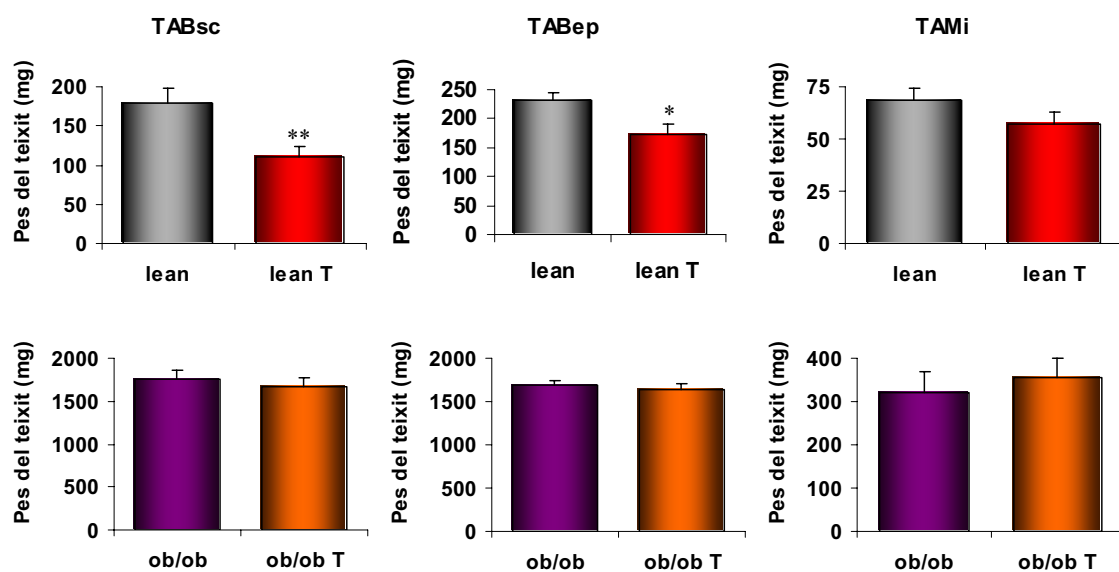
*lean*, el tractament amb tungstat va provocar una disminució significativa del guany ponderal comparat amb els ratolins no tractats ( $3,23 \pm 0,33$  versus  $0,70 \pm 0,86$  g de guany de pes corporal ratolins *lean* NT versus T, n=10) (Fig. 10). Aquests resultats ens indiquen que no només cal una via de senyalització de la leptina intacte perquè el tungstat exerceixi els seus efectes sobre la regulació del pes corporal, sinó que a més, és indispensable la presència de l'hormona. Això implica que el tungstat no està actuant com a un agent mimetitzant de la leptina, sinó que probablement, leptina i tungstat estan actuant de forma sinèrgica.



**Figura 10.** Evolució del guany ponderal en ratolins *ob/ob* i *lean* durant el període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=7), ratolins *lean* tractats (▲, n=7), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=7) i ratolins *ob/ob* tractats (▲, n=7). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*\*\*  $p < 0,0001$ , L'anàlisi de la variança amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.

Aquesta reducció de guany ponderal en ratolins *lean* també va anar acompanyada d'una reducció de l'adipositat en els animals tractats amb tungstat. Així doncs, es va observar una reducció del pes dels dipòsits de greix subcutani i epididimari entre els ratolins tractats i no tractats. El pes del dipòsit de TAM interescapular no es va presentar cap diferència significativa entre ambdós grups de ratolins ( $179,9 \pm 18,5$  versus  $110,4 \pm 14,2$  mg T.A. subcutani,  $p < 0,01$ ;  $231,8 \pm 14,2$  versus  $172,7 \pm 19,1$  mg T.A. epididimari,  $p < 0,05$ ;  $68,3 \pm 6,0$  versus  $57,1 \pm 5,7$  mg T.A marró

interescapular en ratolins *lean* NT vs T) (fig. 11). En ratolins *ob/ob*, no es van observar diferències significatives de pes en cap dels dipòsits de teixit adipós estudiats entre els animals tractats i no tractats ( $1750,1 \pm 110,6$  versus  $1676,3 \pm 96,1$  mg T.A. subcutani;  $1696,9 \pm 50,0$  versus  $1641,1 \pm 63,1$  mg T.A. epididimari;  $319,1 \pm 50,0$  versus  $353,5 \pm 45,8$  mg T.A marró interescapular en ratolins *ob/ob* NT vs T) (fig. 11). Aquests resultats posen de manifest, novament, la manca d'efecte del tractament amb tungstat en aquests ratolins deficientes en la leptina.



**Figura 11.** Valors gravimètrics tissulars en ratolins *ob/ob* i *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=10), ratolins *lean* tractats (■, n=10), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=9) i ratolins *ob/ob* tractats (■, n=9). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb ratolins no tractats (test-t d'Student)

### 2.2.2. Efecte sobre el balanç energètic.

Es va avaluar el balanç energètic dels ratolins *ob/ob* i *lean* mitjançant l'estudi de la ingesta i del consum d'oxigen. Els ratolins *lean* tractats amb tungstat van mostrar una disminució de la ingesta acumulada, així com un increment en la despesa energètica en comparació amb el grup de ratolins *lean* no tractats (taules V i VI). Els ratolins *ob/ob* tractats, al igual que en el

## Resultats

model de rata RZO, no van mostrar cap canvi significatiu en cap del dos paràmetres estudiats respecte els ratolins *ob/ob* no tractats (taules V i VI). Aquests resultats confirmen que la leptina és imprescindible perquè el tungstat varií el balanç energètic dels animals tractats amb tungstat, decantant-lo cap a un balanç negatiu capaç de promoure la reducció de guany ponderal observada.

	<i>lean</i>	<i>ob/ob</i>
CN	<b>323 ±13 Kcal/30 dies</b>	<b>428 ± 32 Kcal/30 dies</b>
T	<b>261 ± 20 Kcal/30 dies (*)</b>	<b>402 ± 39 Kcal/30 dies</b>

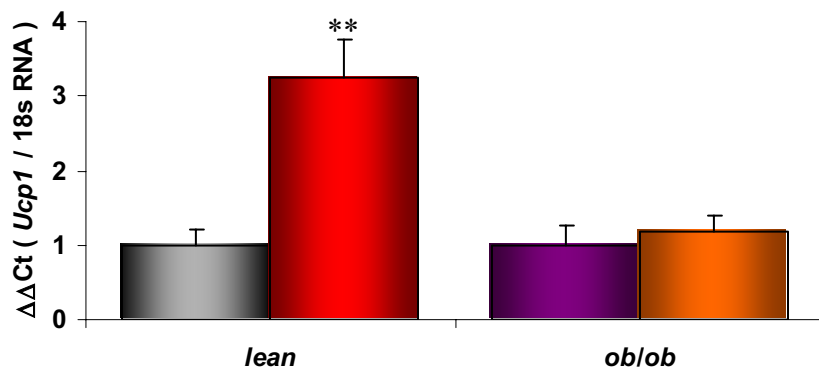
**Taula V.** Valors d'ingesta acumulada en ratolins *ob/ob* i *lean* tractats amb tungstat. Ratolins *lean* (n=10) i ratolins *ob/ob* (n=9). Els resultats són la mitjana ± sem. \*p<0,05 comparat amb ratolins no tractats (test-t d'Student)

	<i>lean</i>	<i>ob/ob</i>
CN	<b>100,00 ± 6,45 %</b>	<b>100,00 ± 6,96 %</b>
T	<b>116,80 ± 3,40 % (*)</b>	<b>95,15 ± 4,66 %</b>

**Taula VI.** Valors de consum d'oxigen en ratolins *ob/ob* i *lean* tractats amb tungstat. Ratolins *lean* (n=6) i ratolins *ob/ob* (n=6). Els resultats són la mitjana ± sem. \*p<0,05 comparat amb ratolins no tractats (test-t d'Student)

Els efectes sobre el consum d'oxigen en els ratolins *lean* són similars als efectes descrits en rates Wistar, en conseqüència, és raonable suposar que els efectes sobre la despesa energètica del tractament amb tungstat, també impliquen canvis en l'expressió gènica de UCP1. Per confirmar que el

canvi en el balanç energètic implica l'activació de la termogènesi, i en conseqüència l'increment en els nivells d'expressió gènica de la UCP1, es van mesurar els nivells d'expressió del gen en aquest ratolins mitjançant la tècnica de PCR quantitativa. El tractament amb tungstat en els ratolins *lean*, efectivament, va provocar un increment aproximat de 3 vegades en els nivells relatius d'expressió del gen respecte els ratolins *lean* no tractats (fig. 12). En contraposició, en els ratolins *ob/ob* el tractament amb tungstat no va promoure canvis en l'expressió del gen respecte el grup de ratolins *ob/ob* control.



**Figura 12.** Nivells d'expressió del mRNA d'*Ucp1* en ratolins *ob/ob* i *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=4), ratolins *lean* tractats (■, n=5), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=5) i ratolins *ob/ob* tractats (■, n=5). Els resultats són la mitjana ± sem. \*\* p<0,01 comparat amb ratolins no tractats (test-t d'Student)

L'increment de la despesa energètica causat per l'activació de la termogènesi requereix, a més de l'increment dels nivells d'expressió i d'activació de la UCP1, l'adaptació del TAM a una situació metabòlica on predomini l'activitat catabòlica respecte l'anabòlica. D'aquesta manera el teixit permet que els processos metabòlics de l'adipòcit evitin l'acumulació d'àcids grassos i promogui la oxidació d'aquest en els mitocondris per,

finalment, generar el gradient de protons necessari per la seva utilització en el procés termogènic. Amb la finalitat d'avaluar la situació metabòlica del TAM després del tractament amb tungstat, es van mesurar els nivells d'expressió de diversos gens al TAM mitjançant la tècnica de PCR quantitativa. El gens avaluats van ser:

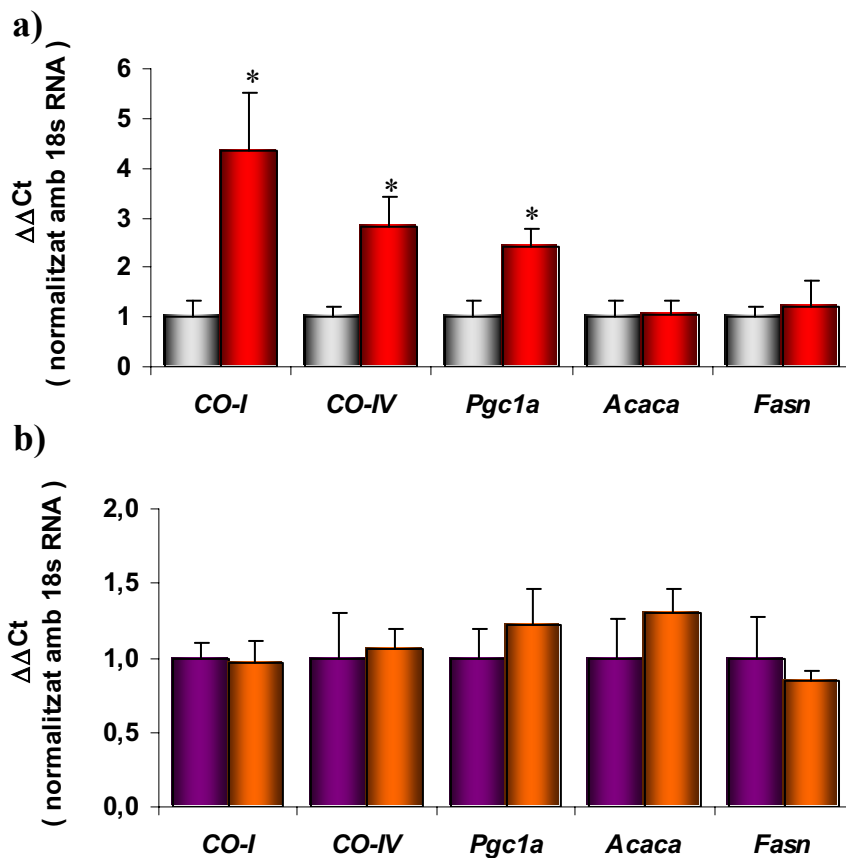
- **Subunitats 1 i 4 de la citocrom oxidasa (CO-I i CO-IV)**, indicador de l'activitat mitocondrial.
- **Co-activador 1 $\alpha$  de PPAR (*Pgc1 $\alpha$* )**, gen relacionat amb l'increment de la biogènesi mitocondrial, a més de responsable de l'increment de l'expressió de la UCP1.
- **Acetil-CoA carboxilasa (*Acac $\alpha$* ) i Sintasa d'àcids grassos (*Fasn*)**, ambdós gens responsables de la síntesi i acumulació d'àcids grassos en l'adipòcit.

El tractament amb tungstat en ratolins *lean* va provocar un increment significatiu en l'expressió de CO-I i IV, i en *Pgc1 $\alpha$*  (fig. 13a), indicant que el TAM d'aquest ratolins incrementava la seva capacitat catabòlica. Per contra, els gens relacionats amb la síntesi lipídica, *Acac $\alpha$*  i *Fasn* no veien alterat els seus nivells d'expressió. Així doncs, el balanç metabòlic que esdevé en ratolins *lean* tractats amb tungstat és favorable a les condicions necessàries per que tingui lloc el procés termogènic.

En ratolins *ob/ob*, no es va observar cap canvi significatiu en el perfil d'expressió gènica del TAM amb el tractament amb tungstat (fig. 13b). Aquests resultats concorden amb la ineficiència del tungstat per promoure canvis en la despesa energètica en aquests animals.

Globalment, aquest resultats indiquen que la leptina està estretament lligada als efectes del tungstat sobre la termogènesi.





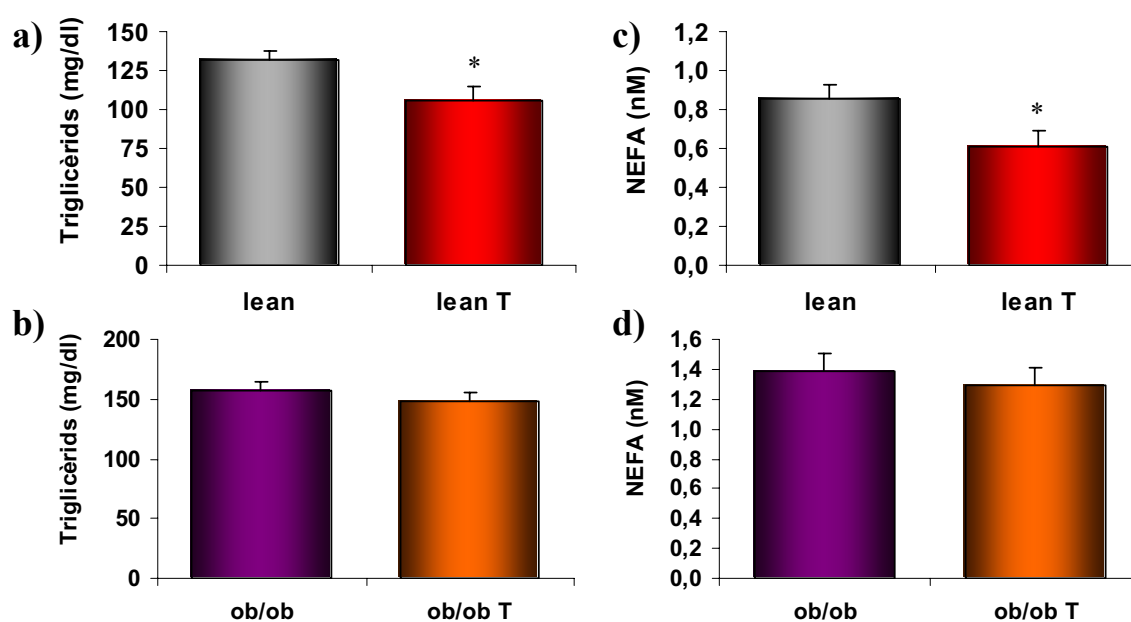
**Figura 13.** Nivells d'expressió del mRNA de gens del BAT implicats en l'activació del teixit per la regulació de la despesa energètica en ratolins *ob/ob* i *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=4), ratolins *lean* tractats (■, n=5), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=5) i ratolins *ob/ob* tractats (■, n=5). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  comparat amb ratolins no tractats (test-t d'Student)

### **2.2.3. Efecte sobre paràmetres bioquímics.**

Després de 30 dies de tractament amb tungstat es van realitzar mesures de diversos paràmetres bioquímics en els grups de ratolins *ob/ob* i *lean*. Els resultats observats al final del tractament concordaven amb el que ja s'havia observat en el model de rata Zucker. Així doncs, en els ratolins *ob/ob* no es van detectar diferències significatives en el perfil lipídic com conseqüència del tractament amb tungstat ( $156,45 \pm 7,93$  versus  $148,25 \pm$

## Resultats

7,57 mg/dl TG plasmàtics;  $0,394 \pm 0,051$  versus  $0,360 \pm 0,046$  mM NEFA plasmàtics en ratolins *ob/ob* NT vs T )(fig. 14). En canvi, en ratolins *lean* el tractament amb tungstat va provocar una millora en el perfil lipídic, disminuint significativament tant els nivells plasmàtics de TG com els de NEFAs respecte als ratolins *lean* no tractats ( $132,20 \pm 5,34$  versus  $105,41 \pm 8,91$  mg/dl TG plasmàtics,  $p < 0,05$ ;  $0,850 \pm 0,080$  versus  $0,608 \pm 0,075$  mM NEFA plasmàtics,  $p < 0,05$ ; en ratolins *lean* NT vs T )(fig. 14). Aquests resultats demostren, novament, la preponderància de la leptina en els efectes del tungstat.



**Figura 14.** Nivells plasmàtic de triglicèrids (a i b) i àcids grassos lliures (c i d) en ratolins *ob/ob* i *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=6), ratolins *lean* tractats (■, n=6), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=6) i ratolins *ob/ob* tractats (■, n=6). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  comparat amb ratolins *lean* no tractats (test-t d'Student)

## **2.3. TRASPLANTAMENT DE TEIXIT ADIPÓS EN RATOLINS *ob/ob*: MODEL DE RECUPERACIÓ DE LA DEFICIÈNCIA EN LA LEPTINA.**

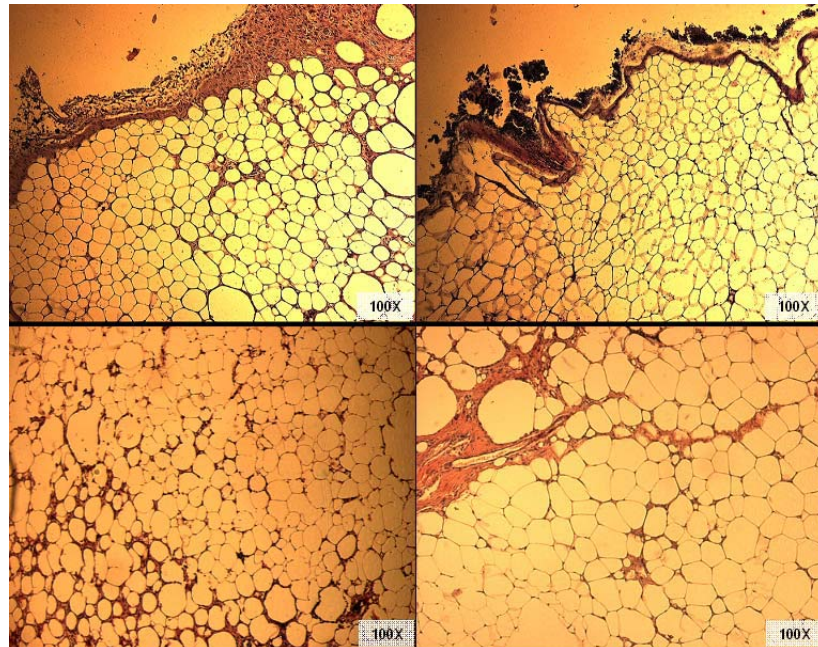
Els dos models animals en els que hem estudiat els efectes del tungstat sobre el pes corporal en aquesta tesi, presenten deficiències en el senyalització de la leptina a nivell de tot l'organisme. En aquests models hem pogut determinar clarament que el tungstat és incapaç d'exercir la seva activitat reductora de pes corporal. Però arrel d'aquests resultats sorgeixen noves incògnites que calen respondre, una d'elles és si la recuperació de les alteracions en la leptina permetria recuperar l'efecte del tungstat.

Es va triar el ratolí *ob/ob* com a model en el que realitzar els estudis de restauració parcial la deficiència de la leptina. En aquest model, l'administració de leptina exògena és suficient per revertir el fenotip d'aquests animals [537-540]. L'administració clàssica de leptina exògena mitjançant injecció intraperitoneal, esdevé una tècnica amb complicacions per al nostre estudi, ja que com a conseqüència del curt temps de vida mitja de la leptina en sang, que és de 49 minuts [541], cal injectar als animals com a mínim dues dosis diàries. A més, el tractament amb tungstat té una durada relativament llarga, amb el que s'haurien de practicar un nombre excessiu d'injeccions a l'animal, pel que es fa inviable emprar aquesta via d'administració de la leptina. Per resoldre aquest impediment es va establir un protocol de trasplantament de teixit adipós epididimari de ratolins *lean*, i per tant capaç de produir leptina, subcutàniament en ratolins *ob/ob*, deficients en l'hormona. Aquest protocol, està descrit detalladament en l'apartat de mètodes.

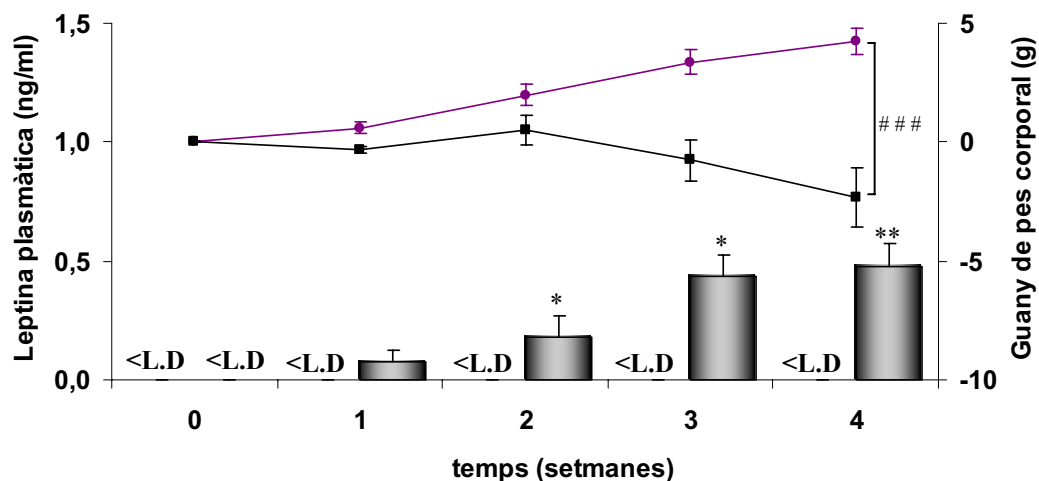
### **2.3.1. Validació del protocol de trasplantament de teixit adipós en ratolins *ob/ob*.**

El primer que es va fer després del trasplantament de teixit adipós, va ser comprovar la viabilitat i la funcionalitat d'aquests trasplants. Per això, es va avaluar l'efecte que tenia el trasplantament de teixit adipós de ratolins *lean* en ratolins *ob/ob* (*ob/ob tx*) comparats amb uns ratolins control (*ob/ob txCN*), que són ratolins *ob/ob* trasplantats amb teixit adipós d'un altre ratolí *ob/ob*, i per tant, no productor de leptina. El teixit trasplantat no va mostrar signes d'infiltració linfocitària, ni de rebuig durant el temps que va durar l'experiment (fig. 15), a més, el teixit va mostrar una alta vascularització, el que és indicatiu de la funcionalitat del teixit [542]. Després de dues setmanes d'haver implantat el teixit adipós es va observar una disminució significativa del pes corporal dels ratolins *ob/ob tx* respecte dels *ob/ob txCN*, a més, aquesta disminució era simultània a l'increment dels nivells plasmàtics de leptina en els ratolins *ob/ob tx* (fig. 16). Les leptinèmies detectades van ser menors que els nivells fisiològics que presenten els ratolins *lean*, no obstant, tenint en compte que la quantitat de teixit adipós trasplantat equival aproximadament a un 20 % del total de teixit adipós d'un ratolí *lean*, és òbvia la diferència de nivells plasmàtics de leptina. Tot i això, els nivells circulants de leptina assolits per ratolins *ob/ob tx* són suficients perquè el tungstat sigui capaç de tornar a exercir l'efecte reductor de guany ponderal en aquests ratolins. Aquests animals també van mostrar una millora en el balanç energètic, el trasplantament els hi va disminuir significativament la ingesta i els va augmentar la despesa energètica ( $589 \pm 21$  versus  $413 \pm 29$  Kcal/ 4 setmanes,  $p < 0,001$ ;  $1033 \pm 20$  versus  $1153 \pm 24$  ml O<sub>2</sub>/h/Kg<sup>0,75</sup>,  $p < 0,05$ ; en ratolins *ob/ob txCN* vs *ob/ob tx*) (fig. 17). Així doncs, aquest resultat mostren clarament que el trasplantament de teixit adipós és viable i funcional, i que per tant és una eina vàlida per a la

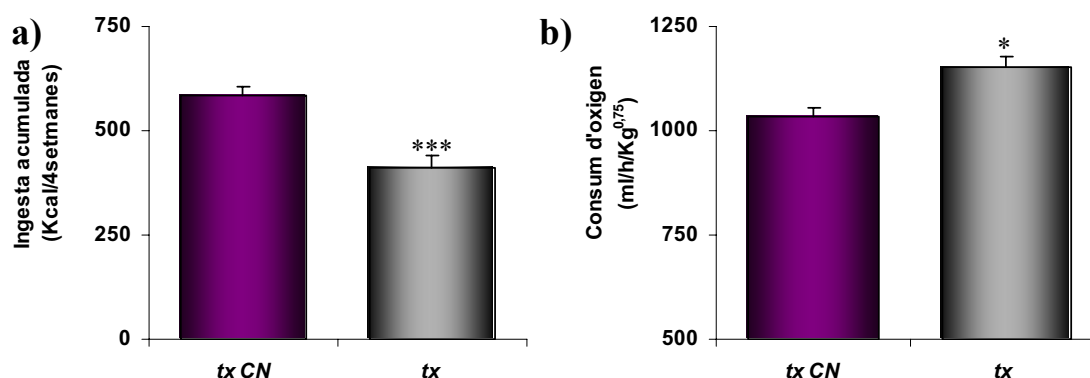
recuperació parcial del fenotip dels ratolins *ob/ob* durant un període mínim de quatre setmanes.



**Figura 15.** Estudi histològic del teixit adipós epididimari trasplantat al final del període de trasplantament. Imatges representatives de microscòpia òptica tenyides amb hematoxilina-eosina.



**Figura 16.** Evolució del guany ponderal (*línies*) i de les leptinèmies (*barres*) en ratolins *ob/ob* trasplantats. Ratolins *ob/ob txCN* (●, n=6) i ratolins *ob/ob tx* (■, n=6). <L.D. correspon a valors de leptinèmies menors al límit de detecció del mètode. Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. ### p<0,0001, L'anàlisi de la variància del pes corporal amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial. \* p<0,05 i \*\* p<0,01 comparat amb ratolins *ob/ob txCN* (test-t d'Student)

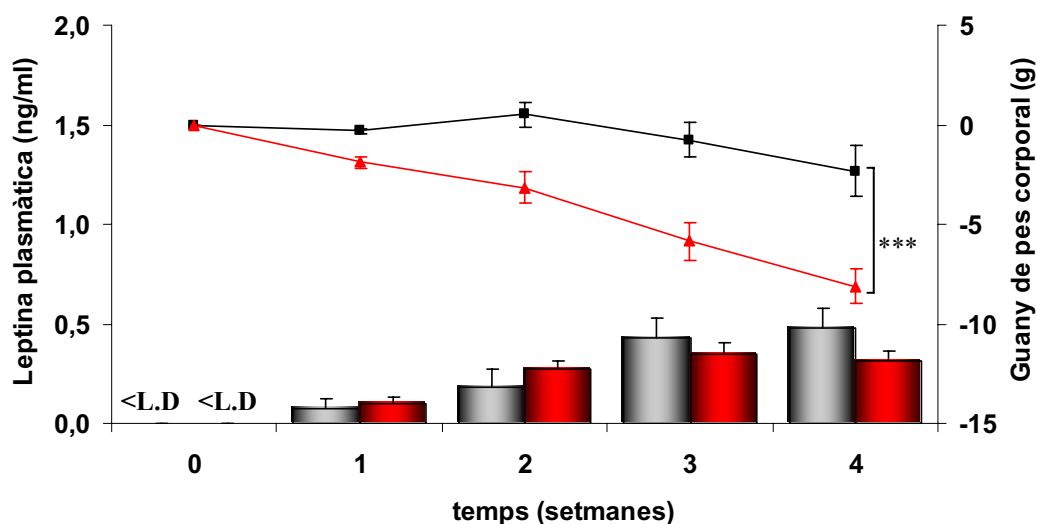


**Figura 17.** Estudi del balanç energètic en ratolins *ob/ob* trasplantats. (a) Valors d'ingesta acumulada en ratolins *ob/ob txCN* (■, n=6) i ratolins *ob/ob tx* (■, n=6), (b) i valors de consum d'oxigen en ratolins *ob/ob txCN* (■, n=3) i ratolins *ob/ob tx* (■, n=3). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  i \*\*\*  $p < 0,001$  comparat amb ratolins *ob/ob txCN* (test-t d'Student)

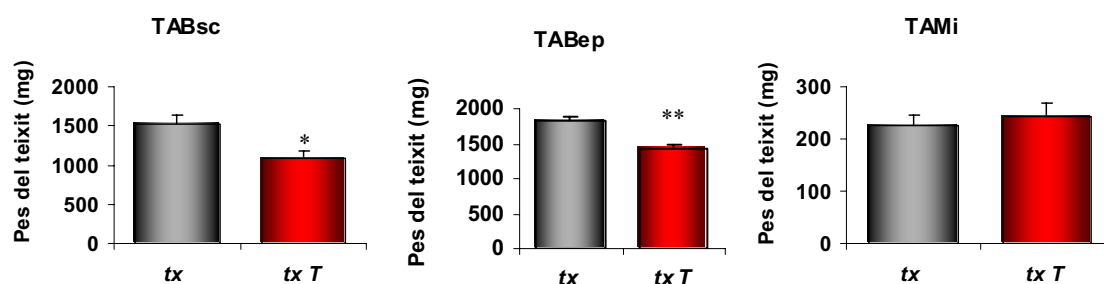
### **2.3.2. Efecte del tungstat en ratolins *ob/ob* trasplantats amb teixit adipós.**

Una vegada validada la viabilitat i funcionalitat del trasplantament de teixit adipós, es va avaluar l'efecte que el tractament amb tungstat exercia en els ratolins trasplantats amb teixit productor de leptina. Es va administrar tungstat en l'aigua de beguda a ratolins *ob/ob* trasplantats amb teixit adipós de ratolins *lean (ob/ob txT)* a partir del moment en que es va implantar el teixit. En aquests animals es va observar una acceleració en la reducció de pes corporal respecte a la que s'havia observat en ratolins *ob/ob tx*, arribant a haver-hi diferències significatives entre ambdós grups d'animals ( $-3,17 \pm 1,37$  versus  $-8,10 \pm 0,83$  g de guany de pes corporal en ratolins *ob/ob tx* vs *ob/ob txT*, n=6) (fig. 18). Aquesta reducció de pes també era simultània a l'increment dels nivells plasmàtics de leptina observats (fig. 18). No obstant les diferències en les leptinèmies entre els ratolins *ob/ob tx* i *ob/ob txT*, no van ser significatives en cap moment de l'experiment, indicant que les diferències en el pes corporal no eren causades per canvis en la síntesi o en la secreció de leptina induïts pel tungstat. Aquest resultat torna a

suggerir que el tungstat està actuant sinèrgicament amb la leptina, incrementant així l'efecte reductor del pes corporal de la pròpia hormona. De la mateixa manera que en la resta de models estudiats, la pèrdua de pes corporal induïda pel tractament amb tungstat estava acompanyada per una reducció de l'adipositat. Els ratolins *ob/ob txT* van mostrar una reducció significativa de pes del dipòsits de teixit adipós epididimari i subcutani respecte els ratolins *ob/ob tx*. En canvi el teixit adipós marró interescapular no va mostrar cap diferència de pes, tal i com s'havia observat en la resta de models estudiats ( $1518 \pm 117$  versus  $1093 \pm 93$  mg T.A. subcutani,  $p < 0,05$ ;  $1836 \pm 61$  versus  $1438 \pm 59$  mg T.A. epididimari,  $p < 0,01$ ;  $226 \pm 18$  versus  $243 \pm 27$  mg T.A marró interescapular en ratolins *ob/ob tx* vs *ob/ob txT*) (fig. 19). El tractament amb tungstat va millorar significativament el canvi en el balanç energètic descrit en els ratolins *ob/ob tx*. Així doncs els ratolins tractats van disminuir els nivells d'ingesta, alhora que incrementaven la despesa energètica ( $413 \pm 29$  versus  $329 \pm 13$  Kcal/ 4 setmanes,  $p < 0,05$ ;  $1153 \pm 24$  versus  $1311 \pm 17$  ml  $O_2/h/Kg^{0,75}$ ,  $p < 0,05$ ; en ratolins *ob/ob tx* vs *ob/ob txT*) (fig. 20).

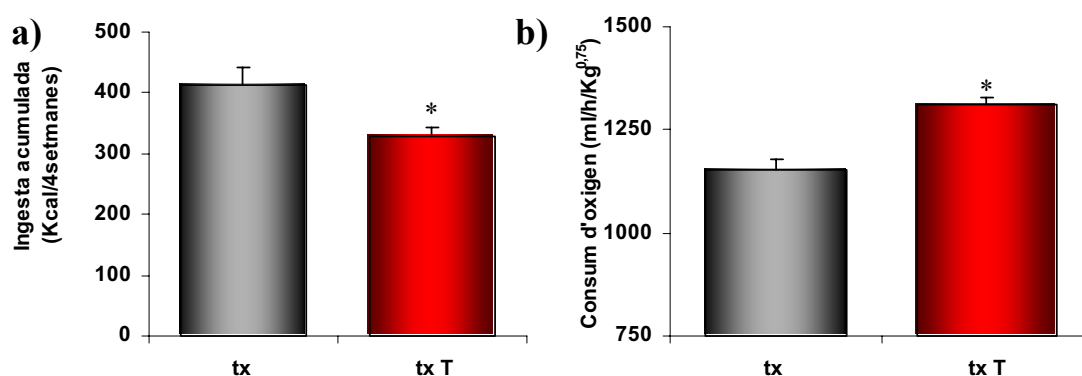


**Figura 18.** Evolució del guany ponderal (*línies*) i de les leptinèmies (*barres*) en ratolins *ob/ob* trasplantats. Ratolins *ob/ob tx* (■, n=6) i ratolins *ob/ob txT* (▲, n=6). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem.\*\*\*  $p < 0,0001$ , L'anàlisi de la variança amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.



**Figura 19.** Valors gravimètrics tissulars en ratolins *ob/ob* trasplantats amb TAB epididimari de ratolins *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins trasplantats no tractats (■, n=6) i ratolins trasplantats i tractats (■, n=6). Els resultats són la mitjana ± sem. \* p<0,05 i \*\* p<0,01 (test-t d'Student)

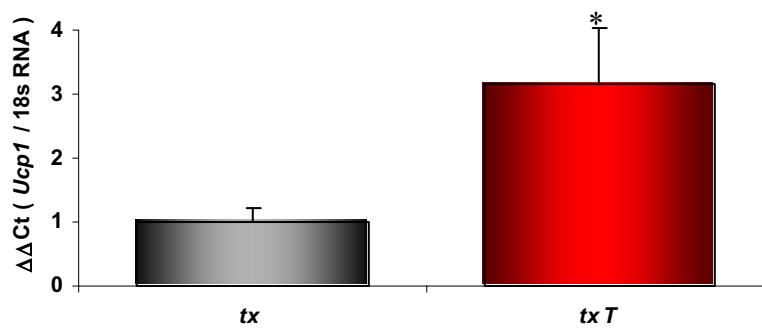
El tractament amb tungstat va millorar significativament el canvi en el balanç energètic descrit en els ratolins *ob/ob tx*. Així doncs els ratolins tractats van disminuir els nivells d'ingesta, alhora que incrementaven la despesa energètica ( $413 \pm 29$  versus  $329 \pm 13$  Kcal/ 4 setmanes, p<0,05;  $1153 \pm 24$  versus  $1311 \pm 17$  ml O<sub>2</sub>/h/Kg<sup>0,75</sup>, p<0,05; en ratolins *ob/ob tx* vs *ob/ob txT*) (fig. 20).



**Figura 20.** Estudi del balanç energètic en ratolins *ob/ob* trasplantats. (a) Valors d'ingesta acumulada en ratolins *ob/ob tx* (■, n=6) i ratolins *ob/ob txT* (■, n=6), (b) i valors de consum d'oxigen en ratolins *ob/ob txT* (■, n=3) i ratolins *ob/ob tx* (■, n=5). Els resultats són la mitjana ± sem. \* p<0,05 comparat amb ratolins *ob/ob tx* (test-t d'Student)

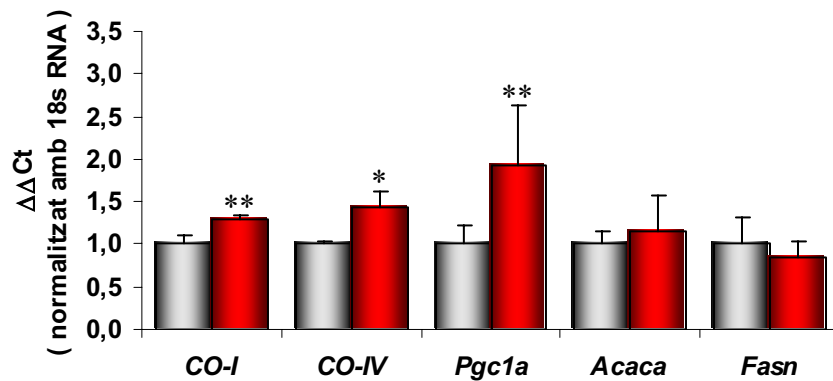


Per determinar si l'increment de la despesa energètica dels ratolins *ob/ob txT* era causada per un increment en la termogènesi, tal i com es va descriure en els models de rata Wistar i de ratolí *ob/ob*, es van determinar els nivells d'expressió gènica d'UCP1. En ratolins *ob/ob txT* es va observar un increment significatiu dels nivells de mRNA del gen respecte els ratolins *ob/ob tx*, el que indicava un increment en la termogènesi (fig. 21).



**Figura 21.** Nivells d'expressió del mRNA d'*Ucp1* en ratolins *ob/ob* trasplantats al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *ob/ob tx* (■, n=4) i ratolins *ob/ob txT* (■, n=5). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  comparat amb ratolins *ob/ob tx* (test-t d'Student)

Al final del tractament es va fer l'estudi del perfil d'expressió gènica del TAM en els ratolins trasplantats mitjançant la tècnica de PCR quantitativa. Els resultats van mostrar, de forma similar al que succeïa en ratolins *lean*, que el tractament amb tungstat incrementava l'expressió dels gens relacionats amb l'increment del catabolisme, sense alterar aquells relacionats amb processos anabòlics (fig. 22).

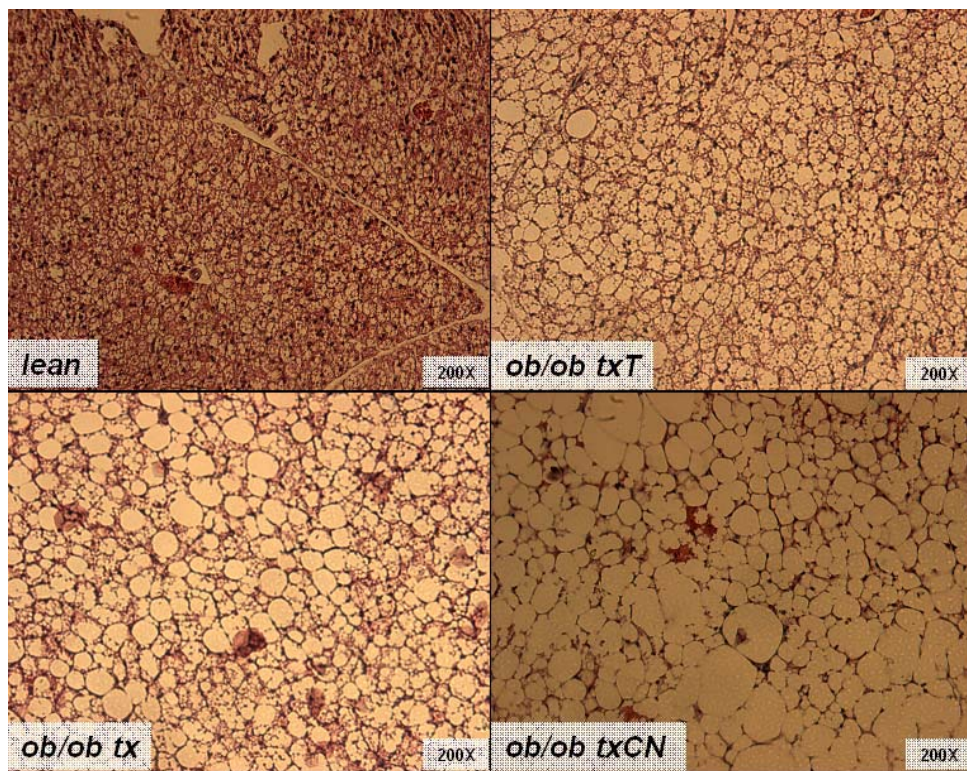


**Figura 22.** Nivells d'expressió del mRNA de gens del BAT implicats en l'activació del teixit per la regulació de la despesa energètica en ratolins *ob/ob* trasplantats al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *ob/ob tx* (■, n=4) i ratolins *ob/ob txT* (■, n=5). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  comparat amb

Simultàniament es va fer l'estudi histològic del TAM interescapular d'aquests animals. En aquest estudi es va observar un canvi morfològic important en el TAM dels ratolins *ob/ob tx*, que presentaven uns adipòcits amb una reducció en el tamany de les vacuoles lipídiques, així com l'aparició d'adipòcits amb múltiples vacuoles lipídiques de tamany reduït (fig. 23), respecte al que s'observava en el teixit de ratolins *ob/ob txCN*, que presentaven adipòcits grans i uniloculars, amb una gran similitud amb els adipòcits de teixit adipós blanc. Així doncs, els ratolins *ob/ob tx* mostraven un teixit amb una morfologia més semblant a la de ratolins *lean*. El tractament amb tungstat en ratolins *ob/ob txT* va causar un canvi més accentuat en la morfologia del TAM, esdevenint aquest un teixit compost per adipòcits petits i multiloculars, molt semblant al teixit plenament funcional dels ratolins *lean*. Els resultats d'aquests estudis histològics, ens indiquen, conjuntament amb els canvis en el perfil d'expressió gènica detectats, la modificació del TAM cap una morfologia típica

Si bé l'estudi histològic no és un indicatiu de la funcionalitat del teixit, els canvis morfològics observats, conjuntament amb els canvis en el perfil

d'expressió gènica en el teixit i l'augment en el consum d'oxigen observats en ratolins *ob/ob txT*, ens indiquen que el tungstat està incrementant respecte als ratolins *ob/ob tx* l'activitat termogènica del TAM induïda per leptina, indicant que la recuperació de la deficiència de la leptina no només recupera l'efecte reductor de pes corporal, sinó que a més ho fa mitjançant la recuperació dels mateixos mecanismes que intervien en l'efecte del tungstat en models animals sense deficiències en la leptina.



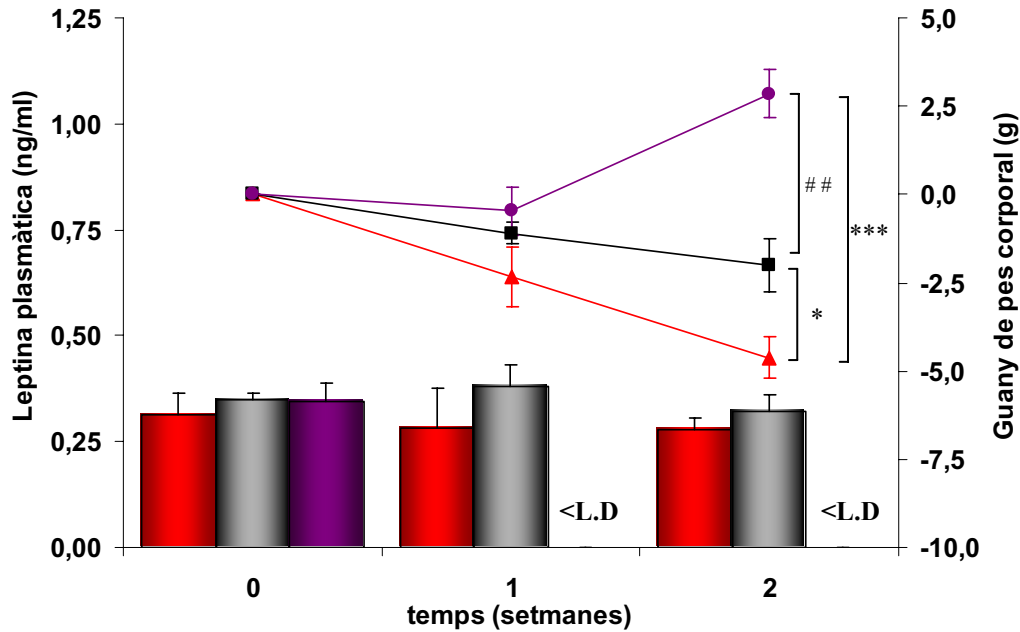
**Figura 23.** Estudi histològic del teixit adipós marró interescaular al final del període de trasplantament. Imatges representatives de microscòpia òptica tenyides amb hematoxilina-eosina de ratolins *lean*, *ob/ob txT*, *ob/ob tx* i *ob/ob txCN*.

Finalment, es van avaluar els efectes de la retirada del tractament i de l'extirpació dels dipòsits de greix trasplantats en els ratolins sotmesos al tractament amb tungstat durant quatre setmanes. L'objectiu d'aquest experiment era determinar si durant el trasplantament de teixit adipós i el

tractament amb tungstat, els efectes observats sobre el pes corporal i el balanç energètic eren causats per la leptina i/o el tungstat, o bé si eren el procés iniciador d'altres possibles mecanismes que actuessin sobre ambdós paràmetres. En primer lloc, quan es va retirar únicament el tractament als ratolins trasplantats, es va observar una desacceleració en la reducció del pes corporal (fig. 24). Aquest canvi en el comportament del guany ponderal, no va anar acompanyat de cap reducció en els nivells plasmàtics de leptina, tal i com s'observa en el mateix gràfic, indicant-nos que la desacceleració era causada exclusivament per la retirada del tractament. Aquest resultat indicaven que, tal i com s'ha descrit prèviament [2], la retirada del tractament provoca la recuperació del pes corporal fins assolir els nivells dels animals no tractats, així doncs, el tractament amb tungstat no provoca efectes permanents sobre la pèrdua de guany ponderal. La desacceleració en la pèrdua de pes corporal en lloc de l'aturada total, també ens indica que en aquests animals la leptina continua induint un balanç energètic negatiu que provoca la pèrdua de pes corporal.

Globalment aquests resultats tornen a evidenciar que el tungstat està actuant com a potenciador de la leptina, incrementant els efectes que mostra l'hormona de *per se*.

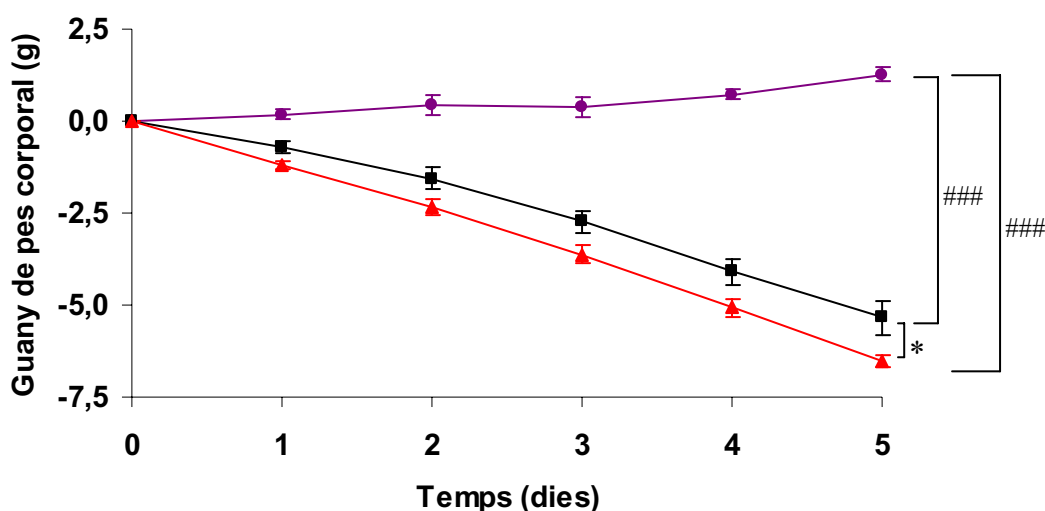
Quan es va realitzar l'extirpació quirúrgica del teixit adipós trasplantat en els animals que havien estat tractats durant quatre setmanes, es va observar una immediata desaparició de la leptina en plasma, que va anar acompanyada d'un increment significatiu del guany ponderal respecte els ratolins *ob/ob txT* (fig 24). Així doncs, el tungstat va tornar a perdre la seva capacitat reductora de guany ponderal en els animals que tornaven a presentar absència de leptina, descartant cap efecte iniciador del tungstat i/o de la leptina sobre altres mecanismes inductors de la pèrdua de pes.



**Figura 24** Evolució del guany ponderal (*línies*) i de les leptinèmies (*barres*) en ratolins *ob/ob* trasplantats després de l'extirpació del teixit adipós trasplantat i/o la retirada del tractament de tungstat. Ratolins *ob/ob txT* (▲, n=3), ratolins *ob/ob tx* amb retirada del tractament (■, n=3), ratolins *ob/ob tx* amb extirpació de teixit adipós trasplantat (●, n=3). <L.D. correspon a valors de leptinèmies menors al límit de detecció del mètode. Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \* $p < 0,05$  i \*\*\* $p < 0,001$  comparat amb ratolins *ob/ob txT*, i ## $p < 0,01$  comparat amb ratolins *ob/ob tx* amb retirada del tractament. L'anàlisi de la variança amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.

Amb el trasplantament de teixit adipós en ratolins *ob/ob*, aconseguíem que els animals tinguessin uns nivells de leptina plasmàtica detectables. Si bé, el conjunt de resultats exposats en aquesta tesi, suggereixen que la leptina és la responsable de la recuperació de la efectivitat del tungstat en la reducció de guany ponderal, no es pot descartar la possibilitat de que aquest efecte estigui mitjançat per altres factors secretats pel teixit adipós trasplantat. Amb la finalitat confirmar que la leptina és el factor secretat pel teixit responsable de la recuperació de l'efectivitat del tungstat, es va injectar leptina intraperitonealment, durant cinc dies consecutius, en ratolins *ob/ob*, el mateix model de ratolí emprat en els experiment de trasplant de teixit adipós, isolant l'efecte produït per la leptina a l'eliminar

la resta de factors secretats pel teixit adipós. Els animals es van dividir en dos grups, amb i sense tractament amb tungstat en l'aigua de beguda. En l'estudi es va incloure un grup de ratolins control del tractament amb leptina, al que en el lloc de l'hormona se'ls va injectar NaCl 0,9 %. L'evolució del guany ponderal en aquest experiment va ser similar a la de l'experiment de trasplantament de teixit adipós en ratolins *ob/ob*. Es va observar que els ratolins tractats amb leptina reduïen significativament el guany ponderal respecte al grup de ratolins no tractats. A més s'observava que el cotractament amb leptina i tungstat no sols reduïa el guany ponderal, sinó que l'accelerava respecte als animals tractats únicament amb leptina (fig 25) Aquests resultats confirmen que el factor secretat pel teixit adipós trasplantat en ratolins *ob/ob* responsable de la recuperació de l'efectivitat del tungstat com a agent reductor del guany ponderal és la leptina.



**Figura 25** Evolució del guany ponderal en ratolins *ob/ob* tractats amb leptina recombinant. Ratolins *ob/ob* no tractats (●, n=4). ratolins *ob/ob* tractats amb leptina (■, n=5) i ratolins *ob/ob* tractats amb leptina i tungstat (▲, n=5). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \* $p < 0,05$  comparat amb ratolins *ob/ob* tractats amb leptina i ### $p < 0,001$  comparat amb ratolins *ob/ob* no tractats. L'anàlisi de la variança amb el tractament es va realitzar amb una ANOVA multifactorial.

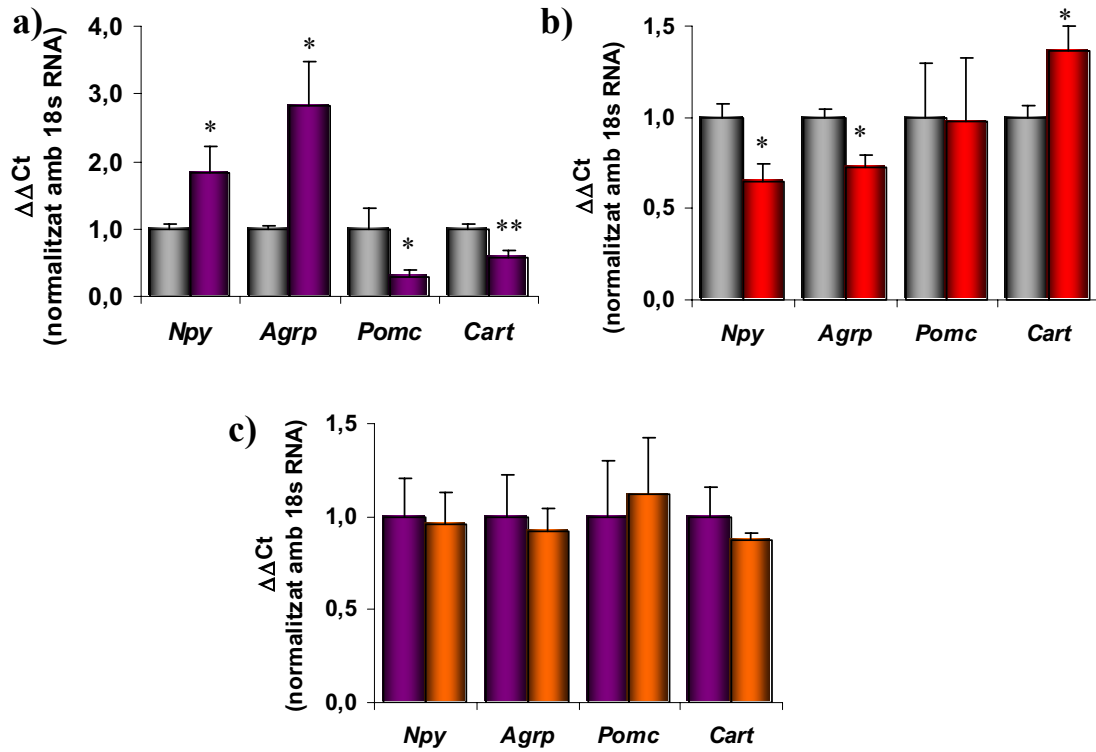
### **3. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TUNGSTAT SOBRE ELS NIVELLS D'EXPRESSION DE mRNA DE NEUROPEPTIDS HIPOTALAMICS EN RATOLINS *ob/ob***

Com ja s'ha revisat prèviament en la introducció, els efectes de la leptina sobre el control de la ingesta i l'expressió de la UCP1, s'inicien a nivell hipotalàmic, i en concret en les subpoblacions neuronals del nucli arcuat que coexpressen els neuropèptids NPY/AGRP i POMC/CART. L'activació del receptor de leptina, àmpliament expressat en aquesta regió, mitjançant la leptina causa la inhibició de la transcripció dels neuropèptids orexigènics NPY i AGRP i l'activació dels anorexigènics POMC i CART [198, 543], iniciant les senyals corresponents per a la ingesta i la despesa energètica. Així doncs, per establir un control de l'activitat central de la leptina i factors que actuin sobre la senyalització d'aquesta hormona, es pot emprar la mesura dels nivells d'expressió d'aquests neuropèptids. Els resultats previs ens han demostrat que el tungstat actua com a potenciador de l'acció de la leptina sobre l'increment de la UCP1 i la disminució de la ingesta en certes circumstàncies, així doncs és plausible pensar que el tungstat pot estar realitzant el seu efecte sinèrgic amb la leptina sobre aquestes subpoblacions neuronals controladores del balanç energètic i regulades per l'hormona. Amb la finalitat de comprovar si el tungstat realment està realitzant accions a nivell central, es van determinar els nivells d'expressió de mRNA dels quatre neuropèptids abans esmentats a nivell hipotalàmic en ratolins *ob/ob* i *lean* tractats amb tungstat durant 4 setmanes. Aquesta mesura es va realitzar mitjançant la tècnica de PCR quantitativa. Si bé aquesta mesura no determina l'efecte concret sobre els diferents nuclis de l'hipotàlem, si que ens és útil per determinar si efectivament hi ha un efecte central del tungstat, el que ens permetria, en un futur, dirigir la investigació cap a la determinació del nucli o nuclis

implicats en l'acció del tungstat, i esbrinar la diana o dianes moleculars sobre les que pot estar actuant el fàrmac per modificar el balanç energètic dels animals tractats.

En primer lloc, es va corroborar que els efectes de la leptina sobre els nivells dels neuropèptids en els nostres animals eren similars als descrits a la bibliografia. Per això es van comparar els nivells d'expressió dels diversos neuropèptids en els ratolins *lean* amb els dels ratolins *ob/ob*, ambdós grups sense tractament amb tungstat. Els resultats, efectivament van mostrar un increment en l'expressió dels neuropèptids NPY i AGRP, a més d'una disminució de POMC i CART en els ratolins obesos (fig 26a). Seguidament es van mesurar els canvis en l'expressió gènica causats pel tractament amb tungstat en ratolins *ob/ob* i *lean*. En ratolins *lean* es va detectar una disminució significativa de l'expressió de NPY en els animals tractats amb tungstat, tanmateix, es va observar una reducció en els nivells de AGRP, tot i que, en aquest cas, la reducció no va ser estadísticament significativa. Pel que fa als neuropèptids anorexigènics, el tractament amb tungstat va incrementar l'expressió de CART, sense alterar l'expressió de POMC (fig 26b). En ratolins *ob/ob* el tractament amb tungstat no va variar significativament l'expressió de cap dels quatre neuropèptids estudiats (fig 26c), indicant novament que la leptina és imprescindible per que el tractament amb tungstat sigui efectiu. Així doncs, aquests resultats demostren que el tungstat actua a nivell central, modificant l'expressió de neuropèptids que estan estretament lligats a la regulació de l'homeòstasi energètica. Si a més, lliguem aquesta afirmació amb el que ja està descrit sobre la regulació de la UCP1 per leptina, podem afirmar que el tungstat està actuant a nivell de l'hipotàlem per tal d'incrementar els nivells de la UCP1 i així incrementar la despesa energètica.





**Figura 26.** Nivells d'expressió del mRNA de *Npy*, *Agrp*, *Pomc* i *Cart* en hipotàlem de ratolins *ob/ob* i *lean* al final del període de tractament amb tungstat. Ratolins *lean* no tractats (■, n=4), ratolins *lean* tractats (■, n=5), ratolins *ob/ob* no tractats (■, n=5) i ratolins *ob/ob* tractats (■, n=5). Els resultats són la mitjana  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  i \*\*  $p < 0,01$  comparat amb ratolins *lean* no tractats (test-t d'Student)



## VI. DISCUSSIÓ



En els resultats publicats pel nostre grup [2], hem descrit que el tungstat redueix el guany de pes corporal i l'adipositat en rates obeses induïdes amb una dieta hipercalòrica (ODC), sense modificar la ingesta ni provocar alteracions en l'absorció intestinal de lípids, a més de causar una millora en el perfil lipídic. Els canvis observats en l'expressió de gens relacionats amb el transport i l'oxidació d'àcids grassos, i en les proteïnes desacobladores (UCPs), suggereixen que el mecanisme d'acció del tungstat, en la reducció del guany ponderal, pot estar relacionat amb la modulació de la despesa energètica. No obstant, el fet que l'administració de tungstat en rates primes alimentades amb una dieta estàndard provoqui, a més de la reducció de guany ponderal, una reducció de la ingesta [491], implica que els mecanismes d'acció del tungstat, també estan relacionats amb el control de la ingesta, i en conseqüència, que el tungstat modula l'homeòstasi energètica dels animals tractats.

Un punt destacat en la recerca prèvia, i que ha estat el punt de partida per a la determinació dels objectius d'aquesta tesi, ha estat l'absència de canvis, amb el tractament amb tungstat, en els nivells d'expressió de les citocines clàssiques per a la regulació del pes corporal, essent la leptina la única excepció. La implicació de la leptina en el control de la ingesta i de la despesa energètica està àmpliament descrita [368-373]. També s'ha determinat l'increment dels nivells plasmàtics d'aquesta hormona en individus obesos [184, 544], i que aquest increment promou un increment en la despesa energètica i una reducció en la ingesta, que són responsables de la reducció del pes corporal i l'adipositat [144]. Paradoxalment, el tractament amb tungstat disminueix el guany pes corporal de rates ODC, tot i reduir els nivells d'expressió de la leptina en TAB [2], així com els nivells circulants de l'hormona (dades no publicades). Indicant que el tungstat ha d'activar mecanismes reductors del pes corporal independents a la leptina, per a compensar l'efecte de la reducció d'aquesta hormona, o bé,

activar mecanismes que incrementin l'eficiència de la leptina. Així doncs, davant d'aquesta dicotomia, l'estudi de l'efecte del tungstat en models amb deficiències en leptina, està justificat per a discriminar entre els possibles mecanismes dependents i independents a la leptina, en l'acció del tungstat.

Diverses alteracions en les funcions de la leptina, estan causades per deficiències en el receptor de l'hormona. Models animals amb deficiències en el receptor de la leptina, com la rata Zucker *fa/fa*, la rata Koletsky, o els ratolins *db/db* o *db<sup>3j</sup>/db<sup>3j</sup>*, mostren clares alteracions en el metabolisme energètic i desenvolupament d'obesitat severa [146, 150-153]. Per realitzar l'estudi de l'efecte del tungstat en un model amb deficiències amb leptina, hem triat la rata Zucker *fa/fa*. Aquest model presenta una alteració en la regió d'unió a la leptina, en la forma llarga del receptor, que impossibilita la transducció del senyal de l'hormona, i en conseqüència, fa inviable el sistema de senyalització de la leptina. La desaparició dels efectes del tractament oral amb tungstat sobre el pes corporal i el balanç energètic en la rata Zucker *fa/fa*, indica que el tungstat necessita un sistema de senyalització de la leptina intacte, per a induir un balanç energètic negatiu, i reduir el guany ponderal. En conseqüència, els mecanismes d'acció del tungstat son dependents del sistema de la leptina. La dependència de l'acció del tungstat al sistema de la leptina, conjuntament amb la reducció dels nivells d'expressió de l'hormona observada al final del tractament, implica que, el mecanisme d'acció del tungstat, ha d'estar basat en l'increment de l'eficiència del senyal de la leptina. A més, aquest resultats també indiquen que el tungstat regula senyals que s'inicien anteriorment al receptor de la leptina, ja que la rata Zucker *fa/fa*, manté intacte la via de senyalització posterior al receptor. En aquest sentit, els esdeveniments que es produeixen en teixits perifèrics, i que són conseqüència de la senyalització de la leptina, com l'amplificació de la resposta  $\beta$ -adrenèrgica

[296], no es veuen alterats per l'acció directe del tungstat en el teixit perifèric (comunicació personal).

Determinada la necessitat d'una via de senyalització de la leptina intacte, cal esbrinar si el mecanisme mitjançant el que el tungstat incrementa l'eficiència de la leptina, podria donar-se per l'actuació del tungstat com un agent mimetitzant de la leptina, com activador d'algun component de la via de senyalització, o bé, com potenciador de l'acció de la pròpia leptina. Per donar resposta a aquesta qüestió, hem estudiat els efectes del tractament oral amb tungstat en el model de ratolí *ob/ob*. Aquest model presenta deficiències en la síntesi de la leptina, que són responsables de la traducció d'una forma anòmala i no funcional de la leptina. Aquest model, manté la via de senyalització de la leptina intacte, amb el que qualsevol efecte que el tungstat pogués exercir sobre els diversos components de la via de senyalització, no tindria cap impediment. Els resultats obtinguts al tractar ratolins *ob/ob* amb tungstat, han determinat l'absència d'efectes sobre el pes corporal i el balanç energètic, indicant que a més d'una via de senyalització de la leptina intacte, el tungstat necessita la presència de l'hormona per exercir els seus efectes antiobesitat. Per corroborar la implicació de la leptina en l'efecte del tungstat, ens calia restablir la deficiència en la leptina en els ratolins *ob/ob*. Per realitzar aquesta restauració, el protocol clàssic, consistent en l'administració intravenosa o intraperitoneal de leptina recombinant, és d'utilitat en protocols de curta durada [545]. En el nostre cas, la duració de l'experiment és un factor limitant per emprar aquest protocol, ja que, a conseqüència del curt temps de vida mitja de la leptina en sang, cal administrar un mínim de dues dosis diàries de l'hormona. Aquesta pauta de dosificació, implica un excessiu nombre d'injeccions a nivell intraperitoneal en uns animals de tamany reduït. Això, a més de ser causant d'un estrès elevat, incrementa el risc

d'enquistament o d'altres alteracions que interferirien tant en l'efecte de la leptina, així com en la dosi efectiva d'hormona administrada. A més, la llarga duració i l'elevat nombre d'animals emprat en l'experiment, conjuntament amb l'elevat cost de la leptina recombinant, fa econòmicament inviable aquesta forma d'abordar la recuperació de la deficiència en la leptina en els ratolins *ob/ob*. Una altre via, més innovadora, per a l'administració de la leptina, consisteix en la utilització de bombes osmòtiques. En aquesta tècnica, l'administració de la leptina es fa amb l'alliberament constant de l'hormona, mitjançant una bomba osmòtica implantada subcutàniament. Amb aquesta tècnica, es redueix la dosi de leptina administrada, i evita la pauta d'injeccions repetitives, eliminant així els problemes derivats.

En el nostre cas, per resoldre les limitacions del protocol clàssic, hem optat per realitzar trasplantament de TAB de ratolí *lean*, i en conseqüència productor de leptina, en els ratolins *ob/ob*. D'aquesta forma, i a diferència de l'administració mitjançant bombes osmòtiques, s'aconsegueix una secreció més fisiològica de la leptina, ja que com conseqüència de la regeneració vascular del teixit trasplantat [546], aquest pot respondre a les senyals de l'organisme que regulen la secreció de l'hormona, com els NEFAs [547], la insulina [548] i els estrògens i andrògens [549, 550], entre d'altres. El control de la producció de leptina mitjançant el SNS, també ha estat descrit [551]. No obstant, en el nostre model de trasplantament, no podem confirmar la contribució del sistema nerviós en la producció de leptina, ja que, per això, caldria una regeneració de la innervació simpàtica en el teixit trasplantat que, tal i com demostra Wang [552], no es produeix en un període inferior a 4 setmanes. Així doncs, el nostre protocol per a la recuperació de la deficiència de la leptina en ratolins *ob/ob*, aporta respecte dels protocols previs, una producció de leptina regulada fisiològicament. Aquesta tècnica de trasplantament ha estat



empleada, amb anterioritat, en ratolins amb lipodistròfia [513] i en altres models murins [514, 516-518], però mai amb la finalitat de restaurar la deficiència de la leptina en ratolins *ob/ob*. Simultàniament a nostre treball, Keblanov [553], ha establert una altre tècnica similar per a la recuperació de la leptina en ratolins *ob/ob*. En aquest protocol, trasplanten teixit adipós disgregat, a diferència de nosaltres, que trasplantem TAB íntegre. Aquesta diferència en el procediment, no altera la funcionalitat del trasplantament, i el ratolins *ob/ob*, de la mateixa manera que en el nostres experiment, recuperen els nivells de leptina en sang.

La viabilitat del trasplantament de teixit adipós, queda demostrada amb la disminució del pes corporal, l'adipositat i la ingesta, i l'increment de la despesa energètica. A més, la manca de rebuig o infiltració linfocitària del teixit trasplantat, l'increment de la vascularització i l'increment de leptina en sang, són signes evidents de la funcionalitat del mateix. El tractament amb tungstat en ratolins en els que es recupera la deficiència de la leptina, torna a ser efectiu, com demostra l'acceleració en la pèrdua de pes i l'accentuació dels canvis en el balanç energètic. No obstant, el trasplantament de TAB implica la secreció d'altres factors, a més de la leptina. Alguns d'aquests factors, com, per exemple, l'adiponectina, la resistina o el  $TNF\alpha$ , també són inductors de canvis en el pes corporal i el balanç energètic. En conseqüència, no podem confirmar, que la recuperació de l'efecte del tungstat estigui causada per la recuperació de la leptina en el ratolí *ob/ob*. Per confirmar-ho, hem realitzat un experiment a curt termini d'administració de leptina recombinant mitjançant injecció intraperitoneal en ratolí *ob/ob*. L'evolució del pes corporal, similar a la determinada en els experiments de trasplantament de TAB, indica que, efectivament, la leptina és el factor secretat per el TAB, responsable de la recuperació dels efectes del tungstat.

Globalment, els resultats obtinguts amb els experiments realitzats en models animals deficients en el sistema de la leptina, ens indiquen que el tungstat actua com a potenciador de la leptina, per a exercir canvis en el pes corporal i en el balanç energètic.

L'increment de l'adipositat està lligat a un increment dels nivells circulants de la leptina, per a donar resposta als canvis en l'homeòstasi energètica induïts per l'obesitat. No obstant, en situacions d'obesitat persistent, l'increment dels nivells de leptina no és capaç de revertir la progressió de l'obesitat. A més, s'ha observat que en humans i en rosegadors obesos, hi ha una resposta limitada o nul·la a l'administració de leptina exògena. Aquesta ineficiència aparent de la leptina, es descriu com a resistència a la leptina [554-558]. Les causes que desemboquen en una resistència a la leptina, inclouen defectes previs i posteriors a l'activació del receptor [559]. Els processos posteriors a l'activació del receptor de la leptina, inclouen una cascada de fosforilacions, en la que estan involucrades les molècules JAK, STAT i el propi receptor de la leptina. La regulació del senyal de la leptina, és la resultant del nivell de fosforilació de aquestes proteïnes, fruit del balanç entre les senyals estimuladores de la fosforilació causades per SH2-B [560], i les senyals inhibidores causades per diverses fosfatases, com SOCS3, involucrada en el *feedback* negatiu de la pròpia hormona [419, 561], PTP-1B [562] i SHP2 [563]. Aquestes tres fosfatases s'han mostrat claus en el control de l'homeòstasi energètica mitjançant l'acció de la leptina. Models murins amb deficiències en aquestes fosfatases, mostren un fenotip comú, caracteritzat per una resistència a l'obesitat i millores en el balanç energètic, a més de mantenir incrementats els nivells de fosforilació de JAK2 i STAT3. Així doncs aquestes fosfatases esdevenen claus per el control de l'acció de la leptina. El tractament de l'obesitat, relacionada amb la resistència a la leptina, es pot abordar des de

tres perspectives, i) mitjançant un increment en el transport de la leptina a través de la barrera hematoencefàlica, amb, per exemple, l'administració intranasal de leptina, ii) l'ús d'agonistes del receptor de la leptina, de més potència que la pròpia leptina, iii) mitjançant mecanismes que regulin les molècules implicades en la sensibilització del senyal de la leptina. Actualment, no hi ha descrits fàrmacs que actuïn a nivell de cap d'aquests mecanismes, no obstant, el disseny de agonistes sintètics del receptor de la leptina, està fent avenços amb la finalitat de concretar noves teràpies contra l'obesitat [564]. En aquest context, on manquen solucions terapèutiques efectives que actuïn contra l'obesitat induïda per la resistència a la leptina, el tungstat pot esdevenir un fàrmac clau, com a conseqüència de la seva activitat inhibidora de fosfatases [479], i activar un mecanisme atenuador de la resistència a la leptina. El mecanisme d'acció del tungstat, podria transcórrer a través de la inhibició d'alguna o de varies de les fosfatases que regulen negativament el senyal de la leptina (SOCS3, PTP-1B,...). En aquest sentit, hem iniciat proves experimentals en línies neuronals i en cultius primaris de subpoblacions hipotalàmiques, per a determinar si la inhibició d'alguna d'aquestes fosfatases, pot ser el mecanisme mitjançant el que el tungstat potenciï l'acció de la leptina.

La determinació, mitjançant calorimetria indirecte, d'un increment en el consum d'oxigen, tant en rates primes, com en rates ODC, indica que el tungstat incrementa la despesa energètica dels animals tractats. Per una altra banda, la manca d'efecte del tungstat en el consum d'oxigen en els models deficients en leptina estudiats, la rata Zucker *fa/fa* i el ratolí *ob/ob*, indiquen, a més, que aquest mecanisme de despesa energètica està modulats pel tungstat de manera dependent de la leptina. L'increment en el consum d'oxigen de tot l'organisme, està provocat, en part, per un increment en la respiració del teixit adipós marró (TAM), i més concretament de la

població d'adipòcits madurs d'aquest teixit, tal i com demostren els resultats obtinguts amb la tècnica de respirometria d'alta resolució en rates primes. El TAM és el principal teixit responsable de la dissipació d'energia mitjançant la UCP1, que en resposta a estímuls com la temperatura o l'excés en el reservori energètic, activa la termogènesi. La regulació d'aquest procés esdevé clau en el manteniment del pes corporal i en el tractament de l'obesitat. No obstant, la implicació exclusiva de la UCP1 en els procés termogènic, és el centre d'un intens debat en el que, encara, no s'ha definit amb exactitud la funcionalitat de les proteïnes homologues UCP2 i 3. El patró d'expressió gènica, així com els baixos nivells d'expressió proteica de UCP2 i 3 en els diversos teixits de l'organisme [298, 314], conjuntament amb la resposta a l'exposició al fred normal i la manca d'obesitat en ratolins *knock-out* per la UCP2 i 3 [156, 312, 313], suggereixen una manca en la funció termogènica d'ambdues proteïnes en condicions normals. La funció més plausible per UCP2 i 3, semblaria estar orientada a la protecció dels teixits contra les espècies reactives de l'oxigen (ROS). En aquest sentit, el tungstat indueix una oxidació d'àcids grassos major, el que provoca un increment en la producció de ROS, suggerint que l'increment de UCP2 i 3 en els diferents teixits, pot estar més relacionat amb la protecció contra aquestes ROS, que no pas amb una funció termogènica. Òbviament, la producció de calor, i per tant la despesa energètica, per part d'aquestes dues proteïnes, ha de tenir lloc en resposta al tractament amb tungstat, si bé, no semblaria que aquesta fos la darrera finalitat, sinó que semblaria, més aviat, un efecte secundari associat a la protecció dels teixits davant de l'increment de l'activitat catabòlica. Però, tal i com demostra Granneman [276], en certes circumstàncies i sota certs estímuls, mecanismes independents de UCP1, poden contribuir significativament a la despesa energètica global. Pel que caldria determinar

la contribució a la despesa energètica induïda pel tractament amb tungstat de cadascuna de les proteïnes desacobladores en els diversos teixits.

La dependència exclusiva de la activitat termogènica de la UCP1 a TAM, sembla encara no estar tancada, i recentment, han sorgit opinions contraposades, reforçant [565] o discrepant [566], sobre aquesta hipòtesi. Però encara són més concloents les evidències que reforcen el paper predominant de la UCP1 a TAM en la despesa energètica. Per aquest motiu, hem centrat la nostre investigació en el paper del tungstat sobre l'expressió de UCP1 i l'activitat termogènica del TAM, com a mecanisme principal de despesa energètica de l'organisme.

El tractament oral amb tungstat en ratolins incrementa significativament els nivells d'expressió de *Ucp1*, de forma similar al que ja s'havia observat en rates ODC, alhora que provoca altres canvis en el perfil d'expressió gènica en el TAM d'aquests animals. L'increment en l'expressió de *Pgc1 $\alpha$*  i en les subunitats 1 i 4 de la citocrom oxidasa provocats pel tractament amb tungstat, impliquen un increment en la biogènesi mitocondrial i en l'activitat de la cadena respiratòria, respectivament. En contraposició, el tractament no provoca canvis d'expressió dels gens *Acaca* i *Fasn*, relacionats amb la síntesi de lípids, procés que, des d'un punt de vista metabòlic, s'oposa a la termogènesi. Així doncs, el tungstat indueix canvis que predisposen el TAM a incrementar la generació del gradient de protons necessari per l'activació de la termogènesi, i conseqüència, la despesa energètica. Aquest resultats estan contrastats amb les observacions dels estudis histològics, realitzats en el TAM de ratolins *ob/ob* trasplantats amb teixit adipós. En els teixits d'aquests ratolins, s'observa una morfologia similar a la que presenta el TAM, totalment funcional, dels ratolins *lean*, amb un contingut reduït de lípids i distribuïts en múltiples vacuoles, a més d'un nombre elevat d'adipòcits. Aquests canvis morfològics potenciats pel tungstat és correlacionen amb l'increment del consum d'oxigen i dels

nivells d'expressió de *Ucp1*. A més, la regulació d'aquest mecanisme és dependent de leptina, tal i com es pot observar amb la desaparició de l'increment en l'expressió de *Ucp1* en ratolins *ob/ob*.

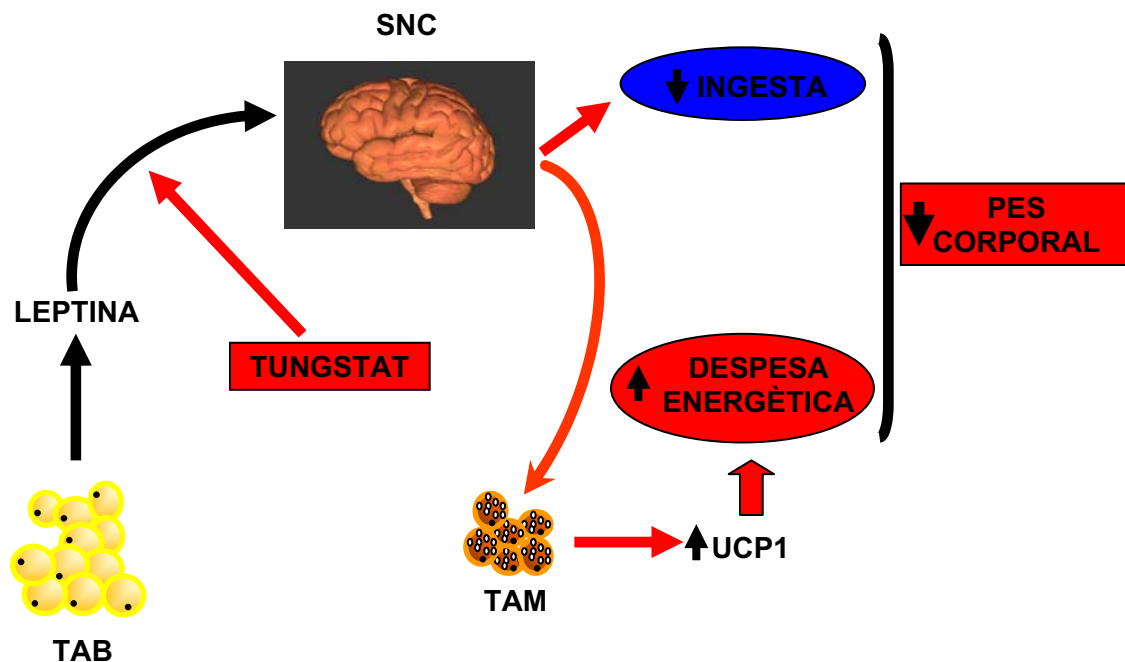
En l'altre banda del balanç energètic, el tractament amb tungstat promou una reducció de la ingesta en animals alimentats amb dietes de baixa palatabilitat, contribuint a la reducció del guany ponderal d'aquests animals. Aquesta reducció de la ingesta, no s'observa en el cas de les rates Zucker *fa/fa*, ni en el dels ratolins *ob/ob*, indicant que el mecanisme implicat en la reducció de la ingesta induïda pel tungstat, també està mitjançat per la leptina. No obstant, l'absència de l'efecte anorèctic induït pel tungstat en els models de rata Zucker *lean* i *fa/fa* alimentats amb dietes d'elevada palatabilitat, suggereix que aquest efecte anorèctic pot ser de menor potència, que els efectes orèctics induïts per les dietes d'elevada palatabilitat. El control de la ingesta implica l'activació de diversos mecanismes, dependents i independents de leptina, que actuen en diversos centres neurològics, com els centres de recompensa o els de percepció de la sacietat [260, 261]. Resultats per determinar la participació de la dopamina i dels centres de recompensa, com el nucli accumbens, en l'acció anorèctica del tungstat, no han estat concloents. Amb el que les dades actuals, no determinen quins mecanismes estan involucrats en la resposta anorèctica del tungstat, i únicament, podem concretar que aquests efectes, estan mitjançats per la leptina i són revertits per dietes d'elevada palatabilitat. Això suposa que, per a donar una resposta més concloent sobre la regulació de la ingesta per part del tungstat, calguin estudis més específics i centrats en els diversos centres reguladors de la ingesta del sistema nerviós central.

La leptina, per a modular el balanç energètic, origina la seva acció en unir-se al receptor de leptina en les subpoblacions neuronals del nucli arcuat de l'hipotàlem, concretament en neurones que coexpressen NPY/AGRP i

POMC/CART, i que mitjançant projeccions, activen altres poblacions neuronals implicades en la regulació de la ingesta, i en l'activació del sistema nerviós simpàtic, per a regular l'activitat de UCP1 a TAM. L'increment dels nivells d'expressió de *Cart*, i la reducció en *Npy* i *Agrp* en hipotàlem de ratolins *lean* tractats amb tungstat, conjuntament amb l'absència de canvis en els ratolins *ob/ob*, tractats, indiquen que el tungstat potencia a la leptina en el lloc d'origen de la senyalització de l'hormona. Així doncs, el tungstat actua a nivell central per controlar la ingesta i la despesa energètica, i en conseqüència, el pes corporal. Un fet destacable, és la absència de canvis en els nivells d'expressió de *Pomc* en ratolins *lean* tractats amb tungstat, no obstant, en cèl·lules i en ratolins amb haploinsuficiència per SOCS3 [421, 567], i en ratolins deficients per SHP2 [563] o SH2-B [560], tampoc s'observen canvis en els nivells d'expressió d'aquest neuropèptid, suggerint que el control del balanç energètic mitjançant per la leptina, i en conseqüència el tungstat, es duu a terme mitjançant senyals neuronals alternatives a *Pomc*.

L'elevada pliotropia del receptor de leptina, suggereix que el tungstat també ha de tenir accions directes en teixits perifèrics. Aquestes accions perifèriques no es poden descartar amb les dades actuals. Tampoc, es pot descartar que part d'aquestes accions perifèriques del tungstat estiguin relacionades en el control la despesa energètica. No obstant, les observacions de Scarpace [443] i Commins [444-446], descarten qualsevol efecte de la leptina sobre la expressió de UCP1 a nivell perifèric, i en conseqüència, tampoc del tungstat. Amb la finalitat de determinar possibles efectes perifèrics del tungstat que afectin a la despesa energètica, s'estan realitzant determinacions dels nivells de respiració mitocondrial en teixits de diversos models experimentals, mitjançant la tècnica de respirometria d'alta resolució.

Finalment, dels estudis realitzats en aquesta tesi es desprèn, que el tungstat redueix el guany ponderal i l'adipositat en models experimentals de rata i ratolí, mitjançant la potenciació dels efectes centrals de la leptina, inhibint la ingesta i incrementant la despesa energètica mitjançada per l'activació de la termogènesi depenent de UCP1 al TAM. Aquest efecte potenciador del tungstat, podria transcórrer a través de la regulació del processos de fosforilació dels elements de la cascada de senyalització de la leptina, mitjançant la inhibició de fosfatases involucrades en aquests processos.



**Figura 27.** Esquema il·lustratiu del mecanisme d'acció del tungstat en la regulació del pes corporal.



## VII. CONCLUSIONS



- El tractament oral amb tungstat sòdic no és efectiu en la reducció del guany ponderal en models funcionals deficientes en leptina.
- El tractament oral amb tungstat sòdic indueix, en models animals sense deficiències en leptina, un balanç energètic negatiu responsable de la reducció de guany ponderal. El canvi en el balanç energètic es causat per un increment en la despesa energètica i, en animals alimentats amb dietes de baixa palatabilitat, per una reducció en la ingesta
- El tractament oral amb tungstat sòdic modifica l'expressió gènica de *Ucp1*, de *Pgc1 $\alpha$*  i de les subunitats I i IV de la citocrom oxidasa, a teixit adipós marró. Aquestes modificacions indiquen una adaptació del teixit adipós marró per a induir canvis en la despesa energètica.
- El tractament oral amb tungstat sòdic modifica, en l'hipotàlem, l'expressió gènica de *Npy*, *Agrp* i *Cart*, gens modulats per la leptina en la regulació de l'homeòstasi energètica. Aquestes observacions suggereixen que els canvis descrits en la despesa energètica i en la ingesta estan mitjançats, en part, per una acció central del tungstat sòdic.
- Els resultats exposats suggereixen que el tungstat actua com a potenciador de la leptina en la reducció del guany ponderal.



## VIII. BIBLIOGRAFIA



1. *Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies.* Lancet, 2004. **363**(9403): p. 157-63.
2. Claret, M., et al., *Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation.* Endocrinology, 2005. **146**(10): p. 4362-9.
3. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
4. Barsh, G.S., I.S. Farooqi, and S. O'Rahilly, *Genetics of body-weight regulation.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 644-51.
5. Allison, D.B., M.S. Faith, and J.S. Nathan, *Risch's lambda values for human obesity.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20**(11): p. 990-9.
6. Stunkard, A.J., et al., *The body-mass index of twins who have been reared apart.* N Engl J Med, 1990. **322**(21): p. 1483-7.
7. Stunkard, A.J., et al., *An adoption study of human obesity.* N Engl J Med, 1986. **314**(4): p. 193-8.
8. Froguel, P. and P. Boutin, *Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans.* Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(11): p. 991-6.
9. Bouchard, C., et al., *The response to long-term overfeeding in identical twins.* N Engl J Med, 1990. **322**(21): p. 1477-82.
10. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.* Nat Med, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
11. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-8.
12. Strobel, A., et al., *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity.* Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 213-5.
13. Tartaglia, L.A., *The leptin receptor.* J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6093-6.
14. Clement, K., et al., *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.* Nature, 1998. **392**(6674): p. 398-401.
15. Krude, H., et al., *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans.* Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 155-7.
16. Jackson, R.S., et al., *Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene.* Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 303-6.
17. Hinney, A., et al., *Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(4): p. 1483-6.
18. Vaisse, C., et al., *A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity.* Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 113-4.
19. Yeo, G.S., et al., *A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity.* Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 111-2.
20. Farooqi, I.S., et al., *Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.* N Engl J Med, 1999. **341**(12): p. 879-84.
21. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* Am J Hum Genet, 1962. **14**: p. 353-62.
22. Hill, J.O. and J.C. Peters, *Environmental contributions to the obesity epidemic.* Science, 1998. **280**(5368): p. 1371-4.
23. Cummings, D.E. and M.W. Schwartz, *Genetics and pathophysiology of human obesity.* Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 453-71.
24. Formiguera, X. and A. Canton, *Obesity: epidemiology and clinical aspects.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(6): p. 1125-46.
25. Deurenberg, P. and M. Deurenberg-Yap, *Validity of body composition methods across ethnic population groups.* Acta Diabetol, 2003. **40 Suppl 1**: p. S246-9.
26. Weisell, R.C., *Body mass index as an indicator of obesity.* Asia Pac J Clin Nutr, 2002. **11 Suppl 8**: p. S681-4.
27. Kobayashi, J., et al., *A novel method of measuring intra-abdominal fat volume using helical computed tomography.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(3): p. 398-402.

## Bibliografia

28. Liu, K.H., et al., *The preferred magnetic resonance imaging planes in quantifying visceral adipose tissue and evaluating cardiovascular risk*. Diabetes Obes Metab, 2005. **7**(5): p. 547-54.
29. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
30. Gallagher, D., et al., *Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(3): p. 694-701.
31. Must, A., et al., *The disease burden associated with overweight and obesity*. Jama, 1999. **282**(16): p. 1523-9.
32. Pi-Sunyer, F.X., *The epidemiology of central fat distribution in relation to disease*. Nutr Rev, 2004. **62**(7 Pt 2): p. S120-6.
33. Serrano Rios, M., *Relationship between obesity and the increased risk of major complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Eur J Clin Invest, 1998. **28 Suppl 2**: p. 14-7, discussion 17-8.
34. Jones, L.M., M. Legge, and A. Goulding, *Healthy body mass index values often underestimate body fat in men with spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil, 2003. **84**(7): p. 1068-71.
35. Schneider, M., et al., *Correlates of low bone density in females with anorexia nervosa*. Int J Adolesc Med Health, 2002. **14**(4): p. 297-306.
36. Morgan, J.F., *From Charles Atlas to Adonis complex--fat is more than a feminist issue*. Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1372-3.
37. Guerrero-Romero, F. and M. Rodriguez-Moran, *Abdominal volume index. An anthropometry-based index for estimation of obesity is strongly related to impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2003. **34**(5): p. 428-32.
38. Han, T.S., et al., *Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample*. Bmj, 1995. **311**(7017): p. 1401-5.
39. Iwao, S., et al., *Does waist circumference add to the predictive power of the body mass index for coronary risk?* Obes Res, 2001. **9**(11): p. 685-95.
40. Janssen, I., et al., *Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(4): p. 683-8.
41. Hartz, A.J., D.C. Rupley, and A.A. Rimm, *The association of girth measurements with disease in 32,856 women*. Am J Epidemiol, 1984. **119**(1): p. 71-80.
42. Jaffrin, M.Y., R. Kieffer, and M.V. Moreno, *Evaluation of a foot-to-foot impedance meter measuring extracellular fluid volume in addition to fat-free mass and fat tissue mass*. Nutrition, 2005. **21**(7-8): p. 815-24.
43. Ginde, S.R., et al., *Air displacement plethysmography: validation in overweight and obese subjects*. Obes Res, 2005. **13**(7): p. 1232-7.
44. Ribeiro-Filho, F.F., et al., *Methods of estimation of visceral fat: advantages of ultrasonography*. Obes Res, 2003. **11**(12): p. 1488-94.
45. Popkin, B.M. and C.M. Doak, *The obesity epidemic is a worldwide phenomenon*. Nutr Rev, 1998. **56**(4 Pt 1): p. 106-14.
46. Mokdad, A.H., et al., *Actual causes of death in the United States, 2000*. Jama, 2004. **291**(10): p. 1238-45.
47. *Getting a handle on obesity*. Lancet, 2002. **359**(9322): p. 1955.
48. Ogden, C.L., et al., *Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000*. Jama, 2002. **288**(14): p. 1728-32.
49. Flegal, K.M., et al., *Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000*. Jama, 2002. **288**(14): p. 1723-7.
50. Ogden, C.L., et al., *Mean body weight, height, and body mass index, United States 1960-2002*. Adv Data, 2004(347): p. 1-17.
51. Kuczmarski, R.J., et al., *Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991*. Jama, 1994. **272**(3): p. 205-11.
52. Martinez, J.A., B. Moreno, and M.A. Martinez-Gonzalez, *Prevalence of obesity in Spain*. Obes Rev, 2004. **5**(3): p. 171-2.



53. Varo, J.J., M.A. Martinez-Gonzalez, and J.A. Martinez, [*Obesity prevalence in Europe*]. An Sist Sanit Navar, 2002. **25 Suppl 1**: p. 103-8.
54. Rennie, K.L. and S.A. Jebb, *Prevalence of obesity in Great Britain*. Obes Rev, 2005. **6**(1): p. 11-2.
55. James, P.T., *Obesity: the worldwide epidemic*. Clin Dermatol, 2004. **22**(4): p. 276-80.
56. Popkin, B.M. and P. Gordon-Larsen, *The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 3**: p. S2-9.
57. Silventoinen, K., et al., *Trends in obesity and energy supply in the WHO MONICA Project*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(5): p. 710-8.
58. Aranceta, J., et al., [*Prevalence of obesity in Spain: results of the SEEDO 2000 study*]. Med Clin (Barc), 2003. **120**(16): p. 608-12.
59. Kahn, B.B. and J.S. Flier, *Obesity and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 473-81.
60. Bachmann, O.P., et al., *Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2579-84.
61. Goldstein, B.J., et al., *Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 91-9.
62. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 248-57.
63. Thamer, C., et al., *Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1785-91.
64. Thamer, C., et al., *Relationship between serum adiponectin concentration and intramyocellular lipid stores in humans*. Horm Metab Res, 2002. **34**(11-12): p. 646-9.
65. Ascaso, J.F., et al., *Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population*. Eur J Intern Med, 2003. **14**(2): p. 101-106.
66. Hotamisligil, G.S., *The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance*. J Intern Med, 1999. **245**(6): p. 621-5.
67. Griffin, M.E., et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1270-4.
68. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 941-6.
69. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
70. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
71. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
72. Bonow, R.O., *Primary prevention of cardiovascular disease: a call to action*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3140-1.
73. Garrison, R.J., M.W. Higgins, and W.B. Kannel, *Obesity and coronary heart disease*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(4): p. 199-202.
74. Hauner, H., *Managing type 2 diabetes mellitus in patients with obesity*. Treat Endocrinol, 2004. **3**(4): p. 223-32.
75. Mokdad, A.H., et al., *Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001*. Jama, 2003. **289**(1): p. 76-9.
76. Denke, M.A., C.T. Sempos, and S.M. Grundy, *Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men*. Arch Intern Med, 1993. **153**(9): p. 1093-103.
77. Dowling, H.J. and F.X. Pi-Sunyer, *Race-dependent health risks of upper body obesity*. Diabetes, 1993. **42**(4): p. 537-43.

## Bibliografia

78. Miyashita, Y., et al., *Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002. **56**(3): p. 181-7.
79. Williams, P.T. and R.M. Krauss, *Associations of age, adiposity, menopause, and alcohol intake with low-density lipoprotein subclasses*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(6): p. 1082-90.
80. Baik, I., et al., *Adiposity and mortality in men*. *Am J Epidemiol*, 2000. **152**(3): p. 264-71.
81. Huang, Z., et al., *Body weight, weight change, and risk for hypertension in women*. *Ann Intern Med*, 1998. **128**(2): p. 81-8.
82. Carlson, S.H., et al., *Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats*. *Hypertension*, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 403-8.
83. Feskens, E.J., et al., *Hypertension and overweight associated with hyperinsulinaemia and glucose tolerance: a longitudinal study of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study*. *Diabetologia*, 1995. **38**(7): p. 839-47.
84. Engeli, S. and A.M. Sharma, *The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension*. *J Mol Med*, 2001. **79**(1): p. 21-9.
85. Paeratakul, S., et al., *The relation of gender, race and socioeconomic status to obesity and obesity comorbidities in a sample of US adults*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002. **26**(9): p. 1205-10.
86. Shinton, R., G. Sagar, and G. Beevers, *Body fat and stroke: unmasking the hazards of overweight and obesity*. *J Epidemiol Community Health*, 1995. **49**(3): p. 259-64.
87. Eckel, R.H., *Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association*. *Circulation*, 1997. **96**(9): p. 3248-50.
88. Seres, L., et al., *[Cardiopulmonary function and exercise capacity in patients with morbid obesity]*. *Rev Esp Cardiol*, 2003. **56**(6): p. 594-600.
89. Kambham, N., et al., *Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic*. *Kidney Int*, 2001. **59**(4): p. 1498-509.
90. Pinto-Sietsma, S.J., et al., *Urinary albumin excretion is associated with renal functional abnormalities in a nondiabetic population*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(10): p. 1882-8.
91. Maddox, D.A., et al., *Prevention of obesity-linked renal disease: age-dependent effects of dietary food restriction*. *Kidney Int*, 2002. **62**(1): p. 208-19.
92. Matsuura, F., et al., *Effect of visceral fat accumulation on uric acid metabolism in male obese subjects: visceral fat obesity is linked more closely to overproduction of uric acid than subcutaneous fat obesity*. *Metabolism*, 1998. **47**(8): p. 929-33.
93. Ogura, T., et al., *Recent trends of hyperuricemia and obesity in Japanese male adolescents, 1991 through 2002*. *Metabolism*, 2004. **53**(4): p. 448-53.
94. Tsunoda, S., et al., *Decreases in serum uric acid by amelioration of insulin resistance in overweight hypertensive patients: effect of a low-energy diet and an insulin-sensitizing agent*. *Am J Hypertens*, 2002. **15**(8): p. 697-701.
95. Calle, E.E. and R. Kaaks, *Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(8): p. 579-91.
96. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
97. Giovannucci, E., *Insulin and colon cancer*. *Cancer Causes Control*, 1995. **6**(2): p. 164-79.
98. Kaaks, R., *Nutrition, hormones, and breast cancer: is insulin the missing link?* *Cancer Causes Control*, 1996. **7**(6): p. 605-25.
99. Weiderpass, E., et al., *Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer*. *Scand J Work Environ Health*, 1998. **24**(3): p. 165-74.
100. Kaaks, R., A. Lukanova, and M.S. Kurzer, *Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(12): p. 1531-43.
101. Pan, S.Y., et al., *Association of obesity and cancer risk in Canada*. *Am J Epidemiol*, 2004. **159**(3): p. 259-68.
102. Moore, L.L., et al., *BMI and waist circumference as predictors of lifetime colon cancer risk in Framingham Study adults*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28**(4): p. 559-67.

103. Friedrich, M.J., *Researchers explore obesity-cancer link*. *Jama*, 2003. **290**(21): p. 2790-1.
104. Khandwala, H.M., et al., *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(3): p. 215-44.
105. Grohmann, M., et al., *Isolation and validation of human prepubertal skeletal muscle cells: maturation and metabolic effects of IGF-I, IGFBP-3 and TNFalpha*. *J Physiol*, 2005. **568**(Pt 1): p. 229-42.
106. Augustin, L.S., et al., *Association between components of the insulin-like growth factor system and endometrial cancer risk*. *Oncology*, 2004. **67**(1): p. 54-9.
107. Morimoto, L.M., et al., *Insulin-like growth factor polymorphisms and colorectal cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(5): p. 1204-11.
108. Forga, L., E. Petrina, and J.J. Barberia, [*Complications of obesity*]. *An Sist Sanit Navar*, 2002. **25 Suppl 1**: p. 117-26.
109. Resta, O., et al., *Sleep-related breathing disorders, loud snoring and excessive daytime sleepiness in obese subjects*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(5): p. 669-75.
110. Valencia-Flores, M., et al., *Prevalence of sleep apnea and electrocardiographic disturbances in morbidly obese patients*. *Obes Res*, 2000. **8**(3): p. 262-9.
111. Koenig, S.M., *Pulmonary complications of obesity*. *Am J Med Sci*, 2001. **321**(4): p. 249-79.
112. Anderson, J.J. and D.T. Felson, *Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work*. *Am J Epidemiol*, 1988. **128**(1): p. 179-89.
113. Aspden, R.M., B.A. Scheven, and J.D. Hutchison, *Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism*. *Lancet*, 2001. **357**(9262): p. 1118-20.
114. Larsson, U.E. and E. Mattsson, *Perceived disability and observed functional limitations in obese women*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2001. **25**(11): p. 1705-12.
115. Carpenter, K.M., et al., *Relationships between obesity and DSM-IV major depressive disorder, suicide ideation, and suicide attempts: results from a general population study*. *Am J Public Health*, 2000. **90**(2): p. 251-7.
116. Puhl, R. and K.D. Brownell, *Bias, discrimination, and obesity*. *Obes Res*, 2001. **9**(12): p. 788-805.
117. Staffieri, J.R., *A study of social stereotype of body image in children*. *J Pers Soc Psychol*, 1967. **7**(1): p. 101-4.
118. Friedman, M.A. and K.D. Brownell, *Psychological correlates of obesity: moving to the next research generation*. *Psychol Bull*, 1995. **117**(1): p. 3-20.
119. Istvan, J., K. Zavela, and G. Weidner, *Body weight and psychological distress in NHANES I*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1992. **16**(12): p. 999-1003.
120. Fabricatore, A.N. and T.A. Wadden, *Psychological aspects of obesity*. *Clin Dermatol*, 2004. **22**(4): p. 332-7.
121. Mussell, M.P., et al., *Clinical characteristics associated with binge eating in obese females: a descriptive study*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996. **20**(4): p. 324-31.
122. Specker, S., et al., *Psychopathology in subgroups of obese women with and without binge eating disorder*. *Compr Psychiatry*, 1994. **35**(3): p. 185-90.
123. Telch, C.F. and W.S. Agras, *Obesity, binge eating and psychopathology: are they related?* *Int J Eat Disord*, 1994. **15**(1): p. 53-61.
124. Yanovski, S.Z., et al., *Association of binge eating disorder and psychiatric comorbidity in obese subjects*. *Am J Psychiatry*, 1993. **150**(10): p. 1472-9.
125. Goodman, E. and R.C. Whitaker, *A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity*. *Pediatrics*, 2002. **110**(3): p. 497-504.
126. Richardson, L.P., et al., *A longitudinal evaluation of adolescent depression and adult obesity*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2003. **157**(8): p. 739-45.
127. Roberts, R.E., et al., *Prospective association between obesity and depression: evidence from the Alameda County Study*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. **27**(4): p. 514-21.

## Bibliografia

128. Goldstein, D.J., *Beneficial health effects of modest weight loss*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1992. **16**(6): p. 397-415.
129. Rössener, S., *Treatment: diet*, in *International textbook on obesity*, P. Bjorntorp, Editor. 2001, John Wiley and sons, Ltd: West Sussex, UK. p. 442-449.
130. Melzer, K., et al., *Effects of physical activity on food intake*. Clin Nutr, 2005.
131. Hauptman, J.B., F.S. Jeunet, and D. Hartmann, *Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin)*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(1 Suppl): p. 309S-313S.
132. Schwizer, W., et al., *Role of lipase in the regulation of upper gastrointestinal function in humans*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. G612-20.
133. Hildebrand, P., et al., *Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 123-9.
134. Sjostrom, L., et al., *Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients*. European Multicentre Orlistat Study Group. Lancet, 1998. **352**(9123): p. 167-72.
135. Halford, J.C., G.D. Cooper, and T.M. Dovey, *The pharmacology of human appetite expression*. Curr Drug Targets, 2004. **5**(3): p. 221-40.
136. Heal, D.J., et al., *Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1998. **22 Suppl 1**: p. S18-28; discussion S29.
137. Jackson, H.C., et al., *Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor, sibutramine, in the rat*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(8): p. 1613-8.
138. James, W.P., et al., *Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial*. STORM Study Group. Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance. Lancet, 2000. **356**(9248): p. 2119-25.
139. Arnone, M., et al., *Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **132**(1): p. 104-6.
140. Colombo, G., et al., *Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716*. Life Sci, 1998. **63**(8): p. PL113-7.
141. Freedland, C.S., J.S. Poston, and L.J. Porrino, *Effects of SR141716A, a central cannabinoid receptor antagonist, on food-maintained responding*. Pharmacol Biochem Behav, 2000. **67**(2): p. 265-70.
142. Iversen, L., *Cannabis and the brain*. Brain, 2003. **126**(Pt 6): p. 1252-70.
143. Sjöström, L., J.P. Després, and A. Golay, *Weight loss in overweight/obese dyslipidemia subjects treated with rimonabant: The RIO-LIPIDS trial*. Int J Obes (Lond), 2004. **28**(s1): p. s28.
144. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
145. Coleman, D.L., *Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice*. Diabetologia, 1973. **9**(4): p. 294-8.
146. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
147. Naggert, J.K., et al., *Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity*. Nat Genet, 1995. **10**(2): p. 135-42.
148. Santagata, S., et al., *G-protein signaling through tubby proteins*. Science, 2001. **292**(5524): p. 2041-50.
149. York, D.A. and B. Hannse, *Animal models of obesity*, in *Handbook of obesity*, G.A. Bray, C. Bouchard, and P.T. James, Editors. 1998, Marcel Dekker, Inc: New York. p. 191-221.
150. Phillips, M.S., et al., *Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 18-9.

151. Ernsberger, P., R.J. Koletsky, and J.E. Friedman, *Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 272-88.
152. Takaya, K., et al., *Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 130-1.
153. Leiter, E.H., I. Strack, and A.B. Eisenstein, *A new mutation (db3J) at the diabetes locus in strain 129/J mice. II. Studies of pancreatic alpha cell function in culture*. Diabetologia, 1980. **19**(1): p. 66-73.
154. Enerback, S., et al., *Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 90-4.
155. Arsenijevic, D., et al., *Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 435-9.
156. Gong, D.W., et al., *Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16251-7.
157. Revelli, J.P., et al., *Targeted gene disruption reveals a leptin-independent role for the mouse beta3-adrenoceptor in the regulation of body composition*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1098-106.
158. Rohrer, D.K., et al., *Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16701-8.
159. Susulic, V.S., et al., *Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29483-92.
160. Bachman, E.S., et al., *betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance*. Science, 2002. **297**(5582): p. 843-5.
161. Inui, A., et al., *Anxiety-like behavior in transgenic mice with brain expression of neuropeptide Y*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(3): p. 171-82.
162. Sclafani, A. and D. Springer, *Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes*. Physiol Behav, 1976. **17**(3): p. 461-71.
163. Rothwell, N.J. and M.J. Stock, *A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis*. Nature, 1979. **281**(5726): p. 31-5.
164. Rolls, B.J., E.A. Rowe, and R.C. Turner, *Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet*. J Physiol, 1980. **298**: p. 415-27.
165. Rothwell, N.J. and M.J. Stock, *Energy expenditure of 'cafeteria'-fed rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry*. J Physiol, 1982. **328**: p. 371-7.
166. De Schepper, J., et al., *Study of serum leptin in cafeteria-diet-overfed rats. Influence of diet, insulin and corticosterone*. Horm Res, 1998. **50**(5): p. 271-5.
167. De Schepper, J.A., et al., *Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations*. Growth Horm IGF Res, 1998. **8**(5): p. 397-401.
168. Coatmellec-Taglioni, G., et al., *Hypertension in cafeteria-fed rats: alterations in renal alpha2-adrenoceptor subtypes*. Am J Hypertens, 2000. **13**(5 Pt 1): p. 529-34.
169. Falcou, R., et al., *Increase of uncoupling protein and its mRNA in brown adipose tissue of rats fed on 'cafeteria diet'*. Biochem J, 1985. **231**(1): p. 241-4.
170. Margareto, J., A. Marti, and J.A. Martinez, *Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma*. J Nutr Biochem, 2001. **12**(3): p. 130-137.
171. Roca, P., et al., *Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males*. Pflugers Arch, 1999. **438**(5): p. 628-34.
172. Llado, I., et al., *Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(11): p. 1396-404.
173. Redonnet, A., et al., *Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat*. Metabolism, 2001. **50**(10): p. 1161-7.

## Bibliografia

174. Rogers, P.J. and J.E. Blundell, *Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet*. Neurosci Biobehav Rev, 1984. **8**(4): p. 441-53.
175. Prats, E., et al., *Energy intake of rats fed a cafeteria diet*. Physiol Behav, 1989. **45**(2): p. 263-72.
176. Ball, K. and D. Crawford, *Socioeconomic status and weight change in adults: a review*. Soc Sci Med, 2005. **60**(9): p. 1987-2010.
177. Weigle, D.S., *Appetite and the regulation of body composition*. Faseb J, 1994. **8**(3): p. 302-10.
178. Bray, G.A. and C.M. Champagne, *Beyond energy balance: there is more to obesity than kilocalories*. J Am Diet Assoc, 2005. **105**(5 Suppl 1): p. S17-23.
179. Kennedy, G.C., *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1953. **140**(901): p. 578-96.
180. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
181. Baura, G.D., et al., *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1824-30.
182. Woods, S.C., et al., *Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons*. Nature, 1979. **282**(5738): p. 503-5.
183. Bagdade, J.D., E.L. Bierman, and D. Porte, Jr., *The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects*. J Clin Invest, 1967. **46**(10): p. 1549-57.
184. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
185. Schwartz, M.W., et al., *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 589-93.
186. Baskin, D.G., J.F. Breininger, and M.W. Schwartz, *Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 828-33.
187. Baskin, D.G., et al., *Insulin and insulin-like growth factors in the CNS*. Trends Neurosci, 1988. **11**(3): p. 107-11.
188. Cheung, C.C., D.K. Clifton, and R.A. Steiner, *Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4489-92.
189. Campfield, L.A., et al., *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. Science, 1995. **269**(5223): p. 546-9.
190. Weigle, D.S., et al., *Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 2065-70.
191. Sipols, A.J., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression*. Diabetes, 1995. **44**(2): p. 147-51.
192. Garofalo, R.S., *Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(4): p. 156-62.
193. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
194. Doyon, C., et al., *Molecular evolution of leptin*. Gen Comp Endocrinol, 2001. **124**(2): p. 188-98.
195. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature, 2006. **443**(7109): p. 289-95.
196. Hetherington, A.W. and S.W. Ranson, *Hypothalamic lesions and adiposity in the rat*. Anatomical Records, 1940. **78**: p. 149-172.
197. Anand, B.K. and J.R. Brobeck, *Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat*. Proc Soc Exp Biol Med, 1951. **77**(2): p. 323-4.
198. Arora, S. and Anubhuti, *Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review*. Neuropeptides, 2006.

199. Funahashi, H., et al., *Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus*. Regul Pept, 2000. **92**(1-3): p. 31-5.
200. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
201. Schwartz, M.W., et al., *Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance*. Endocr Rev, 1992. **13**(3): p. 387-414.
202. Schwartz, M.W., et al., *Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin*. Endocrinology, 1992. **130**(6): p. 3608-16.
203. Neary, N.M., A.P. Goldstone, and S.R. Bloom, *Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(2): p. 153-60.
204. Satoh, N., et al., *Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 947-54.
205. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 741-6.
206. Bernardis, L.L. and L.L. Bellinger, *The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior*. Neurosci Biobehav Rev, 1996. **20**(2): p. 189-287.
207. Ricardo, J.A. and E.T. Koh, *Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat*. Brain Res, 1978. **153**(1): p. 1-26.
208. Ter Horst, G.J., et al., *Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat*. Neuroscience, 1989. **31**(3): p. 785-97.
209. van der Kooy, D., et al., *The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat*. J Comp Neurol, 1984. **224**(1): p. 1-24.
210. Dumont, Y., A. Fournier, and R. Quirion, *Expression and characterization of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype in the rat brain*. J Neurosci, 1998. **18**(15): p. 5565-74.
211. Glass, M.J., J. Chan, and V.M. Pickel, *Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons*. J Neurosci Res, 2002. **67**(6): p. 753-65.
212. Harfstrand, A., et al., *Receptor autoradiographical evidence for high densities of 125I-neuropeptide Y binding sites in the nucleus tractus solitarius of the normal male rat*. Acta Physiol Scand, 1986. **128**(2): p. 195-200.
213. Yoshihara, T., S. Honma, and K. Honma, *Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. E589-95.
214. Sawchenko, P.E., et al., *Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1985. **241**(2): p. 138-53.
215. Kawai, Y., et al., *The distribution and projection of gamma-melanocyte stimulating hormone in the rat brain: an immunohistochemical analysis*. Brain Res, 1984. **297**(1): p. 21-32.
216. Grill, H.J. and G.P. Smith, *Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats*. Am J Physiol, 1988. **254**(6 Pt 2): p. R853-6.
217. Williams, G., et al., *The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes*. Physiol Behav, 2001. **74**(4-5): p. 683-701.
218. Ramos, E.J., et al., *Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation*. Nutrition, 2005. **21**(2): p. 269-79.
219. Schwartz, G.J., *Biology of eating behavior in obesity*. Obes Res, 2004. **12 Suppl 2**: p. 102S-6S.
220. Wynne, K., et al., *Appetite control*. J Endocrinol, 2005. **184**(2): p. 291-318.
221. Adrian, T.E., et al., *Neuropeptide Y distribution in human brain*. Nature, 1983. **306**(5943): p. 584-6.

## Bibliografia

222. Edwards, C.M., et al., *The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin*. J Endocrinol, 1999. **160**(3): p. R7-12.
223. Kalra, S.P. and P.S. Kalra, *NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy*. Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 201-11.
224. Clark, J.T., et al., *Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats*. Endocrinology, 1984. **115**(1): p. 427-9.
225. Stanley, B.G., et al., *Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity*. Peptides, 1986. **7**(6): p. 1189-92.
226. Pedrazzini, T., *Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts*. Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 267-75.
227. Wilding, J.P., et al., *Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse*. Endocrinology, 1993. **132**(5): p. 1939-44.
228. Williams, G., et al., *Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of streptozocin-induced diabetic rats*. Diabetes, 1989. **38**(3): p. 321-7.
229. Gehlert, D.R., *Introduction to the reviews on neuropeptide Y*. Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 135-40.
230. Williams, G., J.A. Harrold, and D.J. Cutler, *The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(3): p. 385-96.
231. Broberger, C., et al., *Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems*. J Comp Neurol, 1998. **402**(4): p. 460-74.
232. Broberger, C., et al., *The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15043-8.
233. Goldstone, A.P., et al., *Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 927-37.
234. Hahn, T.M., et al., *Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons*. Nat Neurosci, 1998. **1**(4): p. 271-2.
235. Haskell-Luevano, C., et al., *Compounds that activate the mouse melanocortin-1 receptor identified by screening a small molecule library based upon the beta-turn*. J Med Chem, 1999. **42**(21): p. 4380-7.
236. Hoggard, N., et al., *Peripherally administered [Nle4,D-Phe7]-alpha-melanocyte stimulating hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti-related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and ob/ob mice*. J Mol Endocrinol, 2004. **33**(3): p. 693-703.
237. Yang, Y.K., et al., *Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(1): p. 148-55.
238. Rossi, M., et al., *A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4428-31.
239. Bertagna, X., *Proopiomelanocortin-derived peptides*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1994. **23**(3): p. 467-85.
240. Castro, M.G. and E. Morrison, *Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain*. Crit Rev Neurobiol, 1997. **11**(1): p. 35-57.
241. Smith, E.M. and J.E. Blalock, *Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7530-4.



242. Bloomquist, B.T., B.A. Eipper, and R.E. Mains, *Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA*. Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 2014-24.
243. Zhou, A., B.T. Bloomquist, and R.E. Mains, *The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1763-9.
244. Pritchard, L.E., A.V. Turnbull, and A. White, *Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity*. J Endocrinol, 2002. **172**(3): p. 411-21.
245. Brown, K.S., R.M. Gentry, and N.E. Rowland, *Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos*. Regul Pept, 1998. **78**(1-3): p. 89-94.
246. Cowley, M.A., et al., *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 480-4.
247. Murphy, K.G., *Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2005. **4**(2): p. 95-111.
248. Douglass, J., A.A. McKinzie, and P. Couceyro, *PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine*. J Neurosci, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2471-81.
249. Elmquist, J.K., C.F. Elias, and C.B. Saper, *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight*. Neuron, 1999. **22**(2): p. 221-32.
250. Koylu, E.O., et al., *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain*. J Comp Neurol, 1998. **391**(1): p. 115-32.
251. Kristensen, P., et al., *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 72-6.
252. Wolden-Hanson, T., B.T. Marck, and A.M. Matsumoto, *Blunted hypothalamic neuropeptide gene expression in response to fasting, but preservation of feeding responses to AgRP in aging male Brown Norway rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(1): p. R138-46.
253. Larsen, P.J., et al., *Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats*. Obes Res, 2000. **8**(8): p. 590-6.
254. Niimi, M., *[The role of anorectic and orexigenic peptides(CART, NPY etc)]*. Nippon Rinsho, 2001. **59**(3): p. 443-8.
255. Elias, C.F., et al., *Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord*. Neuron, 1998. **21**(6): p. 1375-85.
256. Strubbe, J.H. and S.C. Woods, *The timing of meals*. Psychol Rev, 2004. **111**(1): p. 128-41.
257. Gibbs, J., R.C. Young, and G.P. Smith, *Cholecystokinin decreases food intake in rats*. 1973. Obes Res, 1997. **5**(3): p. 284-90.
258. Kelley, A.E. and K.C. Berridge, *The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs*. J Neurosci, 2002. **22**(9): p. 3306-11.
259. Kelley, A.E., et al., *Cortico-striatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward*. Physiol Behav, 2005. **86**(5): p. 773-95.
260. Hommel, J.D., et al., *Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding*. Neuron, 2006. **51**(6): p. 801-10.
261. Fulton, S., et al., *Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway*. Neuron, 2006. **51**(6): p. 811-22.
262. Lowell, B.B. and E.S. Bachman, *Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29385-8.
263. Dulloo, A.G. and S. Samec, *Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered*. Br J Nutr, 2001. **86**(2): p. 123-39.
264. Dulloo, A.G., J. Seydoux, and J. Jacquet, *Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance*. Physiol Behav, 2004. **83**(4): p. 587-602.

## Bibliografia

265. Levine, J.A., N.L. Eberhardt, and M.D. Jensen, *Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans*. Science, 1999. **283**(5399): p. 212-4.
266. Levine, J.A., et al., *Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity*. Science, 2005. **307**(5709): p. 584-6.
267. Ravussin, E., *Physiology. A NEAT way to control weight?* Science, 2005. **307**(5709): p. 530-1.
268. Brand, M.D., *The contribution of the leak of protons across the mitochondrial inner membrane to standard metabolic rate*. J Theor Biol, 1990. **145**(2): p. 267-86.
269. Jansky, L., *Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance*. Physiol Rev, 1995. **75**(2): p. 237-59.
270. Jezek, P., *Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(5): p. 457-66.
271. Depocas, F., J.S. Hart, and O. Heroux, *Cold acclimation and the electromyogram of unanesthetized rats*. J Appl Physiol, 1956. **9**(3): p. 404-8.
272. Davis, T.R., et al., *Regulation of shivering and non-shivering heat production during acclimation of rats*. Am J Physiol, 1960. **198**: p. 471-5.
273. Foster, D.O. and M.L. Frydman, *Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis*. Can J Physiol Pharmacol, 1979. **57**(3): p. 257-70.
274. Ghorbani, M. and J. Himms-Hagen, *Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(6): p. 465-75.
275. Golozoubova, V., et al., *Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold*. Faseb J, 2001. **15**(11): p. 2048-50.
276. Granneman, J.G., et al., *White adipose tissue contributes to UCP1-independent thermogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(6): p. E1230-6.
277. Dauncey, M.J., *Influence of mild cold on 24 h energy expenditure, resting metabolism and diet-induced thermogenesis*. Br J Nutr, 1981. **45**(2): p. 257-67.
278. Leibel, R.L., M. Rosenbaum, and J. Hirsch, *Changes in energy expenditure resulting from altered body weight*. N Engl J Med, 1995. **332**(10): p. 621-8.
279. Shibata, H. and L.J. Bukowiecki, *Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats*. J Appl Physiol, 1987. **63**(2): p. 465-70.
280. Sims, E.A. and E. Danforth, Jr., *Expenditure and storage of energy in man*. J Clin Invest, 1987. **79**(4): p. 1019-25.
281. Lowell, B.B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 740-2.
282. Smith, R.E., *Thermoregulatory And Adaptive Behavior Of Brown Adipose Tissue*. Science, 1964. **146**: p. 1686-9.
283. Aquila, H., T.A. Link, and M. Klingenberg, *The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane*. Embo J, 1985. **4**(9): p. 2369-76.
284. Heaton, G.M., et al., *Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation*. Eur J Biochem, 1978. **82**(2): p. 515-21.
285. Krauss, S., C.Y. Zhang, and B.B. Lowell, *The mitochondrial uncoupling-protein homologues*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 248-61.
286. Nicholls, D.G. and E. Rial, *A history of the first uncoupling protein, UCP1*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(5): p. 399-406.
287. Garlid, K.D., et al., *How do uncoupling proteins uncouple?* Biochim Biophys Acta, 2000. **1459**(2-3): p. 383-9.
288. Klaus, S., et al., *The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue*. Int J Biochem, 1991. **23**(9): p. 791-801.

289. Klingenberg, M. and K.S. Echtay, *Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 128-43.
290. Nedergaard, J., et al., *UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 82-106.
291. Nedergaard, J., et al., *UCP1: the original uncoupling protein--and perhaps the only one? New perspectives on UCP1, UCP2, and UCP3 in the light of the bioenergetics of the UCP1-ablated mice*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(5): p. 475-91.
292. Rial, E. and M.M. Gonzalez-Barroso, *Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 70-81.
293. Winkler, E. and M. Klingenberg, *Effect of fatty acids on H<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(4): p. 2508-15.
294. Jaburek, M., et al., *Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. Ion pair transport demonstrates that direct H(+) translocation by UCP1 is not necessary for uncoupling*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31897-905.
295. Rial, E. and D.G. Nicholls, *On the mechanism of transport by the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria*, in *Anion Carriers of Mitochondria Membranes*, A. A, Editor. 1989, Springer-Verlag: Berlin. p. 261-268.
296. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
297. Ricquier, D. and F. Bouillaud, *Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 3-10.
298. Pecqueur, C., et al., *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8705-12.
299. Sivitz, W.I., B.D. Fink, and P.A. Donohoue, *Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression*. Endocrinology, 1999. **140**(4): p. 1511-9.
300. Borecky, J., I.G. Maia, and P. Arruda, *Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants*. Biosci Rep, 2001. **21**(2): p. 201-12.
301. Boss, O., et al., *Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression*. FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 39-42.
302. Fleury, C., et al., *Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 269-72.
303. Gimeno, R.E., et al., *Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis*. Diabetes, 1997. **46**(5): p. 900-6.
304. Gong, D.W., et al., *Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin*. J Biol Chem, 1997. **272**(39): p. 24129-32.
305. Vidal-Puig, A., et al., *UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(1): p. 79-82.
306. Boss, O., et al., *Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold*. FEBS Lett, 1997. **412**(1): p. 111-4.
307. Boss, O., et al., *Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 5-8.
308. Cadenas, S., et al., *UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged*. FEBS Lett, 1999. **462**(3): p. 257-60.
309. Samec, S., J. Seydoux, and A.G. Dulloo, *Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate?* Faseb J, 1998. **12**(9): p. 715-24.
310. Stuart, J.A., et al., *Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1413**(1): p. 50-4.
311. Laloi, M., et al., *A plant cold-induced uncoupling protein*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 135-6.

## Bibliografia

312. Zhang, C.Y., et al., *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes*. Cell, 2001. **105**(6): p. 745-55.
313. Vidal-Puig, A.J., et al., *Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16258-66.
314. Harper, J.A., et al., *Artificial uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria*. Biochem J, 2002. **361**(Pt 1): p. 49-56.
315. Clapham, J.C., et al., *Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 415-8.
316. Cadenas, S., et al., *The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2773-8.
317. Echtay, K.S., et al., *A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4103-10.
318. Echtay, K.S., et al., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 96-9.
319. Mills, E.M., et al., *Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 403-4.
320. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 755-67.
321. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production*. Biochem Soc Symp, 2004(71): p. 203-13.
322. Brand, M.D., et al., *Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 597-603.
323. Casteilla, L., M. Rigoulet, and L. Penicaud, *Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 181-8.
324. Cortez-Pinto, H., et al., *Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1184-93.
325. Kowaltowski, A.J., A.D. Costa, and A.E. Vercesi, *Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain*. FEBS Lett, 1998. **425**(2): p. 213-6.
326. Negre-Salvayre, A., et al., *A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation*. Faseb J, 1997. **11**(10): p. 809-15.
327. Nicholls, D.G. and S.L. Budd, *Mitochondria and neuronal survival*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 315-60.
328. Rolfé, D.F. and M.D. Brand, *The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues*. Biosci Rep, 1997. **17**(1): p. 9-16.
329. Skulachev, V.P., *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1363**(2): p. 100-24.
330. Skulachev, V.P., *Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants*. Q Rev Biophys, 1996. **29**(2): p. 169-202.
331. Genova, M.L., et al., *Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(5): p. 506-13.
332. Jezek, P. and L. Hlavata, *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2478-503.
333. Bordone, L., et al., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. e31.
334. Joseph, J.W., et al., *Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51049-56.
335. Saleh, M.C., M.B. Wheeler, and C.B. Chan, *Endogenous islet uncoupling protein-2 expression and loss of glucose homeostasis in ob/ob mice*. J Endocrinol, 2006. **190**(3): p. 659-67.

336. Esteves, T.C. and M.D. Brand, *The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1709**(1): p. 35-44.
337. Himms-Hagen, J. and M.E. Harper, *Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2001. **226**(2): p. 78-84.
338. Schrauwen, P. and M.K. Hesselink, *The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity?* *Proc Nutr Soc*, 2004. **63**(2): p. 287-92.
339. Bengtsson, T., B. Cannon, and J. Nedergaard, *Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes*. *Biochem J*, 2000. **347 Pt 3**: p. 643-51.
340. Bronnikov, G., et al., *beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation*. *Endocrinology*, 1999. **140**(9): p. 4185-97.
341. Granneman, J.G., *Norepinephrine infusions increase adenylate cyclase responsiveness in brown adipose tissue*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. **245**(3): p. 1075-80.
342. Marette, A. and L.J. Bukowiecki, *Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis. Evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport*. *Biochem J*, 1991. **277 (Pt 1)**: p. 119-24.
343. Zhao, J., B. Cannon, and J. Nedergaard, *alpha1-Adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of beta3-adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 32847-56.
344. Zhao, J., et al., *Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(4 Pt 1): p. C969-79.
345. Thonberg, H., et al., *As the proliferation promoter noradrenaline induces expression of ICER (induced cAMP early repressor) in proliferative brown adipocytes, ICER may not be a universal tumour suppressor*. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 1): p. 169-77.
346. Thonberg, H., et al., *A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation*. *Biochem J*, 2002. **364**(Pt 1): p. 73-9.
347. Cao, W., et al., *beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(29): p. 27077-82.
348. Puigserver, P., et al., *Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1*. *Mol Cell*, 2001. **8**(5): p. 971-82.
349. Shih, M.F. and P.V. Taberner, *Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by beta 3-adrenoceptor agonists*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **50**(5): p. 601-8.
350. Chaudhry, A. and J.G. Granneman, *Differential regulation of functional responses by beta-adrenergic receptor subtypes in brown adipocytes*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 2): p. R147-53.
351. Martinez-Botas, J., et al., *Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice*. *Nat Genet*, 2000. **26**(4): p. 474-9.
352. Silva, J.E., *Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 435-64.
353. Foellmi-Adams, L.A., et al., *Induction of uncoupling protein in brown adipose tissue. Synergy between norepinephrine and pioglitazone, an insulin-sensitizing agent*. *Biochem Pharmacol*, 1996. **52**(5): p. 693-701.
354. Sadurskis, A., et al., *Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(2 Pt 1): p. E351-60.
355. Alvarez, R., et al., *Both retinoic-acid-receptor- and retinoid-X-receptor-dependent signalling pathways mediate the induction of the brown-adipose-tissue-uncoupling-protein-1 gene by retinoids*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 1**: p. 91-7.

## Bibliografia

356. Alvarez, R., et al., *A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5666-73.
357. Yubero, P., et al., *CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(2): p. 653-9.
358. del Mar Gonzalez-Barroso, M., et al., *Transcriptional activation of the human ucp1 gene in a rodent cell line. Synergism of retinoids, isoproterenol, and thiazolidinedione is mediated by a multipartite response element.* J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31722-32.
359. Del Mar Gonzalez-Barroso, M., D. Ricquier, and A.M. Cassard-Doulier, *The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research.* Obes Rev, 2000. **1**(2): p. 61-72.
360. Kozak, U.C., et al., *An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 59-67.
361. Rim, J.S. and L.P. Kozak, *Regulatory motifs for CREB-binding protein and Nfe2l2 transcription factors in the upstream enhancer of the mitochondrial uncoupling protein 1 gene.* J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34589-600.
362. Sears, I.B., et al., *Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3410-9.
363. Barbera, M.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1486-93.
364. Harris, R.B., T.R. Kasser, and R.J. Martin, *Dynamics of recovery of body composition after overfeeding, food restriction or starvation of mature female rats.* J Nutr, 1986. **116**(12): p. 2536-46.
365. Hervey, G.R., *The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats.* J Physiol, 1958. **145**: p. 336-352.
366. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse.* J Hered, 1950. **41**(12): p. 317-8.
367. Coleman, D.L. and K.P. Hummel, *The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse.* Diabetologia, 1973. **9**(4): p. 287-93.
368. Banks, W.A., *The many lives of leptin.* Peptides, 2004. **25**(3): p. 331-8.
369. Flier, J.S., *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.* Cell, 2004. **116**(2): p. 337-50.
370. Fruhbeck, G. and J. Gomez-Ambrosi, *Rationale for the existence of additional adipostatic hormones.* Faseb J, 2001. **15**(11): p. 1996-2006.
371. Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E827-47.
372. Mora, S. and J.E. Pessin, *An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking.* Diabetes Metab Res Rev, 2002. **18**(5): p. 345-56.
373. Seeley, R.J. and S.C. Woods, *Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity.* Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 901-9.
374. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin.* Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 413-37.
375. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin.* Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
376. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.* Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
377. Morash, B., et al., *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland.* Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5995-8.
378. Kline, A.D., et al., *Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR.* FEBS Lett, 1997. **407**(2): p. 239-42.
379. Prolo, P., M.L. Wong, and J. Licinio, *Leptin.* Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(12): p. 1285-90.

380. Zhang, F., et al., *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 206-9.
381. Fruhbeck, G., S.A. Jebb, and A.M. Prentice, *Leptin: physiology and pathophysiology*. Clin Physiol, 1998. **18**(5): p. 399-419.
382. Madej, T., M.S. Boguski, and S.H. Bryant, *Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine*. FEBS Lett, 1995. **373**(1): p. 13-8.
383. Fruhbeck, G., *A heliocentric view of leptin*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 301-18.
384. Cumin, F., et al., *Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(6): p. 495-504.
385. Cumin, F., H.P. Baum, and N. Levens, *Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20**(12): p. 1120-6.
386. Houseknecht, K.L., et al., *Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity*. Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1638-43.
387. Sinha, M.K., et al., *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1277-82.
388. Lollmann, B., et al., *Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 648-52.
389. Myers, M.G., Jr., *Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 287-304.
390. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
391. Chua, S.C., Jr., et al., *Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts*. Genomics, 1997. **45**(2): p. 264-70.
392. Wang, M.Y., et al., *A novel leptin receptor isoform in rat*. FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 87-90.
393. Ge, H., et al., *Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45898-903.
394. Ceddia, R.B., *Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(10): p. 1175-83.
395. Baumann, H., et al., *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8374-8.
396. Ghilardi, N. and R.C. Skoda, *The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(4): p. 393-9.
397. Ghilardi, N., et al., *Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6231-5.
398. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
399. Bjorbaek, C. and B.B. Kahn, *Leptin signaling in the central nervous system and the periphery*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 305-31.
400. Sahu, A., *Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2613-20.
401. Ahima, R.S. and S.Y. Osei, *Leptin signaling*. Physiol Behav, 2004. **81**(2): p. 223-41.
402. Bjorbaek, C., et al., *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32686-95.
403. Hegyi, K., et al., *Leptin-induced signal transduction pathways*. Cell Biol Int, 2004. **28**(3): p. 159-69.
404. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 655-63.
405. Bates, S.H., et al., *STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction*. Nature, 2003. **421**(6925): p. 856-9.
406. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.

## Bibliografia

407. Zhang, Y. and P.J. Scarpace, *The role of leptin in leptin resistance and obesity*. *Physiol Behav*, 2006. **88**(3): p. 249-56.
408. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. *Trends Genet*, 1995. **11**(2): p. 69-74.
409. Taga, T. and T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 797-819.
410. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
411. Kloek, C., et al., *Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(44): p. 41547-55.
412. White, D.W., et al., *Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(7): p. 4065-71.
413. Bates, S.H. and M.G. Myers, Jr., *The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function*. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. **14**(10): p. 447-52.
414. Bjorbaek, C., et al., *Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4747-55.
415. Munzberg, H., et al., *Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(6): p. 642-52.
416. Munzberg, H., et al., *Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin*. *Endocrinology*, 2003. **144**(5): p. 2121-31.
417. Munzberg, H. and M.G. Myers, Jr., *Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(5): p. 566-70.
418. Bjorbaek, C., et al., *SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 40649-57.
419. Dunn, S.L., et al., *Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(4): p. 925-38.
420. Sasaki, A., et al., *CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(38): p. 29338-47.
421. Howard, J.K., et al., *Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3*. *Nat Med*, 2004. **10**(7): p. 734-8.
422. Howard, J.K. and J.S. Flier, *Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins*. *Trends Endocrinol Metab*, 2006.
423. Mori, H., et al., *Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity*. *Nat Med*, 2004. **10**(7): p. 739-43.
424. Argetsinger, L.S., et al., *Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(11): p. 4955-67.
425. Carpino, N., et al., *Identification, cDNA cloning, and targeted deletion of p70, a novel, ubiquitously expressed SH3 domain-containing protein*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(21): p. 7491-500.
426. Feener, E.P., et al., *Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(11): p. 4968-78.
427. Feng, J., et al., *Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(5): p. 2497-501.
428. Kurzer, J.H., et al., *Tyrosine 813 is a site of JAK2 autophosphorylation critical for activation of JAK2 by SH2-B beta*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4557-70.
429. Ceddia, R.B., et al., *Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance*. *Faseb J*, 2002. **16**(10): p. 1163-76.
430. Kim, Y.B., et al., *In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin*. *Endocrinology*, 2000. **141**(7): p. 2328-39.
431. Kraus, D., et al., *Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes*. *J Endocrinol*, 2002. **175**(1): p. 185-91.



432. Saad, M.J., et al., *Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22100-4.
433. Szanto, I. and C.R. Kahn, *Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2355-60.
434. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 7-20.
435. Fruhbeck, G., *Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 903-8.
436. Fruhbeck, G. and J. Gomez-Ambrosi, *Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide*. Cell Signal, 2001. **13**(11): p. 827-33.
437. Strieter, R.M., *Masters of angiogenesis*. Nat Med, 2005. **11**(9): p. 925-7.
438. Fruhbeck, G., *Peripheral actions of leptin and its involvement in disease*. Nutr Rev, 2002. **60**(10 Pt 2): p. S47-55; discussion S68-84, 85-7.
439. Muoio, D.M. and G. Lynis Dohm, *Peripheral metabolic actions of leptin*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. **16**(4): p. 653-66.
440. Baratta, M., *Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues*. Med Sci Monit, 2002. **8**(12): p. RA282-92.
441. Harvey, J. and M.L. Ashford, *Leptin in the CNS: much more than a satiety signal*. Neuropharmacology, 2003. **44**(7): p. 845-54.
442. Elmquist, J.K., et al., *Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain*. J Comp Neurol, 1998. **395**(4): p. 535-47.
443. Scarpace, P.J. and M. Matheny, *Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 1): p. E259-64.
444. Commins, S.P., et al., *Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4772-8.
445. Commins, S.P., et al., *Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 33059-67.
446. Commins, S.P., et al., *Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 292-300.
447. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
448. Burcelin, R., et al., *Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in ob/ob mice*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1264-9.
449. Kieffer, T.J., et al., *Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 1997. **46**(6): p. 1087-93.
450. Kulkarni, R.N., et al., *Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2729-36.
451. Liu, L., et al., *Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31160-7.
452. Siegrist-Kaiser, C.A., et al., *Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2858-64.
453. Cioffi, J.A., et al., *Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 585-9.
454. Ducy, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell, 2000. **100**(2): p. 197-207.
455. Frank, S., et al., *Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 501-9.
456. Fruhbeck, G. and J. Salvador, *Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism*. Diabetologia, 2000. **43**(1): p. 3-12.
457. Holness, M.J., M.J. Munns, and M.C. Sugden, *Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **157**(1-2): p. 11-20.
458. La Cava, A., C. Alviggi, and G. Matarese, *Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity*. J Mol Med, 2004. **82**(1): p. 4-11.

## Bibliografia

459. Shalitin, S. and M. Phillip, *Role of obesity and leptin in the pubertal process and pubertal growth--a review*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(8): p. 869-74.
460. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
461. Peelman, F., et al., *Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases*. Prog Lipid Res, 2004. **43**(4): p. 283-301.
462. Seufert, J., *Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S152-8.
463. Wilding, J.P., *Neuropeptides and appetite control*. Diabet Med, 2002. **19**(8): p. 619-27.
464. Schioth, H.B., et al., *Further pharmacological characterization of the selective melanocortin 4 receptor antagonist HS014: comparison with SHU9119*. Neuropeptides, 1999. **33**(3): p. 191-6.
465. Milagro, F. and I. Marques-Lopes, *[Nervous system and obesity]*. An Sist Sanit Navar, 2002. **25 Suppl 1**: p. 41-52.
466. Haynes, W.G., et al., *Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 542-7.
467. Morrison, S.F., *Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 67-74.
468. Frausto da Silva, J.J.R., *The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*. 1991, Oxford: Clarendon Press. 411-435.
469. Peterson, P.J., *Unusual accumulation of elements by plants and animals*. Sci. Prog. Oxf., 1971. **59**: p. 505-26.
470. Kletzin, A. and M.W. Adams, *Tungsten in biological systems*. FEMS Microbiol Rev, 1996. **18**(1): p. 5-63.
471. Hille, R., *Molybdenum and tungsten in biology*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 360-7.
472. L'Vov N, P., A.N. Nosikov, and A.N. Antipov, *Tungsten-containing enzymes*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(2): p. 196-200.
473. Drake, M.J. and K. Righter, *Determining the composition of the Earth*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 39-44.
474. Greenwood, N.N., *Chemistry of the elements*. 2 ed. 1997, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann.
475. Wenning, R., *Tungsten*. In: *Handbook on toxicity of organic compounds*. 1988, New York: Marcel Dekker. 731-738.
476. Meyer, O., *The bacterial molybdenum cofactor*. In: *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Vol. 535. 1993, Washington D.C.: ACS Symposium Series. 114-129.
477. Rajagopalan, K.V. and J.L. Johnson, *The pterin molybdenum cofactors*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10199-202.
478. Steifel, E.I., *Molybdenum enzymes, cofactors and chemistry. An introductory survey*. In: *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Vol. 535. 1993, Washington D.C.: ACS Symposium Series. 1-19.
479. Stankiewicz, P.J. and M.J. Gresser, *Inhibition of phosphatase and sulfatase by transition-state analogues*. Biochemistry, 1988. **27**(1): p. 206-12.
480. Stuckey, J.A., et al., *Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate*. Nature, 1994. **370**(6490): p. 571-5.
481. Lund, I.K., et al., *Structure-based design of selective and potent inhibitors of protein-tyrosine phosphatase beta*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24226-35.
482. Weigle, D.S., *Pharmacological therapy of obesity: past, present, and future*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2462-9.
483. Barbera, A., et al., *Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia*. Diabetologia, 1997. **40**(2): p. 143-9.
484. Barbera, A., J.E. Rodriguez-Gil, and J.J. Guinovart, *Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 20047-53.

485. Fernandez-Alvarez, J., et al., *Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate*. *Diabetologia*, 2004. **47**(3): p. 470-7.
486. Muñoz, M.C., et al., *Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats*. *Diabetes*, 2001. **50**(1): p. 131-8.
487. Claret, M., et al., *Tungstate Decreases Weight Gain and Adiposity in Obese Rats Through Increased Thermogenesis and Lipid Oxidation*. *Endocrinology*, 2005.
488. Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg, *Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(12): p. 1997-2006.
489. Storch, J. and A.E. Thumser, *The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1486**(1): p. 28-44.
490. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1486**(1): p. 1-17.
491. Claret, M., *Mecanismes d'acció del tungstat sòdic sobre el pes corporal i la resistència a la insulina: possible regulació de l'activitat transcripcional del PPAR-gamma*, in *Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica*. 2003, Universitat de Barcelona: Barcelona.
492. Desvergne, B. and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(5): p. 649-88.
493. Evans, R.M., G.D. Barish, and Y.X. Wang, *PPARs and the complex journey to obesity*. *Nat Med*, 2004. **10**(4): p. 355-61.
494. Camp, H.S. and S.R. Tafuri, *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10811-6.
495. Hu, E., et al., *Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma*. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2100-3.
496. Zhang, B., et al., *Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 31771-4.
497. Dominguez, J.E., et al., *The antidiabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 42785-94.
498. Domingo, J.L., *Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects*. *Biol Trace Elem Res*, 2002. **88**(2): p. 97-112.
499. Fagin, J.A., K. Ikejiri, and S.R. Levin, *Insulinotropic effects of vanadate*. *Diabetes*, 1987. **36**(12): p. 1448-52.
500. Heyliger, C.E., A.G. Tahiliani, and J.H. McNeill, *Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats*. *Science*, 1985. **227**(4693): p. 1474-7.
501. Matsumoto, J., *Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine*. *Med Hypotheses*, 1994. **43**(3): p. 177-82.
502. McNeill, J.H., H.L. Delgatty, and M.L. Battell, *Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats*. *Diabetes*, 1991. **40**(12): p. 1675-8.
503. Bosch, F., et al., *Lithium inhibits hepatic gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(5): p. 2888-93.
504. Rodriguez-Gil, J.E., J.J. Guinovart, and F. Bosch, *Lithium restores glycogen synthesis from glucose in hepatocytes from diabetic rats*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **301**(2): p. 411-5.
505. Barbera, A., et al., *Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study*. *Diabetologia*, 2001. **44**(4): p. 507-13.
506. Le Lamer, S., et al., *An application of population kinetics analysis to estimate pharmacokinetic parameters of sodium tungstate after multiple-dose during preclinical studies in rats*. *Pharmacol Toxicol*, 2002. **90**(2): p. 100-5.
507. Le Lamer, S., et al., *Estimation of pharmacokinetic parameters of sodium tungstate after multiple-dose during preclinical studies in beagle dogs*. *Eur J Pharm Sci*, 2001. **14**(4): p. 323-9.

## Bibliografia

508. Le Lamer, S., et al., *Pharmacokinetics of sodium tungstate in rat and dog: a population approach*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(2): p. 714-21.
509. Le Lamer-Dechamps, S., et al., *Influence of food and diabetes on pharmacokinetics of sodium tungstate in rat*. Int J Pharm, 2002. **248**(1-2): p. 131-9.
510. Barberà, A., *El tungstat: una nova aproximació terapèutica a la diabetis*, in *Departament de Bioquímica*. 1998, Universitat de Barcelona: Barcelona.
511. Ashwell, M. and C.J. Meade, *Obesity: do fat cells from genetically obese mice (C57BL/6J ob/ob) have an innate capacity for increased fat storage?* Diabetologia, 1978. **15**(6): p. 465-70.
512. Enser, M. and M. Ashwell, *Fatty acid composition of triglycerides from adipose tissue transplanted between obese and lean mice*. Lipids, 1983. **18**(11): p. 776-80.
513. Gavrilova, O., et al., *Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 271-8.
514. Colombo, C., et al., *Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipotrophy*. Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2727-33.
515. Lacy, E.L. and T.J. Bartness, *Effects of white adipose tissue grafts on total body fat and cellularity are dependent on graft type and location*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(2): p. R380-R388.
516. Lacy, E.L. and T.J. Bartness, *Autologous fat transplants influence compensatory white adipose tissue mass increases after lipectomy*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(1): p. R61-70.
517. Rooks, C., et al., *Compensation for an increase in body fat caused by donor transplants into mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(6): p. R1149-55.
518. Chen, H.C., et al., *Obesity resistance and enhanced glucose metabolism in mice transplanted with white adipose tissue lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1715-22.
519. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
520. Lehrach, H., et al., *RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination*. Biochemistry, 1977. **16**(21): p. 4743-51.
521. Heijboer, A.C., et al., *High fat diet induced hepatic insulin resistance is not related to changes in hypothalamic mRNA expression of NPY, AgRP, POMC and CART in mice*. Peptides, 2005. **26**(12): p. 2554-8.
522. Richter, C.P., *Salt taste thresholds of normal and adrenalectomized rats*. Endocrinology, 1939. **24**: p. 367-371.
523. Blizard, D.A., B. Kotlus, and M.E. Frank, *Quantitative trait loci associated with short-term intake of sucrose, saccharin and quinine solutions in laboratory mice*. Chem Senses, 1999. **24**(4): p. 373-85.
524. Kotlus, B.S. and D.A. Blizard, *Measuring gustatory variation in mice: a short-term fluid-intake test*. Physiol Behav, 1998. **64**(1): p. 37-47.
525. Scalera, G., *Acid taste thresholds assessed by conditioned taste aversion and two-bottle preference in rats*. Physiol Behav, 2004. **82**(2-3): p. 411-23.
526. Tordoff, M.G. and A.A. Bachmanov, *Mouse taste preference tests: why only two bottles?* Chem Senses, 2003. **28**(4): p. 315-24.
527. Tordoff, M.G. and A.A. Bachmanov, *Influence of the number of alcohol and water bottles on murine alcohol intake*. Alcohol Clin Exp Res, 2003. **27**(4): p. 600-6.
528. Bursztein, S., D.H. Elwyn, and J. Askanazi, *Energy metabolism and indirect calorimetry in critically ill and injured patients*. Acute Care, 1988. **14-15**: p. 91-110.
529. Ferrannini, E., *The theoretical bases of indirect calorimetry: a review*. Metabolism, 1988. **37**(3): p. 287-301.
530. Frayn, K.N., *Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange*. J Appl Physiol, 1983. **55**(2): p. 628-34.
531. Gnaiger, E., *Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology*. Adv Exp Med Biol, 2003. **543**: p. 39-55.

532. Gnaiger, E., *Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply*. *Respir Physiol*, 2001. **128**(3): p. 277-97.
533. Gnaiger, E., G. Mendez, and S.C. Hand, *High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(20): p. 11080-5.
534. Gnaiger, E., et al., *Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen*. *J Bioenerg Biomembr*, 1995. **27**(6): p. 583-96.
535. Bukowiecki, L.J., *Regulation of energy expenditure in brown adipose tissue*. *Int J Obes*, 1985. **9 Suppl 2**: p. 31-41.
536. Matthias, A., et al., *Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25073-81.
537. Harris, R.B., et al., *A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice*. *Endocrinology*, 1998. **139**(1): p. 8-19.
538. Lam, N.T., et al., *Leptin resistance following over-expression of protein tyrosine phosphatase 1B in liver*. *J Mol Endocrinol*, 2006. **36**(1): p. 163-74.
539. Mercer, J.G., et al., *Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice*. *FEBS Lett*, 1997. **402**(2-3): p. 185-8.
540. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
541. Ahren, B., R.M. Baldwin, and P.J. Havel, *Pharmacokinetics of human leptin in mice and rhesus monkeys*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000. **24**(12): p. 1579-85.
542. Cassell, O.C., et al., *Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states*. *Br J Plast Surg*, 2002. **55**(8): p. 603-10.
543. Jequier, E., *Leptin signaling, adiposity, and energy balance*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 379-88.
544. Ostlund, R.E., Jr., et al., *Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(11): p. 3909-13.
545. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 543-6.
546. Yamaguchi, M., et al., *Revascularization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. **230**(10): p. 742-8.
547. Soliman, M., et al., *Inverse regulation of leptin mRNA expression by short- and long-chain fatty acids in the cultured bovine adipocytes*. *Domest Anim Endocrinol*, 2006.
548. Saladin, R., et al., *Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration*. *Nature*, 1995. **377**(6549): p. 527-9.
549. Shimizu, H., et al., *Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects*. *J Endocrinol*, 1997. **154**(2): p. 285-92.
550. Wabitsch, M., et al., *Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(4): p. 808-13.
551. Rayner, D.V. and P. Trayhurn, *Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions*. *J Mol Med*, 2001. **79**(1): p. 8-20.
552. Wang, Z.W., et al., *Hyperleptinemia depletes fat from denervated fat tissue*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **260**(3): p. 653-7.
553. Klebanov, S., et al., *Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility*. *J Endocrinol*, 2005. **186**(1): p. 203-11.
554. Halaas, J.L., et al., *Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(16): p. 8878-83.
555. Heymsfield, S.B., et al., *Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial*. *Jama*, 1999. **282**(16): p. 1568-75.

## Bibliografia

556. Levin, B.E. and A.A. Dunn-Meynell, *Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(4): p. R941-8.
557. Li, H., et al., *Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats*. Diabetes, 1997. **46**(12): p. 2035-9.
558. Widdowson, P.S., et al., *Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity*. Diabetes, 1997. **46**(11): p. 1782-5.
559. Scarpace, P.J., M. Matheny, and N. Tumer, *Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats*. Neuroscience, 2001. **104**(4): p. 1111-7.
560. Ren, D., et al., *Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice*. Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 95-104.
561. Bjorbaek, C., et al., *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30059-65.
562. Gu, F., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B attenuates growth hormone-mediated JAK2-STAT signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(11): p. 3753-62.
563. Zhang, E.E., et al., *Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 16064-9.
564. Peelman, F., et al., *Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(4): p. 218-25.
565. Golozoubova, V., B. Cannon, and J. Nedergaard, *UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(2): p. E350-7.
566. Ukropec, J., et al., *Leptin is required for uncoupling protein-1-independent thermogenesis during cold stress*. Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2468-80.
567. Kievit, P., et al., *Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 123-32.







