



PAPEL DE CPT1C EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Macarena Pozo Ariza

Dipòsit Legal: B 23127-2015

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**PAPEL DE CPT1C EN EL CONTROL DE LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA**

Macarena Pozo Ariza

TESIS DOCTORAL

Sant Cugat del Vallès, 2015

UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Memoria de tesis doctoral presentada por Macarena Pozo Ariza, para optar al título de Doctor por la Universitat Internacional de Catalunya.

Esta tesis se ha realizado bajo la dirección de las Doctoras Núria Casals Farré y Laura Herrero Rodríguez, en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya.

Dra. Núria Casals Farré
Directora de tesis

Dra. Laura Herrero Rodríguez
Co-Directora de tesis

Macarena Pozo Ariza

Sant Cugat del Vallès, 2015

“Així com Darwin descobrí la llei del desenvolupament de la naturalesa orgànica, Marx descobrí la llei del desenvolupament de la història humana: el fet, tant senzill, però ocult sota la malesa ideològica, que l'home necessita en primer lloc, menjar, beure, tenir un sostre i vestir-se abans de poder fer política, ciència, art o religió.”

Friedrich Engels (1820-1895)

A la gent que em cuida, ...

PRESENTACIÓN

La prevalencia mundial de la obesidad se ha duplicado desde 1980 (OMS, web en línea. Consulta: 20-02-2015). Según los últimos datos de la OMS del 2014, en el mundo hay ya 600 millones de personas mayores de 18 años obesas. Según las estadísticas sanitarias mundiales realizadas por la misma organización en 2012, la obesidad como factor de riesgo que se asocia a un aumento de la mortalidad y de la morbilidad afectaba al 24,9% de hombres i al 23% de las mujeres en España. Además, la OCDE estimó en 2012 que una persona obesa incurre en un 25% más los gastos de salud que una persona de peso normal por año. Destacando en el mismo estudio (*obesity update 2012*) que la obesidad es responsable del 1-3% del gasto sanitario total en la mayoría de países de la OCDE. Por todo ello, la búsqueda de una terapia efectiva contra la obesidad es una prioridad a nivel mundial.

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial prevenible, que aparece cuando hay un desequilibrio en el balance energético del organismo. Es decir, cuando el gasto energético es inferior a la energía ingerida por un individuo. El control de la homeostasis energética está estrechamente regulado por el sistema nervioso central, concretamente, el hipotálamo asume un papel crucial en sensar e integrar señales de los órganos periféricos permitiéndole efectuar una respuesta homeostática adecuada ajustando tanto el consumo de alimentos como el gasto energético.

En consecuencia, en los últimos años se ha tratado de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares a nivel hipotalámico responsables de regular el balance energético. En la actualidad se conoce que el metabolismo de los ácidos grasos a nivel hipotalámico juega un papel muy importante en el control del apetito. Más concretamente, se ha descrito que los niveles de malonil-CoA o de aciles-CoA son reconocidos por las neuronas del hipotálamo como señales intracelulares del estado nutricional del organismo. Las enzimas carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), tienen como sustrato los aciles-CoA y como inhibidor fisiológico el malonil-CoA, situándose así como enzimas clave en la regulación de los niveles intracelulares de estos metabolitos. Las isoformas CPT1A i B, localizadas en la membrana mitocondrial externa, se encargan de internalizar los aciles-CoA a la mitocondria para que sean oxidados. Así, efectivamente, el papel de CPT1A hipotalámica en el control del apetito y de la homeostasis de la glucosa fue demostrada por varios grupos de investigación.

Por otro lado, más recientemente, en 2002, se descubrió una isoforma exclusivamente neuronal, CPT1C, que se localiza en retículo endoplasmático y con afinidades similares al sustrato acil-CoA y al inhibidor malonil-CoA, a pesar de no tener actividad carnitina

palmitoiltransferasa. Desde entonces se ha demostrado que CPT1C modula los niveles de otra familia de lípidos intracelulares, las ceramidas, y que éstas son necesarias para la acción neuroendocrina de las hormonas leptina i grelina. Además, el papel de CPT1C en el control de la homeostasis energética se hizo evidente en varios estudios que muestran un fenotipo hipometabólico de ratones deficientes de CPT1C en situación de ayuno y de dieta rica en grasas.

En esta tesis se ha estudiado qué papel tiene CPT1C en el control de la homeostasis energética. Para ello se han realizado dos aproximaciones distintas. En primer lugar se ha estudiado qué vías del metabolismo intermediario periférico están reguladas por CPT1C en ratones deficientes de esta proteína en distintas situaciones de estrés metabólico. En segundo lugar se ha estudiado el papel de CPT1C en el metabolismo lipídico neuronal y en los procesos necesarios para la regulación hipotalámica de la homeostasis energética.

Los resultados obtenidos demuestran que CPT1C es necesaria para la adaptación al ayuno y al torpor y para producir el cambio metabólico a nivel periférico hacia la oxidación de las grasas frente a la de carbohidratos. Por otro lado, la deficiencia de CPT1C perjudica el metabolismo energético mitocondrial y el flujo de lípidos intracelulares a nivel hipotalámico. Asimismo, hemos podido demostrar que en conjunto, estas alteraciones tienen un efecto acumulativo a largo plazo, produciendo obesidad asociada a la edad.

Por consiguiente, los resultados obtenidos en esta tesis confirman el importante papel de CPT1C en la regulación de la homeostasis energética. Aportando nuevos datos sobre los mecanismos que se encuentran regulados por CPT1C tanto a nivel central como periférico. Situando a CPT1C como posible diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y otros trastornos de la homeostasis energética.

ÍNDICE

ABREVIATURAS **17**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN **21**

1. Regulación de la homeostasis energética	23
1.1. Señales periféricas a corto y a largo plazo	24
1.2. Adaptación metabólica durante el ayuno	31
1.3. Adaptación metabólica al torpor	34
2. Regulación central del balance energético	36
2.1. Hipotálamo	36
2.2. Metabolismo mitocondrial hipotalámico	47
2.3. Metabolismo reticular hipotalámico	49
3. Sistema carnitina palmitoiltransferasa	55
4. CPT1C: Carnitina palmitoiltransferasa 1c	58
4.1. Papel de CPT1C en la regulación del balance energético	60
4.2. Papel de CPT1C en la señalización hipotalámica de leptina y grelina	63
4.3. Otras funciones de CPT1C	65
5. Envejecimiento y homeostasis energética	67
5.1. Hipotálamo	68

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS **73**

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS **77**

1. Biología molecular	79
1.1. Obtención de vectores víricos recombinantes	79
1.1.1. Obtención de pWPI-CPT1C	81
1.1.2. Obtención de pVTHM-shCPT1C	84
1.2. Genotipado	87
1.3. Obtención y análisis de RNA	89
1.3.1. Extracción de RNA	89
1.3.2. Síntesis de cDNA	89
1.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real	90

1.4. Obtención y análisis de proteínas	91
1.4.1. Extracción de proteínas	91
1.4.2. <i>Western blot</i>	92
2. <u>Biología celular</u>	95
2.1. Mantenimiento de líneas celulares	95
2.2. Transfección de mediante liposomas	97
2.3. Obtención de lentivirus	98
2.4. Transducción lentiviral	103
2.5. Ensayo de oxidación de ácidos grasos	103
2.6. Citoquímica fluorescente	106
3. <u>Procedimientos con animales</u>	106
3.1. Animales	107
3.2. Diseños experimentales	107
3.2.1. Ayuno	107
3.2.2. Torpor	108
3.2.3. Envejecimiento	108
3.3. Determinación del peso y la ingesta	108
3.4. Determinación de la temperatura corporal	108
3.5. Determinación de la glucemia	109
3.6. Test de tolerancia al piruvato, a la glucosa y a la insulina	109
3.7. Disección de tejidos de ratón	110
3.8. Perfusión intracardíaca fijativa	110
3.9. Test de memoria: NORT (<i>Novel Object Recognition Test</i>)	112
4. <u>Bioquímica</u>	114
4.1. Determinación de hormonas en suero	114
4.1.1. Hormona del crecimiento	115
4.2. Determinación de metabolitos hepáticos	115
4.2.1. Triacilgliceroles	115
4.2.2. Glucógeno	116
4.3. Ensayo de actividad piruvato deshidrogenasa	118
5. <u>Análisis estadístico</u>	118

CAPÍTULO 4: RESULTADOS **119**

METABOLISMO PERIFÉRICO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C **121**

1. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el ayuno	121
1.1. Análisis del peso y la ingesta	121
1.2. Análisis del metabolismo energético hepático	123
1.3. Análisis de la homeostasis de la glucosa	125
1.4. Análisis del metabolismo energético muscular	126
1.5. Análisis del metabolismo energético hipotalámico	129
2. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el torpor	135
2.1. Análisis de la glicemia	136
2.2. Análisis de la temperatura corporal	137
2.3. Análisis del peso	137
3. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el envejecimiento	138
3.1. Evolución del peso y la ingesta	138
3.2. Análisis de la homeostasis de la glucosa	139
3.3. Estudio de marcadores hipotalámicos de envejecimiento	140
3.4. Test de memoria	142

PAPEL DE CPT1C EN EL METABOLISMO LIPÍDICO HIPOTALÁMICO **144**

4. Expresión de CPT1C en respuesta a distintas situaciones nutricionales	144
4.1. Validación de la línea celular GT1-7	145
4.2. Respuesta de CPT1C y otros marcadores metabólicos al ayuno <i>in vitro</i>	146
4.3. Respuesta de CPT1C y de marcadores de estrés reticular a palmitato	147
5. Funciones celulares reguladas por la expresión de CPT1C	148
5.1. Efecto sobre la oxidación de ácidos grasos	149
5.2. Efecto sobre la activación de la autofagia	150
5.3. Efecto sobre la formación de cuerpos lipídicos	152

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN **155**

1. CPT1C es necesaria para el cambio metabólico durante el ayuno	159
--	-----

2. CPT1C es necesaria para entrar en situación de torpor	166
3. CPT1C y envejecimiento	169
4. CPT1C participa en el metabolismo lipídico hipotalámico	172
5. Conclusiones y futuras investigaciones	175

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES **177**

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA **181**

CAPÍTULO 8: PUBLICACIÓN **201**

1. Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin	
---	--

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AC	Autoclavado
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-Coa sintasa
AG	Ácido graso
AGCL	Ácido graso de cadena larga
AGL	Ácido graso libre
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AgRP	Péptido relacionado con agouti
ARC	Núcleo arcuato
ATGL	Lipasa de triglicéridos adiposa
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BiP	Inmunoglobulina de unión a proteínas
BSA	Albumina sérica bovina
CACT	Carnitina acilcarnitina transferasa
CAMMK	Ca ²⁺ -calmodulina proteína quinasa
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CL	Cuerpo lipídico
CNS	Sistema nervioso central
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
DMH	Núcleo dorsomedial
eIF2	Factor de iniciación eucariota 2
FADH₂	Dinucleótido de flavina y adenina
FAS	Ácido graso sintasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GH	Hormona del crecimiento
GHS-R	Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento

GI	Gastrointestinal
GNG	Gluconeogénesis
GSH	Glutación
GSSG	Disulfido de glutación
GTT	Test de tolerancia a la glucosa
HHA	Eje hipotálamo hipofisario
HSL	Lipasa sensible a hormonas
icv	Intracerebroventricular
IKKβ	Inhibidor de la subunidad quinasa beta del factor nuclear kappa-B
ip	Intraperitoneal
IRE	Enzima requirente de inositol
ITT	Test de tolerancia a la insulina
KO	Animal modificado genéticamente
LC3	Cadena ligera 3 proteína asociada a microtúbulos
LHA	Núcleo lateral
LKB1	Quinasa hepática B1
MAG	monoacilglicerol
MAMs	Membranas asociadas a mitocondria
MBH	Hipotálamo mediobasal
MC4R	Receptor de melanocortina 4
MCD	Malonil-CoA decarboxilasa
Mfn2	Mitofusina 2
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NPY	Neuropéptido Y
NORT	Test de reconocimiento de un objeto nuevo
OCDE	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos

OMS	Organización mundial de la Salud
O/N	Durante toda la noche
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDK4	Piruvato deshidrogenasa quinasa 4
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC1	Coactivador 1 alfa de PPAR gamma
POMC	Pro-opiomelanocortina
PTT	Test de tolerancia al piruvato
PVH	Núcleo paraventricular
RE	Reticulo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SIRT1	Sirtuina 1
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tejido adiposo marrón
TBE	Tejido adiposo blanco epididimal
TGI	Tracto gastrointestinal
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
UA	Unidades arbitrarias
UCP2	Proteína desacoplante 2
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VMN	Núcleo ventromedial
XBP1	Proteína 1 de unión a la caja X
WT	Animal salvaje

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Regulación de la homeostasis energética
2. Regulación central del balance energético
3. Sistema carnitina palmitoiltransferasa
4. CPT1C: Carnitina palmitoiltransferasa 1c
5. Envejecimiento y homeostasis energética

1. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

A menudo se le atribuye la introducción del concepto de homeostasis al fisiólogo francés Claude Bernard cuando acuñó la frase "milieu intérieur" hace más de 150 años (Bernard *et al.*, 1854). Actualmente, el balance energético se define como el flujo de energía a través de los sistemas vivos mediante el metabolismo. El mantenimiento de este balance depende de la regulación de tres procesos: la ingesta, el gasto energético y el almacenamiento de energía (figura 1). Estos procesos están estrechamente regulados por un complejo sistema neuroendocrino, capaz de monitorizar el estado energético del organismo, integrar la información y responder en consecuencia mediante mecanismos homeostáticos con el fin de minimizar el impacto de las fluctuaciones energéticas (Flier, 2004).

A pesar de que la regulación de la homeostasis energética comprende mecanismos sorprendentemente precisos, no siempre son capaces de compensar el desequilibrio. Cuando se instaura un balance calórico positivo, puede conllevar la aparición de obesidad. Esta patología se define como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. En particular se ha asociado principalmente a Diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, algunos tipos de cáncer, complicaciones respiratorias u osteoartritis, demostrándose que tanto el sobrepeso como la obesidad son importantes predictores de una disminución de la longevidad (Friedman, 2000; Kopelman, 2000).

Como ya se ha comentado, las interacciones bidireccionales entre los órganos periféricos y el sistema nervioso central (SNC) permiten regular la ingesta y el gasto energético. Más concretamente, el hipotálamo y el tronco del encéfalo son los encargados de recibir las diferentes señales hormonales, nutricionales y metabólicas provenientes de los órganos periféricos, integrar toda la información y desencadenar una respuesta homeostática adecuada.

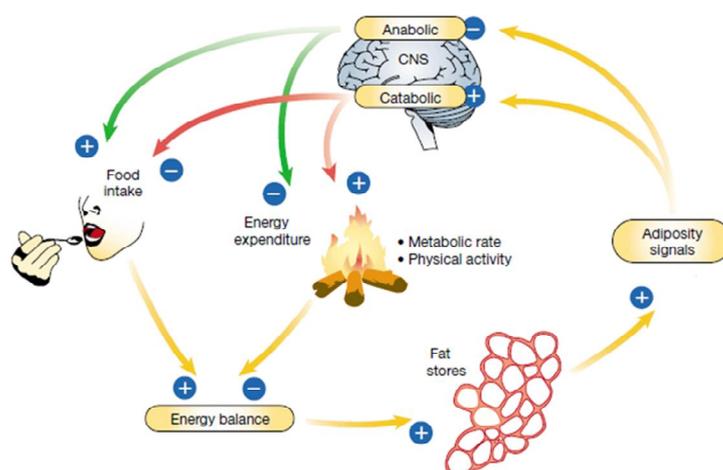


Figura 1. Regulación de la homeostasis energética. Modelo que muestra cómo cambios en la adiposidad acopla ajustes en la ingesta de alimentos y el gasto energético con el fin de mantener el balance de energía corporal en equilibrio (adaptado de Schwartz *et al.*, 2000).

El papel integrador del hipotálamo se detalla más adelante en este capítulo, a continuación se describen las señales periféricas reguladas a corto y a largo plazo en proporción a la cantidad de energía consumida y a la cantidad almacenada por el organismo (figura 3).

1.1. SEÑALES PERIFÉRICAS A CORTO Y A LARGO PLAZO

Aunque hay numerosas señales periféricas que pueden contribuir a la conducta alimentaria y a la regulación del peso corporal, es importante reconocer que a corto plazo y a largo plazo, la ingesta de alimentos y el balance energético se regulan mediante distintos, pero interactivos mecanismos. Las señales a corto plazo actúan primeramente como determinantes de la saciedad, limitando la ingesta de alimentos, mientras que los reguladores a largo plazo se activan en función de las reservas energéticas. En este sentido, cabe destacar los primeros estudios que demostraron una interacción entre el metabolismo periférico y el sistema nervioso central. Así en los años sesenta, la “teoría glucostática” postulaba que declives en la concentración sanguínea de glucosa provocan apetito y el inicio de la ingesta de alimentos, planteando la hipótesis de que el cerebro responde inmediatamente a cambios en la disponibilidad energética y controlando la ingesta (Mayer y Thomas, 1967). Por otro lado, la “teoría lipostática” (Kennedy, 1953) afirmaba que la aparición del apetito no está necesariamente ligada a las necesidades energéticas inmediatas, sino a la necesidad de reposición de sustratos agotados, respondiendo al grado de almacenamiento o adiposidad. Teoría más acertada ya que incluía el gasto energético, además de la ingesta, en la regulación del balance energético.

SEÑALES A CORTO PLAZO

Nutrientes

La ingesta de alimentos proporciona los distintos macro y micronutrientes que serán metabolizados para suplir las necesidades del organismo, por este motivo resulta lógico que los niveles circulantes y la utilización de estos metabolitos regule el apetito.

Glucosa

La teoría glucostática de Mayers para la regulación de la conducta alimentaria fue posteriormente revisada (Bray, 1996) y reafirmada mediante múltiples evidencias. Por ejemplo, la hipoglucemia o la inhibición del metabolismo de la glucosa mediante el análogo de la glucosa 2 desoxi-D-glucosa aumentan la ingesta en animales (Smith y Epstein, 1969) y la

sensación de apetito en humanos (Thompson y Campbell, 1977). Además, Oomura y colaboradores reportaron que neuronas del hipotálamo mediobasal y lateral aumentan su activación en respuesta a la glucosa (Oomura *et al.*, 1969). Estas neuronas glucosensibles son en parte responsables de la inducción de la ingesta en situación de privación de glucosa. Otros investigadores han sugerido que la ingesta por privación de glucosa puede ser regulada por receptores del cerebro posterior (Ritter, Slusser y Stone, 1981) o del hígado (Novin, VanderWeele y Rezek, 1973). El papel de los cambios fisiológicos de los niveles de glucosa en la regulación del comportamiento alimentario ha sido difícil de caracterizar, algunos estudios han sugerido que la tasa de utilización/oxidación de glucosa está involucrada en la inducción de saciedad (Nicolaidis y Even, 1990). Sin embargo, la administración de otra hexosa, fructosa, no es capaz de inducir saciedad (Smith, Driscoll y Campfield, 1988).

Proteínas

La relación entre las fluctuaciones de aminoácidos en suero y el apetito fue sugerida originalmente por Mellinkoff (Mellinkoff *et al.*, 1956). Siendo reafirmada posteriormente con varios estudios que describieron que la proteína dietética induce saciedad a corto plazo (Bray, 1997; Porrini *et al.*, 1997). También, aunque los mecanismos subyacentes a este fenómeno no se comprenden bien, la administración de aminoácidos tales como la fenilalanina y el triptófano suprimen la ingesta de alimentos en humanos (Rogers y Blundell, 1994). Asimismo, se observó que los aminoácidos pueden influir en la ingesta de alimentos ya sea mediante acciones directas dentro del SNC o a través de receptores hepáticos o portales (Niiijima y Meguid, 1995).

Grasas

Por un lado, un aumento de los lípidos circulantes mediante una infusión intravenosa, en ausencia de absorción gastrointestinal, disminuye la ingesta de alimentos (Woods *et al.*, 1984), mientras que la reducción de la utilización de las grasas mediante la infusión de inhibidores de la beta-oxidación, estimula la alimentación (Friedman *et al.*, 1999). A pesar de que las grasas no son sustrato energético del SNC, éste posee los mecanismos de transporte y las enzimas para la síntesis y la oxidación de las grasas, sugiriendo un papel especialmente señalizador de éstas a nivel central. En este sentido, la modulación del metabolismo lipídico a nivel hipotalámico es capaz de regular tanto la ingesta, como la producción de glucosa y el gasto de energía (Obici *et al.*, 2003).

Señales gastrointestinales

Además de los nutrientes, varias señales gastrointestinales (GI) y hormonas secretadas por el estómago y el páncreas endocrino actúan en el SNC modulando la ingesta y el gasto energético.

Mecano y quimiorreceptores

Los mecano-receptores se activan por la distensión causada por la entrada de los alimentos al estómago y el intestino delgado proximal. Además, los quimiorreceptores responden a los productos de la digestión de los nutrientes (azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y péptidos). Las señales de estos receptores GI se transmiten a través de los nervios aferentes vagales a la parte posterior del cerebro donde la integración de esta información visceral se produce. De este modo, las propiedades físico-químicas de los alimentos pueden tener un papel importante en la regulación a corto plazo de la ingesta de alimentos.

Grelina

La grelina es un péptido de 28 AA secretado en su mayor parte por el estómago y en menor proporción por el intestino, el páncreas, el riñón, el hipotálamo y la hipófisis. Fue identificada por primera vez por su actividad secretagoga de hormona del crecimiento (Kojima *et al.*, 1999; Wren *et al.*, 2000). Se trata del único péptido natural acilado, con un grupo octanoil que es esencial para su bioactividad, ya que le permite la unión y la concomitante activación de su receptor, GHS-R, altamente expresado en el hipotálamo mediobasal (Nakazato *et al.*, 2001). Como también de la única hormona periférica con efecto orexigénico conocida hasta el día de hoy. Las concentraciones plasmáticas de grelina siguen un ciclo circadiano, siendo elevadas durante la situación preprandial y disminuyendo con la presencia de nutrientes en el estómago. Del mismo modo, se encuentra elevada en situaciones de equilibrio energético negativo como el ayuno o la anorexia nerviosa y disminuida en situaciones de equilibrio energético positivo como la obesidad. Cabe destacar que en sujetos obesos los niveles de grelina no disminuyen después de la ingesta, contribuyendo a una disfunción en la señalización de saciedad de los individuos obesos (Tschop *et al.*, 2001). La administración de grelina en ratas provoca un aumento de la ingesta y del peso a expensas de un incremento de la adiposidad y una reducción de la utilización de las grasas (Tschop *et al.*, 2000). Debido a que la grelina juega un papel importante en la regulación de la adiposidad, en ocasiones, es considerada como un regulador del balance energético a largo plazo.

Glucagón

El glucagón es una hormona polipeptídica segregada por las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino (Havel y Taborsky, 1989). Aunque la administración central o periférica de glucagón puede inhibir la ingesta en roedores (Shimizu *et al.*, 1993; Geary, 1997), su papel fisiológico a este nivel todavía no está bien establecido. Sin embargo, su papel a nivel periférico es bien conocido; su función es justamente la opuesta a la de la insulina. Ambas hormonas forman parte de un sistema de retroalimentación que mantiene los niveles de glucosa en sangre a una concentración estable (Ramnanan *et al.*, 2011). El glucagón se considera una hormona de respuesta al estrés, ya que es secretado cuando los niveles de glucosa plasmática son bajos, por estimulación de las catecolaminas, la hormona del crecimiento, los glucocorticoides y los receptores alfa adrenérgicos del sistema nervioso simpático (Pipeleers *et al.*, 1985). Cuando el glucagón es liberado a la sangre produce diversos efectos: en el hígado induce el catabolismo del glucógeno, a la vez que aumenta la gluconeogénesis (GNG) e inhibe la glucólisis, como la captación de AA para la GNG. También es un potente activador de la lipólisis en el tejido adiposo, favoreciendo un aumento plasmático de ácidos grasos y glicerol (Longuet *et al.*, 2008).

Otros

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (eje HHA) es un conjunto complejo de influencias directas e interacciones retroalimentadas entre el hipotálamo, región nuclear del cerebro que forma parte del diencefalo y se sitúa por debajo del tálamo, la glándula pituitaria, glándula endocrina situada en la fosa cerebral media que conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisiario y la glándula adrenal o suprarrenal, glándula pareada de forma piramidal localizada en la parte superior de los riñones (figura 2). Las interacciones homeostáticas entre estos tres órganos constituyen una parte esencial del sistema neuroendocrino que controla varios procesos vitales del organismo como la digestión, el sistema inmune, las emociones, la conducta sexual y el metabolismo energético.

Glucocorticoides y catecolaminas

Los glucocorticoides son hormonas de la familia de los corticosteroides producidos principalmente en la corteza suprarrenal. El cortisol, la cortisona y la corticosterona son hormonas catabólicas, estimulan la gluconeogénesis en el hígado y el riñón, de manera que elevan la glucemia. Tienen un cierto efecto antiinsulínico en muchos tejidos periféricos, lo que

colabora a aumentar la glucemia. Favorecen la degradación de proteínas y triglicéridos proporcionando así sustratos gluconeogénicos que colaboran a aumentar la glucemia. Además tienen efectos sobre otras hormonas, en este sentido, facilitan los efectos termogénicos y catabólicos de las catecolaminas.

Las catecolaminas, son un grupo de hormonas que incluyen la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, las cuales pueden ser producidas en la médula suprarrenal ejerciendo una función hormonal, o en las terminaciones nerviosas, por lo que se consideran también neurotransmisores. Las catecolaminas ejercen su efecto mediante la unión a los receptores adrenérgicos y dopaminérgicos, éstos tienen una gran diversidad de efectos ya que en cada tipo celular están acoplados a vías de transducción distintas. Sus funciones principales son aumentar la frecuencia cardíaca, la vasoconstricción, el flujo sanguíneo a músculo esquelético o el suministro de oxígeno al cerebro.

Eje somatotropo

Hormona del crecimiento: GH (del inglés, Growth Hormone)

La hormona del crecimiento o somatotropina es una hormona peptídica sintetizada, almacenada y secretada por las células somatótropas de la adenohipófisis. El control de la secreción es bastante complejo, siendo principalmente regulado por dos péptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de GH, GHRH, que estimula su liberación y la somatostatina que la inhibe (figura 2). No obstante, está bien establecido como otros neurotransmisores, hormonas y señales periféricas modulan la señalización hipotalámica o actúan directamente a nivel hipofisario. Como se ha comentado anteriormente, la grelina es una estimuladora de la secreción de hormona del crecimiento, por consiguiente, ésta muestra una elevación en sangre durante el ayuno (Hartman *et al.*, 1992) necesaria para llevar a cabo la adaptación del metabolismo intermediario durante el ayuno.

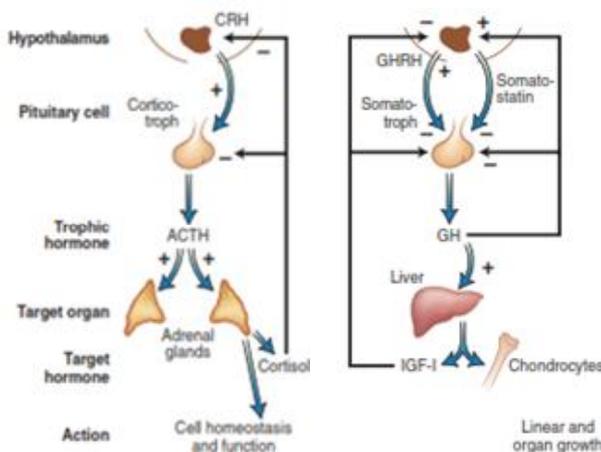


Figura 2. Ejes hipotálamo – hipofisarios: Eje adrenal (izquierda) y eje somatotropo (derecha).

SEÑALES A LARGO PLAZO

Hormonas

Insulina

Fue propuesto por primera vez por Woods y colaboradores que la insulina es un regulador a largo plazo de la ingesta, el balance energético y la adiposidad (Woods *et al.*, 1974). La secreción de insulina desde las células beta del páncreas endocrino es estimulada por la ingestión de alimentos, efecto mediado por la activación de los nervios parasimpáticos que inervan el páncreas y por el efecto directo de nutrientes entrantes, específicamente glucosa y aminoácidos. La grasa de la dieta no estimula la secreción de insulina, sin embargo, las concentraciones circulantes son proporcionales al contenido de grasa corporal (Havel *et al.*, 1999). Es conocido que el cerebro no es un órgano insulino-dependiente, sin embargo, se puso en evidencia que es claramente un órgano insulino-sensible (Baskin *et al.*, 1988). Cuando esto se combinó con el hecho que los receptores de insulina se concentran en áreas del cerebro involucradas en el control de la ingesta y la función autonómica, la insulina surgió como un candidato para la señalización central de la adiposidad y como regulador de la homeostasis energética (Schwartz *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1996). La administración central de insulina produce una pérdida de apetito mientras que la disminución selectiva de su receptor en el hipotálamo causa hiperfagia y resistencia sistémica a la insulina (Brüning *et al.*, 2000). Estos datos están en concordancia con la aparición de obesidad y resistencia a la insulina en dietas altas en grasa, ya que este tipo de dietas contribuyen a una menor secreción de insulina posprandial con una menor señalización central, que contribuye a hiperfagia y a un estado de hiperinsulinemia compensatorio crónico el cual conlleva a una mayor adiposidad corporal (Hill *et al.*, 1992; Shulman, 2000).

Leptina

Veinte años después de la “teoría lipostática” de Kennedy, los elegantes experimentos de parabiosis llevados a cabo por Coleman indicaron la existencia de un factor de saciedad circulante, proporcional a la cantidad de grasa corporal (Coleman, 1973). Este factor de saciedad (ausente en los ratones genéticamente obesos ob/ob) capaz de unirse a un receptor (ausente en los ratones diabéticos db/db) causaba la disminución de la ingesta y un aumento del gasto energético. Se especuló que ese factor ejercía su efecto en el hipotálamo ya que las ratas con lesiones en el núcleo ventromedial resultaron insensibles a él (hervey, 1959; Dube *et al.*, 1999). Veinte años después se descubrió que los ratones obesos sufrían un déficit de

leptina (ob/ob), mientras que los db/db presentaban una mutación en su receptor (Zhang *et al.*, 1994). La implicación de la leptina en el gasto energético surgió debido a que su administración causa una pérdida de peso mayor a lo que puede ser explicada solamente por una reducción en la ingesta de alimentos. Este incremento del gasto energético es mediado por la activación del sistema nervioso simpático (Collins *et al.*, 1996) acompañado de un incremento plasmático de noradrenalina (Haynes *et al.*, 1997) y la termogénesis (Scarpace *et al.*, 1997). El hecho que los niveles de leptina sean elevados en la gran mayoría de personas obesas ha llevado a la hipótesis de que los sujetos obesos son resistentes a la acción de esta hormona (Havel, 2000).

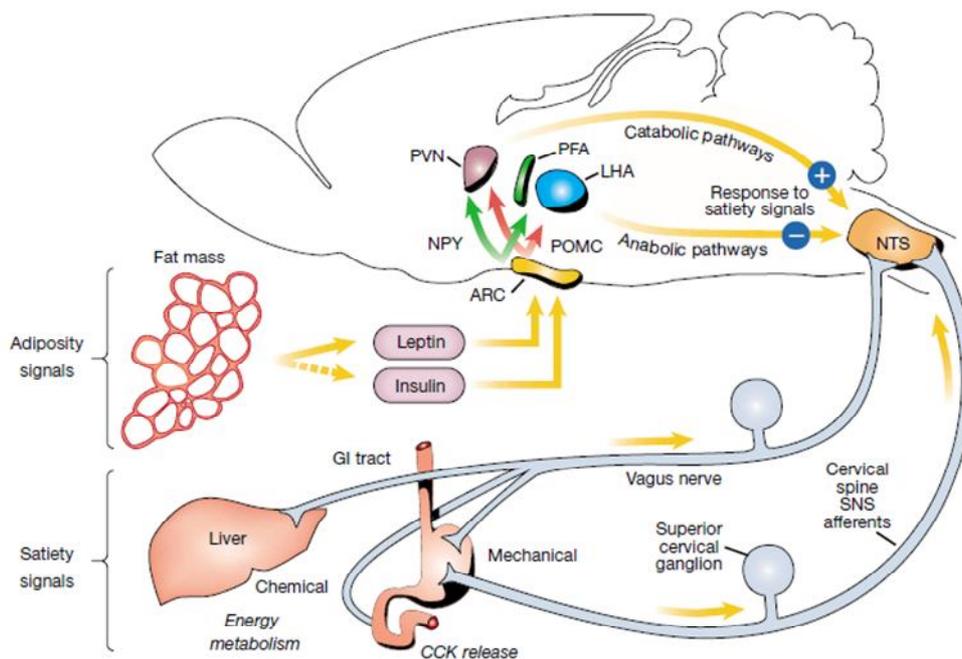


Figura 3. Modelo neuroanatómico de las vías de señalización de adiposidad y saciedad. Se propone que la leptina y la insulina para estimulan una vía catabólica (neuronas POMC/CART) e inhiben una vía anabólica (neuronas NPY / AGRP) que se origina en el núcleo arcuato (ARC). Estas vías son proyectadas a los núcleos PVN y LHA, donde conectan con las vías autonómicas centrales que se proyectan hacia los centros autonómicos del cerebro posterior que procesan las señales de saciedad. Las señales aferentes relacionadas con la saciedad desde el hígado y el tracto gastrointestinal se transmiten a través del nervio vago por fibras simpáticas al núcleo del tracto solitario (NTS), donde se integran junto con las señales hipotalámicas. La respuesta neta del NTS y otras regiones del cerebro posterior conducen a la supresión de la alimentación. Si se reducen las señales, se induce la ingesta mediante la reducción de las respuestas del tronco cerebral a las señales de saciedad (extraído de Schwartz *et al.*, 2010).

1.2. ADAPTACIÓN METABÓLICA DURANTE EL AYUNO

El ayuno se ha practicado durante miles de años, pero sólo recientemente los estudios han arrojado luz sobre su papel en las respuestas celulares adaptativas que reducen el daño oxidativo y la inflamación, optimizan la energía y el metabolismo reforzando la protección celular. En eucariotas inferiores, el ayuno crónico extiende la longevidad en parte mediante la reprogramación de las rutas metabólicas y una mayor resistencia al estrés (Longo *et al.*, 1997; Kaeberlein *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Longo *et al.*, 2012). En roedores, el ayuno intermitente o periódico protege contra la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la neurodegeneración (Fontana y Klein, 2007; Masoro, 2005), mientras que en los seres humanos ayuda a reducir la obesidad, la hipertensión, el asma y la artritis reumatoide (Fontana *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2007; Harvie *et al.*, 2011; Teng *et al.*, 2011). Por lo tanto, el ayuno tiene el potencial de retrasar el envejecimiento y ayuda a prevenir enfermedades.

RESPUESTA ADAPTATIVA AL AYUNO

Durante el ayuno el organismo consume las propias reservas (glúcidos: 300g = 1.200 Kcal., lípidos: 10 a 11kg = 100.000 Kcal., proteínas: 10kg = 45.000 Kcal.). Éste puede dividirse en dos fases distintas según sea la principal fuente de energía.

Primera fase

El combustible principal son los hidratos de carbono, primero se consume la glucosa circulante y después las reservas de glucógeno del hígado y el músculo. Entonces el organismo entra en hipoglucemia, la caída se debe a la depleción de glucógeno hepático y al retardo de la gluconeogénesis. Con la continuación del ayuno se producen varios mecanismos de compensación originados por el sistema nervioso central en respuesta al declive de la glucemia, con el fin de mantener los niveles mínimos de glucosa en sangre.

Segunda fase

La situación de hipoglucemia marca la entrada a la segunda fase del ayuno, caracterizada por el consumo de los lípidos. Será la propia hipoglucemia y la activación del sistema nervioso central que actuarán sobre el hipotálamo, las glándulas suprarrenales y el páncreas para adaptar el metabolismo de los principales órganos metabólicos: hígado, músculo y tejido adiposo.

A continuación se presenta una tabla donde se resumen los distintos procesos metabólicos que tienen lugar durante el ayuno (**Tabla 1**).

<i>Hormona/Péptido</i>	<i>Hígado</i>	<i>Músculo</i>	<i>Tejido adiposo</i>
Hormona del crecimiento	↓ Glucólisis ↑ Cetogénesis	↓ Glucólisis	↑ Lipólisis
Catecolaminas	↓ Acción insulina	↓ Captación de glucosa	↑ Lipólisis
Glucocorticoides	↑ Proteólisis ↑ Glucogenólisis ↑ Gluconeogénesis	↑ proteólisis ↑ Liberación de AA	
Glucagón	↑ Glucogenólisis ↑ Cetogénesis ↑ Proteólisis ↓ Glucólisis	↓ Glucólisis	↑ Lipólisis

Tabla 1. Principales procesos metabólicos de adaptación al ayuno

Seguidamente, se presenta organizado en cinco puntos, el resultado obtenido de los distintos cambios metabólicos producidos durante el ayuno. Para cada uno de ellos se describen más detalladamente las rutas del metabolismo intermediario implicadas, destacando los enzimas clave en cada una de ellas.

- 1) Se favorece la liberación de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo.

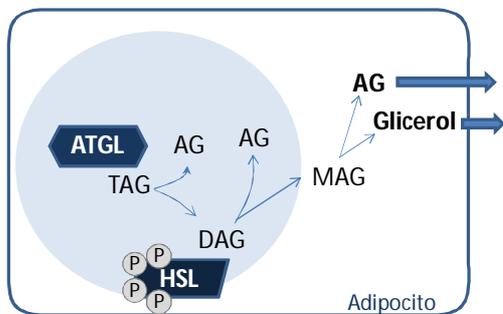


Figura 4. Lipólisis. Cuando se activa la lipólisis en el tejido adiposo, la **ATGL** (adipose triglyceride lipase), hidroliza los triglicéridos en diacilglicerol y un ácido graso. El diacilglicerol es hidrolizado por la **HSL** (Hormone-sensitive lipase) a glicerol y un ácido graso. Los productos de la hidrólisis de los triglicéridos (TAG), los ácidos grasos y el glicerol son exportados al torrente sanguíneo.

- 2) Se favorece la liberación de aminoácidos (glutamina y alanina) y metabolitos (lactato y piruvato) del músculo esquelético como sustratos de la gluconeogénesis hepática.

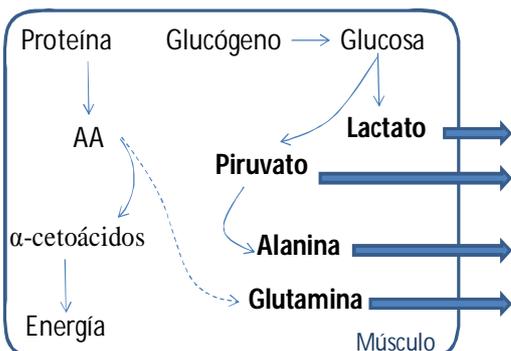


Figura 5. Ciclo de cori y ciclo de la alanina-glucosa. El glucógeno se degrada a glucosa y ésta a piruvato hasta lactato, el cual es exportado a la sangre para usarse como sustrato gluconeogénico en el hígado. El piruvato también puede formar alanina por transaminación del glutamato. Además, por desaminación/transaminación, se obtienen α -cetoácidos para la obtención de energía y glutamina, que junto el lactato, el piruvato y la alanina serán exportados como sustratos gluconeogénicos.

- 3) Se intensifica la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, metabolitos y glicerol (provenientes del músculo y del tejido adiposo, respectivamente) para suplir las necesidades mínimas de glucosa cerebrales.

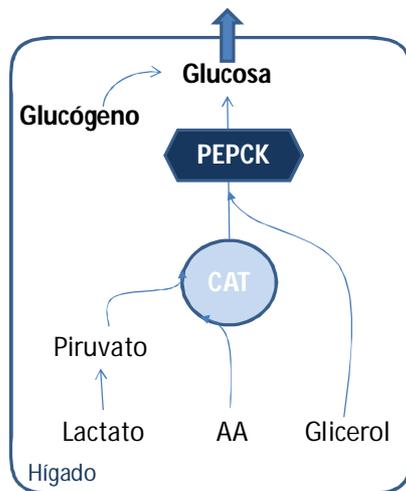


Figura 6. Gluconeogénesis. El hígado es el encargado de sintetizar la glucosa para mantener los niveles plasmáticos en situación de ayuno. Por un lado hidroliza las reservas de glucógeno hasta glucosa que será exportada a la sangre. Por otro lado usará los metabolitos provenientes de otros órganos para la gluconeogénesis, como el glicerol del tejido adiposo y los aminoácidos, el piruvato y el lactato del músculo. En la gluconeogénesis intervienen varios enzimas, sumamente regulados. La **PEPCK** (phosphoenol pyruvatecarboxykinase) cataliza la reacción de conversión de oxaloacetato a piruvato y es un marcador de la activación de la vía de la gluconeogénesis, junto con la fructosa 1,6-bifosfatasa y la glucosa 6-fosfatasa (no se muestran).

- 4) Se promueve la síntesis de cuerpos cetónicos (sintetizados en el hígado a partir también de los ácidos grasos del tejido adiposo) como sustrato energético.

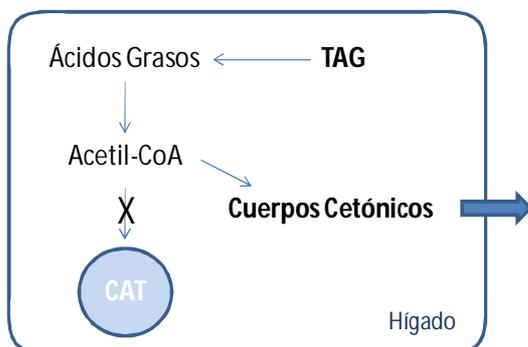


Figura 7. Cetogénesis. Debido a la inhibición de las vías lipogénicas y a la promoción de la lipólisis, los triglicéridos hepáticos son hidrolizados a ácidos grasos, que junto a los ácidos grasos del tejido adiposo son, oxidados produciendo grandes cantidades de acetil-CoA. Éste se acumula, en parte debido a la baja actividad del ciclo de los ácidos tricarbixílicos (CAT). Los cuerpos cetónicos se forman a partir de la condensación de 2 acetil-CoA. Su exportación es esencial para ser usados como sustrato energético por el cerebro.

- 5) Se promueve el metabolismo de los ácidos grasos (provenientes del tejido adiposo) como sustrato energético, frente al uso de carbohidratos en hígado y músculo.

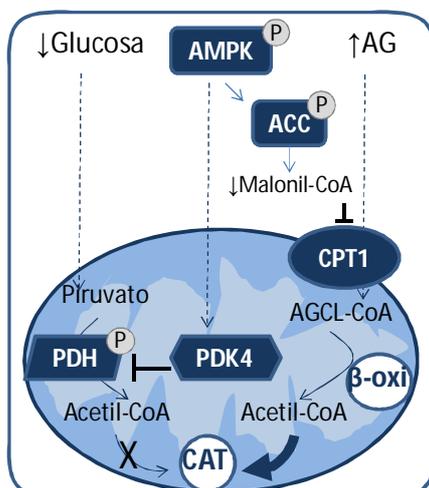


Figura 8. Cambio metabólico. La activación de **AMPK** (AMP-activated protein kinase) fosforila e inhibe a **ACC** (acetyl-CoA carboxylase), disminuyendo los niveles intracelulares de malonil-CoA y aliviando la inhibición que ejerce éste sobre **CPT1**, permitiendo de este modo la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos. Por otro lado, AMPK activa la transcripción de **PDK4** (pyruvate dehydrogenase kinase 4), la cual fosforila e inhibe a **PDH** (pyruvate dehydrogenase) parando la glucólisis a este nivel. Por lo tanto, los acetil-CoA que serán oxidados en el ciclo de los ácidos tricarbixílicos (CAT) para obtener energía provienen de los ácidos grasos, ahorrando así el piruvato para la gluconeogénesis. β -oxi: β -oxidación.

AYUNO Y CEREBRO

Además de sus acciones sobre los órganos endocrinos centrales y periféricos, el ayuno puede aumentar la actividad neuronal de las regiones del cerebro implicadas en la cognición, lo que resulta en una plasticidad sináptica mejorada y una mejor tolerancia al estrés (Rothman *et al.*, 2012). Una restricción calórica severa resulta en una disminución del tamaño de la mayoría de los órganos, excepto del cerebro y los testículos (Weindruch y Sohal, 1997). Desde una perspectiva evolutiva, esto implica que el mantenimiento de un alto nivel de la función cognitiva en condiciones de escasez de alimentos es de importancia preeminente. De hecho, un rasgo de comportamiento altamente conservado de todos los mamíferos es estar activo cuando se tiene hambre y sedentario cuando saciado. En roedores, alternando días de alimentación y ayuno pueden mejorar la función cerebral, como se indica por las mejoras en el rendimiento en pruebas de comportamiento de la función sensitiva y motora (Singh *et al.*, 2012) y el aprendizaje y la memoria (Fontan-Lozano *et al.*, 2007). Las respuestas de comportamiento al ayuno intermitente se asocian con un aumento de la plasticidad sináptica y aumento de la producción de nuevas neuronas a partir de células madre neurales (Lee *et al.*, 2002).

1.3. ADAPTACIÓN METABÓLICA AL TORPOR

El torpor se ha definido como un estado fisiológico temporal caracterizado por un descenso controlado de la tasa metabólica, la temperatura corporal (T_c) y la actividad física (Geiser, 1988). A nivel molecular se ha definido el torpor como el cambio en el consumo de carbohidratos como combustible energético hacia el consumo de lípidos (Heldmaier *et al.*, 1999). El torpor es reconocido como una adaptación de gran éxito que diversos mamíferos utilizan para hacer frente a los períodos de baja disponibilidad de alimentos. Asimismo, la capacidad de mantener la temperatura corporal constante ha contribuido en el éxito evolutivo de los mamíferos (Geiser, 2004). Sin embargo, los mecanismos que integran los cambios ambientales, fisiológicos y moleculares asociados al torpor son en gran parte desconocidos. Descubrimientos revisados recientemente demuestran una conexión entre el estado nutritivo y la maquinaria molecular circadiana (Rutter *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2013). Los ritmos circadianos son mecanismos moleculares que confieren la ventaja selectiva de la anticipación, permitiendo de ese modo a la célula / órgano / organismo prepararse para un estímulo extracelular antes de su inicio (Edery, 2000; Takahashi *et al.*, 2008).

El reloj circadiano central se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, así el SCN ofrece una “hora oficial” para todos los relojes de los tejidos periféricos (Figura 9). En modelos experimentales, la interrupción del reloj central conduce a trastornos en el metabolismo periférico de nutrientes, lo que confirma y apoya la hipótesis propuesta por McKnight que los ciclos circadianos están íntimamente interconectados con los ciclos metabólicos (Rutter *et al.*, 2002). Además, se ha visto como varios genes del reloj regulan directamente la homeostasis energética (Zhang *et al.*, 2010; Schmutz *et al.*, 2010), lo que sugiere que estas proteínas han evolucionado de manera convergente en la regulación de ambos procesos. Del mismo modo, señaladores del estado metabólico celular regulan directamente los genes del reloj, especialmente se ha descrito el papel de SIRT1 (Asher *et al.*, 2008; Nakahata *et al.*, 2008) y AMPK (Takahashi *et al.*, 2008; Lamia *et al.*, 2009). Como también se ha sugerido el papel de los esfingolípidos y en especial de las ceramidas en este proceso (Melvin y Andrews, 2009), al ser los lípidos el principal sustrato circulante durante la situación de torpor.

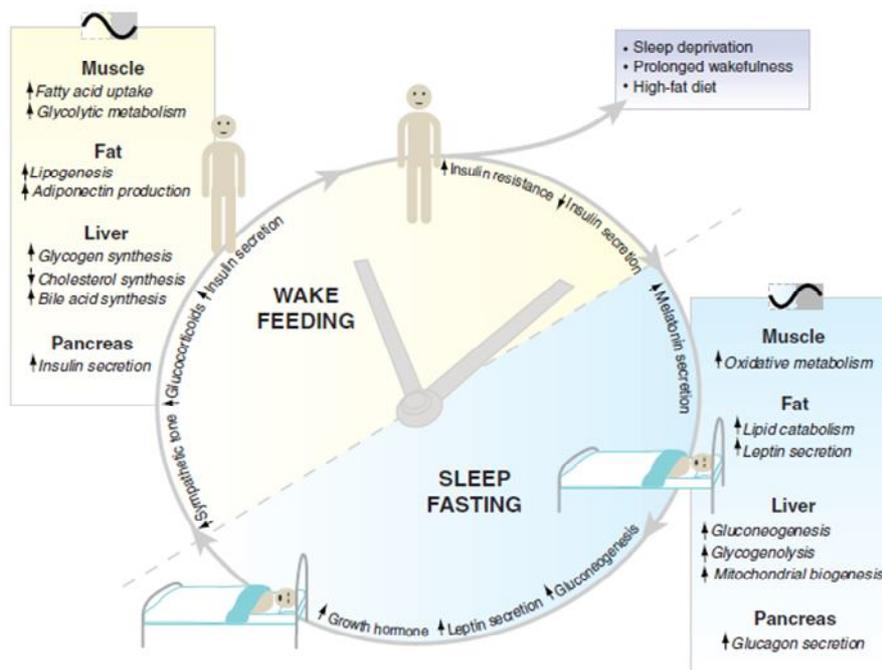


Figura 9. Procesos conductuales y metabólicos circadianos según el momento del día. El reloj coordina las respuestas metabólicas apropiadas dentro de los tejidos periféricos con el ciclo de luz/oscuridad. El correcto funcionamiento de los relojes periféricos mantiene procesos metabólicos en sincronía con el medio ambiente, que es fundamental para mantener la salud del organismo. Contrariamente, la perturbación del reloj en ciertos tejidos causará efectos negativos en la función metabólica alterando la respuesta adecuada según la disponibilidad de nutrientes (extraído de Bass y Takahashi, 2010).

2. REGULACIÓN CENTRAL DEL BALANCE ENERGÉTICO

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el papel integrador del SNC es crucial en el mantenimiento de la homeostasis energética. El hipotálamo y el tronco del encéfalo son las partes encargadas del control de estos procesos (Rinaman *et al.*, 1998; Schwartz, 2000). Ambas regiones se encuentran íntimamente ligados a través de conexiones neuronales, lo que permite integrar todas las señales recibidas. Éstas son tanto de tipo neural como humoral. Las primeras consisten en fibras del nervio vago aferentes que provienen principalmente del hígado y del TGI y desembocan en el tronco del encéfalo, las segundas incluyen péptidos, hormonas y metabolitos circulantes que ejercen su función principalmente en el hipotálamo. Recientemente sin embargo, han surgido interesantes evidencias sobre el papel del hipocampo (región cerebral perteneciente al sistema límbico, conocida hasta ahora por su participación en procesos de memoria y aprendizaje) en la regulación del peso y la ingesta (Davidson *et al.*, 2007). Véase la distribución anatómica de las distintas partes del cerebro en la figura 10.

A lo largo de este apartado se detallan las principales características del hipotálamo y los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la homeostasis energética.

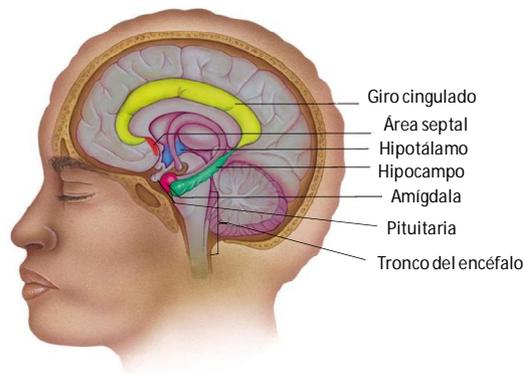


Figura 10. Representación de las macroestructuras del cerebro humano involucradas en el sistema límbico y la regulación de la homeostasis energética.

2.1. HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una pequeña parte del SNC, del tamaño de una almendra en humanos, situada debajo del tálamo, justo por encima del tronco cerebral, formando una parte muy importante del diencefalo. El hipotálamo es responsable de la regulación de

procesos metabólicos y de otras funciones del sistema nervioso autónomo: segrega y sintetiza neurohormonas, controla la temperatura corporal y otros comportamientos vitales para la supervivencia como el apetito y la sed, la presión sanguínea, el sueño y los ritmos circadianos. Es una estructura compuesta por distintos núcleos bien definidos anatómicamente y funcionalmente (figura 11) así como de otros grupos de neuronas menos distinguidos anatómicamente, todos conectados entre sí y con otras regiones cerebrales.

El papel del hipotálamo en la regulación de la homeostasis energética fue revelado hace más de setenta años atrás, cuando se demostró que lesiones en el hipotálamo ventromedial producían hiperfagia y obesidad (Hetherington y Ranson, 1942). Mientras que las lesiones en el hipotálamo lateral causan reducción de la ingesta y pérdida de peso (Anand y Brobeck, 1951), las lesiones en el núcleo paraventricular y arcuato causan el efecto contrario (Olney y Sharpe, 1969). Posteriormente, la investigación en este campo se centró especialmente en el hipotálamo mediobasal (MBH), que comprende los núcleos arcuato y ventromedial, como centros ampliamente reconocidos en la regulación de la ingesta y el gasto energético.

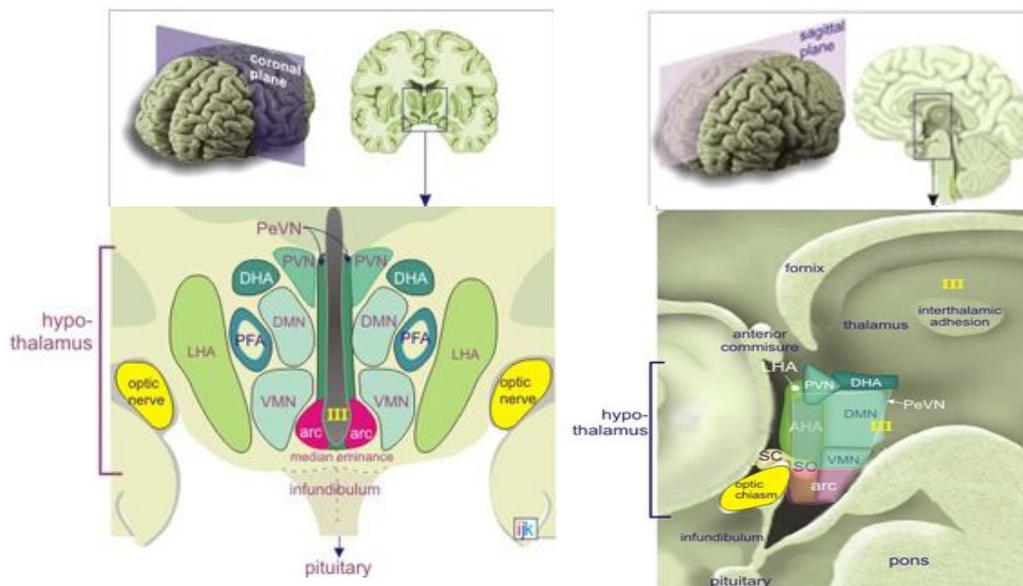


Figura 11. Localización y estructura anatómica del hipotálamo. Esquema de un corte coronal (izquierda) y sagital (derecha) de cerebro humano en el que se señala el tálamo y el hipotálamo. Abajo se muestra un esquema de la disposición relativa de los núcleos que conforman el hipotálamo. **PVN:** núcleo paraventricular, **DHA:** área dorsal hipotalámica, **DMN:** núcleo dorsomedial, **PFA:** núcleo paraforinacular, **VMN:** núcleo ventromedial, **ARC:** núcleo arcuato, **LHA:** área lateral hipotalámica. **PeVN:** núcleo periventricular, **SC:** núcleo supraquiasmático.

NÚCLEOS DEL HIPOTÁLAMO MEDIOBASAL

Núcleo arcuato (ARC)

El núcleo arcuato se encuentra por debajo del VMN, a ambos lados del tercer ventrículo e inmediatamente adyacente a la eminencia media (ME), caracterizada por poseer una red de capilares fenestrados, creando una barrera hematoencefálica semipermeable. Por lo tanto el ARC está estratégicamente colocado para detectar las fluctuaciones hormonales y nutritivas del torrente sanguíneo (Broadwell y Brightman, 1976). En el ARC se encuentran dos grandes poblaciones de neuronas que controlan el apetito y el gasto de energía: 1) un subconjunto de neuronas que co-expresan los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP y 2) otro subconjunto neuronal co-expresa los neuropéptidos anorexigénicos POMC, CART y α -MSH, producto del procesamiento de POMC.

Estas dos poblaciones de neuronas junto con otro conjunto de neuronas corriente abajo que expresan los receptores de melanocortina MC4R y MC3R, constituyen el sistema central de las melanocortinas. Este circuito neuronal es crucial para la detección y la integración de señales periféricas que permiten un control preciso de la ingesta de alimentos y el gasto energético (Farooqi *et al.*, 2003) (figura 12). Por ejemplo, los receptores de grelina se localizan en un 90% en las neuronas AgRP (Willesen *et al.*, 1999), mientras que las neuronas POMC expresan abundantemente el receptor de leptina (Gautron y Elmquist, 2011). Aún más, recientemente se ha descrito que el ARC es capaz de regular la termogénesis en el tejido adiposo marrón. En este sentido, la activación de la población orexigénica resulta en una disminución de la termogénesis (Shi *et al.*, 2013), frente al incremento inducido por la población anorexigénica (Kong *et al.*, 2003).

Núcleo ventromedial (VMN)

El núcleo ventromedial es considerado el mayor núcleo integrador de información tanto periférica como central, contiene un gran número de receptores de neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas, asimismo como neuronas sensibles a nutrientes (Kang *et al.*, 2004). Además de recibir conexiones neurales provenientes del ARC, el VMN a su vez emite proyecciones axonales hacia otras zonas hipotalámicas (PVH, DMH, ARC y LHA), extrahipotalámicas (tronco del encéfalo y amígdala, entre otras) y señales eferentes vía sistema nervioso simpático (King, 2006; López y Lelliot, 2007). De este modo, ejerce una regulación precisa tanto del apetito como del metabolismo de los tejidos periféricos.

Estudios génicos han identificado una serie de genes enriquecidos en las neuronas del VMN (Segal *et al.*, 2005) incluyendo SF-1, que ha sido relacionado directamente con el desarrollo del VMN (Parker *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2004). Las neuronas que expresan SF-1 juegan un papel importante en el control del balance energético, demostrado por los fenotipos metabólicos de ratones transgénicos (Bingham *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Otra proteína expresada abundantemente en el VMN es BDNF. La falta de BDNF o de su receptor (TRKB) conduce a hiperfagia y obesidad en seres humanos y ratones (Lyons *et al.*, 1999; Yeo *et al.*, 2004). Contrariamente, la administración central o periférica de BDNF resulta en pérdida de peso corporal y en la reducción de la ingesta a través de la señalización de MC4R (Xu *et al.*, 2003). El VMN también juega un papel clave en la regulación de la termogénesis (López *et al.*, 2010; Whittle *et al.*, 2012).

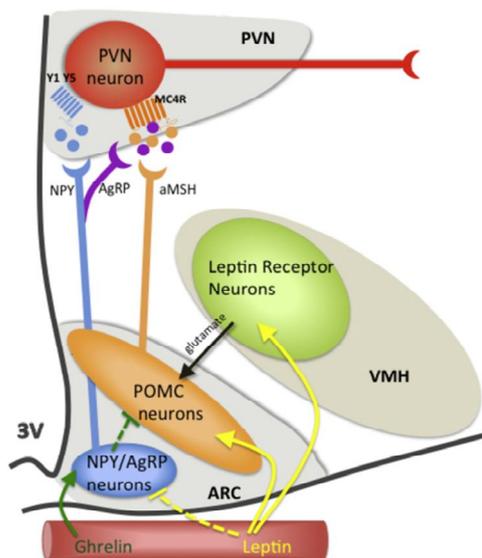


Figura 12. Neurocircuitos del MBH. En el ARC, las neuronas NPY/AgRP son activadas por grelina y silenciadas por leptina. Además, las neuronas NPY/AgRP inhiben las neuronas POMC, conduciendo a un efecto orexigénico neto. La leptina suprime la ingesta, activando directamente las neuronas POMC e indirectamente mediante los receptores de leptina del VMH, los cuales activan las neuronas POMC mediante emisiones excitatorias glutamatérgicas. En el PVH, el péptido anorexigénico α -MSH activa los receptores MC4R para suprimir la ingesta. Mientras que el neuropéptido NPY activa los receptores Y1 e Y5, y AgRP actúa como antagonista de MC4R por tal de inducir la ingesta. (modificado de Stark *et al.*, 2012).

DETECCIÓN HIPOTALÁMICA DEL ESTADO NUTRITIVO Y ENERGÉTICO DEL ORGANISMO

Investigaciones recientes indican que: 1) la detección de nutrientes hipotalámica está alterada en modelos de animales obesos (Parton *et al.*, 2007), 2) la perturbación de la detección de nutrientes en el hipotálamo induce obesidad y desregulación de la homeostasis de la glucosa (He *et al.*, 2006), y 3) la restauración de la detección de nutrientes hipotalámica normaliza la ingesta de alimentos, el balance de energía y la homeostasis de la glucosa en ratas sobrealimentadas (Pocai *et al.*, 2006). Subrayando la relevancia de este fenómeno en la regulación del balance energético y la fisiopatología de la obesidad y las enfermedades metabólicas.

Seguidamente se especifican los estudios más relevantes sobre la caracterización molecular y neurofisiológica de la detección de nutrientes (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) y del papel crítico que desempeñan los principales sensores energéticos intracelulares (AMPK, SIRT y mTOR) en las cascadas de señalización a nivel hipotalámico en respuesta al estado nutritivo y energético del organismo (figura 14).

Detección de nutrientes

Glucosa

Dos tipos de neuronas sensibles a glucosa han sido descritas en el hipotálamo dependiendo del efecto causado por la variación en la concentración de glucosa: las neuronas gluco-excitadas (GE) que aumentan su tasa de disparo con la elevación de la concentración de glucosa, abundantes en el hipotálamo lateral y las neuronas gluco-inhibidas (GI) activadas por una baja concentración de glucosa, más abundantes en el VMN (Oomura y Yoshimatsu, 1984). En el ARC, las neuronas POMC actúan como GE y las neuronas NPY actúan como GI (Ibrahim *et al.*, 2003; Muroya *et al.*, 1999). Además, varios estudios muestran un papel crítico en la detección de glucosa en el cerebro del transportador de glucosa (GLUT2) y la enzima glucoquinasa, expresados en varios tipos de neuronas (Thorens, 2008). Por último, niveles altos de glucosa son capaces de reducir la actividad de AMPK tanto en neuronas POMC como NPY independientemente de la señalización de insulina y leptina (Claret *et al.*, 2007).

Ácidos grasos

El cerebro no utiliza los ácidos grasos como fuente importante de combustible, sino que obtiene la mayor parte de su ATP de la oxidación de la glucosa en el estado alimentado (Sokoloff *et al.*, 1977). A pesar de esto, los niveles de ácidos grasos y, más concretamente, de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) en el cerebro están íntimamente involucrados en la homeostasis energética. Inicialmente, se demostró que la administración central de ácido oleico reduce la ingesta de alimentos y el peso corporal (Obici *et al.*, 2002), desde entonces cada vez hay más evidencias de que el metabolismo de los ácidos grasos dentro de las distintas regiones hipotalámicas pueden actuar como un sensor de la disponibilidad de nutrientes (Lopez y Vidal-Puig, 2008; Jo *et al.*, 2009; Le Foll *et al.*, 2009; Lam y Schwartz, 2005).

Cabe destacar que los AGCL cruzan la barrera hematoencefálica por difusión simple, por lo que el acceso de ácidos grasos libres circulantes al SNC es proporcional a la concentración plasmática de ácidos grasos (Miller y Gnaedinger, 1987; Rapoport, 1996). De acuerdo con esta premisa, evidencias farmacológicas y genéticas han demostrado que tanto

los niveles de metabolitos como de las actividades de las enzimas intermediarias del metabolismo lipídico participan en la modulación de la alimentación y el gasto energético (Wolfgang y Lane, 2006). De este modo, tanto el malonil-CoA como los AGCL-CoA han sido propuestos como señales de saciedad y de abundancia energética corporal, los cuales aumentan sus niveles hipotalámicos en situación de alimentación y disminuyen en el ayuno.

Malonil-CoA es sustrato de la enzima ácido graso sintasa (FAS: fatty acid synthase) para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, resultante de la carboxilación de un acetil-CoA proveniente de la oxidación de la glucosa. Esta reacción es llevada a cabo por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y es revertida por la malonil-CoA decarboxilasa (MCD). La modulación de la actividad de estos tres enzimas y de la concentración intracelular de malonil-CoA está estrechamente relacionada con la modulación de la homeostasis energética (Loftus *et al.*, 2000; Mobbs y Makimura, 2002; Hu *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2008). Asimismo, el principal regulador de ACC es AMPK (Kudo *et al.*, 1995), emergiendo como regulador crítico de los niveles de malonil-CoA y sus efectos (detallado en la sección: sensores energéticos; AMPK).

Por otro lado, malonil-CoA es un inhibidor fisiológico de las enzimas carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) (McGarry y Brown, 1997), enzima que cataliza la entrada de los AGCL-CoA desde el citosol a la mitocondria, convirtiéndose en el principal regulador de la β -oxidación. Por consiguiente, en estado de alimentación, los altos niveles de malonil-CoA están inhibiendo CPT1 y colaborando en el incremento de AGCL-CoA intracelulares en esta situación. Sin embargo, el declive de malonil-CoA durante el ayuno, aliviaría la inhibición de CPT1 favoreciendo un descenso de los niveles de AGCL-CoA hipotalámicos. En este sentido, varios estudios sostienen que son los AGCL-CoA la señal reguladora de la homeostasis energética. Por un lado Obici y colaboradores demostraron que la administración central de ácido oleico se traduce en una disminución de la ingesta y de la producción hepática de glucosa (Obici *et al.*, 2002). Por otro lado demostraron que la inhibición genética y farmacológica de CPT1 en el hipotálamo causa un aumento de los niveles de AGCL-CoA que se traducía de nuevo en una disminución de la ingesta y de la GNG hepática (Obici *et al.*, 2003). Un trabajo publicado posteriormente observó que la sobre-expresión de MCD en el hipotálamo de ratas adultas causaba hiperfagia y aumento de peso, junto con una mayor producción hepática de glucosa (Hu *et al.*, 2005). Este estudio demostró que la disminución de malonil-CoA causa una reducción paralela de AGCL-CoA, sugiriendo que el efecto de la modulación de malonil-CoA se basa en su acción sobre CPT1 y la consiguiente modulación de AGCL-CoA (figura 13).

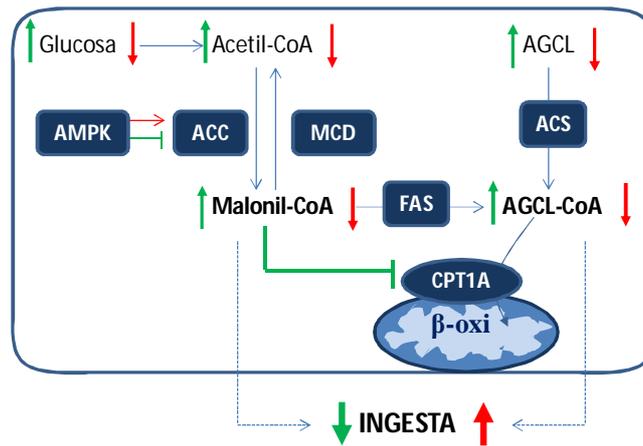


Figura 13. Metabolismo lipídico hipotalámico implicado en la regulación de la ingesta. Representación de los principales enzimas y metabolitos implicados en el metabolismo lipídico hipotalámico y su modulación en función del estado alimentario. Estado alimentado (flechas verdes), déficit alimentario (flechas rojas). La modulación del metabolismo lipídico hipotalámico, en última instancia regula la ingesta. La cual disminuye en respuesta al estado alimentado e incrementa cuando hay un déficit alimentario. β -oxi: β -oxidación.

Aminoácidos

Por último, datos recientes demuestran que las neuronas del ARC también pueden detectar los cambios en la disponibilidad de aminoácidos, e implicar esta detección en la regulación del balance energético. La administración de leucina en el MBH reduce la ingesta de alimentos, tanto a través de una reducción rápida del tamaño de la comida como de una reducción a más largo plazo del número de comidas, lo que conduce a una reducción en la ganancia de peso corporal. Estos efectos conductuales están apoyados mediante datos electrofisiológicos que muestran cómo el aumento de la disponibilidad de leucina despolariza las neuronas POMC del ARC (Blouet *et al.*, 2009).

El primer candidato molecular sugerido para la detección neuronal de aminoácidos fue mTORC1, cuando se evidenció que la inhibición farmacológica de mTORC1 mitigaba la anorexia y la pérdida de peso inducidas por la administración icv de leucina (Cota *et al.*, 2006). El papel de mTORC1 como efector en el control del comportamiento alimentario y del balance de energía se profundiza más abajo en el texto (Sensores energéticos; mTOR).

El producto final del catabolismo de leucina es acetil-CoA, precursor de malonil-CoA. Por lo tanto, la disponibilidad de aminoácidos podría representar otro nutriente de entrada en el *pool* de malonil-CoA intracelular.

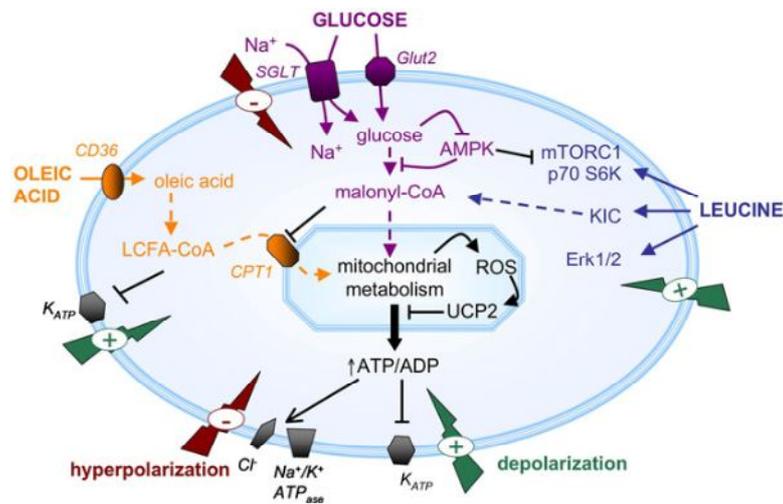


Figura 14. Mecanismos intracelulares implicados en la detección hipotalámica de nutrientes. Esta figura representa los principales mecanismos descritos para la detección hipotalámica de nutrientes con independencia de la identidad neurofisiológica de la célula. En ella se muestran elementos importantes del proceso como los transportadores de nutrientes y las enzimas reguladoras e intermediarias del metabolismo de éstos, que en última instancia causan la activación o represión de la frecuencia de despolarización neuronal. (Extraído de Blouet y Schwartz, 2010).

Sensores energéticos

AMPK

AMPK es una proteína serina/treonina quinasa compuesta por una subunidad catalítica (α) y dos subunidades reguladoras (β y γ). Es un componente de la señalización de una cascada de quinasas que actúa como indicador del estado energético celular, siendo activado por una alta proporción AMP/ATP. La activación de AMPK se produce por fosforilación en Thr172 de la subunidad α , catalizada por LKB1 o por CaMKK α y β , y alostéricamente por AMP (Kahn *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2007). En general, la activación de AMPK resulta en la represión de procesos anabólicos que consumen ATP (tales como la síntesis de ácidos grasos, colesterol, glucógeno y proteínas) y la inducción de procesos catabólicos generadores de ATP (tales como la captación de ácidos grasos y glucosa y su oxidación), para mantener las reservas de energía celulares (Hardie, 2004).

Tal y como se ha comentado anteriormente, el papel de la modulación del metabolismo intracelular en la detección de nutrientes a nivel hipotalámico es un modelo ampliamente difundido. En este modelo, la producción de ATP y los cambios asociados en la proporción ADP/ATP son considerados como las principales señales metabólicas de la disponibilidad de nutrientes. Por consiguiente, este modelo unificador explicaría la detección neuronal de los 3 macronutrientes. En consonancia con todo ello, la activación de AMPK en

respuesta a un aumento en la relación AMP/ATP fue implicada en la detección neuronal de nutrientes y la regulación del balance energético en ARC (Minokoshi *et al.*, 2004). En este estudio se destaca además que no sólo el metabolismo de nutrientes es capaz de modular la actividad de AMPK, sino que también existe una regulación hormonal de la actividad de AMPK en MBH (figura 15).

Por lo tanto, AMPK se sitúa como centro integrador entre la señalización hormonal y el metabolismo de nutrientes intracelular (Kahn *et al.*, 2005; Sanders *et al.*, 2007). Entre los estímulos que activan AMPK en el hipotálamo se encuentran el ayuno, la hipoglucemia, la hormona grelina, los glucocorticoides y el neuropéptido AgRP. Sin embargo, la alimentación, la hiperglucemia, las hormonas insulina y leptina y los agonistas de los receptores de las melanocortinas tienen el efecto opuesto, inhibiendo AMPK (Lage *et al.*, 2008). Entre los efectos más relevantes de la modulación de la actividad AMPK hipotalámica, destaca su papel en la regulación de la ingesta (Stark *et al.*, 2012), el gasto energético (Canto *et al.*, 2009), la homeostasis de la glucosa o la regulación de la termogénesis (Whittle *et al.*, 2012).

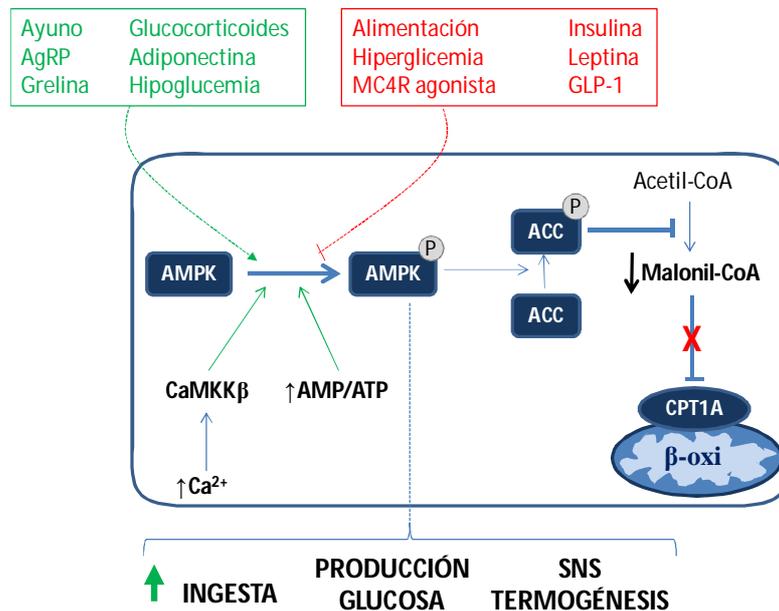


Figura 15. AMPK en el hipotálamo regula la ingesta, la homeostasis de la glucosa y la termogénesis. AMPK es un importante sensor energético celular que responde a múltiples señales nutricionales, hormonales y metabólicas. La modulación de la actividad AMPK en el hipotálamo regula procesos necesarios para producir una adaptación metabólica adecuada y mantener la homeostasis energética.

SIRT1

Las sirtuinas son desacetilasas dependientes NAD^+ altamente conservadas entre especies (Brachmann *et al.*, 1995). SIRT1 es el ortólogo de mamífero de Sir2 más evolucionado, por lo que ha sido objeto de intenso estudio, una gran cantidad de datos demuestran que las sirtuinas son un sensor metabólico que directamente acopla el estado metabólico celular a la regulación de la expresión génica (mediante la desacetilación de histonas y de factores de transcripción). Como desacetilasa, SIRT1 posee una amplia gama de sustratos proteicos (Haigis y Sinclair, 2010; Li y Kazgan, 2011) y en respuesta a ciertos estímulos es transportado del citosol al núcleo (Tanno *et al.*, 2007), pero a pesar de la diversidad de sustratos y localizaciones subcelulares, la actividad de SIRT1 está estrechamente controlada por los niveles celulares de NAD^+ . NAD^+ es una coenzima esencial presente en todas las células vivas, en el metabolismo está involucrado en las reacciones redox a través de la transferencia de electrones, en la que puede cambiar fácilmente de oxidante (NAD^+) a reductor (NADH) y viceversa. Por lo tanto, NAD^+ y NADH son ampliamente utilizados en una serie de reacciones metabólicas y los niveles celulares de NAD^+ son un indicador importante del estado energético celular.

Se ha demostrado que un estado de baja energía que aumenta los niveles celulares de NAD^+ , como el ayuno, la restricción calórica (RC) o AMPK, estimulan la actividad de SIRT1 (Rodgers *et al.*, 2005; Cantó *et al.*, 2009 y 2010). Sin embargo, un estado de abundancia energética que disminuye los niveles de NAD^+ celulares, incluyendo la alimentación, las dietas altas en grasas y las respuestas inflamatorias agudas, reducen la actividad de SIRT1 (Kendrick *et al.*, 2011; Yoshino *et al.*, 2011) (figura 16). Por otro lado, SIRT1 ha sido implicado en la longevidad inducida por restricción calórica (Lin *et al.*, 2000; Tissenbaum y Guarente, 2001; Cohen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Estas evidencias muestran varias similitudes entre la acción de las sirtuinas y la restricción calórica a nivel global del organismo, sugiriendo la posibilidad de que las sirtuinas pueden ejercer su efecto, al menos en parte, sobre los circuitos cerebrales que controlan el balance de energía.

SIRT1 se expresa en hipotálamo y solamente en esta área cerebral incrementa su expresión en respuesta al ayuno (Ramadori *et al.*, 2008), sin embargo esta inducción no se da en ratones obesos y deficientes de leptina (*ob/ob*). Estos hallazgos sugieren que SIRT1 en el cerebro puede funcionar como un enlace entre el hipotálamo y el estado metabólico de los animales. De hecho, así fue corroborado posteriormente: los ratones que carecen de SIRT1 en el SNC muestran defectos en la señalización celular en la pituitaria y son incapaces de mediar cambios en la actividad física en respuesta a la RC (Cohen *et al.*, 2009), mientras que los

ratones transgénicos de SIRT1 específicos de cerebro muestran una mayor actividad neuronal en el hipotálamo (Sato *et al.*, 2010). Además, la señalización y el efecto orexigénico de la grelina también se encuentran abolidos en ausencia de actividad SIRT1 (Velásquez *et al.*, 2011).

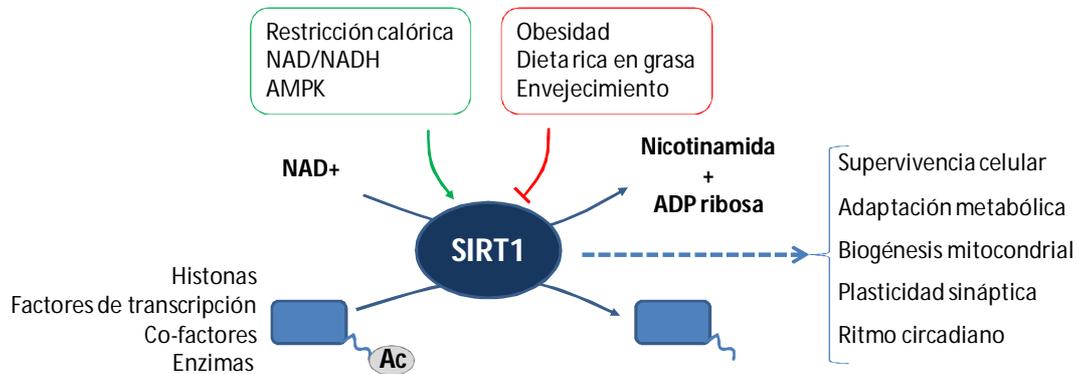


Figura 16. Actividad, regulación y funciones de SIRT1. Se muestran los principales activadores y represores de SIRT1 a nivel hipotalámico. Como la actividad desacetilasa dependiente de NAD que ejerce sobre sus efectores diana y la repercusión funcional que desencadena la activación de SIRT1 en el hipotálamo.

mTOR

La diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) es una serina-treonina quinasa conservada evolutivamente que actúa como un sensor celular de los cambios en el balance de energía, factores de crecimiento y nutrientes (Wulschleger *et al.*, 2006). mTOR es un componente de al menos dos complejos de proteínas: complejo mTOR 1 (mTORC1) y complejo mTOR 2 (mTORC2). En general, mTOR integra vías de señalización de nutrientes con señales hormonales para controlar el crecimiento y la proliferación celular (Sabatini *et al.*, 1994; Schmelzle y Hall, 2000). Cuando mTOR es activado, esencialmente estimula la síntesis de proteína e inhibe la autofagia (Jacinto y Hall, 2003). El hecho de que AMPK sea capaz de fosforilar y activar un inhibidor de la actividad de mTOR, TSC1 (del inglés, *tuberous sclerosis 1*), proporciona un mecanismo potencial por el cual la disminución de los niveles energéticos celulares inhiban rápidamente los efectos de mTOR (Inoki *et al.*, 2003).

A nivel central, recientemente se ha demostrado que la señalización de mTOR en el hipotálamo desempeña un papel importante en la modulación del balance de energía respondiendo a la disponibilidad de nutrientes y la situación hormonal (Cota *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2008; Blouet *et al.*, 2008; Ropelle *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2010). Estos estudios reflejan que mTOR se expresa en hipotálamo y sobretodo en ARC, que en esta región

responde a los cambios alimentarios y regula la ingesta, como el gasto energético y confiere resistencia al frío, que es un mediador de la señalización de leptina y protector frente a dietas inductoras de obesidad, aunque la continuidad de estas dietas a largo plazo causa desensibilización de mTOR reduciendo sus efectos, contribuyendo a la resistencia a leptina y al aumento de peso observado en este tipo de dietas (figura 17).

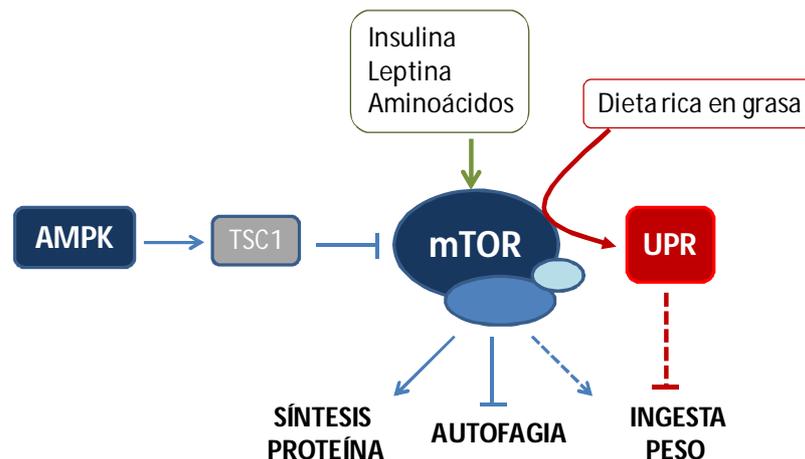


Figura 17. Regulación y funciones de mTOR en el hipotálamo. mTOR es un sensor nutricional que responde a señales hormonales y al estado energético celular, activándose en situación de abundancia energética. Una activación crónica de mTOR contribuye a la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y la resistencia a señales hormonales como leptina, contribuyendo al fenotipo hiperfágico y obeso propio de la obesidad inducida por una alimentación alta en grasa.

2.2. METABOLISMO MITOCONDRIAL HIPOTALÁMICO

El papel de las mitocondrias como una fuente de energía celular está bien establecido sin embargo, la contribución de estos orgánulos a otras funciones celulares es cada vez más evidente (Horvath *et al.*, 2009; Jaillard *et al.*, 2009; Leloup *et al.*, 2009). En los últimos años, se ha visto que la elevada producción de ROS causa la disfunción y la muerte celular, mientras que niveles normales de ROS producidos en las mitocondrias son necesarios como sensor fisiológico vital para la detección hipotalámica de glucosa y ácidos grasos (Leloup *et al.*, 2006).

Sólo recientemente, algunos estudios han comenzado a explorar el papel de ROS específicamente en neuronas del ARC (Benani *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2009). Estos estudios argumentan que la generación de ROS no es simplemente un subproducto de la oxidación de sustratos, sino que tienen un papel crucial en la regulación de las respuestas neuronales dependiente del metabolismo de nutrientes. Así, se ha evidenciado que la utilización diferencial de combustible por las neuronas POMC y NPY es responsable de las distintas

respuestas según la situación metabólica. Por ejemplo, la activación de las neuronas NPY/AgRP durante un balance energético negativo, en parte mediado por el eje grelina – AMPK – CPT1 (López *et al.*, 2008), el cual favorece la β -oxidación de ácidos grasos, los niveles de ROS no aumentan en estas células ya que son tamponados por UCP2. La inducción de la expresión y la actividad de UCP2 es crucial para la señalización central de grelina, en cuanto es necesaria para mantener la β -oxidación y la producción de energía necesarias para una estimulación sináptica sostenida sobre las neuronas POMC, ya que si la generación de ROS es incontrolada en células NPY/AgRP, el disparo neuronal de éstas se deteriora interrumpiendo la señal de sensación de hambre y hacia los tejidos periféricos (Andrews *et al.*, 2008; Diano y Horvath, 2011). Por el contrario, durante un balance energético positivo, las neuronas POMC se activan, en parte mediante la señalización de leptina y glucosa, de manera que los radicales libres derivados de la glucólisis son necesarios para aumentar la actividad neuronal de estas células y reducir la actividad de las neuronas NPY/AgRP favoreciendo la saciedad (Ibrahim *et al.*, 2003, Mountjoy *et al.*, 2007) (figura 18).

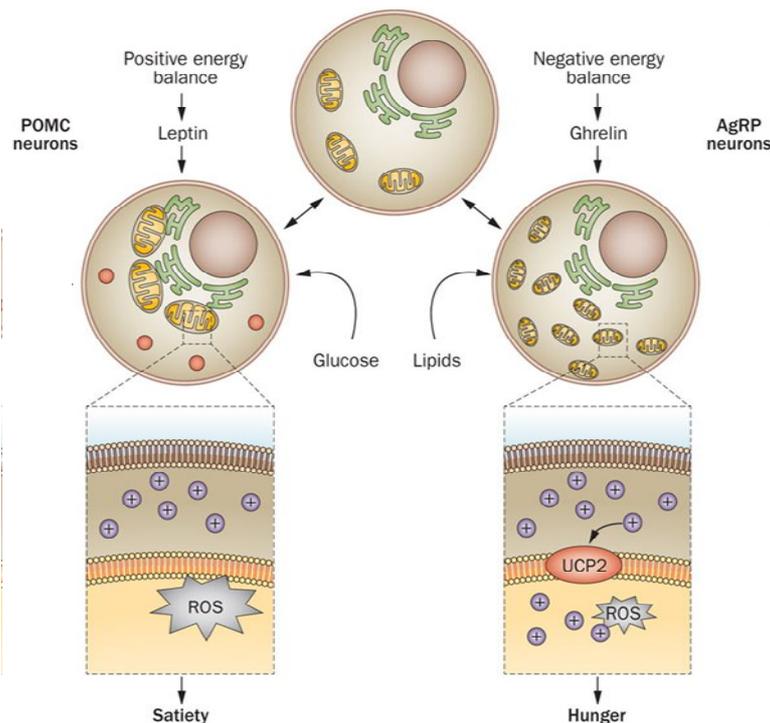


Figura 18. Dinámica mitocondrial en neuronas del ARC según el estado alimentario. La actividad de las neuronas POMC promueve la saciedad asociado con la utilización de glucosa, niveles elevados de ROS, mayor fusión mitocondrial y contactos con el RE. Por el contrario, la actividad de las neuronas NPY/AgRP durante el ayuno promueve la utilización de lípidos y el apetito, que está asociado con bajos niveles de ROS y el aumento de la fisión mitocondrial (modificado de Nasrallah y Horvath, 2014).

2.3. METABOLISMO RETICULAR HIPOTALÁMICO

El retículo endoplasmático (RE) es el principal orgánulo para la síntesis de lípidos y el plegamiento y tráfico de proteínas, sin embargo en los últimos años, se está estableciendo el papel del RE como un orgánulo altamente involucrado en la homeostasis energética celular, siendo un sensor del estado nutritivo de la célula y formando parte de procesos vitales para efectuar una respuesta adaptativa exitosa.

SENSOR ENERGÉTICO Y NUTRICIONAL

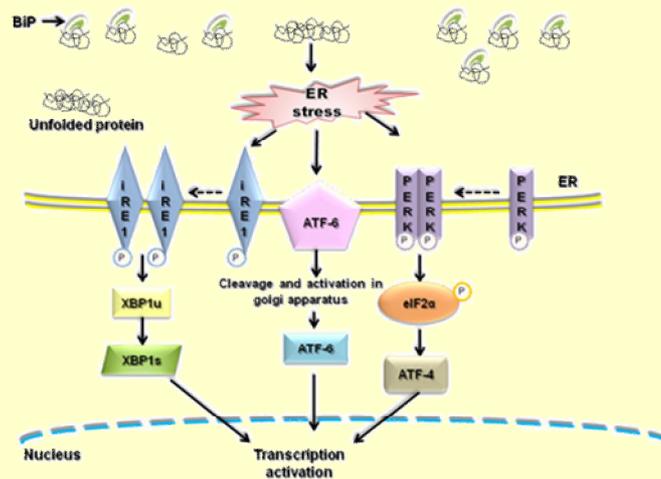
La red membranosa que compone el retículo endoplasmático se extiende desde la envoltura nuclear hasta la periferia de la célula, mantiene zonas de contacto vitales con otros orgánulos y es un orgánulo altamente metabólico (Hotamisligil *et al.*, 2010). Media varios procesos anabólicos tales como la síntesis de lípidos y la biogénesis de peroxisomas y cuerpos lipídicos, pero también el recambio proteico catabólico de proteínas y orgánulos a través de la autofagia y la hidrólisis proteasomal. Un volumen creciente de evidencias coloca el estrés de retículo y la respuesta a proteínas desplegadas (UPR: *unfolded protein response*. Ver caja 1) corriente abajo de un estímulo fisiológico que no necesariamente actúa debido a proteínas desplegadas en el RE (Rutkowski y Egde, 2010). Por ejemplo, se ha descrito que UPR, de forma parecida a mTOR, es sensible a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Appenzeller-Herzog y Hall, 2012). De hecho, la vía UPR fue identificada por primera vez debido al descubrimiento de un conjunto de proteínas reguladas por glucosa (GRPs), lo que sugiere que el ER tiene un papel importante en la detección de nutrientes (Scheuner *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2011). Además, el RE es también importante en el metabolismo lipídico, el hecho que el exceso de ácidos grasos pueda inducir estrés de retículo, ilustra que UPR como mTOR, también puede ser activado por un alto estado nutricional (Pineau y Ferreira, 2010). Aunque los mecanismos exactos que vinculan la detección de lípidos a estrés de RE todavía no están completamente definidos, la inducción de UPR es crucial para la homeostasis metabólica (Ozcan *et al.*, 2004). Por lo tanto, la identificación de enlaces moleculares entre el estado intracelular de ácidos grasos y las respuestas del RE es una cuestión importante aún sin resolver.

A pesar de desconocer con exactitud qué mecanismos moleculares intervienen, recientemente se ha publicado un trabajo revelador que muestra como la inducción del factor de transcripción Xbp1s en respuesta a UPR en neuronas POMC, es suficiente para proteger contra la obesidad inducida por la dieta, así como mejorar la sensibilidad a leptina y a insulina, incluso en presencia de fuertes activadores de estrés de RE. También demuestran que la

expresión constitutiva de Xbp1s en las neuronas POMC contribuye a mejorar la sensibilidad a la insulina hepática y a la supresión de la producción endógena de glucosa. En particular, también han descrito por primera vez que la activación de Xbp1s en las neuronas POMC resulta en la activación del eje de Xbp1s en el hígado a través de un mecanismo celular no autónomo (Williams *et al.*, 2014).

Caja 1 | Estrés de retículo endoplasmático e inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)

Durante las condiciones celulares patológicas, las proteínas se agregan causando acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Esta acumulación de proteínas mal plegadas induce la UPR. Durante el inicio de la UPR, BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose regulated protein) se une preferentemente a las proteínas desplegadas, conduciendo su equilibrio de unión lejos de IRE-1 (inositol requiring enzyme 1), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) y ATF6 (factor activador de la transcripción 6), los cuales son considerados los iniciadores de las tres cascadas de señalización principales de la UPR. IRE-1 activa su actividad quinasa (por autofosforilación) y su actividad endorribonucleasa, escinde el mRNA de XBP1 (X-box-binding protein 1) para eliminar un pequeño intrón, convirtiendo XBP1u (unspliced) a la forma XBP1s (spliced), resultando en un factor transcripcional más potente. Del mismo modo, también PERK dimeriza y se activa para fosforilar a eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) en la subunidad α . Esta acción selectivamente traduce el mRNA de ATF-4 que induce más activador transcripcional. La activación de ATF-6 permite que se transloque al aparato de golgi, donde es escindido por una proteasa, cambiándolo al fragmento citosólico activo. Este fragmento migra al núcleo y activa la transcripción de genes diana UPR (Bhandary *et al.*, 2013).



HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Como se ha comentado anteriormente, UPR no es solamente una señal de estrés y muerte celular, sino que la activación de UPR también se logra por estímulos de crecimiento. Así, dada su influencia sobre la viabilidad celular, tanto mTOR como UPR, y sus intersecciones y sinergismos son fundamentales para la adecuada salud celular. Por un lado, se ha demostrado que mTOR activa la biogénesis y la función basal mitocondrial (Cunningham *et al.*, 2007; Schieke *et al.*, 2006), mientras que su activación crónica conlleva alteraciones metabólicas y a estados patológicos celulares (Bentzinger *et al.*, 2008). Por otro lado, mTOR es capaz de activar

UPR desencadenando o bien una adaptación fisiológica favorable o una señalización patológica (Di Nardo *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2008). En esta dirección, un estudio llevado a cabo en el laboratorio de Vidal-Puig analizó el efecto de la disfunción mitocondrial, la activación de mTOR y la inducción de UPR en neuronas de animales alimentados con dieta grasa (Camacho *et al.*, 2012). Observaron que la disfunción mitocondrial produce un estrés de retículo moderado basal, asociado a una activación crónica de mTOR que impide una adecuada UPR a nivel hipotalámico tanto por estímulos dietéticos como farmacológicos.

Un minucioso sistema de comunicación ha sido desarrollado entre el RE y otros orgánulos, incluyendo el aparato de golgi, la membrana plasmática, el núcleo y la mitocondria (Giorgi *et al.*, 2009; Decuypere *et al.*, 2011), de manera que le permite regular debidamente la homeostasis de Ca^{2+} , componente clave en la señalización, adaptación y supervivencia celular (Schröder *et al.*, 2008). Respecto a la homeostasis energética, la mitocondria, como se lleva exponiendo hasta ahora, juega un papel fundamental. La interacción física entre RE y mitocondria formando contactos especializados es denominada MAM (Membranas asociadas a mitocondria) donde los componentes luminales y transmembrana pueden ser intercambiados (Vance, 1990). La composición de las MAM se adapta en respuesta a múltiples estímulos internos y externos (Myhill *et al.*, 2008; Bui *et al.*, 2010) y su formación y disolución depende de los cambios en la dinámica de cada orgánulo (De Brito y Scorrano, 2008). Entre las proteínas de la interface RE-mitocondria, la proteína de fusión mitocondrial mitofusina 2 (Mfn2) juega un papel importante de anclaje, siendo esencial para la completa funcionalidad de las MAM. Se ha visto que la captación mitocondrial de Ca^{2+} liberado a través del RE estimula la respiración mitocondrial y la producción de ATP, mientras que la interrupción de esta transferencia compromete la función mitocondrial, disminuye la producción de ATP y activa la autofagia (Cárdenas *et al.*, 2010). Varios estudios posteriores detallaron un poco más este proceso, Bravo y colaboradores destacaron la importancia de la distinción entre las fases de estrés de RE temprano y tardío, en el que durante la fase temprana la adaptación de la bioenergética mitocondrial mediada por las uniones con el RE son indispensables (Bravo *et al.*, 2011) (figura 19), mientras Gladys y colaboradores demuestran la implicación de Mfn2 en este proceso (Ngoh *et al.*, 2012).

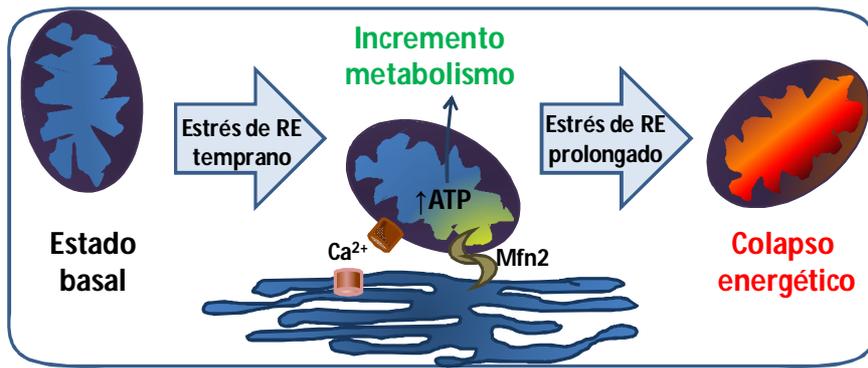


Figura 19. Fases adaptativas del estrés de retículo endoplasmático. Las primeras fases del retículo (ER) endoplásmico desencadenan un aumento en el metabolismo mitocondrial, que depende de manera crítica del acoplamiento entre orgánulos y la transferencia de Ca^{2+} . La aparición de estrés de RE se caracteriza por una redistribución de la localización reticular y mitocondrial hacia la región perinuclear. Un acoplamiento físico se logra mediante proteínas de anclaje, tales como mitofusina 2. Esta interacción permite un aumento en la transferencia de Ca^{2+} del RE a la mitocondria, lo que mejora la bioenergética mitocondrial y la producción de ATP. Sin embargo, si el estrés continúa, esta respuesta promueve colapso mitocondrial y desencadena la muerte celular por apoptosis (adaptado de Bravo *et al.*, 2012).

A nivel hipotalámico, un reciente trabajo manifiesta que Mfn2 en las neuronas POMC es un regulador esencial del balance energético de todo el organismo (Schneeberger *et al.*, 2013). Sugieren un modelo por el cual la interrupción de una adecuada homeostasis mitocondria-RE a través de la delección de Mfn2 en las neuronas POMC conduce a estrés de RE, el procesamiento defectuoso α -MSH, resistencia a la leptina y obesidad.

CUERPOS LIPÍDICOS

El metabolismo lipídico celular se lleva a cabo principalmente en el RE, donde residen muchas de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico intermediario, proporcionando al RE un papel central pero poco investigado sobre el control de la lipotoxicidad. Residen dos formas predominantes de lípidos complejos en el RE, los fosfolípidos anfifílicos y los lípidos neutros como triglicéridos y ésteres de colesterol. Los fosfolípidos son esenciales para el ensamblaje de membranas y las vesículas de transporte de proteínas y otras entidades, los triglicéridos y los ésteres de colesterol son almacenes del exceso de ácidos grasos y colesterol que en virtud de su naturaleza hidrofóbica son acumulados en los cuerpos lipídicos (CL) sintetizados desde la membrana del RE (Martín y Parton, 2006; Farese y Walther, 2009).

Por consiguiente, los cuerpos lipídicos son depósitos intracelulares de ésteres lipídicos envueltos por una monocapa de fosfolípidos y separados del medio hidrofílico citosólico por un recubrimiento de proteínas estructurales. A pesar de una falsa apariencia de reservas

inertes, actualmente se les otorga una alta actividad metabólica con funciones más allá que el almacenaje pasivo de grasas. De hecho su naturaleza dinámica y multifuncional les ha conferido una entidad definida elevada a la categoría de orgánulo intracelular (Greenberg *et al.*, 2011; Fujimoto y Parton, 2011). Además, como muchos otros orgánulos, los CL han demostrado que interactúan de forma regulada con otros compartimentos intracelulares, probablemente para proporcionarles lípidos específicos para sus membranas y para adaptarse a cambios en el entorno celular (Ohsaki *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2009) (figura 20). Otro aspecto creciente en la investigación sobre los CL es la identificación de funciones más allá de los relacionados con el metabolismo de los lípidos o el suministro de lípidos de membrana. Entre los que ha sido pionera, se encuentra la constatación de que la matriz hidrófoba de los CL puede convertirse en un área secuestrante de proteínas desplegadas y participar en los mecanismos de UPR para aliviar el estrés de RE (Cole *et al.*, 2002; Ohsaki *et al.*, 2006). La gestión de proteínas por parte de los CL no sólo se aplica a proteínas patógenas con destino a la degradación, sino que también puede tener un papel regulador en la disponibilidad de algunas proteínas completamente funcionales.

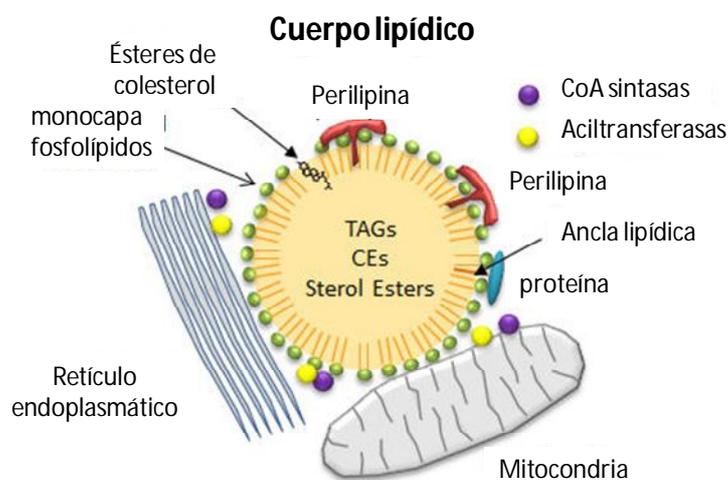


Figura 20. Composición de los cuerpos lipídicos e interacción con otros orgánulos celulares. Los cuerpos lipídicos están básicamente formados por triacilglicéridos y ésteres de colesterol. Pero también son muy importantes las proteínas y los fosfolípidos que forman parte de su cubierta. Las proteínas principales son la perilipina y enzimas aciltransferasas o CoA sintasas. Estos orgánulos presentan una alta interacción con el retículo endoplasmático, mitocondrias y peroxisomas (no mostrado).

AUTOFAGIA Y LIPOFAGIA

La autofagia es un proceso de degradación lisosomal intracelular que se puede clasificar en diferentes tipos, tales como macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada

por chaperonas (Jin y White, 2007). Debido a que la macroautofagia ha sido el proceso mejor caracterizado, de aquí en adelante nos referimos a la macroautofagia como autofagia, que se define por la formación de estructuras de doble membrana, autofagosomas. El autofagosoma, parece ser que, formado en las MAM a partir de la membrana del RE, captura materiales citoplasmáticos y se fusiona con el lisosoma para formar autolisosomas que son un tipo de orgánulos vesiculares ácidos (Lamb *et al.*, 2013). Éstos, degradan el material citoplasmático capturado y producen aminoácidos esenciales y ácidos grasos que se utilizan para sintetizar proteína o ser oxidados para generar ATP para la supervivencia celular. Luego, uno de los principales estímulos que inducen la autofagia es el balance energético negativo celular (Mizushima *et al.*, 2004). En esta dirección, se ha visto que la autofagia inducida por inanición es fisiológicamente muy importante para la regulación de la supervivencia celular (Singh y Cuervo, 2011). El eje AMPK-mTOR es la vía canónica de activación de la autofagia en situación de balance energético negativo. Además recientemente, se ha descrito que ROS son activadores de autofagia (Scherz-Shouval *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009) y posteriormente que un aumento de ROS generados en la mitocondria en situación de inanición activan AMPK y en consecuencia la autofagia (Li *et al.*, 2013).

El primer indicio de que los CL podrían ser sustrato del proceso de autofagia se originó a partir de estudios en hepatocitos cultivados deficientes de ATG5, uno de los genes esenciales para la formación de los autofagosomas. En este estudio vieron que cuando la lipofagia es activada en respuesta a una carga de lípidos o bien a un ayuno prolongado, parece que interviene un proceso selectivo en el secuestro diferencial de CL (Singh *et al.*, 2009). Por otro lado, es de especial interés el hecho de que los CL presentan una interacción dinámica con los orgánulos que se han propuesto como sitios de formación de los autofagosomas, las MAM. Por este motivo, resulta tentador proponer que bajo la situación en que los CL interactúan con las MAM, se podría favorecer su degradación mediante autofagia (Singh y Cuervo, 2012).

A nivel hipotalámico, aunque el conocimiento actual sugiere que la disponibilidad y la oxidación de ácidos grasos neuronales proporcionan los requerimientos energéticos para la activación y el disparo de las neuronas NPY/AgRP (Andrews *et al.*, 2008), los mecanismos de acción lipolítica que generan ácidos grasos disponibles intracelulares han permanecido poco dilucidados. Desde que la autofagia se activa por inanición en la mayoría de las células, es plausible que la movilización de los lípidos mediante la autofagia en el hipotálamo puede contribuir a la generación de ácidos grasos durante la inanición que, a su vez, activen los mecanismos de conducción a la ingesta de alimentos. De hecho, un estudio reciente en ratones deficientes de ATG7 (uno de los genes esenciales para la formación del

autofagosoma), únicamente en las neuronas AgRP muestra que el hipotálamo, efectivamente, necesita la autofagia para regular positivamente la expresión de AgRP en respuesta al agotamiento nutricional (Kaushik *et al.*, 2011) (figura 21). Esto revela una característica distintiva de las neuronas hipotalámicas para activar la autofagia, a diferencia de otras regiones del cerebro en la que la autofagia no parece estar bajo este tipo de regulación nutricional (Mizushima *et al.*, 2004). De hecho, el bloqueo selectivo de la autofagia en las neuronas AgRP reduce el aumento de AgRP hipotalámico, la ingesta de alimentos y el peso corporal inducidos por el ayuno. Curiosamente, los ratones deficientes de la autofagia en las neuronas AgRP también muestran niveles más altos de α -MSH (producida en las neuronas POMC), lo que podría contribuir a la reducción de la adiposidad de estos ratones (Kaushik *et al.*, 2012).

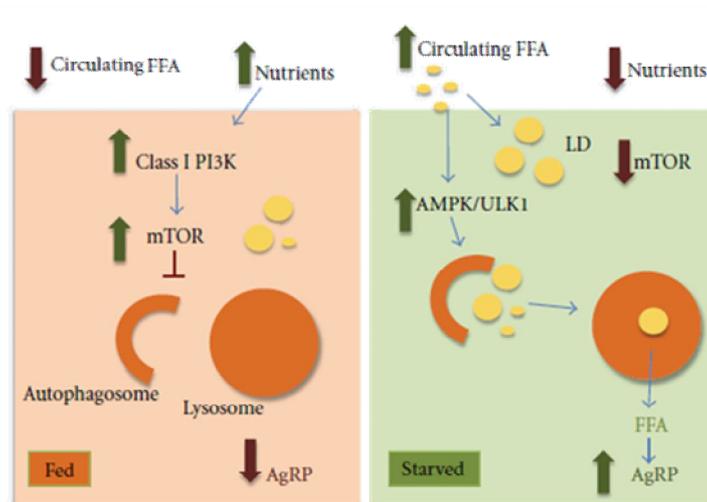


Figura 21. Regulación de la lipofagia en neuronas del ARC. En la situación de alimentación, los niveles de nutrientes en sangre es elevado, mientras que los de ácidos grasos (AG) libres no incrementan significativamente. Esto es sentido por el hipotálamo activando mTOR e inhibiendo la autofagia, con lo cual no se induce la expresión del neuropéptido AgRP. Por el contrario, en situación de ayuno, los AG libres aumentan junto con una disminución de los niveles de nutrientes en sangre, lo que produce la activación de la autofagia, induciendo un aumento de los niveles de AG intracelulares y la expresión de AgRP. (extraído de Singh y Cuervo, 2012).

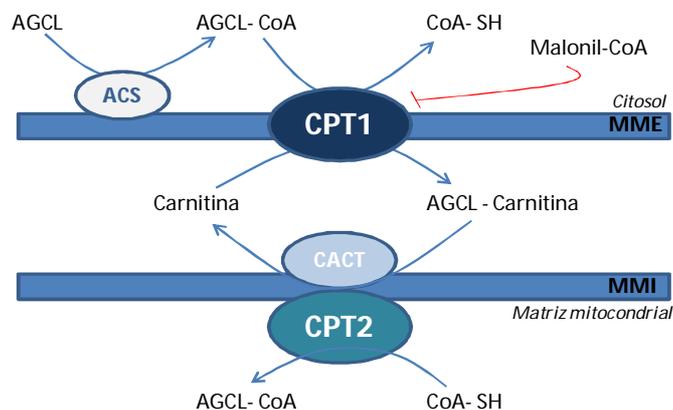
3. SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA

La oxidación mitocondrial de ácidos grasos es esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética tanto en situaciones de necesidad de ahorro de glucosa como situaciones de necesidad de alto aporte energético, tales como el ayuno o el ejercicio, respectivamente. Los ácidos grasos son catabolizados mayoritariamente mediante la β -oxidación mitocondrial, su transporte hacia el interior de la mitocondria es llevado a cabo por

un grupo de enzimas con actividad aciltransferasa (McGarry *et al.*, 1989). Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) pueden ser usados para la síntesis de lípidos complejos en el retículo endoplasmático o bien pueden ser usados para la obtención de energía en la mitocondria. El transporte de estos AGCL requiere el transporte mediado por las carnitina palmitoiltransferasa (CPT), ya que a diferencia de los ácidos grasos de cadena corta y media, son incapaces de difundir al interior de la mitocondria, por lo cual deben someterse a varias reacciones de transesterificación (McGarry y Brown, 1997).

El primer componente de este sistema es la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa que cataliza la transferencia del grupo acilo de los aciles-CoA, formados a partir de la acil-CoA sintasa (ACS), a la carnitina del espacio intermembrana. El producto acilcarnitina es transportado a la matriz mitocondrial por una reacción de intercambio facilitada por la carnitina-acilcarnitinatranslocasa (CACT) situada en la membrana mitocondrial interna. Por último, una vez en la matriz mitocondrial, la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) revierte la reacción, transfiriendo el grupo acilo de la acilcarnitina a una molécula de CoA-SH. De este modo los LCFA-CoA entran en el ciclo de la β -oxidación para producir acetil-CoA (Figura 22).

La reacción catalizada por CPT1 es el punto clave de regulación del sistema y por consiguiente del flujo de la β -oxidación, dependiendo de su inhibición por malonil-CoA (McGarry y Foster, 1980). El malonil-CoA es un derivado de la glucosa y primer intermediario de la lipogénesis, por lo que se convierte en el principal modulador del metabolismo intracelular según sus niveles. Favoreciendo la lipogénesis y la oxidación de la glucosa cuando está elevado, al inhibir CPT1, o favoreciendo la oxidación de las grasas cuando está disminuido, al aliviar su inhibición sobre CPT1. El control de esta reacción no sólo determina el metabolismo oxidativo sino que también determina la disponibilidad de los AGCL para otros procesos, como la síntesis de lípidos complejos.



← **Figura 22. Transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria mediante el sistema CPT.** Los AGCL se activan a AGCL-CoA por acción de la enzima ACS. El transporte al interior de la mitocondria se lleva a cabo por la acción de CPT1, que cataliza la formación de AGCL-carnitina. CACT, transporta la AGCL-carnitina a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) y CPT2 reconvierte los AGCL-carnitina en AGCL-CoA en el interior de la matriz mitocondrial. CPT1 está regulada por su inhibidor fisiológico malonil-CoA. MME: membrana mitocondrial externa.

Mientras que únicamente consta una proteína CPT2 en mamíferos (Demaugre *et al.*, 1990), tres isoformas distintas de CPT1 han sido identificadas:

- **CPT1A** o CPT1L (del inglés, *liver*) es la isoforma que presenta una expresión más ubicua. Se encuentra en hígado, pulmón, páncreas, intestino, ovarios y cerebro (McGarry, 1997).
- **CPT1B** o CPT1M (del inglés, *muscle*) fue primeramente identificada en músculo esquelético y cardíaco, pero también se encuentra en tejido adiposo y testículos (Yamazaki *et al.*, 1995; Esser *et al.*, 1996)
- **CPT1C** es la isoforma descubierta más recientemente (Price *et al.*, 2002), se encuentra exclusivamente en SNC y muestra una alta homología de secuencia con las otras isoformas (figura 23), aunque su función todavía permanece desconocida.

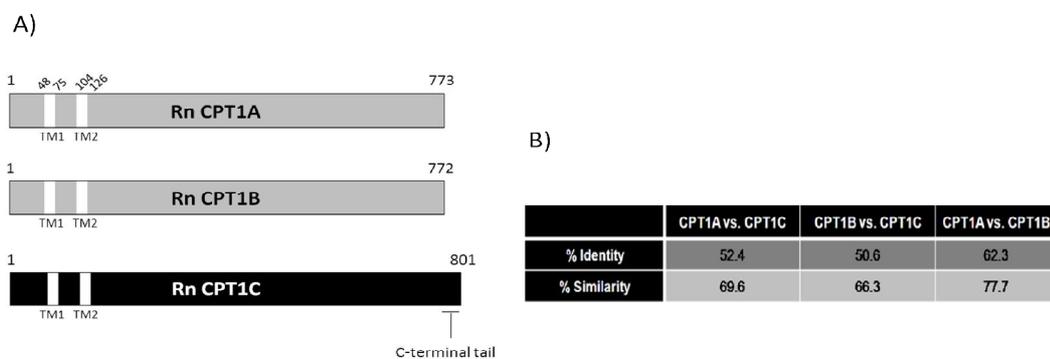


Figura 23. Comparación de las distintas isoformas CPT1. A) Representación esquemática de CPT1A, CPT1B y CPT1C de rata en la que se muestra la cola de CPT1C en el extremo C-terminal, los dominios transmembrana (TM1 y TM2) y la posición de los aminoácidos al inicio y al final. B) La comparación de la identidad y la similitud entre la secuencia de aminoácidos de las distintas isoformas CPT1. CPT1C muestra mayor grado de similitud a CPT1A que a CPT1B. (adaptado de Wolfgang *et al.*, 2006).

El estudio filogenético de las tres isoenzimas indica que los tres genes CPT1 divergieron aproximadamente al mismo tiempo. Sin embargo, CPT1C únicamente se expresa en mamíferos, mientras que CPT1A y CPT1B también se expresan en especies como aves, peces, reptiles o insectos, sugiriendo una función de CPT1C específica sobre el metabolismo lipídico de los cerebros más evolucionados.

4. CPT1C: CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA 1C

La búsqueda *in silico* en bases de datos basada en la secuencia de CPT1A humana resultó en la identificación de un nuevo gen, el cual fue designado como CPT1C, debido a su similitud con las otras isoformas CPT1, a pesar de que éste posee una cola prominente de aproximadamente 30 AA en el extremo C-terminal (Preece *et al.*, 2002). Price también estudió el perfil de expresión de CPT1C en los distintos tejidos del organismo. CPT1C se expresa en SNC y testículos, presentando un patrón de expresión bastante homogéneo en todo el cerebro, con un enriquecimiento en áreas implicadas en la regulación de la homeostasis y el control del apetito como son el hipocampo y los núcleos paraventricular, arcuato y supraquiasmático.

LOCALIZACIÓN DE CPT1C

A nivel celular, nuestro grupo llevó a cabo estudios de co-localización con el fin de identificar qué tipos celulares expresaban CPT1C en el cerebro. Mediante dos aproximaciones distintas (hibridación *in situ* e inmunohistoquímica), se demostró que CPT1C es una proteína específica de neuronas y que no se expresa en astrocitos (figura 24 A) (Sierra *et al.*, 2008). Por lo que concierne a la localización subcelular, primeramente se propuso que también se situaría en la membrana mitocondrial externa (Preece *et al.*, 2002), sin embargo, en 2008 nuestro grupo demostró que se localiza en el retículo endoplasmático. Una vez más, dos aproximaciones distintas se llevaron a cabo, por un lado se transfectaron fibroblastos con CPT1A o con CPT1C fusionadas con GFP y se observó claramente un patrón punteado o uno reticular, respectivamente. Los cuales además co-localizaban con marcadores de mitocondria y de RE, respectivamente (figura 24 B). Por otro lado, se realizaron subfraccionamientos celulares y se detectó por WB CPT1C en la fracción microsomal y CPT1A en la fracción mitocondrial (figura 24 C) (Sierra *et al.*, 2008).

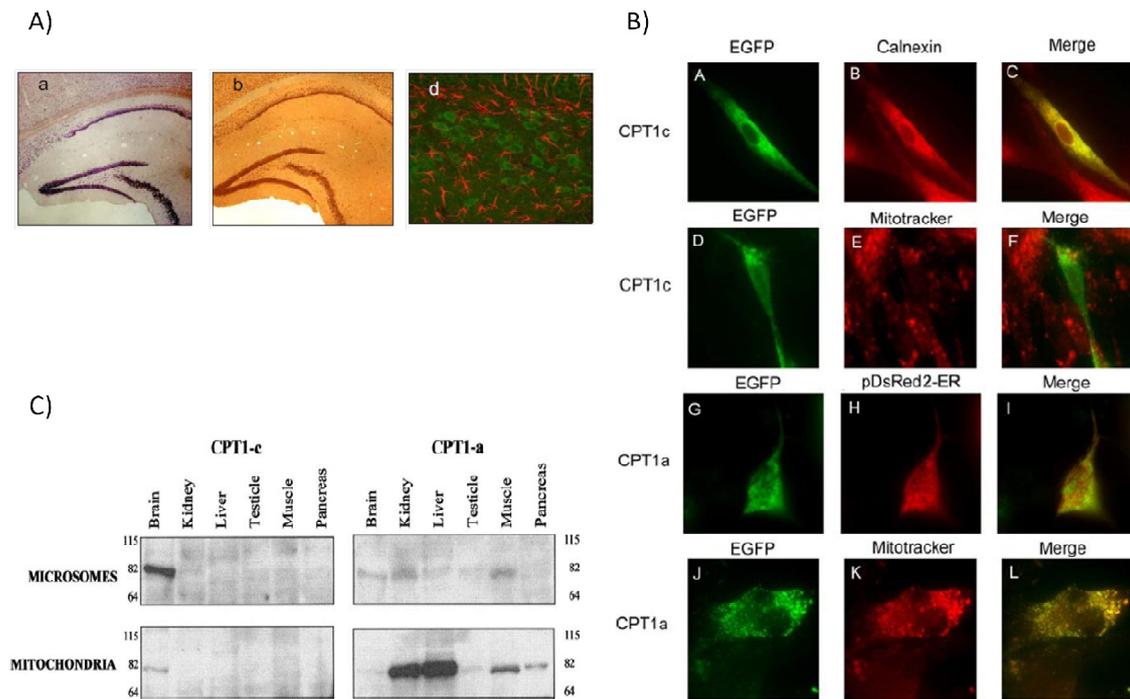


Figura 24. Localización subcelular de CPT1C. **A)** Estudios de co-localización del mRNA de CPT1C con las proteínas NeuN y GFAP en secciones de cerebro de ratón. Se realizó hibridación *in situ* con una ribosonda anti-CPT1C (a), una inmunohistoquímica con anticuerpos primarios para NeuN y secundarios biotinilados (b) y doble inmunohistoquímica con anticuerpos para CPT1C (verde) y GFAP (rojo)(d). **B)** Co-localización de CPT1C-EGFP o CPT1A-EGFP con Mitotracker o Calnexina. **C)** Western blot de CPT1C y CPT1A en distintas subfracciones celulares y tejidos. (adaptado de Sierra *et al.*, 2008).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y REGULACIÓN DE CPT1C

El análisis aminoácido comparativo entre las tres isoformas revela que CPT1C conserva todos los residuos involucrados en la actividad carnitina aciltransferasa, así como el lugar de unión de malonil-CoA. Por lo que desde el descubrimiento de CPT1C varios grupos de investigación han tratado de evaluar su actividad carnitina aciltransferasa bajo distintas condiciones.

Primeramente, Preece ensayó la actividad carnitina aciltransferasa (CAT) en levaduras en las que se expresó una CPT1C recombinante con varios aciles-CoA conocidos como sustratos de las otras isoformas, sin lograr detectar actividad catalítica. Sin embargo, demostró por primera vez que CPT1C tiene la misma afinidad por el malonil-CoA que CPT1A (Preece *et al.*, 2002). Seguidamente, el grupo de Daniel Lane mediante ensayos radiométricos, ensayó la actividad CAT en extractos mitocondriales de células HEK293T transfectadas con CPT1C, ampliando la cantidad y la complejidad de los aciles-CoA usados como sustrato (distintos ésteres, saturaciones y tamaños de las cadenas de ácido graso) siendo incapaces de detectar

actividad catalítica (Wolfgang *et al.*, 2006). El mismo grupo, más adelante realizó ensayos de oxidación de ácidos grasos en cultivo celular y en explantes hipotalámicos y corticales de ratones salvajes y deficientes de CPT1C, sin observar diferencias CPT1C dependientes (Wolfgang *et al.*, 2008). Al mismo tiempo pero, el estudio que mostró la localización reticular de CPT1C, también mostraba que CPT1C es capaz de utilizar al palmitoil-CoA como sustrato aunque la eficiencia catalítica es 200 veces inferior a la observada en CPT1A (Sierra *et al.*, 2008). A pesar de los distintos estudios realizados hasta el momento, actualmente tanto la actividad catalítica como los sustratos de CPT1C siguen siendo enigmáticos.

Respecto a la regulación de CPT1C, dos trabajos han sido publicados recientemente. Uno está basado en la regulación traduccional de CPT1C, mientras que el otro se basa en una posible regulación dependiente de la conformación espacial de la proteína. En el primero, describen que CPT1C es la única isoforma que contiene un uORF en 5'UTR, conservado en varias especies de mamífero, el cual inhibe la traducción del mORF. Sin embargo, esta inhibición de la traducción ejercida por el uORF se alivia en situación de privación de glucosa y/o bajo tratamiento con palmitato. Además, demuestran como AMPK interviene en dicha represión de la regulación, concluyendo que en situaciones basales la expresión de CPT1C se mantiene baja y que la regulación mediante el uORF es importante para inducir su expresión en situaciones de estrés (Lohse *et al.*, 2011). En el segundo, a partir de varios estudios estructurales de los dominios regulador y catalítico de CPT1A y el papel de la interacción entre ambos sobre los cambios de afinidad de malonil-CoA, los autores sugieren que CPT1C se encontraría permanentemente en estado inhibitorio, o bien formando una conformación inhibitoria estable con malonil-CoA o bien formando una conformación activa mediante la interacción con otra proteína (Samanta *et al.*, 2014).

4.1. PAPEL DE CPT1C EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO

Con el fin de averiguar la función fisiológica de CPT1C, un modelo animal deficiente de CPT1C fue creado por primera vez en 2006 (Wolfgang *et al.*, 2006). Los ratones deficientes de CPT1C no manifiestan ninguna anomalía evidente en el desarrollo ni tampoco en la temperatura corporal, aunque presentan una leve disminución del peso corporal y de la ingesta cuando son alimentados con dieta estándar. Sin embargo, cuando son expuestos a dieta rica en grasas, los ratones deficientes de CPT1C o CPT1C KO (del inglés *Knockout*) son más susceptibles a padecer obesidad, ya que presentan un incremento de peso superior que los ratones salvajes o WT (del inglés *Wild type*), junto con una menor sensibilidad a la insulina

(figura 25). Por lo tanto, parece que CPT1C está implicada en la patogénesis de la obesidad inducida por la dieta y que esta podría tener un papel protector sobre esta enfermedad.

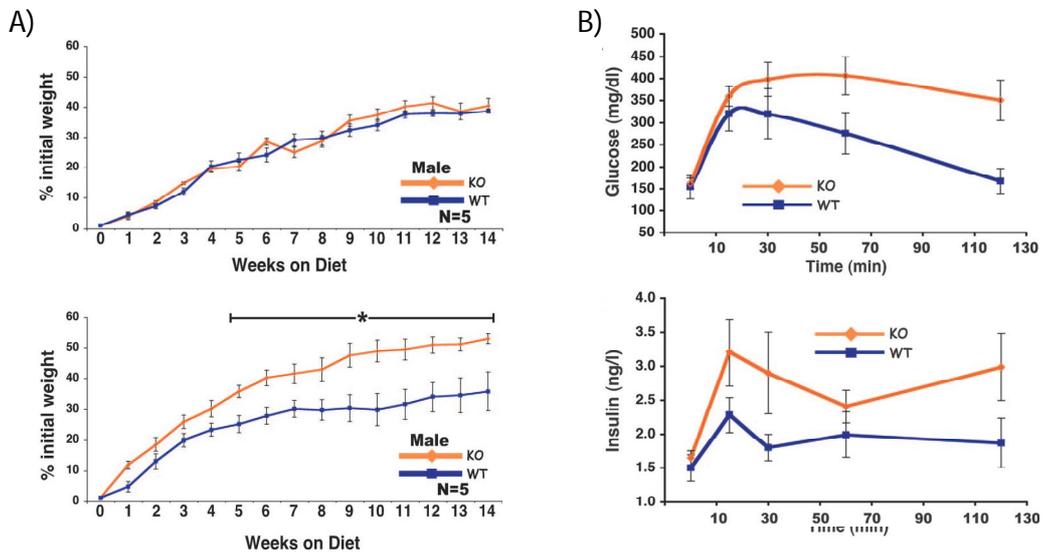
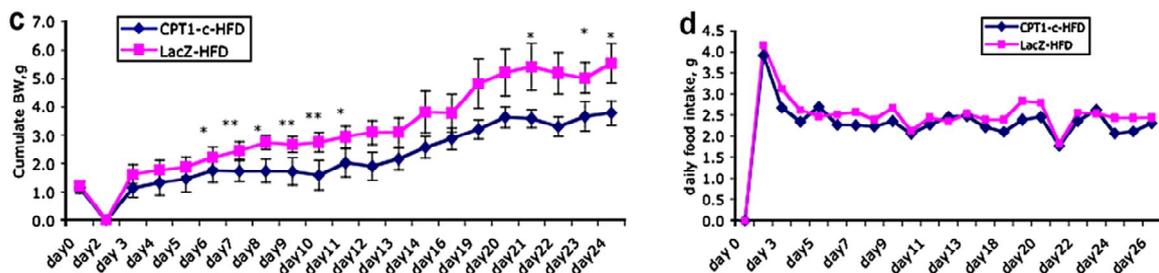


Figura 25. Los ratones CPT1C KO son más susceptibles a los efectos de una dieta alta en grasa. Ratones macho WT y CPT1C KO fueron alimentados con dieta control (10% Kcal provenientes de la grasa) (**A superior**) o con dieta rica en grasas (45% Kcal provenientes de la grasa) (**A inferior**) durante 14 semanas. (extraído de Wolfgang, 2006). **B)** Los ratones alimentados con dieta grasa durante 17 semanas fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa. Los ratones CPT1C KO muestran valores superiores en los niveles de glucosa (superior) e insulina (inferior) indicando mayor resistencia a la insulina. (extraído de Wolfgang *et al.*, 2006)

Contrariamente, la sobreexpresión de CPT1C en el hipotálamo ventral mediante lentivirus previene significativamente el aumento de peso causado por una dieta rica en grasas desde el sexto día después de la infección, el cual no está mediado por una reducción de la ingesta (figura 26) (Dai *et al.*, 2007), indicando que la CPT1C hipotalámica está involucrada en la regulación de la homeostasis energética y más concretamente en la regulación del gasto energético.



← **Figura 26. CPT1C protege frente los efectos de la dieta rica en grasa.** Efecto de la inyección bilateral de adenovirus control (LacZ) o de sobreexpresión de CPT1C en el hipotálamo ventromedial de ratones alimentados con dieta rica en grasa sobre el peso (**c**) y la ingesta (**d**). CPT1C protege frente la ganancia de peso inducida por la dieta, a pesar de no provocar cambios en la ingesta. (extraído de Dai *et al.*, 2007)

Los mismos efectos fueron obtenidos en ratones transgénicos los cuales sobreexpresaban condicionalmente CPT1C (TgN) específicamente en el cerebro. Los ratones TgN mantenían niveles inferiores de peso corporal a lo largo de las 15 semanas de tratamiento con dieta grasa, sin presentar diferencias en la ingesta respecto los ratones control. Como era de esperar, los ratones TgN mejoraron ligeramente los niveles de glucosa e insulina en comparación con los controles, sin embargo, sorprendentemente la sobreexpresión de CPT1C causa un incremento en la glucemia y la insulinemia cuando los ratones están alimentados con dieta estándar. Sugiriendo que CPT1C además de controlar el peso podría tener un papel en la regulación de la producción de glucosa hepática (Reamy y Wolfgang, 2011).

Posteriormente, un grupo independiente a los anteriores generó otro modelo murino deficiente de CPT1C (Gao *et al.*, 2009). Estos ratones no presentaban diferencias en el peso ni en la ingesta cuando eran alimentados con dieta estándar, pero al igual que en el modelo anterior, presentaban mayor susceptibilidad a la obesidad. Los ratones CPT1C KO mostraban un incremento de peso mayor que los WT en dieta alta en grasas y además, desarrollaron resistencia a la insulina a las 8 semanas de alimentación grasa en la misma medida que los ratones WT después de 24 semanas, a pesar de que el peso de los ratones CPT1C KO a las ocho semanas era bastante inferior que el peso de los WT a las 24. En este trabajo también se señaló una mayor gluconeogénesis y una menor oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo en los ratones CPT1C KO en situación de dieta grasa en comparación con los ratones WT. Estos datos contribuyen a determinar el fenotipo observado en los ratones CPT1C KO e indicarían que CPT1C juega un papel en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y en la regulación del metabolismo lipídico periférico.

Por último, CPT1C no sólo tiene un papel importante en una situación patológica de inducción a la obesidad, sino que también participa en la adaptación a situaciones fisiológicas como el ayuno. Se ha visto que CPT1C es necesaria para una correcta adaptación del metabolismo en situación de ayuno ya que los ratones CPT1C KO son incapaces de inducir la oxidación de ácidos grasos a nivel periférico después de un ayuno de 24 horas, sin embargo, a pesar de esta desregulación metabólica, son capaces de mantener los niveles de glucosa, ácidos grasos libres, triglicéridos y cuerpos cetónicos en la misma medida que los ratones WT (Wolfgang *et al.*, 2006 y 2008).

4.2. PAPEL DE CPT1C EN LA SEÑALIZACIÓN HIPOTALÁMICA DE LEPTINA Y GRELINA

La leptina es un importante regulador fisiológico de la ingesta y el balance energético, ejerciendo sus efectos anorexigénicos en parte, induciendo un aumento en los niveles de malonil-CoA en el núcleo arcuato del hipotálamo (Gao, Kinzig *et al.*, 2007). El mismo grupo, demuestra que la leptina no altera los niveles de AGCL-CoA, ni tampoco los de acilescarnitina, principales sustrato y producto de la actividad CPT1A. Con lo cual se ratificó que CPT1A no está implicada en la señalización anorexigénica inducida por leptina en ARC (Gao, Keung *et al.*, 2011).

Posteriormente, los mismos autores en colaboración con nuestro grupo de investigación, identificaron el papel de CPT1C en la señalización de la leptina, proceso en el cual está implicada la modulación del metabolismo de las ceramidas mediada por CPT1C (Gao, Zhu *et al.*, 2011) (figura 27). Así, en este estudio se describió por primera vez que en situación de ayuno, los niveles de ceramidas en ARC aumentan, mientras que la acción de la leptina los disminuye. Teniendo esto en consideración, se analizó el papel de malonil-CoA en la regulación de los niveles de ceramidas. La sobreexpresión de MCD y por consiguiente, la disminución de los niveles de malonil-CoA (igual que durante el ayuno) aumenta las ceramidas en el ARC e impide la disminución de éstas inducida por leptina. Por otro lado, se observó que en los ratones CPT1C KO no aumentaban las ceramidas en ARC en respuesta al ayuno, por lo que se evidenció que CPT1C es necesaria para inducir el incremento de ceramidas en ARC en respuesta al ayuno y a la señalización del malonil-CoA. Confirmándose con la sobreexpresión de CPT1C en ARC, la cual aumenta los niveles de ceramidas e impide la disminución de éstas inducida por leptina, así como la disminución del peso y la ingesta inducidos por esta hormona.

Recientemente, a partir de los descubrimientos descritos en el trabajo anterior, nuestro grupo se planteó el papel que podría ejercer CPT1C en la señalización de la grelina y la implicación de las ceramidas en este proceso (figura 27). La administración icv de grelina induce un pico transitorio de ceramidas en el MBH necesario para inducir el incremento de ingesta y de neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP descritos para esta hormona. Además, CPT1C es imprescindible para el aumento de las ceramidas y la respuesta orexigénica inducida por grelina, ya que los ratones CPT1C KO no presentan ni el pico de ceramidas, ni la inducción de los neuropéptidos ni de la ingesta en respuesta a grelina. Asimismo, las ceramidas (inducidas por CPT1C) también son imprescindibles para efectuar la señalización orexigénica de grelina ya que la administración de miriocina impide la acción de ésta. Sin embargo, la administración única de ceramidas es incapaz de efectuar la acción orexigénica, indicando que

las ceramidas son necesarias pero no suficientes por si solas para efectuar una acción orexigénica (Ramírez, Martins *et al.*, 2013). La señalización hipotalámica de la grelina está bien establecida, en la cual están implicadas la activación de AMPK, CPT1A y UCP2. Curiosamente, los ratones CPT1C KO presentan la vía canónica de grelina activada de forma basal, por este motivo, a pesar de que las ceramidas son incapaces de inducir una respuesta orexigénica en ratones WT, en ratones CPT1C KO, al presentar la vía de AMPK-CPT1A-UCP2 permanentemente activa, las ceramidas por si solas son capaces de inducir un incremento en la ingesta y en los neuropéptidos orexigénicos (Ramírez, Martins *et al.*, 2013).

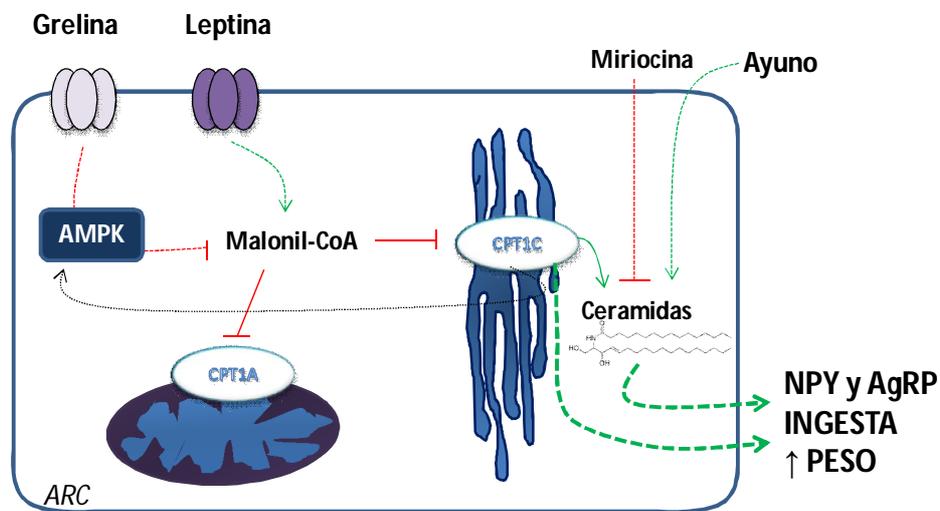


Figura 27. CPT1C y las ceramidas participan en la señalización de grelina y leptina. La grelina y la leptina tienen efectos opuestos sobre la modulación de los niveles de ceramidas y estos efectos están mediados por CPT1C. Grelina disminuye los niveles de malonil-CoA en neuronas del ARC, mientras que la leptina los aumenta. Malonil-CoA es el inhibidor fisiológico de CPT1, por lo que mediante la modulación de malonil-CoA, ambas hormonas regulan la actividad de CPT1C y por consiguiente la concentración de ceramidas en ARC. En última instancia, las ceramidas contribuyen a desencadenar la señal de apetito y a regular el incremento de peso. CPT1A no es necesaria para la señalización anorexigénica de leptina, sin embargo participa en la señalización de grelina. Las flechas verdes indican activación y las flechas rojas inhibición. La flecha de color negro indica que la ausencia de CPT1C causa un bucle de retroalimentación negativa, el cual activa AMPK.

4.3. OTRAS FUNCIONES DE CPT1C

CPT1C ha sido estudiada principalmente en áreas relacionadas con la homeostasis energética debido a su localización en el hipotálamo, pero también se encuentra en otras áreas del cerebro por lo que otros papeles de CPT1C están siendo dilucidados.

MADURACIÓN DE ESPINAS DENDRÍTICAS Y COGNICIÓN

Trabajos realizados en nuestro laboratorio en cultivos primarios de neuronas hipocampales, revelan que CPT1C regula los niveles de ceramidas en estas neuronas, que los ratones CPT1C KO presentan una morfología alterada de las espinas dendríticas, con un aumento de espinas inmaduras o filopodios y un menor número de espinas maduras o en forma de seta. La sobreexpresión de CPT1C o el tratamiento con ceramida de los cultivos hipocampales de ratones CPT1C KO, revierte el fenotipo inmaduro de las espinas dendríticas. Además, en sintonía con estos resultados, los ratones CPT1C KO presentan una deficiencia en el aprendizaje espacial claramente manifiesto por el laberinto de agua de Morris (figura 28) (Carrasco, Sahun *et al.*, 2012).

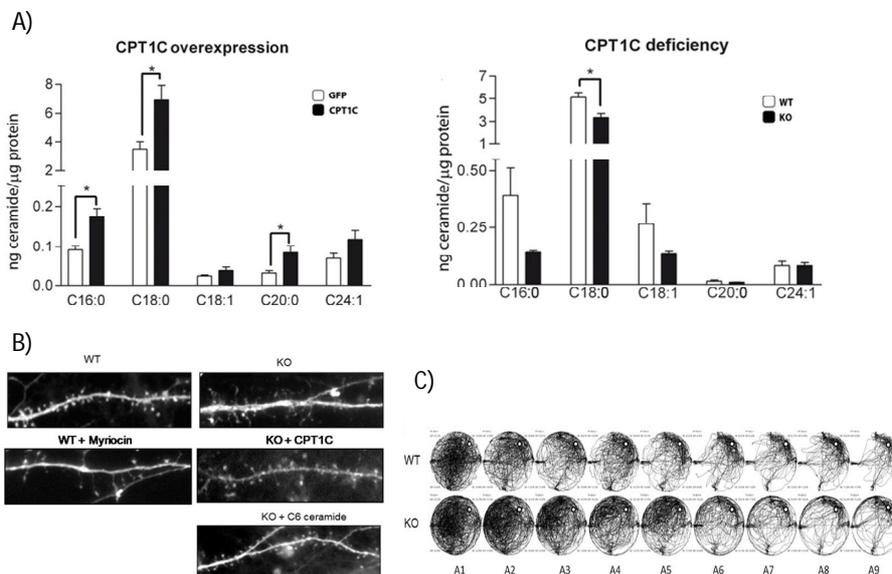


Figura 28. CPT1C y ceramidas en hipocampo son necesarias para la maduración de las espinas dendríticas y el aprendizaje espacial. La sobreexpresión de CPT1C en cultivos primarios de neuronas hipocampales induce un aumento en los niveles de ceramidas, mientras que cultivos de neuronas hipocampales de ratones CPT1C KO muestran menores concentraciones de ceramida (A). El tratamiento con miriocina de neuronas de ratones WT perturba la maduración de las espinas dendríticas, mientras que la administración del análogo de ceramida Cer-C6 revierte el fenotipo de espinas inmaduras de los ratones CPT1C KO (B). Los ratones CPT1C KO presentan déficits en el aprendizaje espacial evaluado por el laberinto de agua de Morris (C). (extraído de Carrasco, Sahun *et al.*, 2012).

FUNCIÓN MOTORA

Recientemente, una batería de pruebas neurológicas realizadas por nuestro grupo en ratones CPT1C KO evidencian que la deficiencia de CPT1C causa alteraciones motoras. Los ratones CPT1C KO muestran un sistema sensorial autónomo intacto, pero un estudio más detallado reveló un deterioro de la coordinación y la marcha, debilidad muscular severa y la

reducción de la actividad locomotora diaria. El análisis de la función motora en estos ratones en edades de 6 a 24 semanas mostraron que los trastornos motores ya estaban presentes en los animales jóvenes y que el deterioro aumenta progresivamente con la edad. Por otro lado, una disminución de los niveles de ceramida y de su derivado esfingosina fueron observados en diferentes áreas motoras de ratones adultos, tales como el cerebelo y la corteza motora y estriada comparado con los ratones WT, indicando que la alteración del metabolismo de las ceramidas en áreas motoras del cerebro inducidas por la deficiencia CPT1C causa una disfunción motora progresiva desde una edad temprana (Carrasco, Jacas *et al.*, 2013).

CANCER

El papel de CPT1C en cáncer fue atribuido por Zaugg y colaboradores. En un primer estudio muestran que la expresión de CPT1C correlaciona inversamente con la activación de la vía de mTOR y que contribuye a la resistencia a rapamicina en tumores primarios murinos. Además, describen que la expresión de CPT1C en líneas celulares tumorales aumenta la oxidación de ácidos grasos, la producción de ATP y confiere resistencia a la privación de glucosa y oxígeno. Por el contrario, las células cancerosas que carecen de CPT1C son más sensibles al estrés metabólico inducido por hipoglucemia e hipoxia, a la vez que presentan mayor sensibilidad a rapamicina. Asimismo, la expresión de CPT1C puede ser inducida por hipoxia o privación de glucosa, sujeta a la regulación por AMPK. Estos resultados indican que las células tumorales pueden utilizar un novedoso mecanismo que implica a CPT1C, el cual es protector en situación de estrés metabólico (Zaugg *et al.*, 2011). Posteriormente, el mismo grupo de investigación revela que CPT1C es un gen diana del factor de transcripción p53 y que en células tumorales la activación de CPT1C está regulada por la vía AMPK-p53 en respuesta a factores de estrés metabólico, destacando la importancia de esta vía en la carcinogénesis (Sánchez-Macedo *et al.*, 2013).

5. ENVEJECIMIENTO Y HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Es un hecho reconocido que el metabolismo en sí conduce al envejecimiento. La hipótesis de que diversos aspectos metabolismo conduce al envejecimiento es apoyada por los muchos estudios que muestran los robustos efectos de la restricción en la dieta para aumentar la vida útil en una amplia gama de especies (Fontana *et al.*, 2010). Un aspecto notable de los efectos protectores de la restricción dietética es que no sólo extiende la vida útil, sino que prácticamente todas las alteraciones y enfermedades relacionadas con la edad también se

reducen, incluyendo el cáncer (Minor *et al.*, 2011) y algunas enfermedades neurológicas (Mouton *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Considerando la condición contraria, cabe destacar los efectos deletéreos del exceso nutricional, es decir, la obesidad y la diabetes. En estas enfermedades, la toxicidad de la glucosa parece implicar una vía metabólica común que conduce al estrés oxidativo (Brownlee, 2001). Otro ejemplo convincente es el caso de un modelo de ratones deficientes en el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), los cuales gozan de larga vida. Estos ratones tienen el metabolismo de la glucosa reducido en un 50% mientras que los niveles de glucosa en sangre se reducen sólo un 25%, por el contrario, el metabolismo de lípidos se eleva alrededor del 20% en estos ratones y se asocia con una reducción del 50% en los niveles de triacilglicerol tisulares (Brooks *et al.*, 2007).

La hipótesis de que el metabolismo de la glucosa conduce al envejecimiento implica que el metabolismo de la glucosa es más tóxico que vías alternativas. Esta hipótesis está apoyada por la evidencia de que la restricción dietética implica un cambio metabólico alejado de la utilización de glucosa y hacia la β -oxidación. Un elemento clave de este modelo es que los efectos protectores de la restricción dietética no requieren una reducción de la tasa metabólica. De hecho, la generación de ATP a partir del metabolismo de la glucosa requiere menos oxígeno por molécula de ATP que la generación de ATP a partir del metabolismo de los lípidos, sin embargo produce más estrés oxidativo (Mobbs *et al.*, 2007; Guarante, 2008). Por lo tanto, los efectos protectores de la restricción dietética requieren un aumento en el consumo de oxígeno, como ha sido consistentemente reportado (Lin *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2007). La importancia del cambio de fuente de átomos de carbono para la oxidación inducida por la restricción dietética radica en que la oxidación de los lípidos y aminoácidos depende mucho más del complejo mitocondrial II que del complejo I, mientras que la oxidación de la glucosa depende mucho más del complejo I, el cual genera más radicales libres (figura 29) (Herrero y Barja 2000; Lenaz, 2001). Por ejemplo, cuando se oxida una molécula de palmitato, produce 15 moléculas de FADH_2 y 31 moléculas de NADH, que en última instancia producirán 129 moléculas de ATP. Mientras que, la producción del mismo número de moléculas de ATP a partir de glucosa, implicaría la producción de 8 FADH_2 y 43 moléculas de NADH. La importancia de este cambio en la relación NADH: FADH_2 es que NADH se oxida sólo al complejo I mitocondrial, mientras que FADH_2 se oxida sólo en el complejo II (Salway, 1994). Además, ha sido demostrado que el complejo mitocondrial II promueve la longevidad, mientras que el resto de complejos mitocondriales la reducen (Ishii *et al.*, 1998; Heszen *et al.*, 2005).

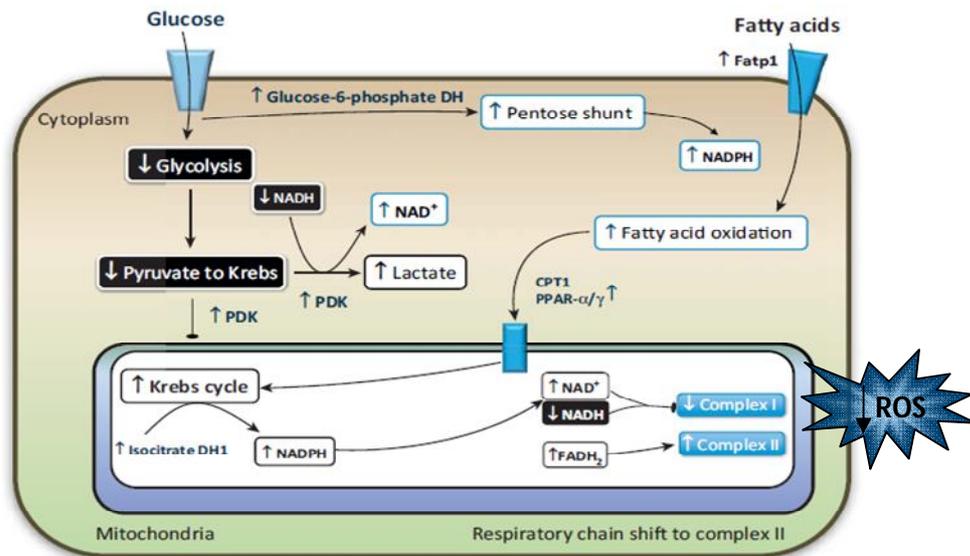


Figura 29. Adaptación metabólica para el uso de ácidos grasos en lugar del glucosa. La inducción de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) es necesaria para desconectar la glucólisis del ciclo de Krebs; el piruvato se convierte en lactato a expensas de NADH. Un efecto fisiológico importante de reducir la glucólisis aumentar la oxidación de ácidos grasos es la reducción del estrés oxidativo. En primer lugar, la glucosa desvía a través de la vía de las pentosas en una mayor producción de NADPH anti-oxidante, que también se incrementa en el ciclo de Krebs por la oxidación de acetiles-CoA derivados de la β -oxidación. En segundo lugar, una reducción general de NADH es secuencial de la reducción de la glucólisis. Lo que conlleva a la disminución de la actividad del complejo I (mayor productor de radicales libres), favoreciendo la actividad del complejo II, que no produce radicales libres (extraído de Mobbs *et al.*, 2013).

Por otro lado, una de las mayores morbilidades durante el envejecimiento es la neurodegeneración. En *C. elegans* los efectos protectores de la restricción dietética están mediados por sólo dos neuronas, las neuronas quimiosensoras de nutrientes (Bishop y Guarente, 2007). En los mamíferos, lo más probable es que las neuronas equivalentes a estas dos neuronas sean las del hipotálamo ventromedial (Mobbs *et al.*, 2013).

5.1. HIPOTÁLAMO

En los años 60, Vladimir Dilman sugirió que el envejecimiento es causado por una pérdida progresiva de la sensibilidad del hipotálamo junto con un aumento de la actividad de algunos de sus centros (Dil'man 1960). Este proceso causaba alteración progresiva de la homeostasis y trastornos metabólicos, lo que llevaba a las enfermedades relacionadas con la edad (Dilman, 1971). En otras palabras, hay una pérdida de la sensibilidad del hipotálamo relacionada con la edad al bucle de retroalimentación negativa a ciertas hormonas, tales como estrógenos y glucocorticoides (Dilman y Anisimov, 1979).

Posteriormente, varios grupos han seguido en la misma dirección sugiriendo que los péptidos clave expresados en las neuronas hipotalámicas activadas por glucosa: 1) están reducidos durante el envejecimiento, 2) están reducidos en el ayuno y en la obesidad, 3) ejercen efectos catabólicos neuroendocrinos, pero su deterioro ejercerían efectos anabólicos, 4) son alterados por una exposición prolongada a niveles elevados de glucosa (Mobbs *et al.*, 2007). En una serie de estudios se ha observado que la hormona α -MSH hipotalámica (producto del procesado de POMC) se encuentra reducida durante el envejecimiento (Lloyd *et al.*, 1991), de igual modo que en el ayuno y en la obesidad (Mizuno *et al.*, 1998). Luego, la corrección genética de la reducción de POMC hipotalámica corrige las alteraciones en la homeostasis de la glucosa en ratones obesos (Mizuno *et al.*, 2003). Así, deterioros en las neuronas POMC relacionados con la edad podrían contribuir a la obesidad y a las alteraciones metabólicas progresivas con la edad.

MARCADORES DE ENVEJECIMIENTO

mTOR

A nivel celular, la geroconversión es un proceso que se desarrolla cuando el ciclo celular es detenido y la estática activación de mTOR primero fuerza el crecimiento del tamaño celular, seguido por la adquisición de propiedades de la senescencia. En otras palabras, la senescencia es una continuación del crecimiento celular, cuando el crecimiento real está restringido (Blagosklonny, 2003). Un fenotipo senescente se caracteriza por ser hiperfuncional derivado de distintas señales de resistencia, distinguido por hipersecreción e hiperinflamación (Pani, 2011). mTOR es la causa principal del envejecimiento celular, o la senescencia, que conduce a enfermedades bien reconocidas relacionadas con el envejecimiento (Blagosklonny, 2012). Por lo tanto, la inhibición de mTOR suprime la geroconversión celular, previniendo la senescencia, aunque al mismo tiempo manteniendo el arresto del ciclo celular (Serrano, 2012). Previsiblemente, la rapamicina extiende la longevidad tanto en eucariotas inferiores como en ratones (Harrison *et al.*, 2009).

Debido al gran interés en descifrar los mecanismos hipotalámicos involucrados en el desarrollo del envejecimiento, recientemente un estudio demuestra que hay un aumento de la señalización de mTOR en las neuronas POMC dependiente de la edad, que conlleva a una disminución de la activación de las neuronas POMC. La administración sistémica o intracerebral de rapamicina causa pérdida de peso en ratones viejos. Además, la infusión intracerebral de rapamicina en ratones viejos aumenta la excitabilidad y la proyección de las

neuritas de las neuronas POMC, causando con ello una reducción de la ingesta de alimentos y del peso corporal. Con lo cual, un incremento en la señalización de mTOR en las neuronas POMC hipotalámicas contribuye a la obesidad dependiente de la edad (Yang *et al.*, 2012).

SIRT1

A nivel molecular, las sirtuinas se han propuesto como reguladores esenciales de la longevidad (Haigis y Sinclair, 2010). De hecho, se cree que son el enlace molecular entre la restricción calórica y la longevidad. Varias evidencias refuerzan esta idea (Bishop y Guarante, 2007), entre las que cabría destacar que la sobreexpresión únicamente en las neuronas de dSir2 extiende la longevidad en *D. melanogaster* (Rogina y Helfand, 2004). En conjunto, estos datos sugieren que las Sirtuinas neuronales pueden ser reguladores importantes del desarrollo del envejecimiento de todo el organismo. El nivel de expresión de SIRT1 en el hipotálamo disminuye con la edad (Li *et al.*, 2011), sin embargo, con el fin de comprobar directamente la relevancia de SIRT1 hipotalámica sobre la longevidad, deberían generarse modelos animales con mutaciones de ganancia o pérdida de función de la actividad SIRT1 dirigidas a neuronas específicas, ya que si estas mutaciones afectan la longevidad aún no está resuelto. Sin embargo, sí se conoce que la sobreexpresión condicional de SIRT1 en neuronas POMC o AgRP de ratón impide el aumento de peso asociado a la edad (Sasaki *et al.*, 2014). La sobreexpresión en las neuronas POMC estimula el gasto de energía a través del aumento de la actividad simpática en el tejido adiposo, mientras que la sobreexpresión en las neuronas AgRP suprime la ingesta de alimentos.

SIRT1, junto con mTOR, se ha visto que participa en la activación de la autofagia (Morselli *et al.*, 2010). La autofagia, del mismo modo que SIRT1, se activa durante la restricción calórica y es un proceso que contribuye a la salud celular al facilitar el recambio de proteínas y lípidos tóxicos para la célula, así como de orgánulos dañados y disfuncionales. Recientemente, la autofagia ha sido relacionada con la extensión de la longevidad en ratones, confiriendo mayor resistencia al estrés oxidativo y un fenotipo delgado a lo largo del tiempo (Sasaki *et al.*, 2014).

UCP2

Un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares es una causa probable de la disminución de la vitalidad celular y del organismo durante el envejecimiento. Hay buena evidencia de que las especies que son de larga vida producen altos niveles de enzimas antioxidantes y, por otra parte, como se ha comentado anteriormente, la RC lleva a una

reducción en la producción de ROS. Además, los ratones con transgénicos con mayor actividad catalasa antioxidante en la matriz mitocondrial tienen una vida más larga (Schriner *et al.*, 2005).

A pesar de que los efectos a largo plazo de la respiración mitocondrial desacoplada mediante UCP2 en la fisiología de los mamíferos siguen siendo controvertidos. En un estudio publicado en 2009 por Andrews y colaboradores, nos muestran que el aumento de la actividad de desacoplamiento mitocondrial de diferentes tejidos predice la vida útil más larga de las ratas en comparación con los ratones. UCP2 reduce las ROS y el estrés oxidativo durante todo el proceso de envejecimiento en diferentes tejidos en ratones. Aún más, la ausencia de UCP2 acorta la esperanza de vida de los ratones de tipo salvaje (Andrews y Horvath, 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

La relación entre obesidad inducida por la dieta e inflamación hipotalámica fue identificada hace algún tiempo y está bien establecida (Pimentel *et al.*, 2014). Sin embargo, la relación entre obesidad e inflamación central es relativamente reciente. En 2005, Souza y colaboradores mostraron que las dietas altas en grasa elevan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de NF- κ B en el hipotálamo (De Souza *et al.*, 2005). Varias investigaciones posteriores sugieren que la dieta rica en grasa causa inflamación en el hipotálamo y que esta inflamación puede interrumpir la adecuada señalización de la ingesta y el metabolismo periférico (Milanski *et al.*, 2009; Thaler y Schwartz, 2010).

No ha sido hasta el trabajo presentado por Zhang y colaboradores en 2013 que, a través de la activación o inhibición de la vía inmune IKK- β y NF- κ B en el hipotálamo de ratones, han sido capaces de acelerar o desacelerar el proceso de envejecimiento, lo que lleva a la menor esperanza de vida o el aumento. Así, en línea con la literatura que apreció los efectos del sistema nervioso en la longevidad, sus resultados proporcionan una prueba consistente sobre la hipótesis de que el envejecimiento es un proceso que está programado por el hipotálamo. El razonamiento sobre que alteraciones en el hipotálamo pueden promover el envejecimiento del resto del cuerpo, se alinea con el hecho de que el hipotálamo es la sede de la regulación neuroendocrina del cuerpo. En esta dirección, han revelado un vínculo directo entre la activación de IKK- β , de NF- κ B y el declive de GnRH en el hipotálamo, responsables del control del envejecimiento sistémico (figura 30). En concordancia, la administración de GnRH compensa el deterioro de la neurogénesis asociado al envejecimiento y desacelera el

envejecimiento. La base subyacente de este mecanismo incluye la integración del sistema inmunitario con el neuroendocrino y la diafonía neurona-microglía a nivel hipotalámico.

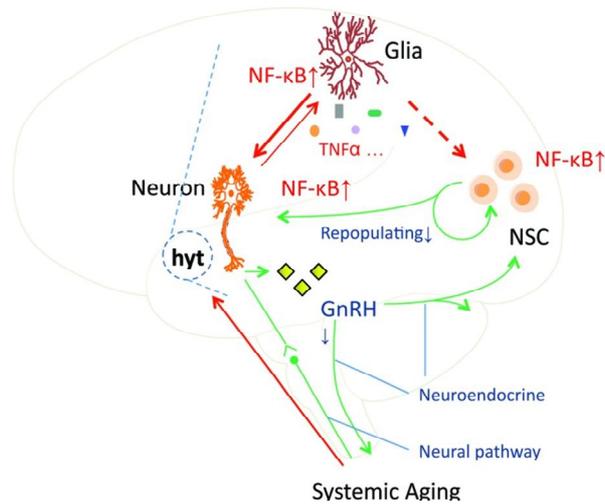


Figura 30. Control hipotalámico del envejecimiento sistémico. Asociada al aumento de la edad se produce una activación de la vía pro-inflamatoria IKK β /NF- κ B en la microglía hipotalámica, este evento inflamatorio emplea citoquinas para dirigir la diafonía autocrina y paracrina entre los diferentes tipos de células para inducir posteriormente la activación IKK β /NF- κ B en las neuronas. Esta inflamación hipotalámica finalmente provoca varios defectos en las funciones de regulación y la neurogénesis del hipotálamo, y el deterioro de la producción de GnRH representa una base importante. En última instancia, el control hipotalámico de la fisiología de todo el cuerpo se ve comprometido, contribuyendo profundamente al desarrollo del envejecimiento sistémico (extraído de Tang y Cai, 2013).

CAPÍTULO 2.
OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar el papel de CPT1C hipotalámica en la homeostasis energética. Para ello se proponen dos objetivos específicos:

1. Estudiar el metabolismo periférico de ratones deficientes de CPT1C en distintas situaciones de estrés metabólico: durante el ayuno, durante el torpor y durante el envejecimiento.

2. Estudiar el efecto de la modulación de la expresión de CPT1C sobre el metabolismo energético y lipídico de neuronas hipotalámicas.

CAPÍTULO 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Biología molecular
2. Biología celular
3. Procedimientos con animales
4. Bioquímica
5. Análisis estadístico

1. BIOLOGÍA MOLECULAR

En esta tesis se han llevado a cabo métodos de trabajo con DNA, RNA y proteína, que nos han permitido obtener vectores plasmídicos recombinantes y determinar el genotipo de los modelos de ratón utilizados. Así como analizar la expresión génica y la expresión y activación de proteínas tanto de tejidos de animales como de células en cultivo. En este apartado también se incluyen los métodos de trabajo con bacterias realizados para la obtención de dichos vectores.

1.1 OBTENCIÓN DE VECTORES VÍRICOS RECOMBINANTES

VECTORES PLASMÍDICOS

Los vectores plasmídicos usados para las estrategias de clonaje y posterior producción de lentivirus han sido: 1) pWPI para la sobre-expresión de CPT1C y 2) pLVTHM para el silenciamiento de CPT1C mediante RNA de interferencia (shRNA) (figura 31).

- **pWPI:** Vector de transferencia lentiviral de segunda generación bicistrónico que permite la expresión simultánea de un transgén y un marcador GFP para facilitar el seguimiento de las células transducidas. El cDNA de GFP se ha insertado corriente abajo del EMCV IRES. (Addgene plasmid # 12254).
- **pLVTHM:** Vector lentiviral similar a pLVTHM, pero que contiene una sustitución de 3 pares de bases que genera un sitio único MluI para la clonación directa de un shRNA en MluI-ClaI. (Addgene plasmid # 12247).

Descripciones simples de los distintos componentes de los vectores se pueden encontrar en la siguiente tabla (tabla 2).

<i>Componente</i>	<i>Descripción</i>
5'LTR	Repetición larga en la terminación 5', contiene las regiones reguladoras cis que reclutan proteínas que promueven la transcripción de la longitud completa del lentivirus. Secuencias aquí facilitan la integración proviral en el genoma huésped. Una LTR en 5' intacta indica que este es un plásmido de transferencia segunda generación
Psi	Secuencia que facilita el empaquetamiento del RNA lentiviral
RRE	Elemento de respuesta a Rev: secuencia a la que la proteína Rev se une para facilitar la exportación nuclear de ARN viral
EF1 α	Promotor para el factor de elongación 1 α : utilizado para la expresión de un gen marcador tal como GFP
cPPT	Polipurina tracto central: permite la importación nuclear de lentivirus en células huésped
WPRE	Elemento de respuesta post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota: aumenta la expresión de shRNA
TetO	Sitio de unión para la proteína represora tet, que se puede utilizar para activar o desactivar la expresión de shRNA
H1	Promotor de la histona H1 utilizado para conducir la expresión shRNA
LoxP	Sitio que se recombina por la recombinasa Cre con el fin de eliminar condicionalmente los provirus de lentivirus del genoma del huésped después de la infección con y la incorporación éxito
3'LTR/SIN	LTR en 3' con una gran deleción en la región U3, que hace que la replicación del virus incompetente

Tabla 2. Breve descripción de los principales componentes de los vectores pWPI y pLVTHM.

Ambos vectores han sido cedidos a Addgene por el Laboratorio Trono. Son vectores dirigidos a la expresión en mamífero, de tipo lentiviral y Cre/Lox. Ambos contienen el gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias y éstas los generan en número alto de copias (figura 31).

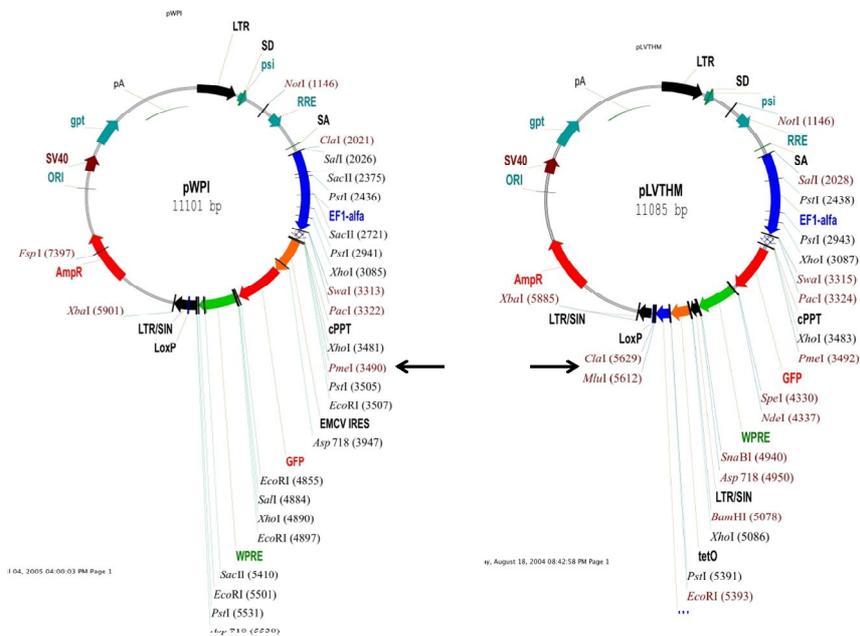


Figura 31. Esqueleto de los vectores pWPI y pLVTHM. Las flechas indican el lugar de inserción del transgén en pWPI (en PmeI) y del shRNA en pLVTHM (en ClaI-MluI).

1.1.1. OBTENCIÓN DE pWPI-CPT1C

Para la obtención del vector de sobre-expresión de CPT1C, pWPI-CPT1C se siguió la siguiente estrategia de clonaje:

1) Obtención de cDNA de CPT1C

Para obtener el cDNA de CPT1C de ratón, primeramente se realizó una transcripción reversa específica a partir de RNA de hipotálamo.

Mezcla de Reacción	Condiciones de PCR	
RNA	1 µg	65°C, 5 min
Oligonucleótido <i>reverse</i> 2,5 µM	1 µL	
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 µL	
Agua	3,2 µL	
Tampón de reacción 5x	4 µL	37°C, 2 min
DTT 0,1 M	2 µL	
Inhib. de RNAsa	1 µL	
Transcriptasa reversa M-MLV	1 µL	
		37°C, 50 min
		70°C, 15 min

Oligonucleótido *reverse*

- **R17:** 5'- GAGCAACACCTTCCATCCTGA -3'

Seguidamente, el cDNA obtenido se amplificó por PCR usando unos oligonucleótidos los cuales introducen la diana de restricción HpaI que permitirán cortar los extremos del amplicón de forma roma (Inici HpaI *forward*: 5'-GTCAGTTAACATGGCTGAGGCACACCAG-3'; Stop HpaI *reverse*: 5'-CAGTGTTAACTACAAGTTGGTGGAGGATG-3') y la polimerasa de DNA de alta fidelidad *Phusion*[®] (F-530S, Thermo Fischer Scientific).

Mezcla de Reacción		Condiciones de amplificación	
cDNA	2 µL	Pre-Incubación	98°C, 30 seg
Oligonucleótido <i>forward</i> 10 µM	1 µL	Desnaturalización	98°C, 10 seg
Oligonucleótido <i>reverse</i> 10 µM	1 µL	Hibridación	59°C, 20 seg
Tampón de reacción 5x	4 µL	Extensión	72°C, 1min 20 seg
Mezcla de dNTPs 10 mM	0,4 µL	35x desde el paso 2	
Agua	11,3 µL	Extensión final	72°C, 5 min
DNA polimerasa <i>Phusion</i>	0,3 µL		

El producto de la PCR fue resuelto en un gel de 0,8% agarosa y purificado mediante el *QIAEX II Gel Extraction Kit* de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA fue cuantificado con lector de microplacas de multi-detección Synergy HT de Biotek[®] y digerido con la enzima de restricción KspAI (HpaI) #ER1031 de Fermentas[®] mediante la siguiente reacción:

Mezcla de Reacción		Condiciones de digestión	
DNA	(500 ng) 30 µL		
Tampón de digestión B 10x	4 µL	37°C, o/n	
Agua	4 µL	65°C, 20 min	
HpaI	2 µL		

El producto de la digestión fue purificado por columnas mediante el *QIAquick PCR Purification Kit* de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.

2) Obtención del vector pWPI digerido con PmeI

Para obtener el vector pWPI, primeramente se lleva a cabo una Maxiprep siguiendo las instrucciones del kit *Nucleobond[®] Xtra Maxi* de Clontech. Seguidamente es digerido con la enzima de restricción MssI (PmeI) #ER1341 de Fermentas[®] mediante la siguiente reacción:

Mezcla de Reacción		Condiciones de digestión	
DNA	1 µg		
Tampón de digestión B 10x	2 µL	37°C, o/n	
Agua	16 µL	65°C, 20 min	
PmeI	1 µL		

El producto de la digestión fue resuelto en un gel de 0,8% agarosa, purificado mediante el *QIAEX II Gel Extraction Kit* de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificado. Finalmente, el vector fue defosforilado siguiendo las instrucciones de la fosfatasa alcalina intestinal de ternero de Invitrogen®.

3) Ligación

Una vez obtenidos el vector (V) y el inserto (I), se realizó la ligación con el ratio molar V:I = 1:3. Para ello se aplicó la fórmula: $\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{bp inserto}}{\text{bp vector}}$ y se llevo a cabo la reacción con la ligasa de DNA T4 de Fermentas® (#EF0511).

Mezcla de Reacción		Condiciones de ligación
Vector	50 ng	
Inserto	32, 5 ng	
Tampón de reacción 10x	2 µL	37°C, o/n
PEG	2 µL	65°C, 20 min
Agua	7 µL	
T4 ligasa	1 µL	

El producto de la ligación fue transformado en *E.Coli* (ver procedimiento en la sección Microbiología de este apartado) para la obtención de colonias con el plásmido recombinante.

4) Comprobación de clones positivos

A partir de las colonias obtenidas se realizaron minipreps de cada una de ellas mediante el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*, se obtuvo el DNA y se digirieron con el enzima de restricción Sal I (10348783001, Roche) con el fin de obtener un patrón de bandas que nos permitió identificar los clones con el inserto colocado en la dirección correcta.

Mezcla de Reacción		Condiciones de digestión
DNA	50 ng	
Tampón de reacción H 10x	32, 5 ng	37°C, 3 horas
Agua	2 µL	
Sall	2 µL	

El producto de la digestión se resolvió en un gel de 0,8% agarosa y se comprobó el patrón de bandas.

5) Secuenciación

El DNA de los clones positivos fue analizado mediante varias amplificaciones de la secuencia del plásmido por PCR usando el *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Los productos de la PCR fueron analizados por el servicio de secuenciación de la Universitat de Barcelona y los datos obtenidos los analizamos con el programa Sequence Scanner.

Mezcla de reacción		PCR
DNA	25-100 ng/1000pb	96°C, 1 min
Oligo (5 µM)	1 µL	96°C, 10 seg
BD3.1	1 µL	45°C, 5 seg
Tampón	3 µL	60°C, 4 min
Agua	csp 20 µL	25x desde el paso 2
		4°C, ∞

Oligonucleótidos de secuenciación

- **mCPT1c seq1:** 5'- CCTCCAGCTGGACCCTTCC -3'
- **mCPT1c seq2:** 5'- GTGGGTGAGGACATGGCGCC -3'
- **pWPI 3530 Rev:** 5'- CAAGCGGCTTCGGCCAGTAAC -3'
- **F1:** 5'- GACTTATGAGTCAGCCAGTACCCGACTG -3'
- **F2:** 5'- AACCGCAGCTGCTGACCTCTG -3'

1.1.2. OBTENCIÓN DE pVTHM-shCPT1C

Para la obtención del vector de silenciamiento de CPT1C, pLVTHM-CPT1C se siguió la siguiente estrategia de clonaje:

1) Diseño de la secuencia del shRNA

El diseño de la secuencia diana para silenciar la expresión de CPT1C se realizó mediante la plataforma en red: <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>. La cual procesó la secuencia de mRNA de CPT1C y diseñó un listado de posibles shRNA ordenados por energía de apareamiento. El factor más importante que determina que un dúplex siRNA sea procesado por el complejo RISC, y por tanto su capacidad de silenciamiento, es la energía de apareamiento de las bases en el extremo 5'. Ya que, a través del complejo RISC entran los dúplex siRNA que contienen nucleótidos de apareamiento débil en 5' y son excluidos los que contienen nucleótidos de apareamiento fuerte. Es decir, nos interesa que en el extremo 5' de

la hebra antisentido existan As o Ts, mientras que en el extremo 5' de la hebra sentido existan Gs y Cs. Por otro lado, los criterios para escoger el shRNA más efectivo se basaron en los descritos en el trabajo publicado por Reynolds y colaboradores (Reynolds *et al.*, 2004). Los cuales, fueron introducidos en un Excel por el grupo del Dr. Ramón Trullàs del Institut d'Investigacions Biomèdiques d'August Pi i Sunyer (IDIBAPS) que nos proporcionó. Este archivo, a partir de la secuencia de CPT1C, generó otro listado de posibles shRNA ordenados por mayor cumplimiento de los nueve requisitos descritos en el trabajo de Reynolds. De este modo, de la valoración en conjunto de los dos listados se escogieron dos secuencias de 19 pb para el silenciamiento de CPT1C y se diseñaron los siguientes shRNA (negrita: secuencia diana, verde: dianas de restricción de Mlul y ClaI).

352-374: Locus en la secuencia de CPT1C

5' CGCGT CCCC **GCAGGAAATTTACCTCTGT** TTCAAGAGA **ACAGAGGTAATTTCTGC** TTTTT GGAA AT 3'
 3' A GGGG **CGTCCTTTAAATGGAGACA** AAGTTCTCT **TGTCTCCATTTAAAGGACG** AAAAA CCTT TAGC 5'

2402-2424: Locus en la secuencia de CPT1C

5' CGCGT CCCC **GACCATGGGTATGGTATCT** TTCAAGAGA **AGATACCATACCCATGGTC** TTTTT GGAA AT 3'
 3' A GGGG **CTGGTACCCATACCATAGA** AAGTTCTCT **TCTATGGTATGGGTACCAG** AAAAA CCTT TAGC 5'

2) Hibridación de los oligonucleótidos del shRNA

La hibridación de los oligonucleótidos se realizó de la siguiente manera:

- I. Resuspensión de los oligonucleótidos en agua mQ autoclavada (A.C.) a 3mg/mL
- II. Añadir en un tubo de PCR, por parejas, 1 µL de *forward* y 1 µL de *reverse*.
- III. Añadir 48 µL de tampón de hibridación A.C.: 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,4
- IV. Reacción en termociclador:

PCR
95°C, 4 min
70°C, 10 min
60°C, 20 min
50°C, 30 min
37°C, 45 min
10°C, 60 min

3) Obtención de pLVTHM digerido con Mlul-Clal

Primeramente se llevó a cabo la digestión con Clal (10404217001, Roche) o/n a 37°C, partiendo de 4 µg de vector (2 µg/tubo) procedente de una maxiprep realizada previamente, el producto de la digestión se resolvió en gel de agarosa y se purificó del mismo modo que se ha descrito anteriormente. 1 µg del plásmido obtenido pLVTHM/Clal fue posteriormente digerido con Mlul también o/n a 37°C y vuelto a purificar en gel de agarosa.

4) Ligación y comprobación de clones positivos

La ligación del vector pLVTHM/Clal/Mlul con los insertos shRNA se realizó con un ratio molar V:I = 1:4, con lo que la reacción se llevó a cabo con 40 ng de vector por 1 ng de inserto mediante la ligasa de DNA T4. Los productos de la ligación fueron transformados en *E. Coli* para su posterior comprobación.

De igual manera que en el clonaje anterior, a partir de las colonias obtenidas, se realizaron minipreps (*Miniprep DNA Purification System*, #A1330 Promega) y se obtuvo el DNA. En este caso, la comprobación de los clones se hizo mediante una digestión simultánea EcoRI-Clal a 37°C, durante 3 horas.

Los clones positivos se denominaron sh352 y sh2424 haciendo referencia al locus de la secuencia diana de inhibición de CPT1C.

MICROBIOLOGÍA

La cepa de *E. Coli* utilizada en este trabajo es la DH5α. Esta cepa no es patógena y fue desarrollada para su uso en estrategias de clonación de laboratorio, de tal forma que contiene múltiples mutaciones que les confieren una alta eficiencia de transformación. El procedimiento de transformación consiste en introducir un plásmido de DNA en células bacterianas competentes para su posterior purificación, amplificación o expresión de proteínas. En este trabajo se llevó a cabo la transformación por medio de choque térmico en células DH5α competentes producidas en el laboratorio, tal y como se indica a continuación.

Transformación bacteriana

Todo el procedimiento se lleva a cabo en condiciones de esterilidad:

1. Descongelar las células competentes (DH5α) en hielo.
2. Añadir 50-100 ng de DNA a cada tubo de transformación (*ependorf* 1,5 mL).
3. Añadir 50 µL de células competentes al tubo de transformación con el DNA

4. Mantener 30 minutos en hielo.
5. Someter las células a choque térmico durante 1 minuto y 15 segundos a 42°C.
6. Agregar 500 µL de medio SOC e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación.
7. Plaquear hasta 250 µL de la suspensión en placas LB agar con el antibiótico apropiado (opcionalmente se puede centrifugar durante 5 minutos a 2500rpm para concentrar las células) e incubar a 37°C o/n.

Medio SOC: Triptona (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), MgSO₄ (4,8 g/L), dextrosa (3,6 g/L), NaCl (0,5 g/L), KCl (0,186 g/L).

Cultivo de bacterias

En función del procedimiento, las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo LB (Luria-Bertani) líquido o bien LB sólido (LB agar) en presencia del antibiótico apropiado.

El medio LB está compuesto por triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (5 g/L), 20 g. se disuelven en 1L de agua destilada y se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Se almacena a 4°C hasta su uso, momento en el que se le añade el antibiótico. El medio LB agar se compone de agar bacteriológico (15 g/L) además de los descritos en el medio LB. 35 g. se disuelven en 1L de agua destilada y se autoclava, cuando la temperatura del medio baja a 45-50°C se añade el antibiótico (100 mg/L de ampicilina) y se distribuyen 30 mL de medio en placas de petri que se almacenan a 4°C hasta su uso.

Se realizaron stocks glicerolados de bacterias para el almacenamiento a largo plazo de los plásmidos obtenidos. Tras la transformación con el plásmido deseado, se inocula una colonia aislada en 3 mL de medio de cultivo LB líquido (precultivo) durante 8 horas en agitación, posteriormente los 3 mL se inoculan en 500 mL de medio LB durante 16 horas. Por último, se añaden 200 µL de glicerol 80% estéril a 600 µL de la suspensión celular. La adición de glicerol estabiliza las bacterias congeladas, evitando daños en las membranas de las células y manteniéndolas vivas.

1.2 GENOTIPADO

La generación de ratones CPT1C KO fue a través de una mutación genética introducida por recombinación homóloga. Para verificar la correcta recombinación e identificar el genotipo de los animales, se analizó el ADN obtenido de las colas de los ratones por PCR utilizando simultáneamente 3 cebadores específicos, que permite la identificación tanto de los

homocigotos como de los heterocigotos (figura 32). La preparación del ADN y la reacción de PCR se detallan a continuación:

1. Hervir las colas (0,5 cm) durante 10 minutos a 95°C en tampón de digestión
2. Centrifugar
3. Añadir 2 µL de proteinasa K recombinante 1 mg/mL (#03115887081 Roche)
4. Incubar o/n a 55°C en agitación
5. Vortear y centrifugar
6. Hervir durante 10 minutos a 95°C (desnaturalización proteinasa K)
7. Centrifugar y recuperar el sobrenadante

Tampón de digestión: 1 mL de β-mercapto + 100 mL de tampón (300 mL: 13,4 mL de Tris-Cl 1,5M pH 8,8, 5 mL de (NH₄)₂SO₄ 1M, 2 mL de MgCl₂ 1M, 1,5 mL de tritón X-100 100%, agua csp. 300 mL).

Mezcla de reacción		PCR
DNA	2,5 µL	
dNTPs 2,5 mM	1 µL	94°C, 2 min
Forward F9 12,5 mM	0,9 µL	94°C, 30 seg
Reverse R1 12,5 mM	0,6 µL	65°C, 30 seg
Reverse R9 12,5 mM	1,6 µL	72°C, 1 min
Tampón de reacción 10x	2,5 µL	30x desde el paso 2
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µL	72°C, 7 min
BioTherm™ Taq DNA polimerasa	0,35 µL	
Agua	14,3 µL	

Oligonucleótidos para genotipado

- **KOF9:** 5'- GAGTCAGCCATGACCCGACTGTTG -3'
- **KOR1:** 5'- CCGGTAGAATTGACCTGCAGGGGC -3'
- **KOR9:** 5'- CGCTAAAGCCCAGACAGAACACAC -3'



Figura 32. Análisis del genotipado de ratones WT, heterocigotos y CPT1C KO por PCR, en gel de agarosa.

1.3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

1.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA

La homogenización de los tejidos de ratón y la purificación del RNA se realizó con el reactivo TRIzol® (15596-026 Invitrogen) siguiendo las instrucciones del manual. Este reactivo es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes que facilitan el aislamiento de especies de RNA de distintos tamaños moleculares. Además mantiene la integridad del RNA debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad RNasa mientras se lisan las células y se disuelven los componentes celulares durante la homogeneización de la muestra.

Para la homogenización de los tejidos periféricos (35-40 mg) y del hipotálamo se utilizó el homogeneizador Fast-PreP®-24 (MP Biomedicals). Una sección de los tejidos previamente congelados se introducen en tubos de 1,5 mL con rosca que contienen una base de esferas de cerámica (#13113-325 Mo Bio) como matriz de molienda y 500 µL de Trizol®, se someten a tres ciclos de cuarenta segundos a máxima potencia, manteniendo las muestras en hielo durante cinco minutos entre ciclos. En el caso del MBH, fue homogenizado con 250 µL de Trizol® mediante sonicación.

Después de homogeneizar las muestras, se añade cloroformo y se permite que el homogenado se separe en una capa transparente superior acuosa (que contiene RNA), una interfase, y una capa orgánica inferior (que contiene DNA y proteínas). El RNA se precipita de la capa acuosa con isopropanol y se lava con etanol 75% para eliminar impurezas, finalmente se resuspende en agua DEPC autoclavada para su uso en aplicaciones posteriores. La concentración final del RNA se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el lector de micro-placas Synergy HT de Biotek®.

1.3.2. SÍNTESIS DE cDNA

Para el análisis de la expresión de genes a partir de los mRNA es necesaria la síntesis de cDNA de cadena simple mediante la enzima transcriptasa inversa a partir de RNA, el cual será amplificado posteriormente por la técnica de PCR a tiempo real.

La transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*) utilizada en el procesado de nuestras muestras fue la M-MLV RT (28025 Invitrogen). La RT es una DNA polimerasa que en presencia de un oligonucleótido inicia la síntesis de una cadena de DNA complementaria (cDNA) a partir de una cadena simple de RNA o DNA. Para el análisis de la expresión génica de

nuestras muestras, en todos los casos se partió de 1µg de RNA y se utilizaron *random primers*, que son una colección de oligonucleótidos de secuencia aleatoria que permiten sintetizar cDNAs a partir de todos los RNAs de la muestra. La reacción se lleva a cabo en presencia del tampón de reacción proporcionado juntamente con el enzima, DTT y un inhibidor de RNAsas, durante 1 hora a 37°C.

1.3.3. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) es una variante de la PCR convencional que permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la reacción. Para ello, a la que a la mezcla de reacción se añade un fluoróforo y se lleva a cabo en un termociclador capaz de detectar la fluorescencia emitida por dicho fluoróforo, de manera que permite cuantificar la tasa de generación de DNA después de cada ciclo de amplificación. Existen dos tipos distintos de fluoróforos que pueden ser utilizados, distinguidos por la especificidad de su unión. En la mayoría de casos se puede utilizar un fluoróforo inespecífico que se une a la doble cadena de DNA permitiendo detectar la generación de nuevas hebras. En este caso, el fluoróforo habitual es el agente intercalante *SYBRGreen*. Sin embargo, en algunos casos no es aconsejable su uso debido a la naturaleza inespecífica de su unión. En estos casos, las sondas específicas con una secuencia complementaria al fragmento de DNA a amplificar son utilizadas. En este trabajo se han utilizado sondas de hidrólisis, este sistema se basa en la existencia de una sonda, además de los cebadores, marcada con dos compuestos, un apagador (*quencher*) y un fluoróforo. Durante el proceso de elongación, la sonda es hidrolizada y el fluoróforo y el *quencher* se separan, lo que provoca la liberación de fluorescencia.

Se utilizó la mezcla de reacción *SsoAdvanced™ SYBR®Green Supermix* (#172-5261 BioRad) o bien la *SsoFast™ Probes Supermix* (172-5231 BioRad) según el sistema de detección, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. En todos los casos se usó el termociclador C1000 Thermal Cycler CFX96™ de BioRad. Asimismo, en todos los casos se realizaron curvas patrón para determinar la eficiencia de amplificación de los pares de oligonucleótidos, se partió de 20 ng de cDNA para cada reacción y se analizó la temperatura de desnaturalización en el caso del uso de *SYBRGreen* para comprobar la correspondiente especificidad del producto amplificado. La cuantificación de GAPDH o β-actina se utilizó para la normalización en el cálculo de la expresión relativa de los genes analizados. A continuación se detallan los oligonucleótidos que han sido utilizados a lo largo de este trabajo (proveídos por Integrated DNA Technologies).

Oligonucleótidos para SYBRGreen

- **CPT1C:** 5'- TATGCAGTCGCCCTTCCT -3' y 5'- ACATCAATCAGGTGTGTCTGCT -3'
- **PDK4:** 5'- CGCTTAGTGAACACTCCTTCG -3' y 5'- CTTCTGGGCTCTTCTCATGG -3'
- **CPT1A:** 5'- GACTCCGCTCGCTCATTC -3' y 5'- AAGGCCACAGCTTGGTGA -3'
- **CPT1B:** 5'- TGCCTTTACATCGTCTCCAA -3' y 5'- GGCTCCAGGGTTCAGAAAGT -3'
- **GAPDH:** 5'- TCCACTTTGCCACTGCA -3' y 5'- GAGACGGCCGCATCTTCTT -3'
- **β -actina:** 5'- CCCGCGAGTACAACCTTCT -3' y 5'- CGTCATCCATGGCGAACT -3'

Oligonucleótidos con Sonda

- **UCP2:** Mm.PT.58.13053128.g PrimeTime™ Std qPCR Assay
- **AgRP:** Mm00475829_g1 Applied Biosystem
- **NPY:** Mm00445771_m1 Applied Biosystem
- **β -actina:** Mm.PT.39^a.22214843.g
- **GAPDH:** 4352339E Applied Biosystem

1.4. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**1.4.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

El método de extracción de proteínas varió en función de la fuente de extracción. A continuación se detalla el procedimiento seguido para la extracción de proteína de tejidos de ratón y de células en cultivo.

DISECCIÓN DE TEJIDOS DE RATÓN

Extractos de proteína total fueron obtenidos a partir de tejido previamente congelado mediante homogeneización en Fast-Prep®-24. La disgregación del tejido se consigue añadiendo secciones de 35-50 mg de tejido a tubos de 1,5 mL con rosca que contienen una base de esferas de cerámica como matriz de molienda y 500 μ L de tampón de lisis RIPA (R 0268 Sigma) en presencia de inhibidores de proteasas (P8340 Sigma-Aldrich) y fosfatasas (#04906845001 Roche). Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4°C. Las muestras se someten a 3 ciclos de 40 segundos a potencia máxima, manteniéndolas en hielo durante 5 minutos entre ciclos. El homogenado se recupera en tubos *ependorf*, se mantiene en rotación durante 20 minutos a 4°C y los restos tisulares se descartan mediante centrifugación a 4°C. La homogeneización del hipotálamo se realiza en 150 μ L de tampón de lisis y el MBH en 100 μ L

mediante sonicación. La cuantificación de proteínas se realiza mediante el *BCA Protein Assay Kit* (PI-23227 Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

CÉLULAS EN CULTIVO

Extractos de proteína total fueron obtenidos a partir de células en cultivo mediante el siguiente procedimiento:

1. Lavar las células con PBS (*Phosphate Buffer saline*) 1x.
2. Colocar la placa en hielo y añadir la cantidad correspondiente de tampón de lisis (placa de 6 pocillos: 80 μ L/pocillo, placa de 12 pocillos: 40 μ L/pocillo).
3. Recoger las células con la ayuda de un rascador en el tampón de lisis en un *ependorf* de 1,5 mL.
4. Romper las células mediante sonicación y dejar proceder la lisis celular durante 15 minutos en hielo.
5. Almacenar a -20°C.

PBS 1x: NaCl (8 g), Na₂HPO₄·2H₂O (1,44 g), KCl (0,2 g), KH₂PO₄ (0,2 g) disueltos en agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

Tampón de lisis: 20 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 150 mM NaCl.

La cuantificación de la concentración de proteína final de las muestras se realizó de acuerdo con las instrucciones del *Bradford Protein Assay* (500-001 BioRad).

1.4.2. WESTERN BLOT

La técnica de inmunodetección de proteínas con anticuerpos permite detectar la cantidad de una proteína concreta de entre el total de proteínas de una muestra. Esta técnica se denomina *western blot* e incluye varias fases.

1) Separación electroforética en gel de poliacrilamida (SDS_PAGE)

Primeramente las muestras se hierven en tampón de carga 1x durante 5 minutos a 95°C para monomerizar y desnaturalizar las proteínas favoreciendo que migren de manera proporcional a su masa molecular durante la separación electroforética en gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizó montando los geles en la cámara correspondiente sumergidos en tampón de electroforesis, fijando el voltaje a 130v en el caso de usar geles de acrilamida caseros, o bien a 180v en el caso de usar geles prefabricados (*Mini o Midi-PROTEAN® gels* BioRad).

Tampón de carga 4x: 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 20% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol en agua destilada.

Tampón de electroforesis: 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina, 0,1% SDS.

Gel de acrilamida apilador: Para 2,5 mL: 1,9 mL de agua destilada, 300 μ L de acrilamida/bisacrilamida 40%, 250 μ L de 1,25 M Tris-HCl pH 6,8, 25 μ L de SDS 10%, 8,5 μ L de persulfato amónico 10% y 2,5 μ L de TEMED.

Gel de acrilamida separador: Para 7,5 mL al 8% acrilamida: 4,4 mL de agua destilada, 1,5 mL de acrilamida/bisacrilamida 40%, 1,5 mL de 1,87 M Tris-HCl pH 8,8, 75 μ L de SDS 10%, 25 μ L de persulfato amónico 10% y 3,75 μ L de TEMED.

2) Electrotransferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana de PVDF. Para ello montamos un sándwich con los siguientes componentes por orden: esponja, papel *Whatman*, gel, membrana, papel *Whatman* y esponja. Éste se introdujo en una cubeta sumergido en el tampón de transferencia. La cual se llevo a cabo durante una hora a 400 mA a 4°C. Una vez terminada, la membrana se lava con PBS 1x.

Tampón de transferencia: 20 mM Tris pH 8,5, 150 mM glicina, 20% metanol.

3) Bloqueo de la membrana

Los sitios de unión inespecíficos de la membrana fueron bloqueados por inmersión de la misma en solución de bloqueo. Se han utilizado dos soluciones de bloqueo distintas en función de la inmunodetección realizada posteriormente: I) 2% leche desgrasada en polvo (Blotting-Grade blocker #170-6404 BioRad) en TBST, II) 5% BSA en TBST. Por el mismo motivo, la membrana fue bloqueada durante una hora a temperatura ambiente o bien o/n a 4°C, en agitación en ambos casos.

TBST: 0,1% Tween 20 en TBST 1x (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3,9 mM HCl)

4) Incubación del anticuerpo primario

La incubación de los anticuerpos primarios fue puesta a punto para cada uno de ellos. En general los anticuerpos contra proteínas fosforiladas se incubaron o/n a 4°C, el resto se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, y en el caso del anti-CPT1C se incubó durante una hora y media a 37°C. En todos los casos las incubaciones se hicieron en bolsas de plástico selladas en agitación, siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la

preparación de cada anticuerpo (tabla 3). Seguidamente, éstas fueron consecutivamente lavadas con TBST durante 15, 10 y 5 minutos.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti CPT1C	Sintetizado por encargo contra los últimos 14 AA de CPT1C de ratón
Anti CPT1A	Sintetizado por encargo contra los AA 317-430 de CPT1A de rata
Anti fosfo-AMPK α (Thr172)	#9957 Cell Signaling
Anti fosfo-ACC (Ser79)	#9957 Cell Signaling
Anti fosfo-PDH (Ser232)	AP1063 Calbiochem
Anti SIRT1	#07-131 Millipore
Anti fosfo-mTOR (Ser2448)	#2971 Cell Signaling
Anti mTOR	#2972 Cell Signaling
Anti LC3A/B (D3U4C) Xp [®]	#12741 Cell Signaling
Anti BiP	#3183 Cell Signaling
Anti fosfo-NF- κ B (Ser536)	#3033 Cell Signaling
Anti fosfo-IRE (S724)	Ab104157 Abcam
Anti fosfo-eIF2 (Ser51)	#9721 Cell Signaling
Anti β -actina (AC-15)	MA1-91399 Thermo Scientific
Anti tubulina	T2200 Sigma
Anti GAPDH	AM4300 Applied Biosystems

Tabla 3. Detalle de los anticuerpos usados en este trabajo

5) Incubación del anticuerpo secundario

El complejo antígeno-anticuerpo generado tras la incubación con el anticuerpo primario se visualizó por inmunoensayo enzimático indirecto utilizando un anticuerpo secundario. Este anticuerpo es una inmunoglobulina contra el anticuerpo primario conjugada con la peroxidasa de rábano (*HRP, Horseradish Peroxidase*). Por lo tanto, el anticuerpo secundario utilizado depende de la especie dónde ha sido sintetizado el anticuerpo primario. En todos los casos, la incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, la membrana fue lavada del mismo modo que en el paso anterior.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti conejo	9340 Amersham biosciences
Anti ratón	515-035-003 Jackson Immunoresearch

6) Detección y cuantificación

La detección del anticuerpo secundario se realizó con la adición a la membrana del sustrato de quimioluminiscencia (*Luminata Forte WBLUF0500* Millipore). La enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario actúa sobre él emitiendo luz, que será captada por una cámara y capturará la imagen, que nos permitirá mediante un *software*, la cuantificación de la intensidad de las bandas de cada muestra. El sistema de detección y el *software* utilizados han sido Syngene G:Box y GeneTools de Syngene, respectivamente.

7) Reutilización de la membrana

La membrana con las proteínas transferidas puede utilizarse para más de una inmunodetección. La eliminación de los anticuerpos unidos evitará la interferencia con la incubación y la detección de nuevos anticuerpos. Para ello, la membrana fue incubada con agua destilada hirviendo mediante 3 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno. Tras este procedimiento, la membrana puede ser directamente re-incubada con los anticuerpos de interés o almacenada a 4°C en PBS 1x.

2. BIOLOGÍA CELULAR

En este trabajo se han realizado métodos de trabajo de cultivo celular con tres líneas celulares distintas. 1) **HEK293T**: Esta línea celular deriva de riñón humano embrionario y ha sido utilizada para la fabricación de lentivirus, 2) **Neuro-2a**: estas células provienen de neuroblastoma de ratón, obtenidas a partir de un tumor espontáneo de una cepa de ratón albino, esta línea ha sido utilizada para la comprobación de la funcionalidad de los vectores plasmídicos, y 3) **GT1-7**: línea neuronal hipotalámica de ratón, usada como modelo experimental *in vitro* para llevar a cabo el estudio del metabolismo hipotalámico.

2.1. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

En este apartado se detallan las condiciones de crecimiento de las distintas líneas celulares que han sido utilizadas en este trabajo, así como los procedimientos básicos de cultivo celular empleados.

En todos los casos, las células han sido mantenidas a 37°C y 5% CO₂ y cultivadas en medio de crecimiento DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, E15-009 PAA) con alto

contenido de glucosa (4,5 g/L), 10% de suero inactivado (FBS: *Fetal Bovine Serum*) y 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina.

- **HEK293T**: DMEM suplementado con 4 mM glutaMAX™ (#35050 Life Technologies). Estas células se expandieron dos veces por semana mediante diluciones 1:10, mientras que se realizaban cambios de medio cada 2-3 días.
- **Neuro-2a**: DMEM suplementado con 6 mM glutaMAX™ y 1 mM piruvato sódico (P5280 Sigma-Aldrich). Se subcultivaron mediante diluciones 1:5 dos veces por semana, realizando cambios de medio cada 2-3 días.
- **GT1-7**: DMEM suplementado con 4 mM glutaMAX™, 1 mM piruvato sódico. Las GT1-7 se subdividían mediante diluciones 1:3 dos veces a la semana, realizando cambios de medio cada 2-3 días.

Todos los reactivos usados en cultivos celulares fueron esterilizados o bien autoclavándolos durante 30 minutos a 121°C, o bien filtrándolos por filtros de 0,22 µm (#SLGP33R3 Millipore).

CONTAJE DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS

El conteo celular se realizó con la ayuda de un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Ésta se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, la cual está dividida en 9 cuadrantes de 1 mm². 20 µL de células en suspensión se colocan entre la cámara y un cubreobjetos, la media de células contadas en dos cuadrantes de las esquinas x 10.000 nos indicará el número de células por mL. Esta cámara permite medir la concentración celular dentro de un rango entre 250.000 células y 2,5 millones de células por mL.

CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS

Un stock de 6-8 viales de cada línea celular fueron criopreservados con el número de pases más bajo posible. A partir de este stock, cada tubo descongelado fue reemplazado con otro vial de células criopreservado. Para ello, las células cultivadas en placa a una confluencia de entre el 70-80% en el caso de las neuronas y del 50-60% en el caso de las HEK, fueron tripsinizadas (T3924 Sigma-Aldrich), suspendidas en 10 mL de medio de cultivo y centrifugadas durante 5 minutos a 300xg. El pellet de células se resuspendió con 1,5 mL de medio 10% DMSO en un criotubo. Debido a la citotoxicidad del DMSO a 37°C, las células se depositaron inmediatamente en un contenedor con isopropanol a -80°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo se almacenaron en N₂ líquido.

DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Células almacenadas en N₂ líquido, son descongeladas en un baño a 37°C, inmediatamente son diluidas en 10 mL de medio de crecimiento atemperado y centrifugadas durante 5 minutos a 300xg para eliminar el DMSO. Posteriormente son resuspendidas en el volumen de medio deseado y sembradas en placa. El medio es reemplazado al día siguiente.

2.2. TRANSFECCIÓN MEDIANTE LIPOSOMAS

La transfección es el procedimiento por el cual material génico externo es introducido en células de mamífero en cultivo. La transfección mediante liposomas se basa en la combinación de lípidos cationicos (cargados positivamente) con el material génico aniónico (cargado negativamente) para formar un agregado con carga neta positiva fácilmente fusionable con la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares cargada negativamente. De esta manera, el DNA o RNA es introducido al interior de la célula.

Tres reactivos de transfección distintos fueron ensayados en células Neuro-2a (*Lipofectamine2000*, *Metafectene* y *Effectene*). Finalmente, *LipofectamineTM2000* (#11668 Invitrogen) fue utilizado para comprobar la funcionalidad de los plásmidos obtenidos para la sobre-expresión y la inhibición de CPT1C descritos en el primer apartado de este capítulo.

Primeramente se transfectaron células Neuro-2a con los 4 plásmidos (ShRandom, Sh352, pWPI-GFP y pWPI-CPT1C) durante 24 horas. Debido al gran peso molecular de los plásmidos, la máxima eficiencia de transfección conseguida fue de aproximadamente el 50% (figura 33A). Sin embargo, el western blot contra CPT1C de estas muestras nos indica que los plásmidos son capaces tanto de inducir la sobre-expresión de CPT1C como de inhibirla (figura 33A). Por otro lado, para confirmar mediante otra aproximación la funcionalidad de los vectores, tal y como se describe en el trabajo publicado por Xie y colaboradores ([Xie et al., 2011](#)), la transfección simultánea de un plásmido de sobre-expresión junto con el de inhibición es un método efectivo para comprobar la eficacia de ambos. Por lo cual, células HEK293T fueron co-transfectadas. En la figura 33B se puede ver una mayor eficiencia de transfección en comparación con las células Neuro-2a, así como los niveles de mRNA de CPT1C, los cuales muestran un incremento de 17 veces sobre la expresión endógena de CPT1C y una inhibición del 80% efectuada por el sh352 y del 65% por el sh2402.

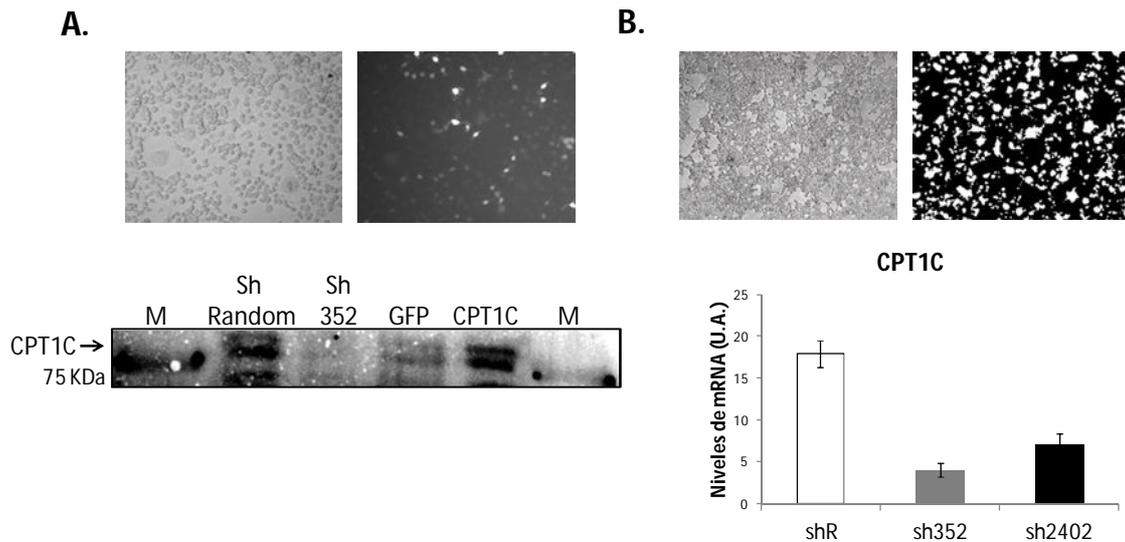


Figura 33. Sobre-expresión e inhibición de CPT1C mediante transfección. **A)** Células Neuro-2a transfectadas con los plásmidos Sh352, pWPI-CPT1C y los respectivos controles shRandom y pWPI-GFP durante 24 horas. Arriba: imagen de células Neuro-2a transfectadas (derecha: campo claro, izquierda: fluorescencia), abajo: Western blot de CPT1C. **B)** Células HEK293T transfectadas simultáneamente con los plásmidos de sobre-expresión y de inhibición durante 24 horas. Arriba: imagen de células HEK293T transfectadas, abajo: niveles de mRNA de CPT1C.

2.3. OBTENCIÓN DE LENTIVIRUS

Una vez comprobada la funcionalidad de los vectores obtenidos, se decidió fabricar lentivirus con el fin de mejorar la eficiencia de la transfección en células neuronales en cultivo (denominada transducción en el caso de ser mediada por infección viral).

Los lentivirus son virus de la familia Retroviridae, cuyo genoma se basa en RNA, replicándose a través de la formación por retrotranscripción de un DNA provisional. Los retrovirus dependen de transcriptasas inversas para la retrotranscripción y de integrasas para que su DNA sea insertado en el genoma de la célula huésped. Por lo que el material génico introducido es integrado y heredado por las células hijas, aunque los lentivirus ofrecen la ventaja de ser altamente eficientes no sólo en células que se dividen, sino también en células que no están destinadas a dividirse como las neuronas. Sin embargo, los lentivirus no tienen la capacidad de autoreplicarse por lo que una célula infectada no es capaz de generar más viriones.

Para la generación de lentivirus, además del vector lentiviral (pVLTHM y pWPI) también son necesarios un vector de empaquetamiento vírico (cápside) y otro de envoltura vírica que permite la fusión con la membrana de la célula huésped e introducir la cápside con

el genoma. Los vectores utilizados fueron psPAX2 (#12260 Addgene) y pMD2.G (#12259 Addgene), respectivamente (figura 34).

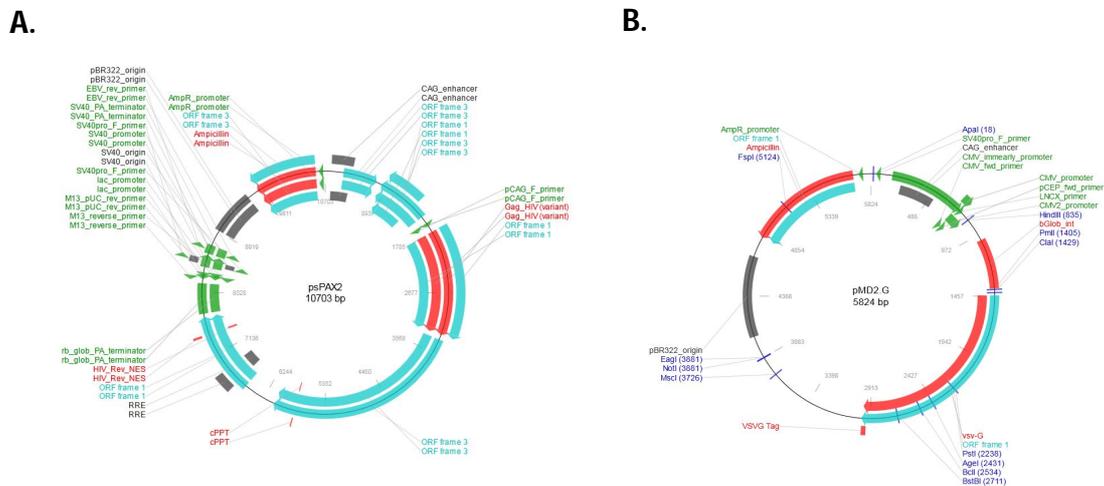


Figura 34. Vectores psPAX2 y pMD2.G. A) psPAX2: vector de empaquetamiento de segunda generación, **B)** pMD2.G: vector de envoltura vírica.

Para la generación de los distintos lentivirus se siguió el protocolo descrito por el Laboratorio Trono, basado en la transfección por fosfato cálcico de los tres vectores en células HEK293T. A continuación se detallan las distintas fases del procedimiento, desde la producción hasta la titulación. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo las medidas de seguridad correspondientes al nivel de bioseguridad 2 (BL2).

PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

1) Preparación de células para transfección

1. El día anterior a la transfección sembrar $4 \cdot 10^6$ células/placa p100 mm (3 placas por virus).
2. En el día de la transfección las células deben de estar ~ 80% confluencia

2) Transfección por fosfato de calcio

3. 2h antes de la transfección, cambiar el medio y reponer 10 mL.
4. Ajustar la concentración de DNA de todos los plásmidos a 1 mg/mL en TE buffer pH 8.
5. Para 3 placas a transfectar, en un falcon de 50ml preparar la mezcla en la siguiente orden:
 - 45 μ g de pLVTHM o pWPI
 - 15,9 μ g de pMD2.G

- 29,1 µg de psPAX2
 - 1,3 mL de TE 0,1X (final 0,03X) y 727 µL de buffered water
 - 223 µL de CaCl₂ 2,5M (final 124 mM) y mezclar bien por pipeteo.
 - 2,25 mL de 2x HeBS (final 1x) gota a gota y sobre agitación con vortear (asegurará la formación de un precipitado óptimo para la transfección)
V_{final} = 4,5 mL
6. Dejar el precipitado a temperatura ambiente (por lo menos 5 min y no exceder los 30 minutos) 20 min.
 7. Añadir gota a gota 1,5 mL/placa. Mezclar suavemente hasta que el medio tenga un color uniforme. Incubar o/n.
 8. En la mañana siguiente, aspirar el medio y añadir lentamente 5 mL de medio. Incubar 8h.
⇒ Tomar imágenes de fluorescencia (GFP) en el microscopio.

3) Recogida de sobrenadantes

9. Recoger los sobrenadantes en un *Falcon* de 50 mL. Cerrar el tubo, vaporizar con 75% etanol antes de sacarlo de la campana. Almacenar los sobrenadantes a 4°C.
10. Añadir otros 5 mL de medio e incubar otras 8-12h.
11. Recoger los últimos sobrenadantes a la mañana siguiente, en el *Falcon* de 50 mL del día anterior (los sobrenadantes pueden ser recuperados 2 o 3 veces, cada 8-12h. Mantenerlos a 4°C hasta que se finalice el periodo de recogida).

4) Concentración de sobrenadantes

12. Filtrar los sobrenadantes con filtros de 0,45 µm
13. Lentamente, pipetear los sobrenadantes para los tubos de 30ml de ultracentrífuga *Beckman* (~28ml – dejar 1 cm de margen). Usar los tubos del rotor SW 28 (*Beckman*)
14. Ultracentrifugar 2h, 20.000 rpm a 16°C
15. Suavemente, descartar el sobrenadante por inversión
16. Dejar el tubo secar invertido (dejar el pellet secar demasiado, cerca de 2-3 min es suficiente)
17. Resuspender el sedimento (no siempre visible) con 150 µL de PBS 1X, pipeteando 10-15 veces alrededor del pellet, y después subir y bajar 15 veces. (El medio que queda es importante porque tiene algunas proteínas importantes para la estabilización de partículas virales. Evitar la formación de burbujas cuando se resuspende el sedimento)
18. Hacer alícuotas de 20ul y almacenar a -80°C.

Tampón TE 1x pH 8: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8

Agua tamponada: 50 mL agua mQ + 125 μ L de 1 M HEPES pH 7,3 (2,5 mM final). Esterilizar con filtro de 0,22 μ m. almacenar hasta 6 meses a 4°C.

CaCl₂ 2,5M: 9,18g CaCl₂.2H₂O en 25ml de H₂O. Esterilizar con filtro de 0.22 μ m. Almacenar a 4°C.

2x HeBS (HEPES Buffered saline): Disolver en 800 ml de agua: 16,36 g NaCl (280 mM final), 11,9 g HEPES (50 mM final), 267 mg Na₂HPO₄.2H₂O (1,5 mM final). Ajustar el pH a 7.00 con 5M NaOH y enrasar con agua a 1L y comprobar el pH final a 7.00 (el pH es crítico porque debajo de 6.95 el precipitado no se forma; por encima de 7.05 el precipitado será grande y la eficiencia de transfección baja). Esterilizar con filtro de 0,22 μ m. Almacenar hasta 2 años en alícuotas de 50 mL a -70°C. Una vez descongelada, la solución de HeBS se puede mantener a 4°C durante varias semanas.

TITULACIÓN DE LENTIVIRUS

El título es un valor que expresa la concentración de virus en un determinado volumen. Para conocer este valor se lleva a cabo la titulación, en la cual se emplean una serie de diluciones para obtener información cuantitativa aproximada de un procedimiento analítico que inherentemente sólo evalúa como positivo o negativo. El título corresponde al factor de dilución más alto que todavía produce una lectura positiva. A continuación se detalla el procedimiento y el análisis de la titulación mediante citometría de flujo.

1) Titulación en células HEK293T

1. Primer día (9-12h): Sembrar 40.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos
2. Segundo día (16-18h):
 - I. Contar las células de 2 pocillos y hacer la media
 - II. Transducir las células con 8 diluciones 1:2, añadiendo 1 μ L de cada dilución en la mitad del volumen del medio de cultivo
 - III. Dejar un pocillo sin virus como control negativo
3. Tercer día (9-12h): Añadir 1 mL de medio de cultivo
4. Quinto día: Recoger las células para analizarlas por citometría de flujo.
 - I. Lavar con PBS 1x, añadir 100 μ L de tripsina (5 minutos a 37°C)
 - II. Añadir 1 mL de medio, centrifugar en tubos de 1,5 mL durante 5 minutos a 1500 rpm, aspirar el medio y hacer 2 lavados con PBS 1x.
 - III. Resuspender el sedimento de células en 2 mL de PBS 1x.

2) Análisis de la titulación por citometría de flujo (FACS)

El análisis de las muestras por citometría de flujo se basa en pasar las células suspendidas en un fluido por un finísimo tubo transparente sobre el que incide un haz de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto al tamaño y la complejidad de las células. La técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) es un tipo especializado de citometría que provee un método para la identificación de células según las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula.

Primeramente, con la ayuda de otros miembros del laboratorio fue identificada la población de células HEK293T, seguidamente a partir de células transfectadas con GFP y de células sin transfectar como control negativo se marcaron los parámetros en el citómetro (BD FACSalibur™) de modo que permitía discriminar las células en función de la señal de fluorescencia. Los datos proporcionados por el citómetro fueron analizados con el programa WinMDI de modo que para cada muestra se pudo calcular el porcentaje de células GFP positivas y negativas. A partir de estos valores se generó la curva de diluciones (figura 35) y se calculó la concentración de virus (TU/mL: Unidades de transducción por mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TU/mL} = \frac{\% \text{ células GFP positivas} \times \text{número de células Día 2}}{\mu\text{L de virus}}$$

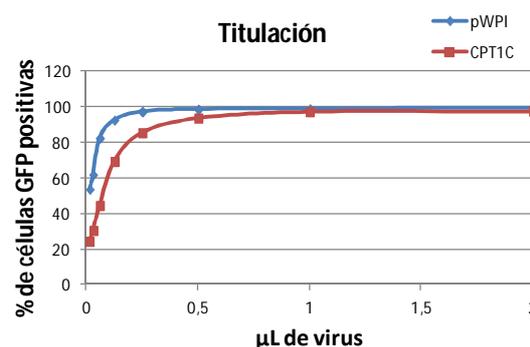


Figura 35. Titulación de lentivirus por citometría de flujo. Curva de células transducidas mediante diluciones en serie de lentivirus.

2.4. TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

El protocolo seguido en los experimentos dónde se sobre-expresaba o inhibía CP1C mediante lentivirus fue el siguiente:

1. Sembrar 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos
2. A las 24 horas, retirar la mitad del volumen del medio de cultivo y añadir el volumen de virus en función de la dosis de virus deseada. La dosis se expresa en MOI (TU/célula), el volumen de virus necesario se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\mu L \text{ virus} = \frac{mL \text{ virus}}{\mu L \text{ virus}} \times \frac{TU}{mL \text{ virus}} \times \frac{célula}{TU} \times n^{\circ} \text{ de células}$$

3. A las 16 horas aspirar el medio y añadir medio completo
4. A las 72 horas después de la transducción se recogen las células para el posterior análisis de RNA o proteína.

2.5. ENSAYO DE OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los distintos ensayos de oxidación realizados en este trabajo se han llevado a cabo en las instalaciones de radioactividad de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Este método ha sido descrito por Roduit y colaboradores ([Roduit et al., 2004](#)). Se basa en el principio por el cual la oxidación de oleato a CO₂ indica la oxidación total de la molécula de ácido graso, por lo cual utiliza un sistema en el que el CO₂ radioactivo producido por las células como producto de la oxidación del ácido graso marcado radioactivamente es recogido en un papel humedecido con KOH (figura 36). Seguidamente se detallan las distintas fases de este método.

1) Preparación de la células

Se siembran 750.000 células/flask en flasco de 25 cm². Opcionalmente las células pueden ser tratadas o transducidas previamente a la reacción de oxidación. Las distintas condiciones de cada experimento son ensayadas por triplicado, además en todos los experimentos hay que añadir un punto extra para la cuantificación de proteína y otro punto extra como control negativo, el cual consiste en realizar exactamente los mismos pasos en un flasco sin células.

2) Reacción de oxidación

1. Primeramente se preparan las siguientes soluciones:
 - KRB 5x: para 500 mL: NaCl (19,72g), KCl (0,67g), NaH₂PO₄ (0,17g), MgSO₄ (0,25g), CaCl₂ (0,55g), agua hasta 500 mL. (El CaCl₂ debe prepararse en primer lugar porque puede precipitar). Almacenar a 4°C.
 - KRBH: para 100 mL: 20 mL de KRB5x, 2 mL de NaHCO₃ 100 mM (extemporáneo), 1 mL de HEPES 1M pH 7,4, 77 mL de agua. Preparar el mismo día del ensayo.
 - KRBH + 0,1% BSA: para 45 mL: añadir 150 µL de 30% BSA a 45 mL de KRBH. Filtrar con filtro de 0,45 µm
 - KRBH + 1% BSA: para 15 mL: añadir 500 µL de 30% BSA a 14,5 mL de KRBH. Filtrar con filtro de 0,45 µm.
 - 30% BSA: Disolver 15g de BSA desgrasado (A-6003 Sigma-Aldrich) en 50 mL de KRBH. Alícuotar y almacenar a -20°C.
 - 3mM [1-¹⁴C] oleato-BSA: Para 5 mL: disolver 4,567 mg de oleato sódico en 500 µL de 0,1N NaOH durante 5 minutos a 80°C. Añadir 500 µL de [1-¹⁴C] oleato (CFA243-50 mCi GE Healthcare). Añadir esta solución (1mL) gota a gota a una solución de 1% BSA (disolver 0,5g de BSA desgrasado en 4,5 mL de 0,9% NaCl a 37°C al baño maría) y mantener en agitación durante 5 minutos. Filtrar con un filtro de 0,22 µm, hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20°C.
2. Seguidamente se añaden 100 µL de KOH 0,1N a recortes de 2x2 cm de papel *Whatman* y se dejan secar. Mientras tanto se proceden con los siguientes pasos.
3. Se lava el flasco para la cuantificación de proteína con 1 mL de PBS 1x y se recogen las células en 500 µL de tampón de lisis.
4. Se lavan el resto de flasco con 3 mL/flasco de KRBH + 0,1% BSA.
5. Posteriormente, se incuban con 2 mL/flasco de KRBH + 1% BSA durante 30 minutos a 37°C.
6. A continuación se vuelven a lavar con 3 mL/flasco de KRBH + 0,1% BSA.
7. Se añade la mezcla de reacción de oxidación de oleato, 2 mL/flasco

Mezcla de Reacción	
KRBH	1,6 mL
3 mM [1- ¹⁴ C] oleato-BSA	200 µL
25 mM glucosa + 8 mM carnitina	200 µL

8. Cerrar los flascos con el montaje del tapón de goma, el tubo de PVC y el papel *whatman* con KOH y sellar con *parafilm*.
9. Incubar durante 3 horas a 37°C en un incubador libre de CO₂.

3) Fijación del CO₂

10. Pasadas las 3 horas, parar la reacción con la adición de 200 µL de 40% HClO₃ mediante una jeringa de 1 mL con aguja. Volver a sellar con *parafilm*.
11. Incubar o/n a temperatura ambiente.

4) Contaje de la radioactividad

12. Desmontar el sistema y transferir el papel Whatman a un vial de centelleo con 5 mL de líquido de centello
13. Añadir un vial de centelleo extra con 50 µL de 3 mM [1-¹⁴C] oleato-BSA para conocer las cuentas totales.
14. Incubar o/n
15. Contar la radioactividad de los viales con el protocolo 10 (¹⁴C 1 min)

Los resultados se expresan como:

$$\text{nmol de oleato} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot} \cdot \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 600 / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$$

Donde 600 son los nmol totales de oleato por flasco y cpm totales son las cuentas correspondientes a los 200 µL de oleato añadidos por flasco.

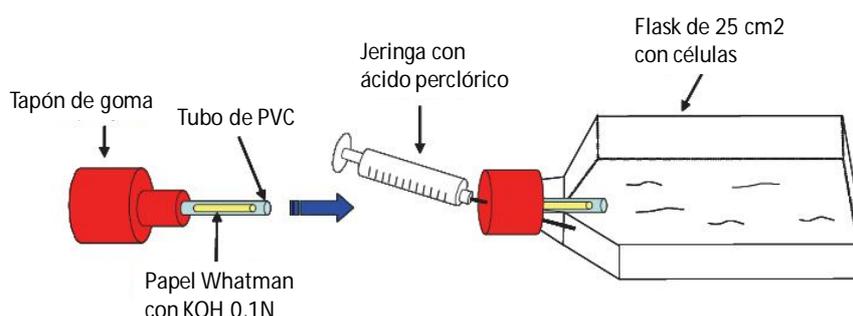


Figura 36. Sistema de oxidación de oleato en flask de 25 cm². La mezcla de reacción se añade al flask y el sistema se cierra herméticamente con un tapón de goma que dispone de un tubo de PVC con un papel *Whatman* con KOH en el interior. Los flask se incuban durante 3 horas a 37°C. (Adaptado de la tesis de JM Orellana).

2.6. CITOQUÍMICA FLUORESCENTE

BODIPY® es un colorante fluorescente ($C_{14}H_{17}BF_2N_2$) usado para la tinción de lípidos neutros y la visualización de cuerpos lipídicos intracelulares. Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, el reactivo BODIPY® se preparó a una concentración stock de 1 mg/mL en DMSO (500x). Del mismo modo, el tratamiento de las células se llevó a cabo acorde al posterior procedimiento de tinción con BODIPY® descrito a continuación:

1. Sembrar 80.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos sobre cubres previamente autoclavados y tratados con poli-L-lisina (Añadir 500 μ L/pocillo de 0,01 % poli-L-lisina y mantener durante 2 horas a 37°C, lavar 2 veces con agua mQ autoclavada y dejar secar durante 30 minutos a 37°C).
2. Realizar los tratamientos convenientes.
3. Lavar 2 veces con PBS1x.
4. Fijar las células durante 15 minutos a 4°C con 4% paraformaldehído.
5. Lavar 2 veces con PBS 1x (en este punto se pueden guardar las células a 4°C varios días).
6. Teñir los lípidos neutros con BODIPY® durante 15 minutos a temperatura ambiente a una concentración final de 2 μ g/mL. Diluir el stock en PBS 1x.
7. Lavar 2 veces con PBS 1x.
8. Teñir los núcleos celulares con Hoechst durante 5 minutos a temperatura ambiente. Diluir el stock en PBS 1x.
9. Lavar 2 veces con PBS 1x.
10. Montar los cubres con el medio de montaje acuoso Fluoromount-G® (Southern Biotech) sobre portaobjetos previamente rotulados.
11. Dejar secar durante varias horas protegidos de la luz. Almacenar a 4°C.
12. Analizar por microscopía de fluorescencia.

3. PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES

Todos los procedimientos con animales y su estabulación se llevaron a cabo en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona. Los ratones se estabularon en habitaciones con ciclos de luz / oscuridad de 12 horas, en un ambiente controlado de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (60%) con libre acceso a agua y comida. El número de ratones usado para cada condición experimental fue de 6 a 8, salvo indicado. Todos

los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona.

3.1. ANIMALES

Los animales empleados en esta tesis fueron ratones adultos, de entre 2 y 3 meses de edad con un peso de 25-30 g de la cepa salvaje C57/BL6J y ratones deficientes de CPT1C con el mismo fondo genético que los ratones salvajes. Los ratones deficientes de CPT1C (CPT1C KO) fueron generados en colaboración con el CEBATEG (Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica) de la Universitat Autònoma de Barcelona, mediante una mutación génica introducida por recombinación homóloga. Los exones del 12 al 15 fueron eliminados, perturbando el marco abierto de lectura de la proteína CPT1C desencadenando en una proteína truncada. El vector fue electroporado en células madre embrionarias (ESC, Embryonic Stem Cells) 129SvEv y el par de clones de ESC positivos obtenidos fueron expandidos. Posteriormente fueron microinyectados en blastocitos de ratones C57/BL6, los cuales fueron transferidos a hembras aceptoras. Los ratones obtenidos mediante este procedimiento se denominaron quimeras ya que se generaron a partir de células 129/SV y embriones C57/BL6. Los ratones quiméricos con capacidad de transmisión de la línea germinal fueron seleccionados para obtener ratones heterocigotos. Éstos fueron cruzados entre sí para generar ratones homocigotos deficientes de CPT1C.

3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.2.1. AYUNO

Para los experimentos en los que los animales fueron ayunados, en todos los casos la comida se retiró al inicio del ciclo claro, es decir, a las 9 h de la mañana. Después del tiempo de ayuno correspondiente, los animales o bien se sacrificaron o bien se tomaron medidas oportunas antes de reponer de nuevo la comida. En este trabajo se han aplicado tres tipos de ayuno distinto, indicados en cada caso en el capítulo de resultados.

1. Ayuno a corto plazo: Privación de alimento durante 6 horas. Aplicado para la cuantificación de glucógeno, ya que las reservas de éste se agotan muy rápidamente.
2. Ayuno de 24 horas: Aplicado en la mayoría de experimentos de privación de alimento.
3. Ayuno a largo plazo: Privación de alimento durante 48 horas. Aplicado puntualmente para la medición de la glucemia.

3.2.2. TORPOR

El torpor se caracteriza por una gran disminución de la actividad fisiológica de un animal, evidenciado generalmente por una disminución en la temperatura corporal y la tasa metabólica que puede durar días o semanas, o puede hacer referencia a un período de baja temperatura corporal y del metabolismo que dura menos de 24 horas, como es el caso del "torpor diario". Para inducir el estado de torpor a nuestros animales, éstos fueron sometidos a dos procedimientos distintos:

1. Mantenimiento de todo el grupo de animales a 16°C de temperatura ambiental, dividido en dos subgrupos, alimentados y ayunados, durante 32 horas.
2. Mantenimiento de un grupo de ratones durante 2 horas a 4°C, mientras el resto son mantenidos a temperatura ambiente.

3.2.3. ENVEJECIMIENTO

El estudio del envejecimiento se llevó a cabo mediante la monitorización mensual del peso y la ingesta de los animales, desde los 2 meses de edad hasta los 12 meses. Durante este período de tiempo se realizaron pruebas de la homeostasis de la glucosa. A los 15 meses de edad se realizó una prueba de memoria juntamente con un grupo de ratones jóvenes. Finalmente a los 16 meses de edad fueron sacrificados. Un subgrupo de animales fue perfundido por tal de fijar los tejidos para un análisis histológico posterior (apartado 3.8.), el resto fue diseccionado como se detalla en el apartado 3.7. de este capítulo.

3.3. DETERMINACIÓN DEL PESO Y LA INGESTA

El peso corporal de los ratones se determinó pesando los animales en los períodos de tiempos indicados en cada caso. El incremento de peso fue calculado como la diferencia entre el peso medido en los intervalos de tiempo descritos.

La ingesta fue medida mediante el peso en una balanza de precisión del pienso antes de ser administrado a los ratones y después del tiempo indicado. Los animales sometidos a ingesta controlada fueron estabulados en jaulas individuales.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

La temperatura corporal de los ratones fue medida mediante una sonda rectal específica para roedores pequeños (RET-3-ISO Physitemp) acoplada a un termómetro (Acorn®)

Temp TC Thermocoupled Thermometer Oakton Instruments). La profundidad de inserción de la sonda es crítica para la reproducibilidad de los registros de la temperatura. Los animales fueron estabulados en grupos de tres en la misma jaula en los experimentos en los que se midió la temperatura.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

La determinación de los niveles de glucosa en sangre fue medida tanto a nivel basal como después de períodos de ayuno a las 9 h de la mañana. Después de realizar un pequeño corte en la cola de los animales, la primera gota de sangre es descartada y la segunda es recogida en tiras reactivas de glucosa (Contour®Next Bayer) utilizando un glucómetro para su lectura.

3.6. TEST DE TOLERANCIA AL PIRUVATO, A LA GLUCOSA Y A LA INSULINA

El test de tolerancia al piruvato se realizó en ratones ayunados durante 16 horas. Una dosis de 2g/kg de piruvato sódico en PBS (preparado el mismo día y filtrado) fue administrada a los ratones mediante una inyección intraperitoneal (ip). La medida de la glucemia se realizó antes de la inyección y a los 30, 60, 90 minutos tras la inyección.

El test de tolerancia a la glucosa se realizó en ratones ayunados durante 6 horas. Se practicó una inyección ip de glucosa 20% en PBS, teniendo en cuenta el peso de cada ratón y la dosis a administrar (2 g/kg) se ajustó el volumen administrado (multiplicando por 10 el peso del ratón en gramos). La glucemia se midió justo antes de la inyección y a los 30, 60 y 120 minutos tras la inyección.

Para el test de tolerancia a la insulina, los ratones se ayunaron durante 4 horas. La solución de insulina se preparó a 0,1 U/mL (añadir 16,6 μ L de insulina 10mg/mL a 40 mL de PBS). La dosis administrada fue de 0,75 U/Kg, por lo que el volumen de administración se ajustó en función del peso de los animales (multiplicando el peso en gramos del ratón por 7,5). La medida de la glucemia se realizó antes de la inyección y a los 30, 60 y 120 minutos tras la inyección.

3.7. DISECCIÓN DE TEJIDOS DE RATÓN

En todos los casos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Rápidamente se diseccionaron los siguientes tejidos: hígado (lóbulo medial derecho), músculo gastrocnemio, tejido adiposo blanco epididimal e inguinal, tejido adiposo marrón interescapular, hipotálamo y MBH. Para la disección del MBH se usó una matriz de acero inoxidable que permite hacer cortes coronales de 0,5 mm de grosor (SA-2165 Roboz Surgical Instrument) mediante el uso de dos cuchillas. Posteriormente en la sección coronal obtenida se realiza una micropunción con un micro-colector de tejido de 1 mm de diámetro para la obtención del MBH (figura 37).

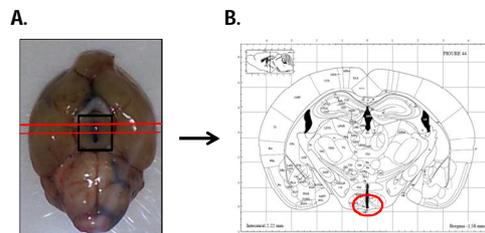


Figura 37. Representación esquemática de la disección del hipotálamo mediobasal. **A)** Visión ventral de cerebro de ratón. La sección marcada por el cuadro negro es el hipotálamo. Las líneas rojas indican el corte coronal realizado con la ayuda de una matriz. **B)** Representación de un corte coronal a la altura del MBH. La sección marcada con el círculo rojo es el MBH (Imagen adaptada del atlas anatómico de cerebro de ratón Paxinos Atlas).

3.8. PERFUSIÓN INTRACARDÍACA FIJATIVA

El objetivo de la fijación es preservar rápida y uniformemente el tejido de una forma similar al estado *in vivo*. Si bien la colocación de tejidos en soluciones fijadoras es un método correcto para la fijación de secciones pequeñas, la fijación por inmersión plantea un problema para las muestras más grandes. La ventaja de la perfusión transcárdial con fijadores basados en aldehído se considera un paradigma eficaz para la preservación de los tejidos que se autolisan rápidamente, como el tejido nervioso o el tejido endocrino, ya que puede llegar rápidamente a todos los rincones del organismo utilizando la red vascular natural (figura 38). Por lo tanto, este método es óptimo para estudios anatómicos, histológicos y moleculares. La descripción de este método se detalla a continuación. Todo el procedimiento se llevó a cabo siguiendo las medidas de seguridad oportunas debido a sus propiedades nocivas.

1) Perfusión

1. Anestesiarse el animal mediante la administración i.p. de la mezcla de ketamina/Xilacina (Ket: 100mg/kg, Xil: 10 mg/Kg)
2. Hacer una incisión en la piel en la línea media de la entrada torácica hasta la pelvis. Usar las tijeras para abrir cuidadosamente el abdomen.
3. Hacer una incisión lateral de 5-6 cm a través del tegumento y la pared abdominal justo debajo de la caja torácica. Separar con cuidado el hígado a partir del diafragma.
4. Hacer una pequeña incisión en el diafragma. Continuar la incisión del diafragma a lo largo de toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural.
5. Desplazando cuidadosamente los pulmones, hacer un corte a través de la caja torácica hasta la clavícula. Hacer un corte similar en el lado contralateral.
6. Levantar el esternón y recortar cuidadosamente cualquier tejido que conecte al corazón.
7. Sujetar el corazón suavemente e identificar las aurículas y los ventrículos. Introducir la aguja mariposa por la esquina inferior del ventrículo izquierdo (más grueso y de color más claro que el derecho) y abrir con la tijera la aurícula derecha.
8. Colocar la aguja mariposa en dirección a la aorta y mantener en esa posición.
9. Iniciar el flujo de PBS 1x hasta que se haya desplazado toda la sangre del animal y salga un líquido casi transparente (aprox. 30 mL)
10. Cambiar la jeringa y reponer una jeringa con 4% PFA. Continuar el flujo hasta pasar 60 mL. Las contracciones musculares y el blanqueo del hígado son signos de buena perfusión. La perfusión se ha completado cuando todas las contracciones musculares se han detenido y la cantidad deseada de fijativo se ha pasado a través del sistema circulatorio. El ratón debe estar rígido.

2) Disección y post-fijación

11. Diseccionar los tejidos de interés
12. Sumergirlos en 4% PFA y mantenerlos o/n a 4°C.

3) Almacenaje

13. Criopreservación: pasar los tejidos a una solución 30% sacarosa y almacenar a 4°C hasta que depositen en el fondo del recipiente.

14. Congelación: Cada tejido fue pegado a un trozo de papel Whatman previamente rotulado mediante la resina de incrustación Cryomatrix™ (Thermo Scientific) específica para la sección de tejidos congelados.

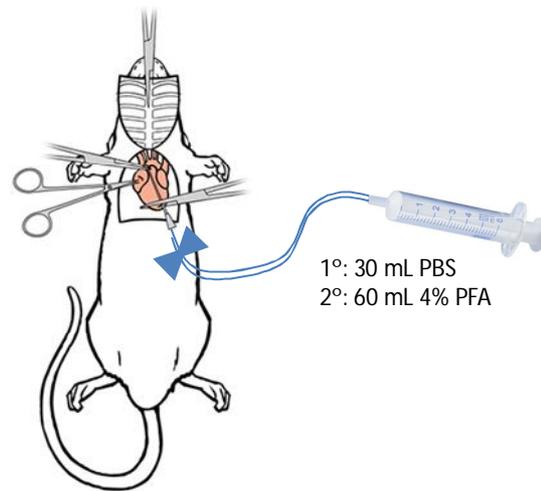


Figura 38. Procedimiento quirúrgico de perfusión intracardiaca. Representación esquemática del procedimiento de la perfusión intracardiaca como método de fijación de tejidos (figura adaptada de Gregory et al., 2012; Journal of visualized Experiments).

3.9 TEST DE MEMORIA: NORT (*NOVEL OBJECT RECOGNITION TEST*)

El test de memoria de reconocimiento de un objeto nuevo (NORT, *Novel Object Recognition Test*) evalúa la capacidad de los roedores para reconocer un objeto nuevo en el entorno. En esta prueba no hay refuerzos positivos o negativos, por lo que evalúa la preferencia natural por los objetos presentados. Este ensayo proporciona una medida de la memoria episódica, ya que a los animales se les permite explorar libremente dos objetos iguales (A + A) durante la sesión de familiarización. Después de un período de tiempo (dependiendo del diseño experimental), los animales son expuestos a un objeto explorado previamente (familiar) y a un objeto novedoso (A + B). Una segunda prueba puede llevarse a cabo después de otro período de tiempo (B + C). La memoria de reconocimiento se expresa como un índice de discriminación que se define como la proporción de tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso respecto al objeto familiar sobre el tiempo total dedicado a explorar los dos objetos.

Esta prueba ha sido sometida a varias modificaciones por distintos grupos de investigación (revisado en Antunes y Biala, 2012). En nuestro caso, se utilizó un laberinto en forma de "L" como espacio donde se ensayó la prueba y los objetos se colocaron en las

esquinas (figura 39). Éste se colocó sobre una plataforma envuelta por una cortina negra para evitar interferencias visuales en una sala aislada durante los tiempos de la prueba, la cual contiene una videocámara (Logitech Webcam) colocada en el techo para registrar el comportamiento de los animales. Las distintas etapas de la prueba se realizaron lo más próximo posible al ciclo de oscuridad (cuando los animales presentan mayor actividad), a partir de las seis de la tarde en adelante. Dos pruebas de memoria se realizaron durante el mismo procedimiento, a corto plazo (2h) y a largo plazo (24h). Los objetos utilizados se muestran en la figura .Las distintas etapas del test se detallan a continuación.

1) Habitación (repetir durante 3 días consecutivos)

1. Colocar a los animales en la sala donde se realiza el ensayo 30 minutos antes del inicio del mismo.
2. Colocar el animal en el vértice central del laberinto sin objetos y dejar que explore el entorno durante 5 minutos.
3. Devolver el animal a la jaula.
4. Limpiar el laberinto con 70% etanol.

2) Sesión de familiarización

5. 24 horas después de la última sesión de habituación, colocar dos objetos idénticos en las esquinas del laberinto (A + A).
6. Colocar el animal en el centro del laberinto y dejar que explore libremente durante 10 minutos.
7. Devolver el animal a la jaula.
8. Limpiar el laberinto y los objetos con 70% etanol.

3) Sesión de prueba de memoria

9. A las **2 horas** después de la sesión de familiarización, sustituir un objeto por otro objeto distinto (A + B).
10. Colocar a los ratones en el mismo orden que en la sesión anterior en el centro del laberinto y dejar que exploren libremente durante 10 minutos.
11. Limpiar con 70% etanol entre animales.
12. A las **24 horas** después de la primera sesión de memoria, sustituir un objeto reconocido previamente por otro objeto distinto (B + C).

13. Dejar explorar a los ratones durante 10 minutos del mismo modo que anteriormente, limpiando con 70% etanol entre animales

4) Recopilación y análisis de datos

14. Familiarización: un mínimo de 20 segundos de reconocimiento para cada objeto es necesario para incluir los animales en el análisis
Prueba: contar con un cronómetro el tiempo de reconocimiento de cada objeto (tener en cuenta los criterios descritos para tal efecto).

Los resultados se expresan como el índice de discriminación entre objetos:

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{\text{tiempo objeto nuevo} - \text{tiempo objeto familiar}}{\text{tiempo objeto familiar} + \text{tiempo objeto nuevo}}$$

Los valores obtenidos cercanos a 1 indican preferencia por el objeto nuevo, valores cercanos a 0 indican que no hay discriminación entre objetos, valores cercanos a -1 indican preferencia por el objeto familiar.

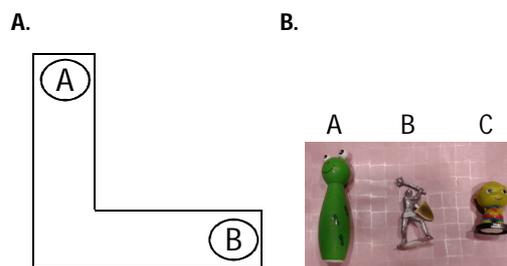


Figura 39. Laberinto y objetos utilizados en el NORT. A) Esquema representativo del laberinto en forma de L con objetos distintos en las esquinas. B) Fotografía de los tres objetos distintos utilizados.

4. BIOQUÍMICA

4.1. DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN SUERO

La obtención de suero se realizó en el momento de sacrificio de los animales. Después de la dislocación cervical, rápidamente fueron decapitados y la sangre fue directamente recolectada en tubos Vacutainer® (BD Diagnostics). Una vez obtenida la sangre, los tubos fueron mantenidos un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000xg a 4°C. El sobrenadante se alicuotó y almacenó a -80°C.

4.1.1. HORMONA DEL CRECIMIENTO

Para la cuantificación de las hormonas en suero se suelen utilizar kits basados en la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay). Para la cuantificación de la hormona del crecimiento (GH) se usó el kit de la casa comercial Invitrogen (#KRC5311) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el mismo. Básicamente, los pocillos de las tiras de microtitulación proporcionados han sido recubiertos con anticuerpo monoclonal específico para GH de rata. Durante la primera incubación, los estándares de concentración conocida de GH de rata, los controles y las muestras desconocidas se pipetea en los pocillos. Después del lavado, se añade anticuerpo secundario biotinilado. Después del lavado, se añade estreptavidina-peroxidasa (enzima) que se unirá al anticuerpo biotinilado para completar el sándwich de cuatro componentes. Finalmente, se vuelve a lavar para eliminar toda la enzima no unida y se añade la solución de sustrato, que actúa sobre la enzima unida para producir color. La intensidad de este producto coloreado es directamente proporcional a la concentración de GH de rata presente en la muestra original.

4.2. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS HEPÁTICOS

4.2.1. TRIACILGLICEROLES (TAG)

El primer paso para la determinación de TAG en hígado de ratón consistió en la extracción de grasas de dicho tejido. Posteriormente se utilizó un kit comercial para determinar el contenido de TAG en las muestras obtenidas.

1) Extracción de las grasas

1. Hacer secciones aproximadamente del mismo tamaño del tejido congelado y pulverizarlo con la ayuda de un mortero, previamente enfriado, sobre nieve carbónica.
2. Añadir el polvo a un *ependorf* de 1,5 mL con 500 μ L de PBS 1x.
3. Sonicar manteniendo las muestras a 4°C
4. Guardar 50 μ L del homogenado para la cuantificación de proteína.
5. Transferir el resto del homogenado a tubos de vidrio con rosca y añadir 1,5 mL de cloroformo. Agitar vigorosamente y dejar o/n a 30°C en agitación.
6. Centrifugar 5 minutos a 10.000xg y transferir el sobrenadante y la fase inferior (descartar interfase) a un tubo de vidrio nuevo.

1) Extracción de glucógeno

1. Añadir 250 μL de 30% KOH a 100 mg de tejido congelado y homogenizar con el Fast-Prep24.
2. Guardar 10 μL del homogenado para la valoración de la concentración de proteína. Hervir el resto del homogenado durante 15 minutos a 95°C.
3. Precipitación del glucógeno:
 - I. Añadir 120 μL del homogenado en cuadros de 2x2 cm de papel Whatman, o bien 120 μL de 30% KOH (blanco). Dejar secar a temperatura ambiente.
 - II. Agrupar los papeles del mismo grupo de muestras en el mismo vaso de precipitados para hacer los lavados en 300 mL 66% etanol previamente enfriado a -20°C. (A esta concentración de etanol, el glucógeno precipita y debido a su gran tamaño se queda retenido en el papel, a diferencia del resto de metabolitos más solubles que son lavados de los papeles).
 - III. Hacer un primer lavado durante 10 minutos y dos lavados más durante 20 minutos a temperatura ambiente.
 - IV. Secar los papeles en una estufa (70°C).
 - V. Transferir los papeles a tubos de ensayo que contienen 1 mL de la solución 0,5 mg/mL amiloglucosidasa (A7420 Sigma-Aldrich) preparada en 400 mM acetato sódico pH 4,8.
 - VI. Incubar los tubos durante 90 minutos a 37°C.
 - VII. El producto de la digestión contiene las moléculas de glucosa proporcionales a la cantidad de glucógeno de las muestras.
 - VIII. Para validar los resultados se han ensayado unos controles de calidad, que se han procesado de igual forma que las muestras, con concentraciones conocidas de glucógeno.

2) Contenido de glucosa

Se realizó utilizando el kit comercial Cromatest Glucosa MR basado en un método enzimático colorimétrico (#1129010 LINEAR Chemicals, S.L.) (figura 41). Brevemente, la glucosa es oxidada a D-Gluconato por la glucosa oxidasa (GOD), con formación de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD), el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del peróxido de hidrógeno, formando una quinonaimina de color rojo proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

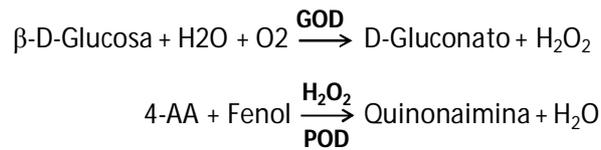


Figura 41. Método enzimático colorimétrico a punto final para la determinación de glucosa.

4.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD PIRUVATO DESHIDROGENASA

El ensayo de la actividad piruvato deshidrogenasa se realizó mediante el kit de Abcam Pyruvate dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay Kit (ab109902). Este kit de actividad en microplaca está validado para la determinación de la actividad PDH en muestras derivadas de tejido muscular. La enzima PDH es inmunocapturada dentro de los pocillos de la microplaca ya que éstos están recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-PDH. Posteriormente, la actividad se determina siguiendo la reducción de NAD^+ a NADH , acoplada a la reducción de un colorante indicador el cual produce un producto coloreado cuya concentración puede ser monitorizada mediante el registro del incremento de la absorbancia a 450 nm a 30°C a lo largo del tiempo (figura 42).

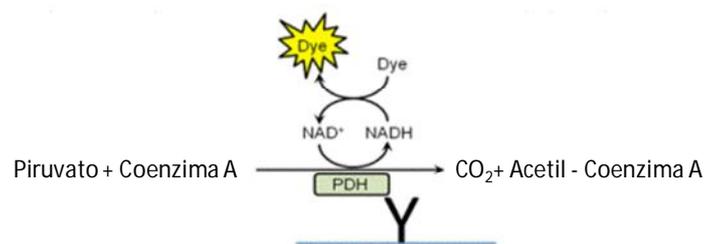


Figura 42. Método enzimático utilizado para la cuantificación de la actividad piruvato deshidrogenasa. Dye: colorante

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. El análisis comparativo de los resultados obtenidos se realizó utilizando el test estadístico de la *t-student*. Con valores obtenidos inferiores a 0,05 se considera que hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas.

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS

METABOLISMO PERIFÉRICO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C

1. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el ayuno
2. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el torpor
3. Fenotipo de ratones deficientes de CPT1C durante el envejecimiento

PAPEL DE CPT1C EN EL METABOLISMO LIPÍDICO HIPOTALÁMICO

4. Expresión de CPT1C en respuesta a distintas situaciones nutricionales
5. Funciones celulares reguladas por la expresión de CPT1C

PARTE I

METABOLISMO PERIFÉRICO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C

Los antecedentes conocidos hasta este momento sugieren que CPT1C en el hipotálamo es una proteína clave en la regulación de la oxidación de las grasas a nivel periférico. En base a estos datos, en este trabajo se analiza la respuesta de ratones deficientes de CPT1C durante el ayuno y el torpor, dos situaciones en las que el principal sustrato energético son las grasas y la capacidad de adaptación metabólica del organismo es crucial para el mantenimiento de la homeostasis energética. Además, debido a que una disrupción del metabolismo puede tener consecuencias acumulativas a largo plazo, se realiza por primera vez un estudio de envejecimiento en ratones deficientes de CPT1C.

1. FENOTIPO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C DURANTE EL AYUNO

Se ha estudiado la participación de CPT1C en la adaptación metabólica de los tejidos periféricos metabólicamente más activos, el hígado y el músculo, así como los efectos de la deficiencia de CPT1C en el metabolismo energético del hipotálamo mediobasal (MBH) durante el ayuno.

Ratones de entre 8 y 10 semanas de edad, fueron sometidos a distintos tipos de ayuno (6, 24 y 48 horas) tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Retirando la comida en todos los casos a las 9h de la mañana hasta el tiempo indicado, momento en que se sacrificaron los animales y se recogieron los distintos tejidos.

1.1. ANÁLISIS DEL PESO Y LA INGESTA

Con el fin de caracterizar la respuesta al ayuno de los ratones CPT1C KO, en primer lugar se evaluó la pérdida de peso y la ingesta después de un ayuno de 24 horas. Los datos obtenidos muestran una tendencia de los ratones deficientes de CPT1C a perder menos peso durante el ayuno (WT: $-6,6 \text{ g} \pm 0,37$ vs. KO: $-5,83 \text{ g} \pm 0,08$) (figura 43A). Durante la realimentación después del ayuno de 24 horas, los ratones CPT1C KO no muestran diferencias en la ingesta (WT: $5,86 \text{ g} \pm 0,22$ vs. KO: $6,02 \text{ g} \pm 0,19$) (figura 43B).

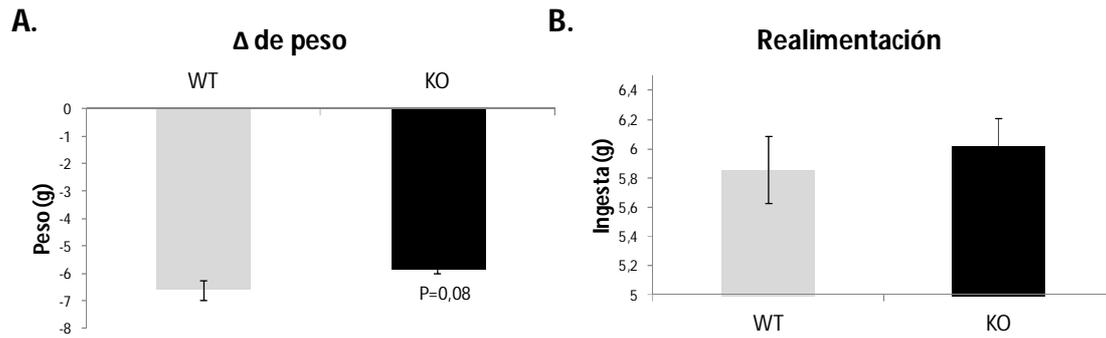


Figura 43. Efecto del ayuno sobre el peso y la realimentación. A) Pérdida de peso de ratones WT y CPT1C KO después de un ayuno de 24 horas. B) Ingesta durante 24 horas después de un ayuno de 24 horas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. n = 6.

A pesar de no haber cambios significativos en el peso corporal de los ratones CPT1C KO respecto los WT tras el ayuno, se quiso analizar la adiposidad de los mismos. Por un lado, se analizó el tejido adiposo blanco epididimal (TBE), como se puede ver en la figura 44A, los ratones WT disminuyen su TBE un 60% tras el ayuno, mientras que los ratones CPT1C KO muestran una disminución del 34% de este tejido tras el ayuno. Estos datos sugieren que en situación de ayuno, los ratones deficientes de CPT1C utilizan en menor medida las grasas almacenadas en el TBE que los ratones WT. Por otro lado, se analizó el tejido adiposo marrón (TAM) interescapular, donde se observó que los ratones CPT1C KO presentan un tamaño mayor de este tejido respecto a los animales WT durante la alimentación (figura 44B), lo que sugiere que tienen una hipertrofia de este tejido posiblemente por acumulación de lípidos. Esta hipertrofia se sigue observando tras el ayuno, aunque las diferencias entre ratones WT y CPT1C KO no son significativas ($p=0,06$).

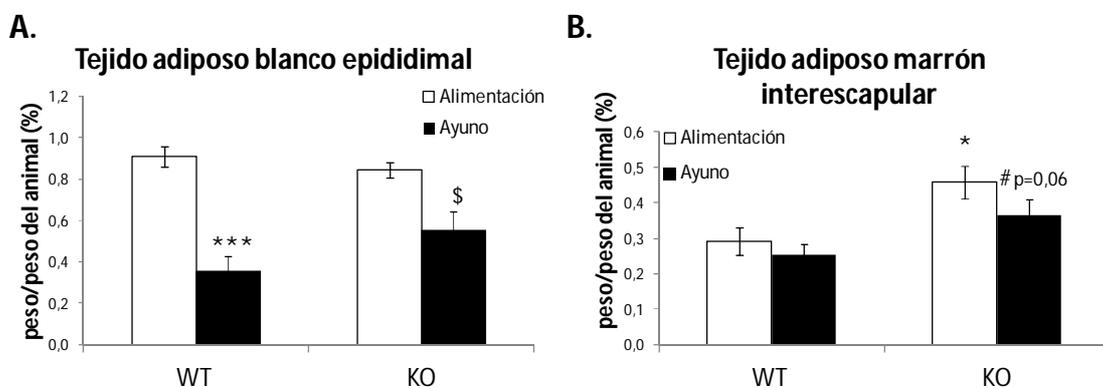


Figura 44. Efecto del ayuno sobre la adiposidad. Peso del tejido adiposo blanco epididimal (A) y del tejido adiposo marrón interescapular (B) en porcentaje respecto el peso total del animal. ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentación, \$: $p < 0,05$ vs. KO alimentación, #: vs. WT ayuno. n = 6.

1.2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO HEPÁTICO

El hígado es un órgano crucial para la adaptación metabólica al ayuno. En esta situación, su función principal es sintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos para exportarla a la circulación sanguínea. Al mismo tiempo debe parar la glucólisis y favorecer la oxidación de las grasas como sustrato energético. Este cambio en el uso de combustible es posible gracias a la activación de enzimas clave, como se detalla en la figura 8 de la introducción. Con lo cual, primeramente se analizó la vía AMPK-ACC-CPT1A como marcador de la activación de la oxidación de ácidos grasos. Como era de esperar, los niveles de pAMPK, pACC y CPT1A aumentan durante el ayuno en los hígados de los ratones WT, mientras que este incremento no ocurre en los ratones deficientes de CPT1C (figura 45). La ausencia de activación de AMPK, se traduce en una ausencia de activación de ACC y en una disminución de los niveles de CPT1A en el hígado de los ratones CPT1C KO. Estos resultados indican que los ratones deficientes de CPT1C no activan la oxidación hepática de las grasas durante el ayuno.

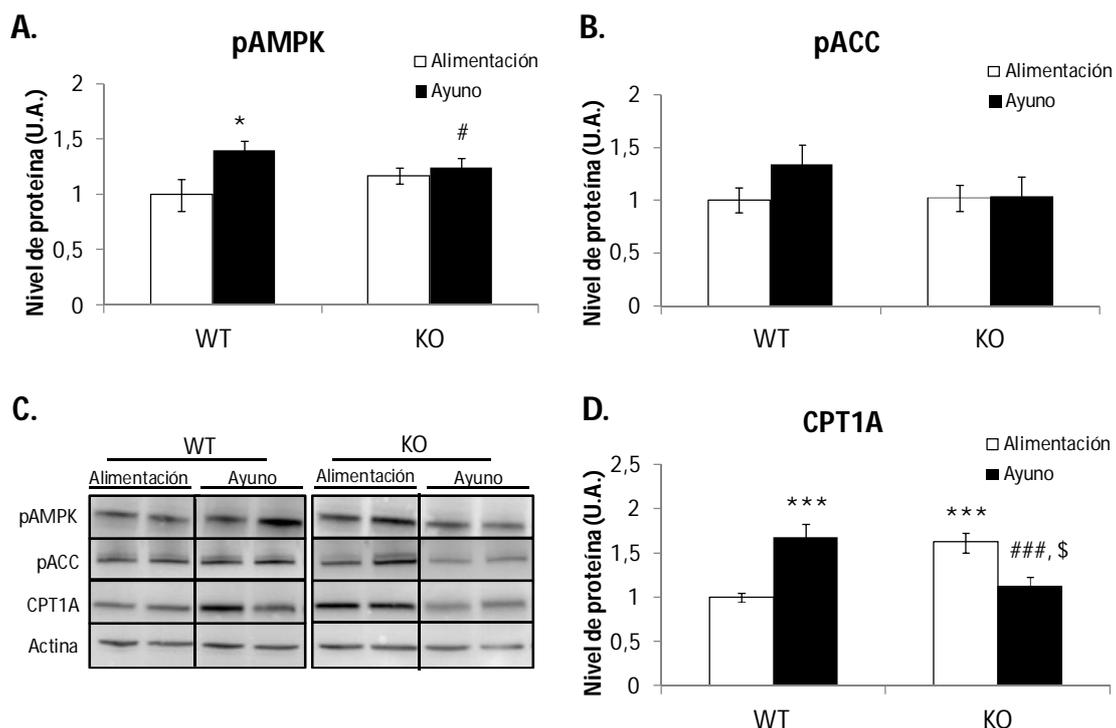


Figura 45. Efecto del ayuno sobre la activación hepática de la oxidación de grasas. Niveles de fosfo-AMPK (A), fosfo-ACC (B) y CPT1A (D), determinados por WB, imagen representativa en C). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$, *** $p < 0,005$ vs. WT alimentado, ###: $p < 0,005$ vs. WT ayunado, \$: $p < 0,05$ vs. KO alimentado. $n = 6-8$.

Además de la activación de la oxidación de las grasas, la inhibición de PDH mediada por PDK4 es crucial para evitar la conversión de piruvato a acetil-CoA, ya que el ahorro de piruvato en el hígado es esencial durante el ayuno. Por ello analizamos el eje PDK4-PDH. Para comprobar los niveles de expresión de PDK4, se cuantificaron los niveles de RNA mensajeros por PCR a tiempo real. Los ratones CPT1C KO son incapaces de inducir la expresión de PDK4 en respuesta al ayuno, a diferencia de los WT que muestran un incremento considerable (figura 46A). El incremento de PDK4 conduce a un aumento de la fosforilación de PDH (inhibiéndola), el cual sólo se observa en los ratones WT (en forma de tendencia) (figura 46B). Estos datos indicarían una menor inhibición de PDH en los hígados de los ratones CPT1C KO y por lo tanto un mayor consumo de piruvato y acetil-CoA proveniente de la glucólisis.

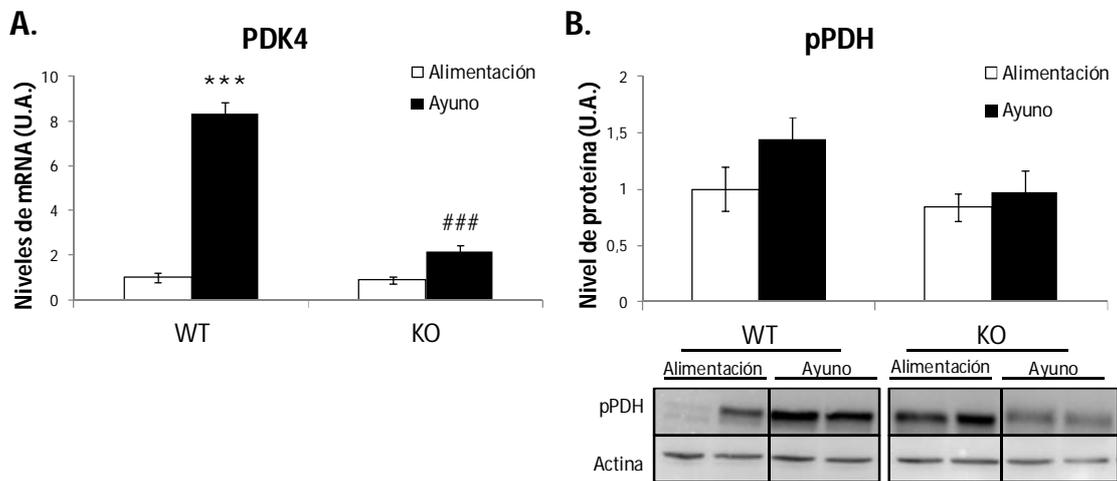


Figura 46. Efecto del ayuno sobre la activación del eje PDK4-PDH en el hígado. Niveles de mRNA de PDK4 (A) y fosforilación de PDH (B) de ratones WT y CPT1C KO después de un ayuno de 24 horas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentados, ###: $p < 0,005$ vs. WT ayunados. $n = 6-8$.

Durante el ayuno, a pesar de la inducción de la oxidación de grasas como sustrato energético, los niveles hepáticos de TAG aumentan debido al gran aporte de ácidos grasos libres del tejido adiposo, mientras que los niveles de glucógeno se agotan casi por completo durante las primeras 8 horas de privación de alimentos. Una vez identificado el defecto hepático de los ratones deficientes de CPT1C tanto en la activación de la oxidación de grasas como en la inhibición de la oxidación de la glucosa, analizamos las reservas hepáticas de ambos nutrientes. En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, después de un ayuno de 24 horas, los ratones CPT1C KO presentan un acúmulo de casi el doble de TAG que los ratones WT (KO: $4,63 \pm 0,71$ vs. WT: $2,55 \pm 0,65$) (figura 47A), mientras que tras 6 horas

de ayuno han consumido prácticamente todo el reservorio de glucógeno hepático (WT: 10,84 \pm 0,84; KO: 3,83 \pm 1,2) (figura 47B). Estos resultados confirman que los ratones CPT1C KO siguen utilizando la glucosa frente a las grasas como sustrato principal durante el ayuno.

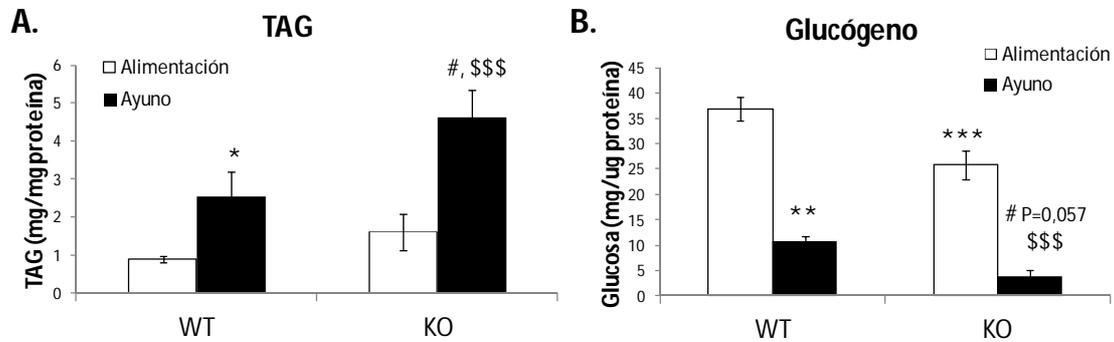


Figura 47. Efecto del ayuno en las reservas hepáticas de triacilgliceroles y glucógeno. Los niveles de TAG fueron cuantificados después de 24 horas de ayuno (A) y los niveles de glucógeno tras 6 horas de ayuno (B). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentado; #: $p < 0,05$ vs. WT ayunado; \$\$\$: $p < 0,005$ vs. KO alimentado. $n = 5-8$.

1.3. ANÁLISIS DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

En base a los resultados obtenidos en el metabolismo hepático, analizamos más detalladamente distintos mecanismos implicados en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Primeramente, se evaluó la gluconeogénesis mediante dos aproximaciones distintas, luego se midió la glicemia de los dos grupos de ratones, WT y CPT1C KO, tras un ayuno de 48 horas.

Los ratones CPT1C KO presentan mayor inducción de la gluconeogénesis tras la administración de piruvato, indicado por los mayores niveles de glucosa en sangre respecto los WT (figura 48A). Además, los ratones CPT1C KO muestran una mayor expresión de PEPCK tras un ayuno de 24 horas, indicando mayor gluconeogénesis durante el ayuno (figura 48B).

Los trabajos publicados por Lane y colaboradores, describieron niveles normales de metabolitos plasmáticos (glucosa, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos, etc.) en ratones deficientes de CPT1C durante un ayuno de 24 horas. Sin embargo, teniendo en consideración la mayor gluconeogénesis observada en los ratones CPT1C KO, se esperaría que también presentarían hiperglicemia, por lo cual medimos la glicemia de ambos grupos de ratones durante un ayuno de 48 horas. Como se puede ver en la figura 48C, los ratones CPT1C KO no presentan diferencias en los niveles circulantes de glucosa durante un ayuno prolongado

respecto los WT. Este resultado permite hipotetizar que los ratones deficientes de CPT1C sostienen un mayor consumo de glucosa, lo cual da lugar a que los niveles en sangre de glucosa sean normales a pesar de presentar la ruta gluconeogénica aumentada.

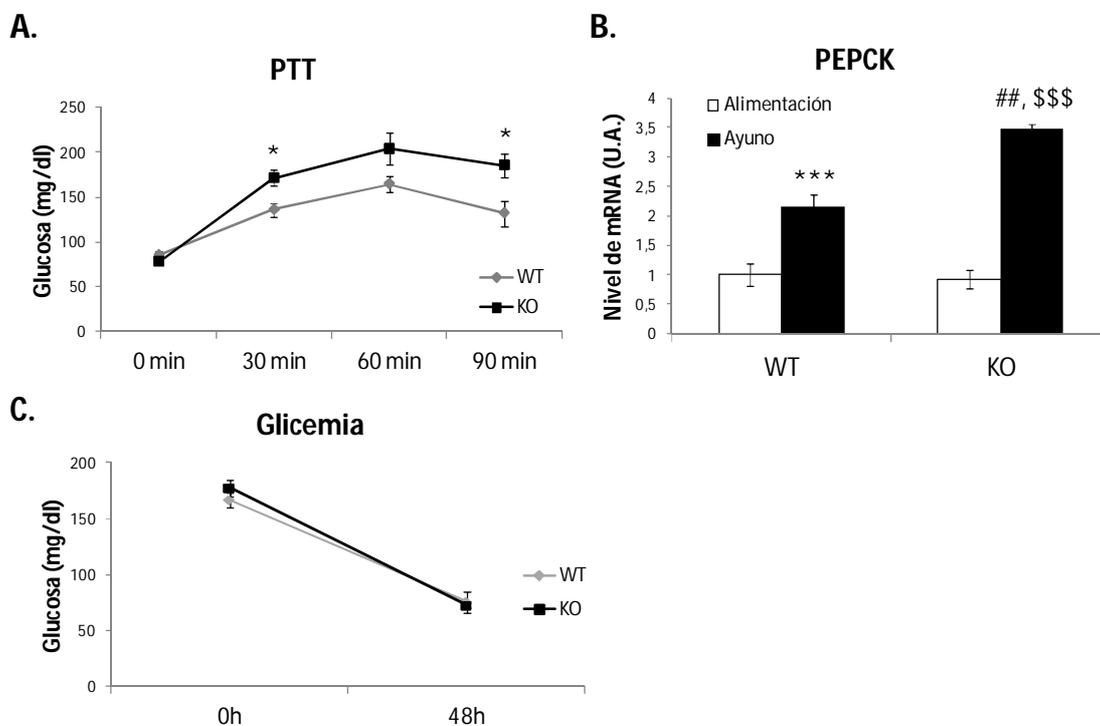


Figura 48. Homeostasis de la glucosa *in vivo*. La homeostasis de la glucosa fue determinada en cada grupo mediante una prueba de tolerancia al piruvato (A) y la cuantificación de la expresión de PEPCK después de un ayuno de 24 horas (B). La glicemia de ratones WT y CPT1C KO fue medida tras 48 horas de ayuno (C). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentado, ##: $p < 0,01$ vs. WT ayunado. $n = 6$.

1.4. ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR

El músculo esquelético requiere grandes cantidades de energía para desarrollar correctamente sus funciones, por lo cual es vital su adaptación metabólica a las distintas situaciones de disponibilidad energética. Asimismo, el músculo juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa ya que es el principal tejido responsable del aclarado de ésta. Por consiguiente, analizamos el metabolismo muscular de ratones WT y CPT1C KO en respuesta a un ayuno de 24 horas.

Del mismo modo que en el hígado, primeramente analizamos la activación de la oxidación de las grasas. Usando como marcadores de activación de este proceso la fosforilación de AMPK y los niveles de mRNA de CPT1B. Los ratones CPT1C KO presentan

niveles elevados tanto de fosfo-AMPK como de CPT1B durante la situación de alimentación (figura 49A y B), que a diferencia de los ratones WT, no incrementan en respuesta al ayuno (figura 49A y B). Estos datos indicarían una regulación inadecuada de las enzimas implicadas en la regulación de la oxidación de las grasas en el músculo de los ratones deficientes de CPT1C a la disponibilidad de nutrientes.

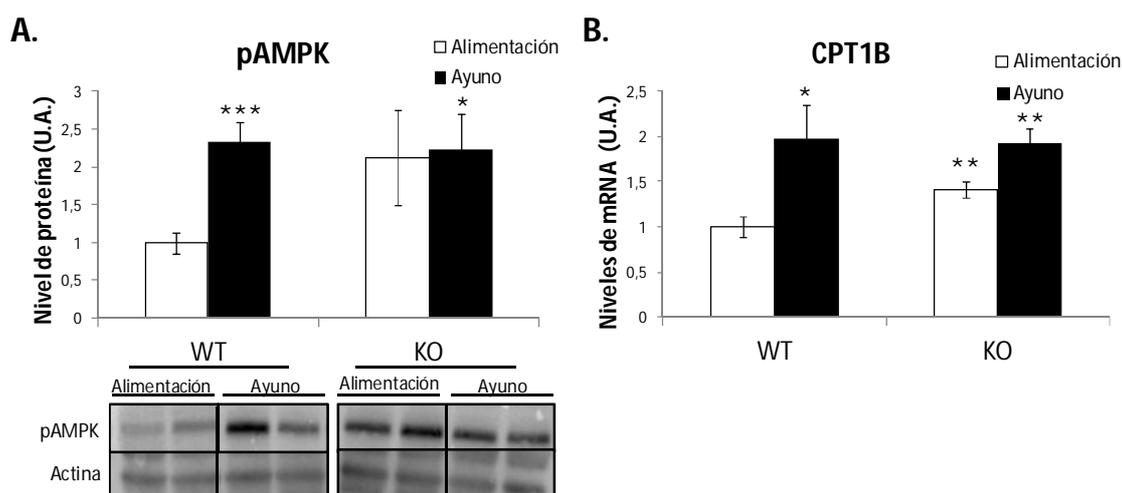


Figura 49. Efecto del ayuno en la activación muscular de la oxidación de las grasas. Niveles de fosfo-AMPK (A) y CPT1B (B) de ratones WT y CPT1C KO determinados por WB y PCR a tiempo real, respectivamente. Los resultados se muestran como promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentado. $n = 5-8$.

A continuación se estudiaron las enzimas clave necesarias para inducir el cambio metabólico durante el ayuno, es decir, el eje PDK4-PDH. Los ratones CPT1C KO manifiestan una menor inducción de la expresión de PDK4 durante el ayuno (figura 50A) en comparación con los WT, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa. La disponibilidad de un kit comercial para la determinación de la actividad PDH en homogenados de tejido muscular nos permitió valorar la actividad de esta enzima en los músculos de nuestros animales durante el ayuno mediante un ensayo *in vitro*. Los resultados de actividad PDH revelan que los ratones CPT1C KO, contrariamente a los ratones WT, tienen la actividad PDH aumentada durante el ayuno, en lugar de disminuida (figura 50B). Por lo tanto, podemos concluir que los ratones deficientes de CPT1C mantienen activo el flujo de la glucólisis, produciendo más acetil-CoA susceptible de ser oxidado, a partir de piruvato, lo cual correlacionaría con un mayor consumo de glucosa a nivel muscular durante el ayuno.

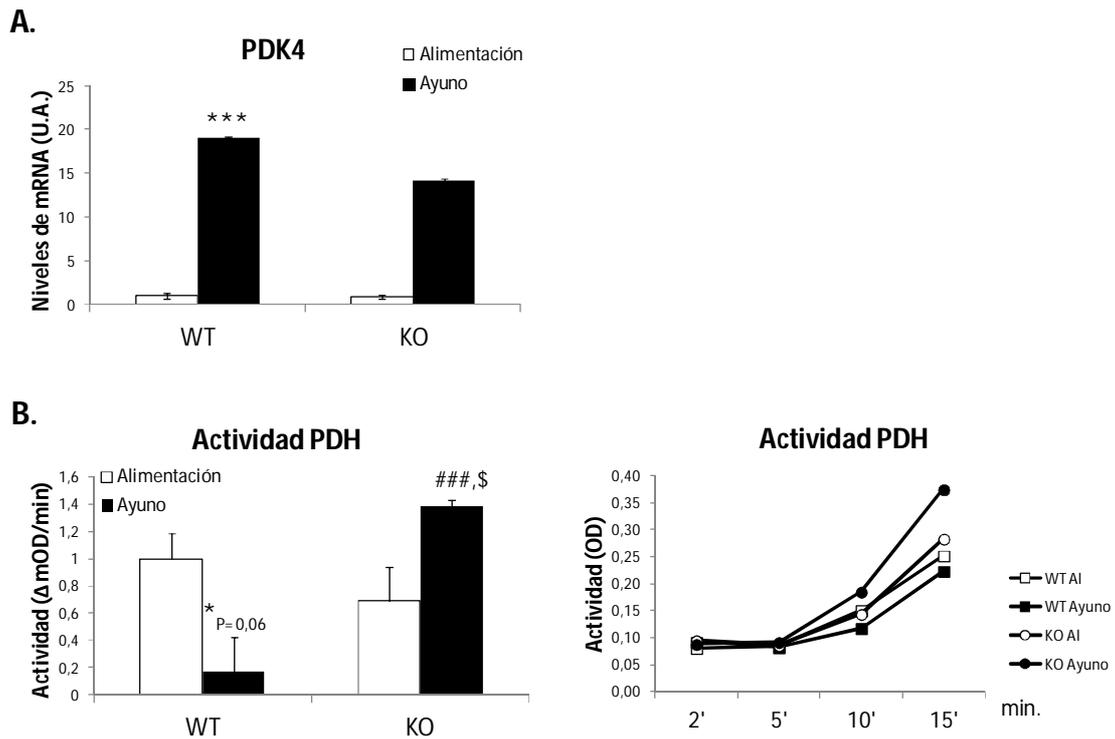


Figura 50. Efecto del ayuno en el eje PDK4-PDH muscular. Nivel de expresión de PDK4 determinados por la cuantificación de mRNA por PCR a tiempo real (A), (B) actividad PDH en músculo de ratones WT y CPT1C KO alimentados y tras un ayuno de 24 horas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$, **, ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentado; ###: $p < 0,005$ vs. WT ayunado; \$: $p < 0,05$ vs. KO alimentado. $n = 4-6$.

Por último, se ha cuantificado el reservorio de glucógeno muscular en ambos grupos de animales, WT y CPT1C KO, tanto en situación de alimentación como tras un ayuno de 6 horas. Los ratones deficientes de CPT1C no presentan diferencias en el contenido de glucógeno muscular respecto los ratones WT, ni en situación de alimentación ni después de la privación de alimentos, tal y como se puede ver en la figura 51. El metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético está controlado en gran parte por la captación de glucosa plasmática. En situación de ayuno donde la síntesis de glucógeno está inhibida, cuando la glucosa entra en el músculo es rápidamente metabolizada y oxidada.

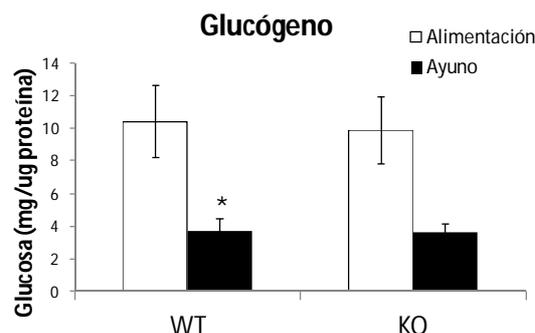


Figura 51. Efecto del ayuno en las reservas musculares de glucógeno. Contenido de glucógeno muscular de ratones WT y CPT1C KO en situación de alimentación y tras un ayuno de 6 horas, expresado en mg de glucosa por μg de proteína. *: $p < 0,05$ vs. WT alimentado. $n = 4-6$.

Teniendo en consideración, la mayor gluconeogénesis hepática junto con el mantenimiento de la glicemia y del glucógeno muscular, además de la mayor actividad PDH, parece factible que en los ratones deficientes de CPT1C, el músculo contribuye al aclaramiento de la glucosa plasmática sintetizada en mayor extensión por el hígado, debido a un mayor consumo de glucosa muscular, posiblemente consecuente de una menor capacidad de oxidación de ácidos grasos.

1.5. ANÁLISIS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO HIPOTALÁMICO

Está ampliamente descrito el papel del metabolismo en el hipotálamo mediobasal (MBH) sobre la regulación de la homeostasis energética. En esta tesis se han estudiado 3 vías de señalización hipotalámicas distintas implicadas en la regulación de la homeostasis energética del organismo: 1) la activación del metabolismo energético mitocondrial, 2) la activación de la autofagia, 3) la respuesta al estrés reticular.

Con el fin de determinar el papel de CPT1C en estos eventos, primeramente se ha analizado si la expresión de CPT1C varía en respuesta al ayuno. Para ello, un grupo de ratones WT se mantuvo con alimentación y otro fue ayunado durante 24 horas, después de este período se extrajo el hipotálamo entero y se analizaron los niveles de CPT1C. El mismo experimento se repitió para diseccionar únicamente los núcleos mediobasales del hipotálamo. Como se indica en la figura 52, CPT1C aumenta su expresión en el MBH en respuesta al ayuno, sin embargo este efecto no se observa cuando se analiza el hipotálamo entero. Por este motivo, se decidió hacer el resto de experimentos utilizando únicamente los núcleos mediobasales del hipotálamo (salvo puntualmente cuando indicado).

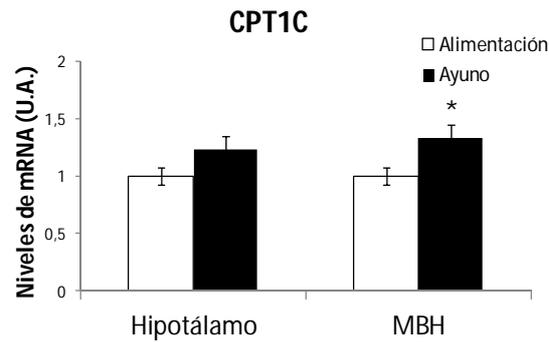


Figura 52. Efecto del ayuno sobre los niveles de CPT1C. Niveles de expresión de CPT1C en el hipotálamo entero y en el hipotálamo mediobasal en situación de alimentación y de ayuno, determinados por PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. MBH alimentación. $n = 6$.

Debido a los datos publicados previamente sobre el papel de CPT1C en la modulación de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos mediada por la señalización de leptina y grelina (Gao *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2013), decidimos analizar los niveles de los neuropéptidos AgRP y NPY tras 24 horas de ayuno en animales WT y CPT1C KO (figura 53). En situación de privación de la ingesta, los ratones deficientes de CPT1C no presentan alteraciones en la expresión de neuropéptidos orexigénicos en comparación con los ratones WT. Este dato podría indicar que en situación de ayuno, el efecto de la ausencia de CPT1C se encuentra compensado por el resto de reguladores de la expresión de los neuropéptidos.

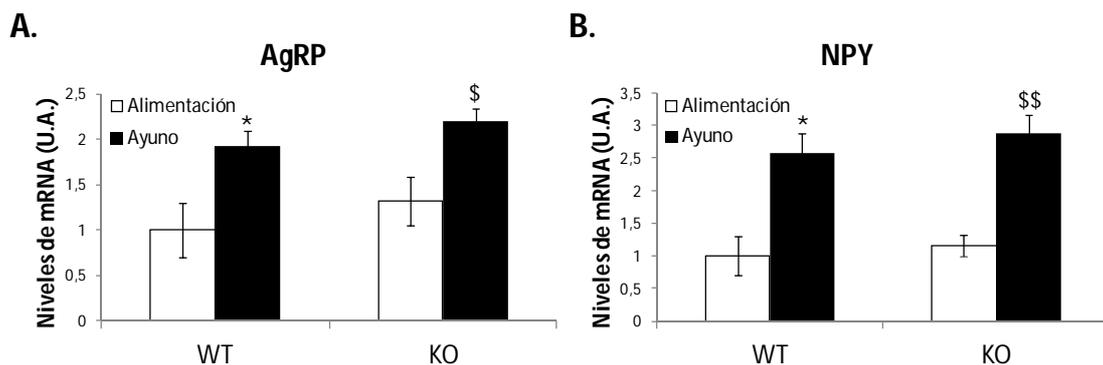


Figura 53. Efecto del ayuno sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos. Niveles de mRNA de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY. Resultados expresados como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. WT alimentados; \$: $p < 0,05$, \$\$: $p < 0,01$ vs. KO alimentados. $n = 6$.

Los últimos trabajos publicados en la literatura reflejan la complejidad del metabolismo hipotalámico. La mayoría de trabajos se han centrado en el estudio del hipotálamo mediobasal como centro regulador de la homeostasis energética. A pesar de la focalización en esta área hipotalámica, el MBH sigue siendo muy heterogéneo, ya que se han descrito respuestas diferenciales específicas de cada tipo de población neuronal distinta. Sin embargo, parece estar bien establecido que durante el ayuno, en el MBH se induce la oxidación de las grasas mediante la activación del eje AMPK-CPT1A y que éste desencadena la expresión de UCP2 con el fin de tamponar los ROS producidos en la mitocondria y permitir una β -oxidación sostenida (Andrews *et al.*, 2008). Por otro lado, también está bien establecido que a nivel hipotalámico, SIRT1 aumenta su expresión y actividad durante el ayuno. SIRT1 contribuye a la biogénesis y a la función mitocondrial mediante el factor de transcripción PGC1, además de participar en el eje de señalización de la grelina (AMPK-CPT1A-UCP2) descrito anteriormente (Nakazato *et al.*, 2001).

Con el objetivo de averiguar si CPT1C juega algún papel en alguna de estas rutas de señalización, el hipotálamo mediobasal de ratones WT y CPT1C KO fue diseccionado después de someter a los ratones a un ayuno de 24 horas o bajo el mantenimiento de la alimentación *ad libitum* (grupo control). Se extrajo la proteína a la mitad de los ratones de cada grupo, y el RNA a la otra mitad y se analizó el efecto de la ausencia de CPT1C sobre la activación de los sensores energéticos intracelulares AMPK y SIRT1, así como la actividad mitocondrial mediante el análisis de los niveles de UCP2.

Como está descrito, los ratones WT incrementan los niveles de fosfo-AMPK en respuesta al ayuno, sin embargo, los ratones deficientes de CPT1C presentan una mayor activación de AMPK en situación de alimentación respecto los ratones WT, la cual contrariamente a lo esperado, disminuye durante el ayuno (figura 54). Respecto a SIRT1, cabe mencionar que se expresa más intensamente en el MBH en relación al resto de núcleos hipotalámicos (Ramadori *et al.*, 2008). Esto podría explicar que no se observe un incremento de SIRT1 durante la situación de ayuno en los ratones WT, ya que SIRT1 fue analizada en extracto proteico de hipotálamo entero. Sin embargo, en estas muestras hipotalámicas, se ha podido observar una disminución de la expresión de SIRT1 en los ratones CPT1C KO en situación de ayuno respecto los WT (figura 54). Estos resultados sugieren que la ausencia de CPT1C altera de algún modo la correcta respuesta adaptativa al estado energético y oxidativo celular.

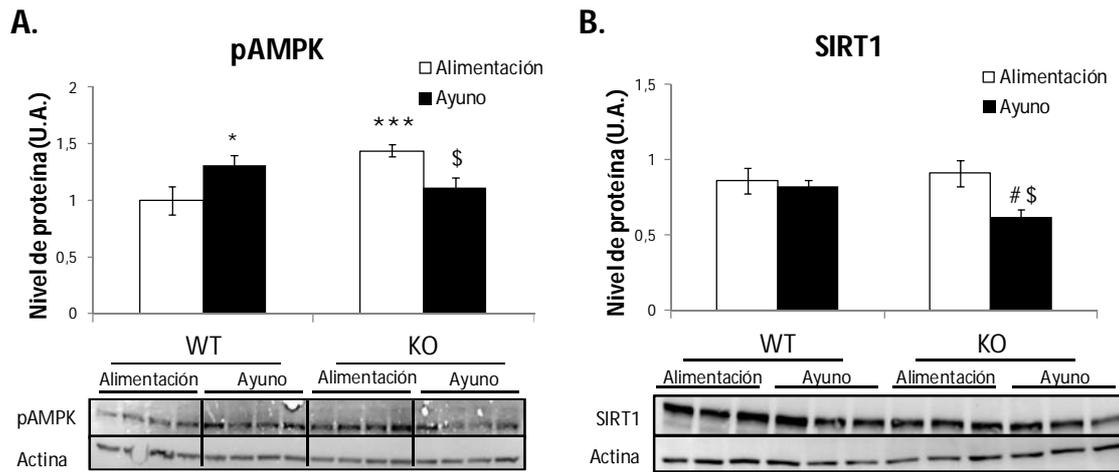


Figura 54. Efecto del ayuno sobre los sensores energéticos AMPK y SIRT1 en el MBH. Niveles de expresión de fosfo-AMPK (A) y SIRT1 (B) en el MBH de ratones WT y CPT1C KO en situación de alimentación y ayunados durante 24 horas. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. $n = 6$. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentados; \$: $p < 0,05$ vs. KO alimentados; #: $p < 0,05$ vs. WT ayunados.

CPT1C es una proteína que se encuentra en el retículo endoplasmático. Luego, considerando el papel de las interacciones entre el retículo y la mitocondria en la regulación de la homeostasis energética celular, nos propusimos estudiar el efecto de la ausencia de CPT1C sobre la actividad mitocondrial hipotalámica en situación de ayuno.

Del mismo modo que fosfo-AMPK, observamos un incremento en la expresión de UCP2 en respuesta al ayuno en los ratones WT, efecto que no se observa en el MBH de los ratones deficientes de CPT1C (figura 55). Debido a la incapacidad de los ratones CPT1C KO de aumentar la expresión de UCP2 en respuesta al ayuno, se analizó el daño oxidativo causado por ROS mediante la cuantificación de proteínas carboniladas (figura 55). Efectivamente los ratones CPT1C KO presentaron mayores niveles de proteínas carboniladas en el MBH durante el ayuno respecto los WT, el cual también se observa durante la alimentación, lo que sugiere que este daño oxidativo aumentado es sostenido en el tiempo.

En conjunto, estos resultados demuestran que de algún modo, CPT1C es necesaria para el correcto funcionamiento mitocondrial en respuesta al ayuno. Más concretamente, la ausencia de CPT1C impide la inducción de la expresión de UCP2 en el MBH en respuesta al ayuno, lo que conlleva un mayor daño oxidativo.

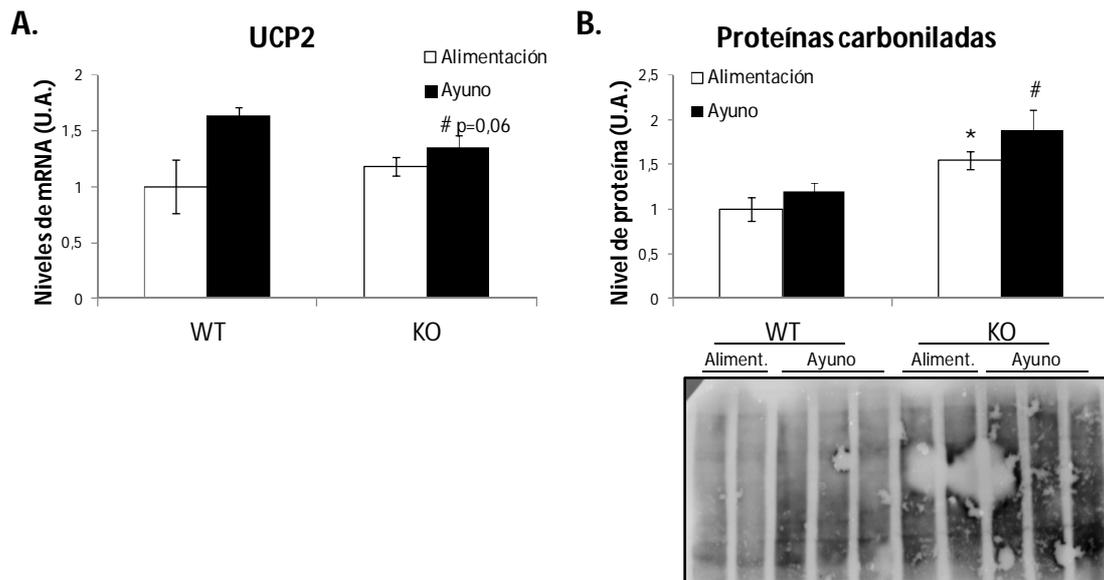


Figura 55. Efecto del ayuno sobre la inducción de UCP2 y la producción de ROS en el MBH. Expresión de UCP2 (A) y cuantificación del daño oxidativo mediante la detección de proteínas carboniladas (B) en el MBH de ratones WT y CPT1C KO en situación de alimentación y durante el ayuno. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. #: $p < 0,05$ vs. WT ayunado; *: $p < 0,05$ vs. WT alimentado. $n = 6$.

A continuación se analizó la activación de la autofagia mediante el análisis de la conversión de LC3I a LC3II, así como de su principal regulador, el sensor nutritivo intracelular mTOR. mTOR es activado en situación de abundancia de nutrientes, por lo que en situación de ayuno permanece inactivo, permitiendo la activación de la autofagia, ya que mTOR es un fuerte represor de ésta. De la misma manera que SIRT1, el análisis de la expresión de mTOR se realizó en proteína obtenida de hipotálamo entero. En este caso, no se observa modulación de fosfo-mTOR en respuesta al ayuno en los animales control (WT), sin embargo, los hipotálamos de los ratones deficientes de CPT1C presentan una tendencia a tener mayores niveles de fosfo-mTOR relativo a mTOR total durante el ayuno (figura 56A). En concordancia con este resultado, los animales CPT1C KO tienen reprimida la autofagia en situación de ayuno en el MBH (figura 56B).

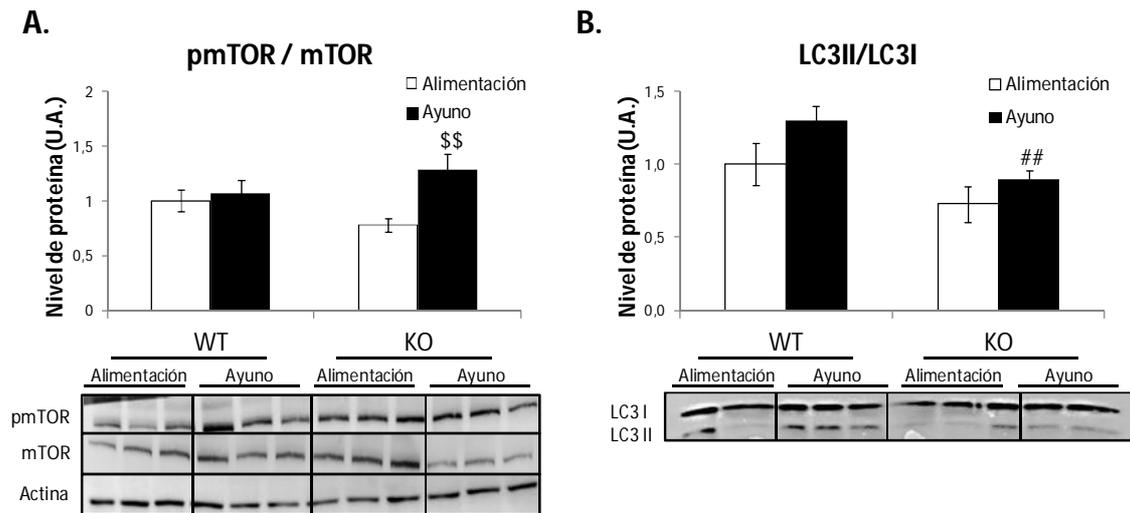
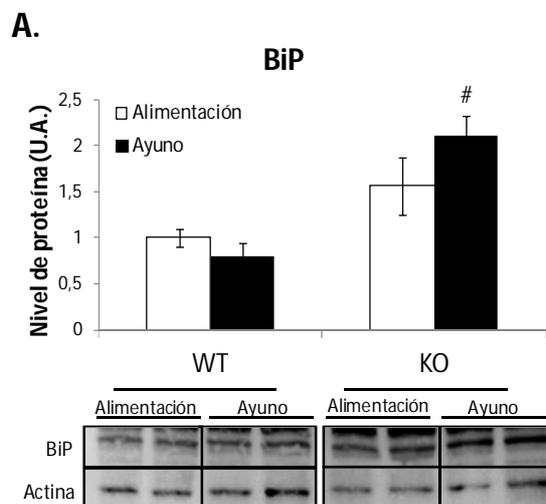


Figura 56. Efecto del ayuno sobre mTOR hipotalámico y la autofagia en el MBH. A) Niveles de expresión de fosfo-mTOR respecto mTOR total en hipotálamo de ratones WT y CPT1C KO en alimentación y ayuno (24 horas), **B)** activación de la autofagia en respuesta al ayuno (24 horas) en el MBH de animales WT y CPT1C KO. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. \$\$: $p < 0,01$ vs. KO alimentado; ##: $p < 0,01$ vs. WT ayunado. $n = 6$.

Teniendo en cuenta una vez más la localización de CPT1C en el retículo endoplasmático, junto con el papel de éste en la homeostasis energética y la regulación de la respuesta al estrés reticular (UPR) en parte mediado por mTOR (Appenzeller-Herzog y Hall, 2012), emerge de manera muy interesante estudiar el efecto de la ausencia de CPT1C sobre la UPR. Así, podemos observar en la figura inferior (figura 57) que la ausencia de CPT1C causa un incremento en la expresión de la chaperona BiP, estadísticamente significativo en situación de ayuno en comparación con ratones salvajes.



← **Figura 57. Niveles hipotalámicos de la chaperona BiP en ratones WT y CPT1C KO.** *Western blot* de BiP de extractos proteicos hipotalámicos de ratones WT y CPT1C KO en situación basal y tras 24 horas de ayuno. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. #: $p < 0,05$ vs. WT ayunado. $n = 6$.

Por último, valorando el conjunto de resultados obtenidos, los cuales demuestran una alteración en los mecanismos de adaptación al ayuno en el hipotálamo de ratones deficientes de CPT1C, juntamente con datos previos que demuestran una resistencia a la señalización de grelina de este modelo animal (Ramírez *et al.*, 2013), se quiso analizar la funcionalidad neuroendocrina del hipotálamo. Para ello, cuantificamos los niveles de hormona del crecimiento (GH) en plasma de ratones WT y CPT1C KO, ya que la hormona del crecimiento es sintetizada y secretada por la hipófisis mediante la regulación de los péptidos liberados por los núcleos neurosecretorios del hipotálamo. Los resultados obtenidos muestran una tendencia a niveles inferiores de GH en sangre de los animales deficientes de CPT1C durante el ayuno, aunque no es significativa (figura 58).

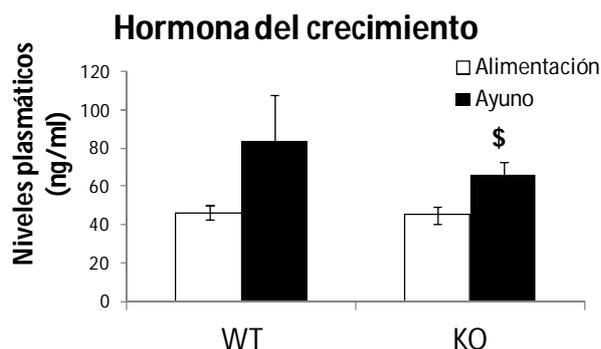


Figura 58. Niveles plasmáticos de hormona del crecimiento en ratones WT y CPT1C KO. Después de un ayuno de 24 horas, se obtuvo el plasma de ratones WT y CPT1C KO, en el cual se midió mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. \$: $p < 0,05$ vs. KO alimentado. $n = 6-8$.

2. FENOTIPO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C DURANTE EL TORPOR

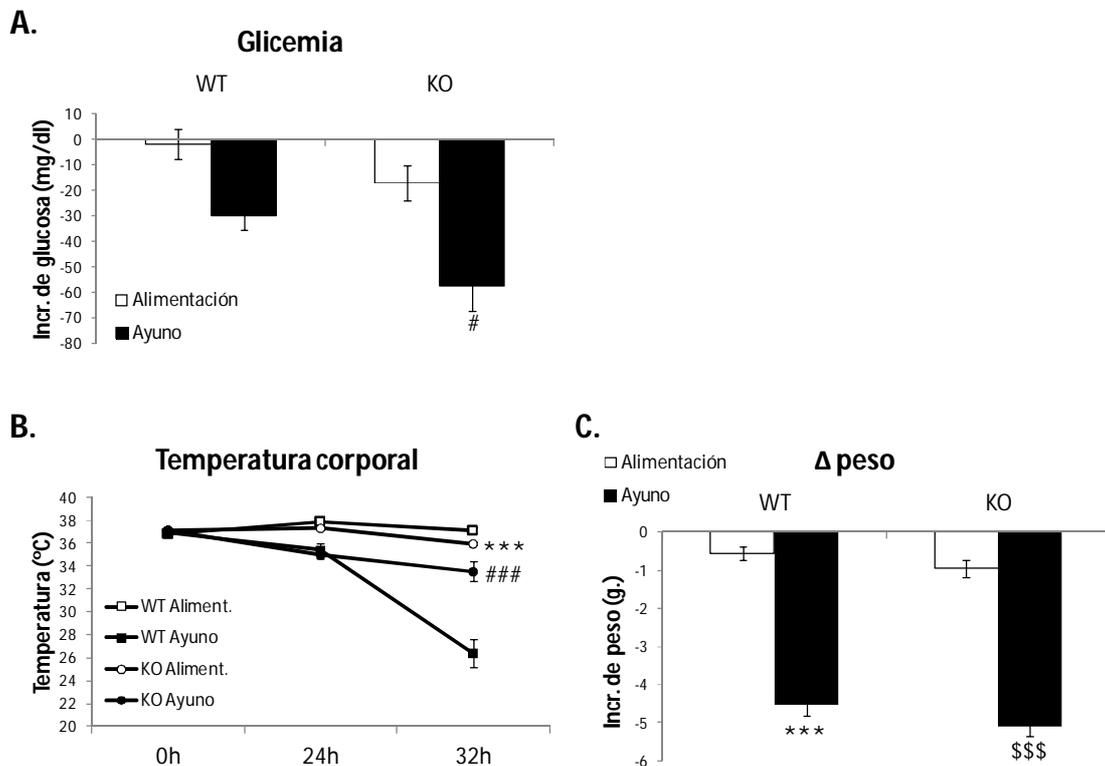
Como se comentaba en la introducción (apartado 1.2.), el torpor es la adaptación metabólica a la situación ambiental, caracterizada por un descenso controlado de la tasa metabólica y de la temperatura corporal, en la que se da lugar el cambio del consumo de carbohidratos como sustrato energético por el consumo de lípidos. Resultados presentados en el apartado anterior de resultados de esta tesis demuestran que los ratones deficientes de CPT1C son incapaces de producir el cambio metabólico hacia el consumo de grasas durante el

ayuno tanto en hígado como en músculo. Se ha visto que este cambio es necesario para la adecuada adaptación metabólica al torpor, así que se realizaron dos experimentos con el fin de averiguar si CPT1C está involucrada en la respuesta adaptativa al torpor.

Primeramente, un grupo de ratones WT y CPT1C KO se mantuvieron hasta 32 horas en ayunas y a una temperatura ambiental de 16°C, mientras que el grupo control se mantuvo a la misma temperatura pero con alimentación *ad libitum*. En segundo lugar, se hizo un experimento en el cual a primera hora de la mañana, un grupo de ratones WT y otro de CPT1C KO fueron sometidos durante dos horas a 4°C, mientras que el grupo control se mantuvo a temperatura ambiente (23°C). En el primer procedimiento se midió la glicemia y en ambos procedimientos experimentales se midió la temperatura corporal de los animales y el peso corporal.

2.1. ANÁLISIS DE LA GLICEMIA

En el primer experimento, se observa como los ratones CPT1C disminuyen en mayor grado la concentración de glucosa en sangre a las 24 horas desde el inicio del procedimiento, esta disminución es más acusada en el grupo de ratones ayunados (figura 59A).



← **Figura 59. Efecto de la disminución de la temperatura ambiental a 16°C durante 32 horas.** Incremento de glucosa en sangre (A), temperatura corporal (B) e incremento de peso (C) de ratones WT y CPT1C KO alimentados o ayunados durante 32 horas a una temperatura ambiente de 16°C. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. ***: $p < 0,005$ vs. WT alimentado; ###: $p < 0,005$ vs. WT ayunado; \$\$\$: $p < 0,005$ vs. KO alimentado. $n = 6$.

2.2. ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA CORPORAL

En el primer experimento (32 horas a 16°C), se observan diferencias significativas entre los ratones WT y CPT1C KO en el grupo de alimentados *ad libitum*. Los ratones deficientes de CPT1C adquieren una temperatura corporal aproximadamente de un grado menos que los ratones WT al cabo de 32 horas desde el inicio del procedimiento (KO: 35,95°C \pm 0,23 vs. WT: 37,10°C \pm 0,23) (figura 59B). Las diferencias aún son más evidentes en el grupo de los animales ayunados, pero en el sentido contrario, donde los ratones CPT1C KO descienden siete grados menos la temperatura corporal en comparación con los ratones WT (33,53°C \pm 0,85 vs. 26,40°C \pm 1,22, respectivamente) (figura 59B). El mismo efecto fue observado cuando los ratones fueron sometidos durante 2 horas a 4°C, mientras que los WT disminuyeron la temperatura casi tres grados (de 37,52°C \pm 0,14 a 34,75°C \pm 0,41), los CPT1C KO sólo disminuyeron un grado y medio (de 37,22°C \pm 0,14 a 35,7°C \pm 0,30) (figura 60A).

2.3. ANÁLISIS DEL PESO

En ninguno de los dos procedimientos experimentales ensayados se han encontrado diferenciadas de peso destacables entre los ratones WT y CPT1C KO. La mayor pérdida de peso se alcanza cuando los ratones son ayunados y mantenidos a 16°C, donde ambos grupos de animales pierden alrededor de cinco gramos (figura 59C). Sin embargo, el descenso de la temperatura hasta 16°C no conlleva prácticamente pérdidas de peso en los ratones alimentados, los cuales disminuyen menos de un gramo a lo largo de las 32 horas del procedimiento (figura 59C). Igualmente, los ratones mantenidos 2 horas a 4°C tampoco presentan pérdidas de peso considerables (figura 60B).

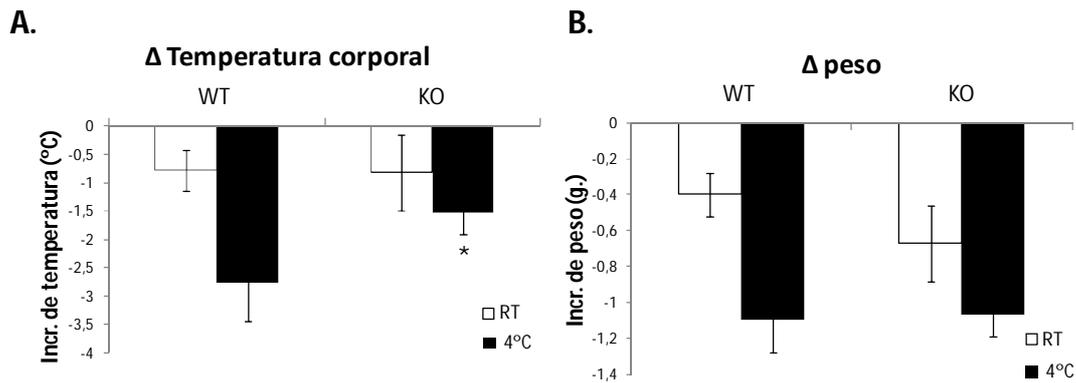


Figura 60. Efecto de la disminución de la temperatura a 4°C durante 2 horas. Incremento de temperatura corporal (A) y de peso (B) de ratones WT y CPT1C después de permanecer 2 horas a temperatura ambiente o bien a 4°C. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. WT a 4°C. $n = 6$.

3. FENOTIPO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Se ha demostrado que los beneficios de la restricción calórica y su efecto sobre la longevidad se deben en parte al favorecimiento de la oxidación de las grasas en lugar de los azúcares. Varias evidencias soportan que la metabolización de la glucosa causa estrés oxidativo, principal causa del envejecimiento celular (Mobbs *et al.*, 2007). En este trabajo, se aportan datos consistentes que apuntan hacia un mayor consumo de glucosa y menor consumo de lípidos por parte de los ratones deficientes de CPT1C. Sin embargo, hasta este momento, el efecto de esta alteración metabólica observada durante el ayuno y también bajo dietas ricas en grasa, no se conoce a largo plazo. Tanto la obesidad como las enfermedades neurodegenerativas son patologías asociadas a la edad, por otra parte, la ausencia de CPT1C causa mayor sensibilidad a la obesidad como también disfunciones de aprendizaje y motoras (Wolfgang *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2012 y 2013). Por estas razones se ha llevado a cabo un estudio a largo plazo en el cual se ha monitorizado el peso, la ingesta y la homeostasis de la glucosa de ratones salvajes y deficientes de CPT1C. Asimismo, también se ha analizado a nivel hipotalámico algunos marcadores asociados al envejecimiento, al estrés de retículo endoplasmático y a la inflamación.

3.1. EVOLUCIÓN DEL PESO Y LA INGESTA

El seguimiento del peso y la ingesta se llevó a cabo mensualmente en un grupo de ratones salvajes y CPT1C KO desde las ocho semanas de edad hasta el año. Como se puede ver

en la figura 61, los ratones deficientes de CPT1C presentan obesidad asociada a la edad, caracterizada por una ganancia de peso mayor que los ratones WT a partir de las 16 semanas de edad. Además, la observación ocular del tejido adiposo blanco durante la disección de los ratones al final del experimento indicaba que los ratones CPT1C KO presentaban un incremento de la adiposidad. Por lo que se puede concluir que el mayor aumento de peso de los ratones CPT1C KO es debido a un menor gasto energético, ya que la ingesta es equivalente a los ratones control (WT).

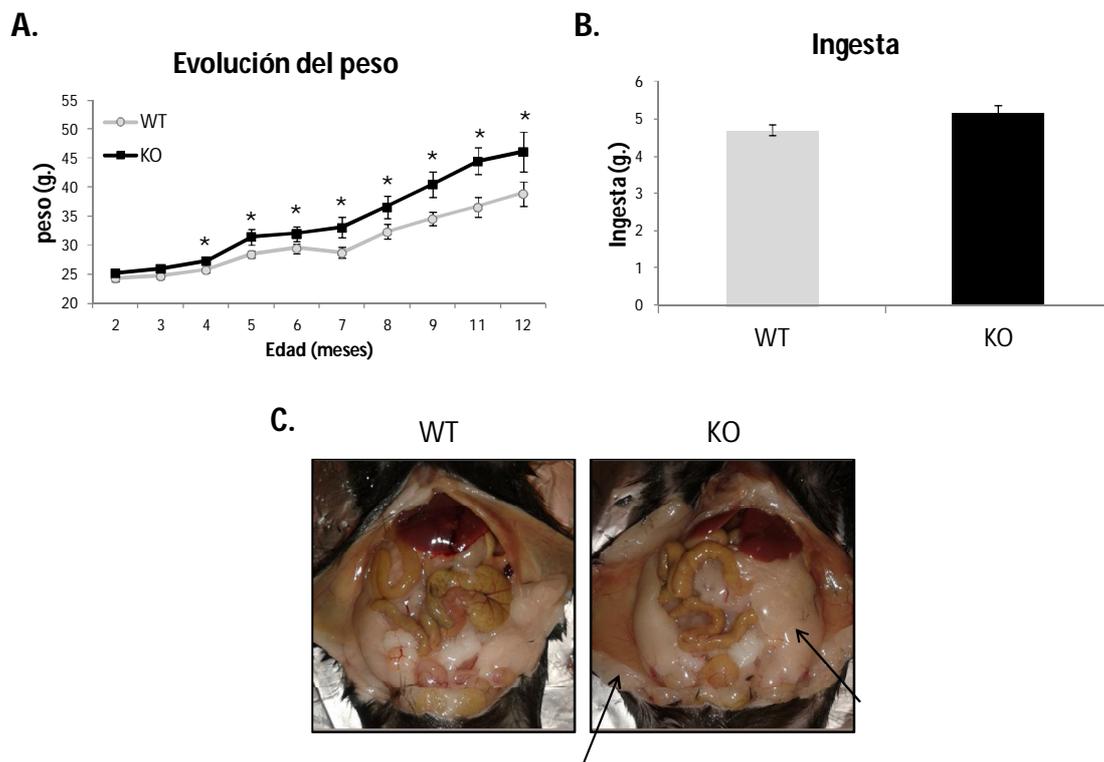


Figura 61. Los ratones CPT1C KO presentan obesidad asociada a la edad. Evolución del peso (A) y promedio de la ingesta durante 24 horas medida mensualmente (B) de ratones WT y CPT1C KO. C) Fotografías representativas del abdomen de animales WT y CPT1C KO a los 16 meses de edad. Las flechas señalan el tejido adiposo blanco epididimal e inguinal. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. WT. $n = 8$.

3.2. ANÁLISIS DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

A partir de los seis meses de edad, cuando ya se observan diferencias significativas de peso sostenidas en los ratones CPT1C KO hasta el año, se realizaron varias pruebas para comprobar el estado de la homeostasis de la glucosa a lo largo del tiempo, tanto en ratones WT como CPT1C KO.

A los seis meses de edad de los animales, se realizó una medida de la glucemia durante un ayuno de 48 horas. A diferencia de los resultados obtenidos en los ratones jóvenes (2 meses de edad) en los que no se observaban diferencias en los niveles de glucosa entre ambos genotipos (figura 48C), en este grupo de animales más mayores y más pesados, se observa un leve aumento en la concentración sanguínea de glucosa en los ratones CPT1C KO, que se mantiene a lo largo del ayuno (figura 62A). Posteriormente, a los siete meses de edad, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) que reveló una total capacidad de los ratones CPT1C KO para regular los niveles de glucosa sanguínea (figura 62B). Por último, al año de edad, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina, en la que los ratones CPT1C KO mostraron unos niveles de glucosa levemente superiores en comparación a los WT, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo ($p=0,058$) (figura 62C). Mediante estas tres pruebas podemos concluir que los ratones deficientes de CPT1C presentan una leve hiperglicemia que aparece a partir de los seis meses de edad, a pesar de no manifestar resistencia a la insulina tras la administración de un bolo de glucosa o de insulina.

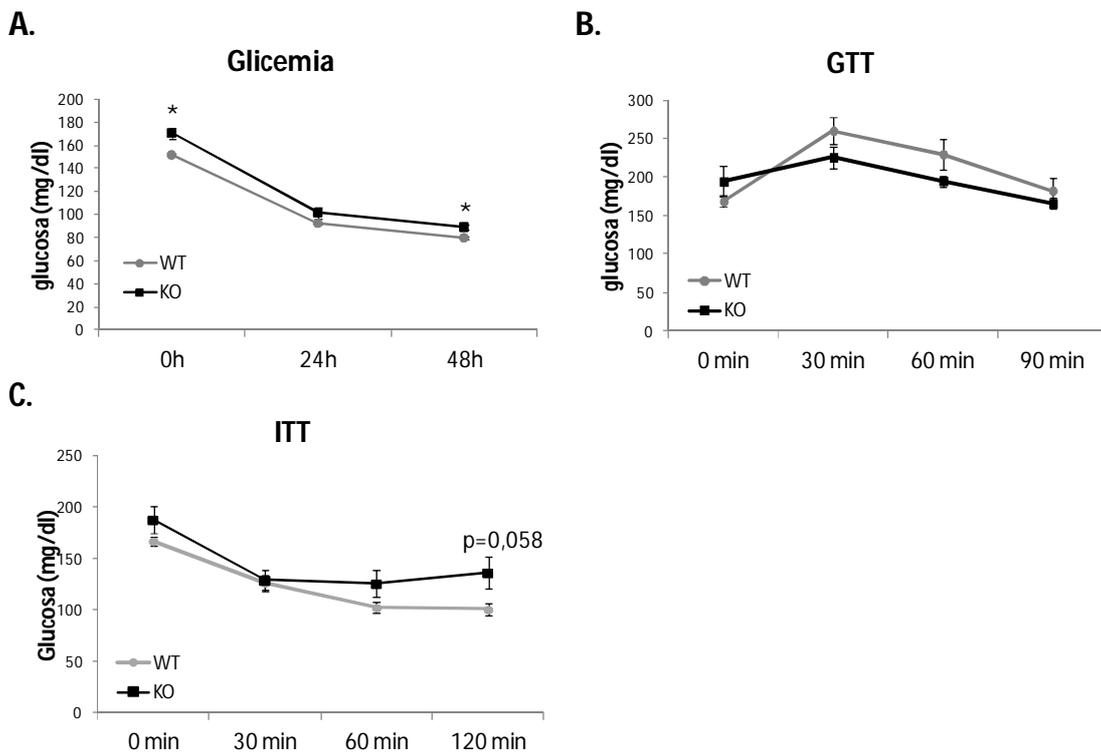


Figura 62. Homeostasis de la glucosa durante el envejecimiento. **A)** Glicemia durante un ayuno de 48 horas realizada a los seis meses de edad, **B)** prueba de tolerancia a la glucosa realizada a los siete meses de edad, **C)** prueba de tolerancia a la insulina al año de edad. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. WT. $n = 8$.

3.3. ESTUDIO DE MARCADORES HIPOTALÁMICOS DE ENVEJECIMIENTO

Hay evidencias en la literatura que relacionan la expresión de los sensores energéticos SIRT1 y mTOR con el envejecimiento (Duan, 2013; Blagoskonny, 2013; Wei *et al.*, 2015). Se ha descrito que SIRT1 en el hipotálamo disminuye con la edad, mientras que un aumento de la actividad de mTOR va en paralelo al aumento de la edad. Aunque es cierto que la disminución de SIRT1 aparece hacia los 2 años de edad en los ratones, cabría esperar una reducción precoz si hubiese un envejecimiento acelerado. Concerniente a mTOR, un aumento considerable de su activación está presente en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo a los doce meses de edad asociado a obesidad dependiente de la edad (Yang *et al.*, 2012).

Para el estudio de los niveles de SIRT1 y mTOR, se obtuvo el extracto proteico de los hipotálamos de ratones WT y CPT1C KO a los dieciséis meses de edad. Tal y como se esperaba, no hay diferencias de expresión de SIRT1 entre los ratones jóvenes y viejos WT, aunque tampoco las hay entre los ratones CPT1C KO (figura 63A). Respecto a mTOR, tampoco se observa un incremento en la activación de mTOR en ratones WT, como se puede ver la figura 63B. Sin embargo, los ratones CPT1C KO presentan un aumento de fosfo-mTOR respecto los niveles de mTOR total a nivel hipotalámico, lo que correlacionaría con la mayor obesidad observada en estos ratones.

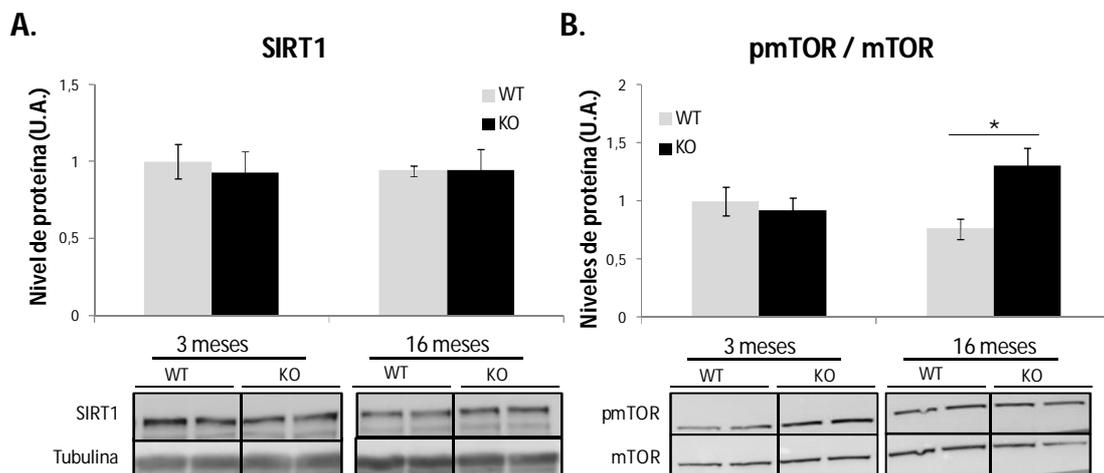


Figura 63. Efecto del envejecimiento sobre los niveles de SIRT1 y la activación de mTOR. Western blot de SIRT1 (A) y de las formas activa e inactiva de mTOR (B) de hipotálamo de ratones de 3 y 16 meses de edad WT y CPT1C KO. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$. $n = 5-6$.

Además de SIRT1 y mTOR, existen otros marcadores de envejecimiento a nivel hipotalámico, como son BiP y NF- κ B. Las chaperonas residentes en el retículo endoplasmático

tales como BiP se oxidan progresivamente durante el envejecimiento y este deterioro contribuye a su deterioro funcional. La expresión de BiP se reduce significativamente con la edad en varias áreas cerebrales (Brown y Naidoo, 2012). También se ha descrito que la ruta IKK β - pNF- κ B aumenta con la edad en el hipotálamo, produciendo inflamación en dicho tejido y causando envejecimiento a nivel general (Zhang *et al.*, 2013).

Los niveles de expresión de BiP y fosfo-NF- κ B fueron analizados por *western blot* en extractos proteicos de hipotálamo de ratones jóvenes (3 meses de edad) y viejos (16 meses de edad) WT y CPT1C KO. Como era de esperar, tal y como está descrito en la literatura, los ratones WT viejos presentan una disminución en la expresión de BiP y un aumento en la expresión de fosfo-NF- κ B (en forma de tendencia) respecto los jóvenes. Los ratones deficientes de CPT1C, muestran niveles de expresión similares a los WT tanto a los 3 meses de edad como a los 16 meses. Por lo tanto, estos resultados indicarían que los ratones CPT1C KO a los 16 meses de edad no manifiestan un envejecimiento acelerado evaluado mediante los marcadores hipotalámicos asociados a la edad BiP y fosfo-NF- κ B.

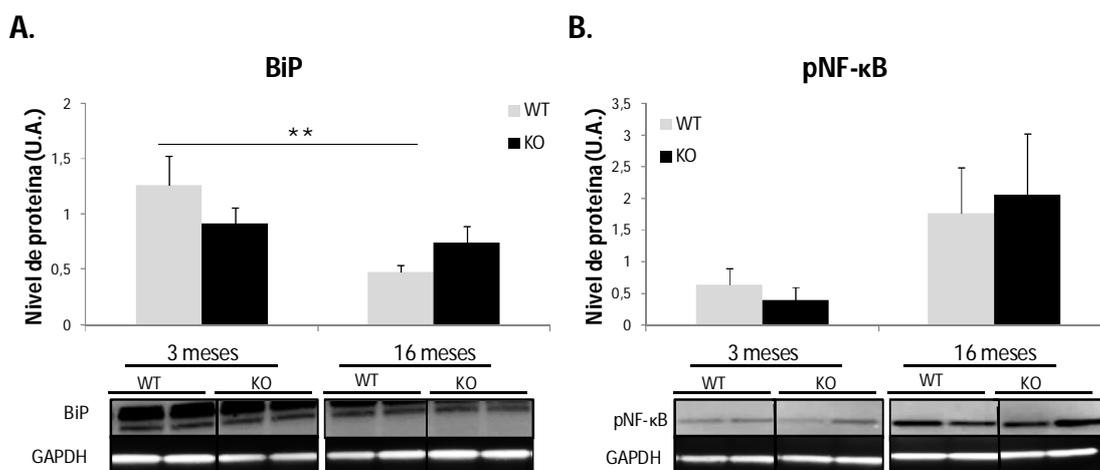


Figura 64. Efecto del envejecimiento sobre los niveles de BiP y fosfo-NF- κ B. . Western blot de BiP (A) y de fosfo-NF- κ B (B) de hipotálamo de ratones de 3 y 16 meses de edad WT y CPT1C KO. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. **: $p < 0,01$. $n = 5-6$.

3.4. TEST DE MEMORIA

El sobrepeso y la obesidad crónicos son factores de riesgo para un menor rendimiento cognitivo, un deterioro o un déficit del mismo. Aunque un menor rendimiento cognitivo temprano puede ser en sí un factor de riesgo para un aumento de peso corporal con el tiempo

(Elias, Goodell y Waldstein, 2012). Ha sido demostrado que la obesidad provoca inflamación en el cerebro, particularmente en el hipotálamo, y que esto es en parte responsable de los efectos negativos sobre la cognición. Esta inflamación local probablemente cause remodelación sináptica y neurodegeneración en el hipotálamo, así como alteración de los circuitos hipotalámicos internos y de la conexión con otras regiones del cerebro (Miller y Spencer, 2014).

En base a los resultados obtenidos en el experimento de envejecimiento, en el cual la monitorización del peso a largo plazo indicaba un mayor aumento de peso de los ratones CPT1C KO respecto los WT, se llevó a cabo una prueba de memoria antes del sacrificio de esos animales. La prueba llevada a cabo es la de reconocimiento de un objeto nuevo (NORT, del inglés *novel object recognition test*), esta prueba se ha convertido en un método popular para el ensayo de la memoria en roedores. Se basa en la tendencia natural de los roedores para explorar objetos nuevos. Tal y como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos, si el animal pasa más tiempo con el objeto nuevo, significa que recuerda el objeto antiguo y el índice de discriminación será más próximo a 1, si no hay discriminación entre los objetos y el animal pasa el mismo tiempo con ambos, el valor será próximo a 0, y en el caso de que el animal esté más tiempo con el objeto antiguo, el índice de discriminación será alrededor de -1. Por lo tanto, valores cercanos a 1 son indicativos de manifestar mejor memoria frente a los objetos presentados. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas entre genotipos (figura 65), aunque parece que hay una tendencia de los ratones deficientes de CPT1C, tanto jóvenes como viejos, a pasar menos tiempo con el objeto nuevo, como se aprecia por los valores más próximos a cero e incluso negativos en comparación con los WT.

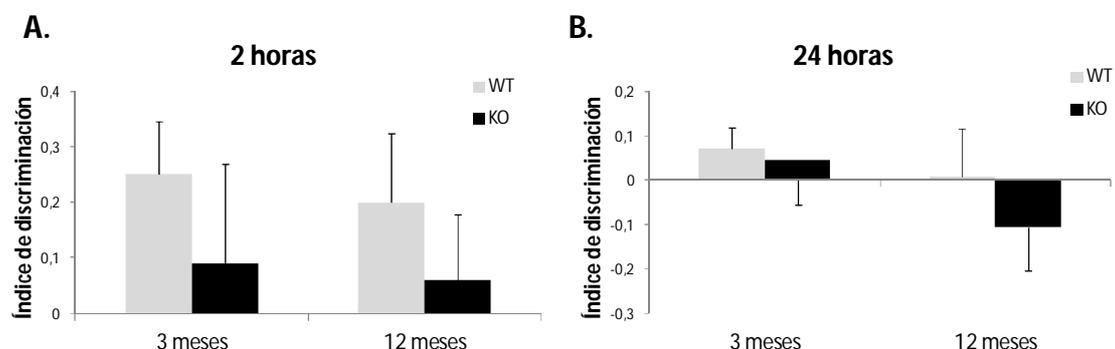


Figura 65. Efecto del envejecimiento sobre la memoria de ratones WT y CPT1C KO. Prueba de reconocimiento de un objeto nuevo a corto y a largo plazo, realizada en ratones jóvenes y viejos. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM del índice de discriminación. $n = 8$.

PARTE II

PAPEL DE CPT1C EN EL METABOLISMO LIPÍDICO HIPOTALÁMICO

El estudio del papel de CPT1C sobre el metabolismo lipídico y energético hipotalámico requiere una aproximación experimental a nivel molecular muy difícil de llevar a cabo mediante estudios *in vivo*. Por lo cual, los experimentos presentados en esta segunda parte de resultados han sido realizados en células hipotalámicas en cultivo, concretamente en la línea celular GT1-7.

La línea celular GT1-7 es una línea neuronal hipotalámica de ratón. Las células GT1-7 derivan de la línea celular GT1, la cual fue producida por Hales y colaboradores (Hales *et al.*, 1992) al dirigir genéticamente la tumorigénesis específicamente en neuronas del hipotálamo de ratones transgénicos utilizando la región promotora del gen de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), expresando el oncogén SV40 antígeno-T y produciendo tumores neuronales para desarrollar las líneas celulares neurosecretoras clonales diferenciadas. Estas células extienden neuritas, expresan marcadores neuronales pero no gliales, y además de expresar y liberar GnRH, también expresan gran cantidad de receptores de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos como de hormonas. Con lo cual esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como sistema modelo en estudios sobre el metabolismo hipotalámico, demostrando que responden a variaciones en las concentraciones extracelulares de nutrientes como al tratamiento con hormonas.

La línea celular GT1-7 fue amablemente cedida por el laboratorio de la Dra. Pamela Mellon de la Universidad de California.

4. EXPRESIÓN DE CPT1C EN RESPUESTA A DISTINTAS SITUACIONES NUTRICIONALES

A pesar de que CPT1C prácticamente no tiene actividad carnitina palmitoiltransferasa demostrada hasta el momento, CPT1C posee los aminoácidos característicos de la unión de los sustratos palmitoil-CoA y carnitina conservados, asimismo mantiene la misma afinidad por el inhibidor malonil-CoA que el resto de isoformas CPT1. Además, aunque no se ha descrito el mecanismo todavía, CPT1C modula los niveles intracelulares de ceramidas (Carrasco *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2013). Todos estos metabolitos son compuestos lipídicos, lo cual nos permite hipotetizar que CPT1C está involucrada en el metabolismo lipídico celular. Asimismo, los estudios realizados *in vivo* en este trabajo y en otros anteriores,

demuestran que el fenotipo de los ratones CPT1C KO está alterado en situaciones en las que hay un aumento en la concentración plasmática de grasas, como es durante el ayuno y la alimentación de dietas ricas en grasa.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la validación de la línea celular GT1-7 como sistema modelo para el estudio de la privación de nutrientes y la sobrecarga lipídica en células hipotálamicas *in vitro*, así como algunos datos preliminares sobre el papel de CPT1C en los mecanismos que intervienen en la adaptación metabólica a estas dos situaciones.

4.1. VALIDACIÓN DEL MODELO CELULAR GT1-7

La validación de la línea celular GT1-7 como modelo celular adecuado para desarrollar nuestro objetivo, se basó en la comprobación que CPT1C modula su expresión en función de las concentraciones de nutrientes del medio, del mismo modo que lo hace *in vivo* en el MBH en respuesta al ayuno (ver figura 52). Las células GT1-7 fueron privadas de suero o bien de glucosa durante dos horas, y se analizó la expresión de CPT1C por *western blot*. La figura 66A muestra como CPT1C responde al déficit nutricional aumentando su expresión. También se muestran los niveles de LC3I y II como marcadores de activación de la autofagia, ya que se ha descrito que ésta se induce por privación de suero y no de glucosa, corroborando la adecuada respuesta de las células GT1-7 a ambos tratamientos (figura 66A).

Por otro lado, debido a la mayor sensibilidad de los ratones CPT1C KO a la obesidad inducida por la dieta, junto con la idea de que los ácidos grasos saturados causan lipotoxicidad a nivel celular, se ensayó la respuesta de CPT1C en células GT1-7 bajo el tratamiento con palmitato. Para ello, se consideró conveniente analizar el efecto producido a corto y a largo plazo, ya que puede haber respuestas diferenciales dependiendo tanto de la dosis como del tiempo de tratamiento. En base a estudios previos, se fijó la dosis de palmitato a 300 μ M, mientras que se fijaron los tiempos a 6 y 24 horas de tratamiento. La figura 66B, muestra en primer lugar que CPT1C en situación basal, aumenta su expresión a lo largo del experimento, conforme va aumentando la confluencia y las conexiones intercelulares. También se puede ver como a corto plazo, el palmitato induce levemente la expresión de CPT1C, la cual disminuye considerablemente después de 24 horas de tratamiento, indicando que en este período posiblemente el palmitato esté causando lipotoxicidad celular. En conjunto, estos resultados demuestran que CPT1C en las células GT1-7 responde a variaciones nutricionales, mostrando una inducción adaptativa de su expresión frente a la privación de nutrientes y a una carga de

palmitato a corto plazo, mientras que esta respuesta decae bajo el tratamiento persistente con palmitato.

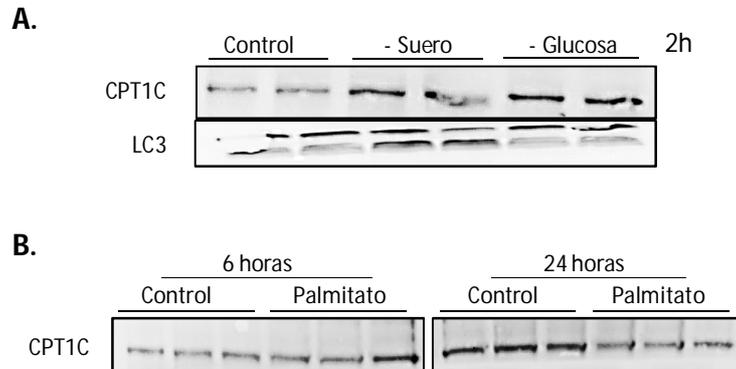


Figura 66. Expresión de CPT1C en respuesta a distintos tratamientos nutricionales. Imágenes de *western blot* representativas de **A)** Expresión de CPT1C y LC3 en situación basal o bajo privación de suero y glucosa durante 2 horas, **B)** expresión de CPT1C bajo tratamiento con palmitato a 6 y 24 horas.

4.2. RESPUESTA DE CPT1C Y OTROS MARCADORES METABÓLICOS AL AYUNO *IN VITRO*

Una vez validado el modelo celular, se diseñó el siguiente experimento con el fin de caracterizar con más detalle la respuesta de CPT1C frente a una situación de ayuno *in vitro*. Datos de nuestro grupo, indican que la expresión de CPT1C aumenta con la privación de suero a largo plazo, por lo que se decidió mantener el medio celular suplementado con 10% de suero en todas las condiciones para evitar fluctuaciones en la expresión de CPT1C. Otros estudios realizados en esta línea celular en los que privan a las células de nutrientes también mantienen el suero al 10% (Beall *et al.*, 2012; Taib *et al.*, 2013). Las células control se mantuvieron en medio completo a lo largo del experimento, mientras que las células en condición de ayuno, tal y como se ha descrito en la literatura (Kaushik *et al.*, 2011), se trataron con medio con la misma composición que el control pero sin glucosa y suplementado con oleato 300 μ M. La expresión de CPT1C, así como de sensores energéticos y de marcadores de estrés reticular fueron analizados a las 2, 6 y 24 horas de tratamiento.

El perfil de expresión de CPT1C se caracteriza por mostrar un aumento a tiempos cortos (hasta las 6 horas) que decae a las 24 horas. Con el fin de conocer el contexto metabólico celular, se analizaron los sensores energéticos AMPK y mTOR. Tal y como está descrito, AMPK muestra una activación temprana, la cual no es sostenida y a las 6 horas ya ha desaparecido, mientras que la inhibición de mTOR no ocurre hasta tiempos largos de

tratamiento (24 horas). Por otro lado, los marcadores de estrés reticular pIRE y pelf2 muestran un pico de activación a las 6 horas que se mantiene más levemente a las 24 horas. Estos datos apuntan a que CPT1C presenta un perfil de expresión similar al de los marcadores de estrés de retículo en las condiciones ensayadas.

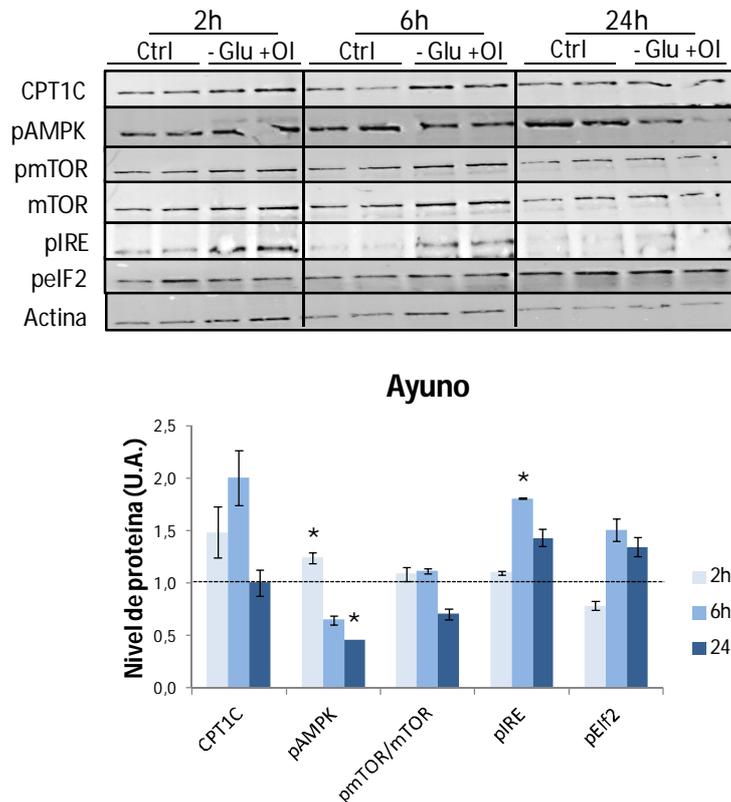


Figura 67. Marcadores metabólicos y de estrés reticular en respuesta al ayuno *in vitro*. Niveles de expresión de CPT1C, fosfo-AMPK, fosfo-mTOR, mTOR, fosfo-IRE y fosfo-Elf2 en respuesta al ayuno en células GT1-7 durante 2, 6 y 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM respecto los controles de cada tiempo. n = 2.

4.3. RESPUESTA DE CPT1C Y DE MARCADORES DE ESTRÉS RETICULAR A PALMITATO

A continuación se realizó otro experimento con el fin de analizar la respuesta de CPT1C y los marcadores de estrés reticular pIRE y pelf2, frente a una carga de palmitato en condiciones normales de glucosa. Las células control se trataron con medio completo, mientras que el resto fueron tratadas con medio completo suplementado con palmitato 300 μ M durante 30 minutos, 2, 6 y 24 horas. Las tres proteínas analizadas muestran un patrón de expresión muy parecido a lo largo del *time-course*. CPT1C y pelf2 incrementan a los 30 minutos hasta las 2 horas, disminuyendo claramente a partir de las 6 horas de tratamiento. La

activación de pIRE se sostiene a lo largo de todo el experimento, aunque a las 24 horas ha disminuido considerablemente. Teniendo en consideración que está bien establecido que el palmitato causa estrés de retículo endoplasmático en una amplia gama de tipos celulares. Estos resultados indican que CPT1C es sensible a las concentraciones intracelulares de palmitato y que responde a éste de forma parecida a los marcadores de estrés reticular analizados.

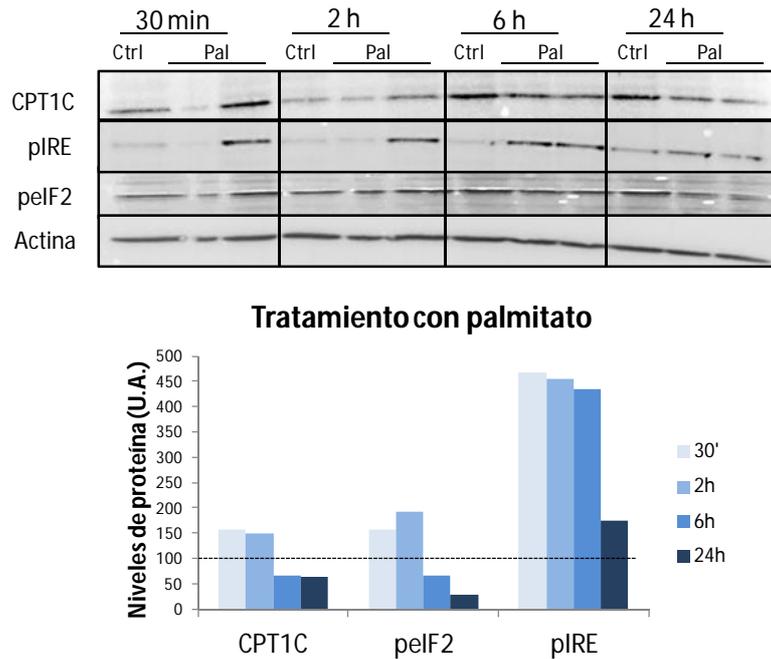


Figura 68. Expresión de CPT1C y marcadores de estrés reticular en respuesta a palmitato. Western blot de CPT1C, fosfo-eIF2 y fosfo-IRE en células GT1-7 en respuesta a palmitato 300 μ M durante 30 minutos, 2, 6 y 24 horas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM respecto los controles de cada tiempo. n = 1-2.

5. FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR LA EXPRESIÓN DE CPT1C

Los resultados obtenidos sobre la modulación de CPT1C en respuesta a distintas situaciones nutricionales, hizo preguntarnos en qué mecanismos moleculares estaba involucrada la inducción de CPT1C en las neuronas del hipotálamo. Para ello nos centramos en estudiar los principales eventos que ocurren durante el ayuno a nivel hipotalámico en relación al metabolismo lipídico. Por un lado, se ha descrito un aumento en la oxidación de ácidos grasos mediada por AMPK-CPT1A (López *et al.*, 2007 y 2008) y, por otro lado también se ha visto que hay una inducción de la autofagia y más concretamente de la lipofagia a nivel del hipotálamo mediobasal en situación de balance energético negativo del organismo, lo que

también favorecería en última instancia la oxidación de los ácidos grasos procesados por el autofagosoma (Kausik *et al.*, 2011).

Para llevar a cabo el estudio de estos eventos se generaron lentivirus para la sobre-expresión y para la inhibición de CPT1C. Las preparaciones víricas obtenidas y utilizadas en los siguientes experimentos poseían títulos de entre 1 y 5×10^8 unidades de transducción (TU)/mL.

Para analizar la capacidad infectiva de nuestros lentivirus en las células GT1-7, se transdujeron las células con concentraciones crecientes de virus y se analizaron los niveles de proteína por *western blot* a las 72 horas tras la transducción. Para la sobre-expresión de CPT1C se utilizaron lentivirus que expresan CPT1C y GFP de forma bicistrónica (CPT1C) y lentivirus que únicamente expresan GFP como controles (GFP), y se usaron dosis desde 0,2 hasta 1 MOI (TU/célula). Para la inhibición de CPT1C se utilizaron virus que expresan un RNA de interferencia aleatorio como control (R), y virus que expresan un RNA de interferencia contra CPT1C (SH), las dosis utilizadas fueron desde 30 a 50 MOI. Como se muestra en la figura 69, se consiguió con éxito tanto sobre-expresar como inhibir CPT1C mediante lentivirus. En base a este resultado, se determinó la dosis utilizada en los siguientes experimentos, siendo de 0,3 MOI para la sobre-expresión y 40 MOI para la inhibición (70-80% inhibición de CPT1C).

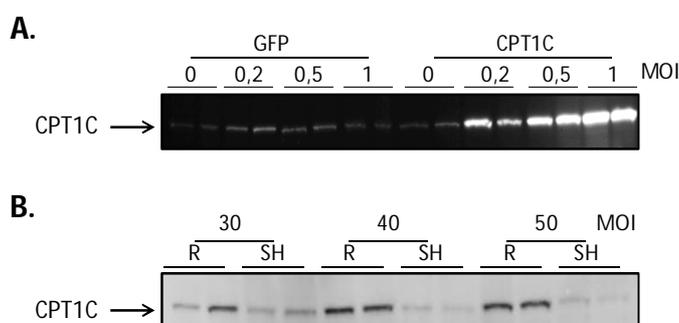


Figura 69. Sobre-expresión e inhibición de CPT1C mediante lentivirus. Niveles de expresión de CPT1C resueltos por western blot de muestras obtenidas de células GT1-7 infectadas con concentraciones crecientes de lentivirus que sobre-expresan (A) e inhiben (B) CPT1C.

5.1. EFECTO SOBRE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Estudios previos han demostrado que las células GT1-7 expresan de manera endógena aproximadamente el doble de CPT1C que de CPT1A (Taib *et al.*, 2013), como también que estas células presentan niveles de oxidación de palmitato similares a los de extractos hipotalámicos. Por otro lado, resultados presentados en este trabajo demuestran que CPT1C

responde al declive de la concentración celular de glucosa aumentando su expresión. Este dato junto con la idea de que el retículo endoplasmático participa en el mantenimiento de la homeostasis energética mediante las uniones con la mitocondria, nos propusimos evaluar el efecto de la modulación de la expresión de CPT1C sobre la oxidación de ácidos grasos en células GT1-7 privadas de glucosa durante la reacción. Para ello, se sobre-expresó y se silenció CPT1C mediante lentivirus y se realizó el ensayo de oxidación con ^{14}C -oleato durante 3 horas.

La sobre-expresión de CPT1C no causa variaciones en la oxidación de oleato respecto a las células control (GFP) (figura 70A), sin embargo el silenciamiento de CPT1C en células GT1-7 causa un ligero aumento, aunque significativo, de la oxidación del ácido graso marcado respecto a las células control (Random) (figura 70B). Este incremento podría deberse a un aumento compensatorio de la expresión de CPT1A, descrita anteriormente en un trabajo realizado por Gao y colaboradores ([Gao et al., 2009](#)), o bien a un incremento de la actividad de CPT1A, ya que nuestros resultados obtenidos *in vivo* en ratones CPT1C KO, demuestran que la ausencia de CPT1C correlaciona con mayor activación de AMPK. Los niveles de oxidación obtenidos, expresados en nmoles de oleato oxidado por mg de proteína por hora son similares a los descritos en la literatura tanto en células GT1-7 como en extractos hipotalámicos.

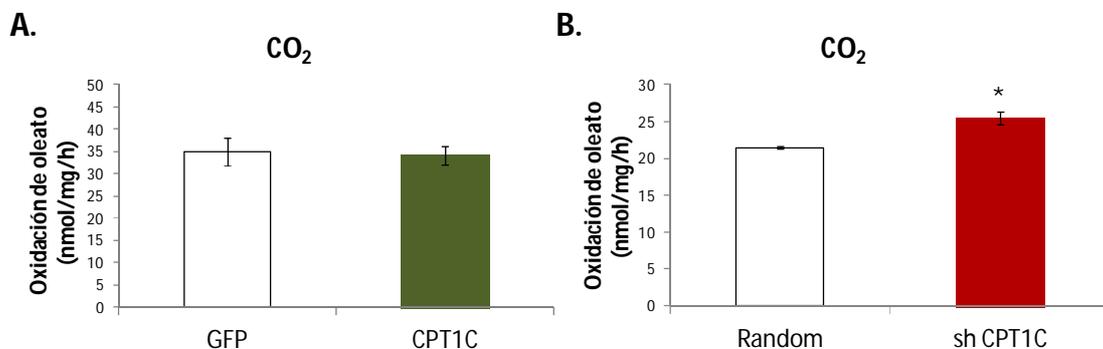


Figura 70. Efecto de la expresión de CPT1C sobre la oxidación de ácidos grasos. Niveles de ^{14}C -CO₂ derivados de la oxidación de ^{14}C -oleato en células GT1-7 infectadas con lentivirus de sobre-expresión (A) e inhibición (B) de CPT1C. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$ vs. Random. $n = 3$.

5.2. EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA

Los trabajos realizados en el laboratorio de AM. Cuervo pusieron de manifiesto el papel de la autofagia y más concretamente de la lipofagia en el MBH durante el ayuno. En estos trabajos se demostraba que la inducción de este proceso proporciona a la célula los

ácidos grasos almacenados en los cuerpos lipídicos para su oxidación y la obtención de energía, así como que la inducción de la autofagia en el MBH es necesaria para la inducción de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos o también para la activación de la lipólisis en el tejido adiposo blanco en respuesta al ayuno (Kaushik *et al.*, 2011 y 2012). Con el propósito de analizar el papel de CPT1C en la activación de la autofagia en situación de ayuno *in vitro*, se han reproducido los experimentos publicados por Cuervo y colaboradores en células GT1-7 con niveles de expresión de CPT1C aumentados y reducidos mediante transducción lentiviral. Estos experimentos consisten en cuantificar la activación de la autofagia mediante la relación LC3II/LC3I en presencia de inhibidores lisosomales. Esta estrategia permite cuantificar la formación total de autofagosomas en respuesta a un estímulo, ya que se impide su degradación por parte del lisosoma.

Como se puede ver en la figura 71, las células control están privadas de suero, mientras que la estimulación de la autofagia se realiza privando las células de suero y suplementado el medio con oleato. Las barras blancas indican los niveles de autofagosoma activo basales, los cuales no muestran diferencias dependiendo del tratamiento/estimulación ya que a la vez se van degradando. Sin embargo, la adición de los inhibidores lisosomales (barras negras), nos permiten ver el acúmulo de los autofagosomas activos formados (figura 71A). En la figura 71B se muestra la activación neta de la autofagia, obtenida por la diferencia entre las barras negras y las blancas. Los resultados obtenidos muestran que en las células control (- suero), la sobre-expresión de CPT1C aumenta la autofagia. Sin embargo, en las células tratadas para inducir la autofagia (- suero + oleato), la sobre-expresión de CPT1C no causa variaciones en la activación de la autofagia respecto las células GFP, mientras que la inhibición de CPT1C, incrementa la activación de la autofagia.

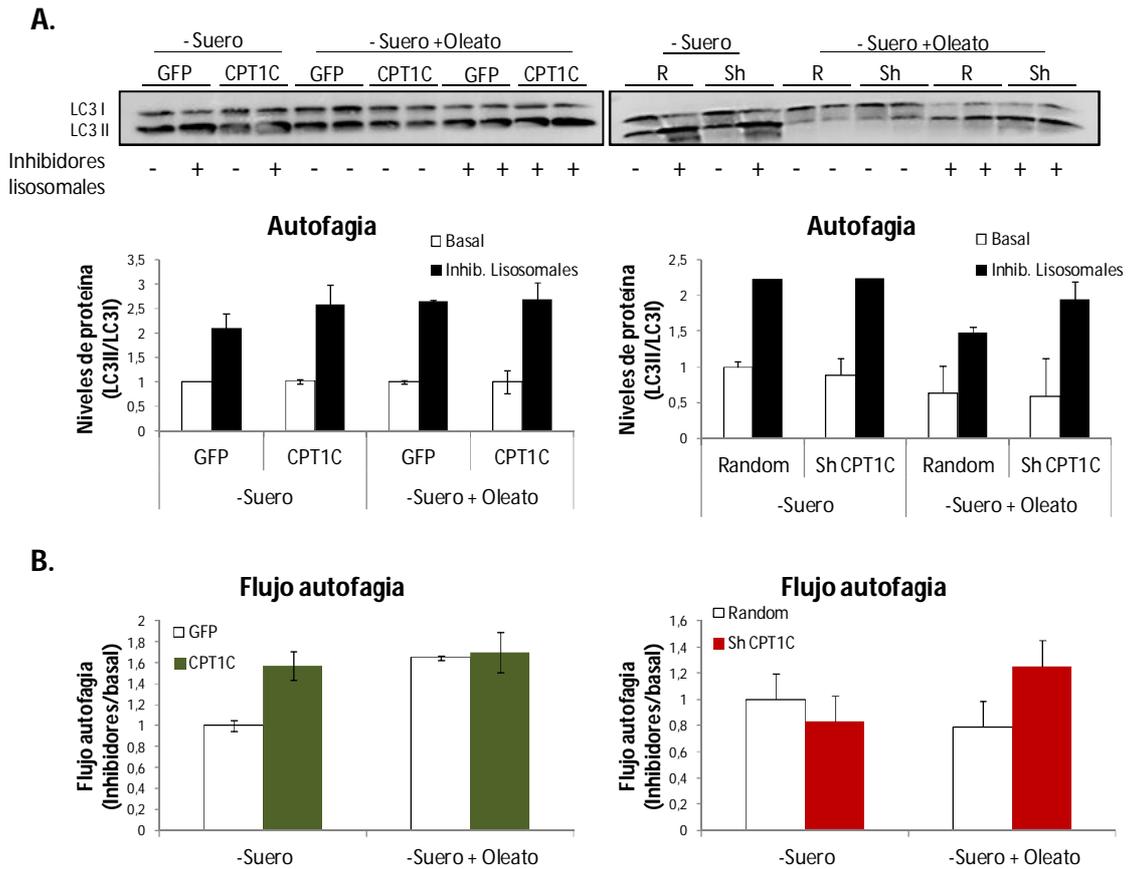


Figura 71. Efecto de la expresión de CPT1C sobre los flujos de autofagia. **A)** Activación de la autofagia indicado por la relación LC3II/LC3I en células GT1-7 que sobre-expresan o silencian la expresión de CPT1C, privadas de suero o suplementadas con oleato y en presencia o ausencia de inhibidores lisosomales. **B)** Flujos de autofagia calculados mediante la diferencia de la activación de la autofagia en presencia de inhibidores lisosomales respecto las células en ausencia de éstos. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. $n = 2$.

5.3. EFECTO SOBRE LA FORMACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

La formación de cuerpos lipídicos (CL) en células hipotalámicas en cultivo se induce mediante la incubación con ácidos grasos. Ha sido demostrado que la presencia de CL en situación basal (medio completo) en células cultivadas es ínfima, y que la privación de suero reduce casi por completo el contenido intracelular de CL. Sin embargo, la incubación de ácidos grasos en medio sin suero conlleva una formación mayor de CL que las células que contienen suero. Con lo cual, el análisis de la formación de cuerpos lipídicos se ha realizado tratando las células GT1-7 en medio sin suero suplementado con oleato.

Células GT1-7 fueron transducidas con lentivirus de inhibición de CPT1C (Sh CPT1C) o con virus control (Random). 72 horas tras la transducción, las células fueron tratadas en medio sin suero suplementado con 300 μ M oleato durante 6 horas, posteriormente fueron fijadas e

incubadas con el marcador fluorescente de lípidos neutros BODIPY, el cual permite visualizar el contenido intracelular de CL. Las células transducidas con los virus control muestran la formación de cuerpos lipídicos tras el tratamiento. Sin embargo, las células transducidas con los virus Sh CPT1C carecen completamente de CL. A pesar de la relevancia de este resultado, queda sin resolver si esta carencia en el contenido de CL se debe a una mayor degradación de éstos mediante lipofagia o bien a una disrupción en su formación.

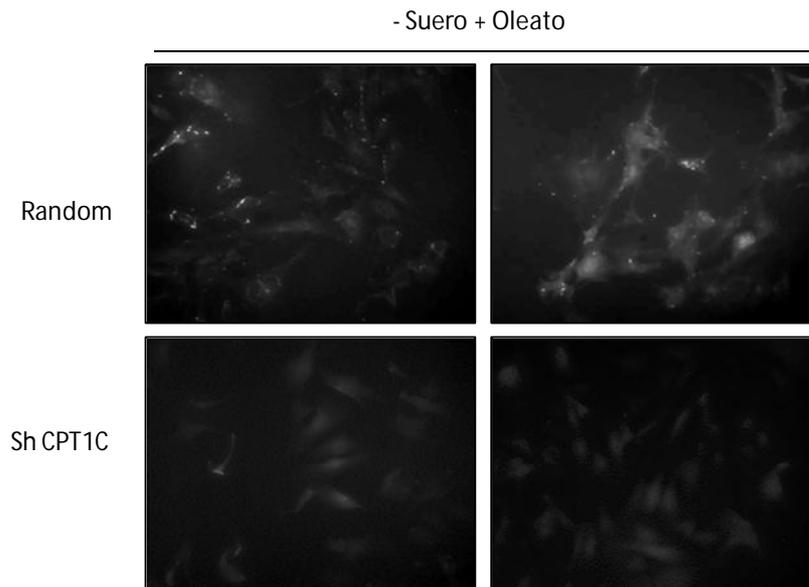


Figura 72. Efecto de la expresión de CPT1C sobre la formación de cuerpos lipídicos. Tinción de cuerpos lipídicos (CL) con el marcador fluorescente BODIPY en células GT1-7 tratadas con medio de inducción de CL (medio sin suero suplementado con 300 μ M oleato) durante 6 horas y transducidas con virus control y Sh CPT1C. Se muestran dos campos distintos de cada tratamiento de transducción. n = 2.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

1. CPT1C es necesaria para el cambio metabólico durante el ayuno
2. CPT1C es necesaria para entrar en situación de torpor
3. Papel de CPT1C en el envejecimiento
4. CPT1C participa en el metabolismo lipídico hipotalámico
5. Conclusiones y futuras investigaciones

En los últimos años la obesidad ha ido adquiriendo proporciones epidémicas a nivel mundial. En algunos países ya es un problema de salud pública debido a las cifras alarmantes tanto de incidencia como de prevalencia que se han alcanzado. La obesidad y el sobrepeso, o en definitiva, un acúmulo excesivo de grasa corporal es un trastorno asociado a múltiples comorbilidades tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes insulino resistente, algunos tipos de cáncer, enfermedades respiratorias, etcétera. Resulta curioso y a la vez preocupante que tras la enorme dedicación de la comunidad científica en la investigación de esta enfermedad aún no exista una terapia efectiva. Con lo cual, entender los procesos fisiológicos y moleculares implicados en el control de la ingesta y el gasto energético es de gran importancia para lograr no sólo un tratamiento, sino una prevención eficaz de la obesidad y de los trastornos asociados.

Desde este punto de vista, las investigaciones sobre la regulación central del metabolismo periférico y del balance energético han ganado relevancia en los últimos años, confirmando al hipotálamo un papel central en dicha regulación. Concretamente, se ha atribuido una gran relevancia al metabolismo lipídico hipotalámico en los procesos de regulación de la homeostasis del organismo. El presente trabajo se centra en el estudio a nivel hipotalámico de la isoforma de cerebro de una familia de proteínas clave en el metabolismo lipídico, y su papel en la regulación de la homeostasis energética. Esta proteína es la carnitina palmitoiltransferasa 1C (CPT1C).

CPT1C es una proteína que se expresa en el retículo endoplasmático de todas las neuronas (Dai *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2008), a diferencia de sus homólogas CPT1A y B que se encuentran en la membrana mitocondrial externa. Por lo que su función a nivel molecular no está relacionada con la obtención de energía mediante la oxidación de ácidos grasos, sino que probablemente juega un papel relacionado con funciones específicas del retículo endoplasmático. El hecho de que CPT1C únicamente se encuentre en las neuronas de los organismos más evolucionados, en mamíferos, hace pensar que CPT1C pudiera ser una versión “más inteligente” de proteínas conservadas surgida en el curso de la evolución animal, ya que hay estudios que hablan sobre posibles mecanismos por los que las proteínas neuronales adquieren nuevos atributos que son cruciales en la evolución de la complejidad del sistema nervioso y su función. Las neuronas de los organismos con un comportamiento más complejo y flexible deben controlar con precisión la localización y la actividad de las proteínas para afrontar las funciones cerebrales superiores tales como el aprendizaje y la memoria. En este sentido, el trabajo publicado por Gratacós-Batlle y colaboradores apenas hace unas semanas, efectivamente revela la participación de CPT1C en el tráfico intracelular de los receptores del

neurotransmisor glutamato (GluA1). La modulación del tráfico de membrana de estos receptores es fundamental para la correcta actividad sináptica y plasticidad neuronal, por lo que describen a CPT1C como un candidato putativo de la regulación de la fisiología neuronal de los GluA1 ([Gratacós-Batlle et al., 2015](#)). Por lo tanto, a pesar de que este estudio aporta datos muy interesantes sobre el papel de CPT1C en la plasticidad sináptica, no se ha conseguido dilucidar su actividad, permaneciendo desconocida hasta este momento.

A nivel fisiológico, se ha encontrado que CPT1C participa desde el control de la homeostasis energética ([Wolfgang et al., 2006 y 2008](#)) hasta en la resistencia de células cancerosas a la supervivencia celular ([Zaugg et al., 2011](#)). Su papel en la función motora ([Carrasco, Jacas et al., 2013](#)) o en procesos cognitivos como el aprendizaje o la memoria ([Carrasco, Sahun et al., 2012](#)) han sido descritos muy recientemente, a pesar de que CPT1C fue descubierta hace más de una década ([Price et al., 2002](#)). Desde entonces aún permanece sin conocerse su actividad enzimática, sin embargo estudios genómicos y estructurales han aportado evidencias acerca de su regulación, apuntando hacia una activación de CPT1C en respuesta a situaciones de estrés ([Lohse et al., 2011](#); [Samanta et al., 2013](#)).

Las peculiaridades de esta isoforma de CPT1 específica de neuronas y su intrigante función desconocida hacen su estudio altamente atractivo. Nuestras investigaciones se han basado en la hipótesis que CPT1C a nivel hipotalámico es un sensor del estado energético y metabólico de las células neuronales, respondiendo a los niveles de lípidos intracelulares y efectuando una respuesta adaptativa necesaria para el mantenimiento del balance energético del organismo. Para la resolución de ésta hipótesis se han llevado a cabo dos aproximaciones distintas. Primeramente se ha usado un modelo animal deficiente de CPT1C para el estudio del fenotipo de estos animales frente a situaciones de estrés metabólico como son el ayuno, el torpor y el envejecimiento. En segundo lugar se han generado lentivirus de sobre-expresión y silenciamiento de CPT1C como herramienta de trabajo para el estudio a nivel molecular del papel de CPT1C en el metabolismo lipídico celular de neuronas hipotalámicas en cultivo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que CPT1C en el hipotálamo es necesaria para la modulación de enzimas a nivel hepático y muscular responsables de efectuar el cambio metabólico que tiene lugar durante el ayuno. En esta dirección, los resultados obtenidos también indican que CPT1C es necesaria para posibilitar el uso de las grasas almacenadas como combustible energético en situación de privación de nutrientes. Además, este trabajo también muestra como en el torpor, otra situación fisiológica donde las grasas son la principal fuente energética, CPT1C es necesaria para una correcta

adaptación de la temperatura corporal a esta situación. En el estudio realizado a largo plazo por primera vez en ratones deficientes de CPT1C, demostramos que el defecto de la adaptación metabólica observada en estos animales desencadena obesidad asociada a la edad independientemente de la ingesta. Por otra parte, se ha demostrado mediante los estudios realizados *in vitro*, que tanto una disminución en la concentración intracelular de glucosa, como un incremento en la concentración de lípidos inducen la expresión de CPT1C en células hipotalámicas en cultivo, mientras que el silenciamiento de CPT1C está relacionado con una acusada reducción del contenido de cuerpos lipídicos intracelulares.

1. CPT1C ES NECESARIA PARA EL CAMBIO METABÓLICO DURANTE EL AYUNO

Estudios previos con ratones deficientes de CPT1C mostraron una mayor susceptibilidad de estos animales a padecer obesidad inducida por la dieta (Wolfgang *et al.*, 2006; Gao *et al.* 2009). Según los datos mostrados, esta susceptibilidad estaría causada por una disminución en los niveles de oxidación de grasas tanto a nivel hepático como muscular. Se ha descrito que dietas ricas en grasa causan lipotoxicidad en distintos tejidos, causando resistencia a la insulina a nivel periférico y central, así como resistencia a la adecuada señalización central de otras hormonas y nutrientes (Clegg *et al.*, 2011). Por estos motivos, decidimos analizar el papel de CPT1C en la regulación del balance energético en situaciones fisiológicas como el ayuno. En este sentido, el mismo grupo demostró defectos en la oxidación de las grasas de ratones CPT1C KO ayunados (Wolfgang *et al.*, 2006 y 2008), sin embargo, no resolvieron los mecanismos implicados en este defecto. Con el fin de aproximarnos a la función de CPT1C a nivel fisiológico, decidimos profundizar en el estudio del fenotipo de ratones CPT1C KO, centrándonos en el metabolismo energético hepático y muscular, así como en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético de las neuronas del hipotálamo medioabasal. Además, las variaciones en el peso corporal de los animales y de los tejidos adiposos también fueron analizadas.

La regulación del metabolismo energético en el hígado y en el músculo es crucial para el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo y la adaptación del mismo a la disponibilidad de alimentos. AMPK es un sensor energético intracelular que juega un papel central en la adaptación del metabolismo en la mayoría de los tejidos. Así, en situación de ayuno, hay un aumento de los niveles de fosforilación y de actividad de AMPK. La activación de AMPK en el hígado induce, directamente mediante la fosforilación de proteínas o bien, indirectamente mediante la regulación de la expresión génica, el cambio metabólico para

favorecer la oxidación de los lípidos como sustrato energético en lugar de la glucosa. Los resultados obtenidos demuestran claramente cómo los ratones deficientes de CPT1C son incapaces de activar AMPK a nivel hepático durante el ayuno. AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos y favorece su oxidación mediante la fosforilación e inactivación de ACC. En concordancia con los datos obtenidos sobre AMPK, los ratones CPT1C KO también muestran un defecto en la inactivación de ACC durante el ayuno. El mantenimiento de ACC en estado activo, se traduce en mayores niveles de malonil-CoA hepáticos, lo cual resulta en la inhibición de CPT1A y por consiguiente de la oxidación de ácidos grasos. CPT1A además es regulada transcripcionalmente a la alza durante el ayuno en respuesta al incremento de la relación glucagón/insulina (Park y Mynatt *et al.* 1995), hecho que no se observa en los hígados de los ratones CPT1C KO. Por lo tanto, estos resultados indican que el déficit de CPT1C interrumpe la activación de la vía de oxidación de ácidos grasos AMPK-ACC-CPT1A a nivel hepático en respuesta al ayuno. Por otro lado, AMPK sinérgicamente con los ácidos grasos, limita la oxidación de glucosa mediante la activación a nivel transcripcional de PDK4 (Houten *et al.*, 2009). Una vez más, el defecto en la activación de AMPK observada en los ratones deficientes de CPT1C, se traduce en este caso en un defecto en el aumento de los niveles de PDK4 hepáticos en respuesta al ayuno. La inducción de PDK4 en el hígado es crucial durante el ayuno para el mantenimiento de la glicemia, ya que al fosforilar e inhibir a PDH, impide la conversión de piruvato a acetil-CoA, ahorrando de este modo uno de los principales sustratos gluconeogénicos. PDK4 (enzima mitocondrial) también está regulado positivamente por los niveles de acetil-CoA, en gran parte derivados de la β -oxidación. El hecho de que los ratones CPT1C KO presenten una reducción en la β -oxidación podría contribuir a su vez a una reducción en los niveles intracelulares de acetil-CoA y de PDK4. Estos datos, junto con una tendencia de una menor inhibición de PDH en los ratones CPT1C KO, indican un mayor flujo de piruvato hacia acetil-CoA y su entrada en el ciclo de Krebs para ser oxidado. Finalmente, mediante el análisis de los niveles de triglicéridos y de glucógeno hepáticos se demuestra que el déficit de CPT1C conlleva la interrupción del cambio metabólico en el hígado, basado en la incapacidad de activar la oxidación de las grasas mientras que se mantiene un consumo sostenido de carbohidratos durante el ayuno.

El músculo, junto con el hígado, también desempeña un papel muy importante en la regulación del balance energético y de la homeostasis de la glucosa. Debido a su masa, el músculo esquelético es el principal tejido responsable del aclarado de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, a pesar de los altos niveles de captación de glucosa que ocurren en el músculo, la concentración de glucosa libre intramiocelular no cambia, indicando que ésta es

rápidamente metabolizada y que el transporte de glucosa es el paso limitante de la tasa de su utilización.

Como se ha comentado anteriormente, la activación de AMPK durante el ayuno es clave para la adaptación del metabolismo en respuesta a un balance energético negativo. AMPK en el músculo, favorece la oxidación de las grasas aumentando los niveles del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 (Luiken *et al.*, 2003). Sin embargo, no modula la actividad ACC. La isoforma ACC β del músculo esquelético (a diferencia de la ACC α hepática) tiene propiedades cinéticas similares a los de ACC α . Sin embargo, a diferencia del enzima hepático no muestra cambios en su actividad medida por fosforilación en respuesta a alteraciones en el estado nutricional (Chien *et al.*, 2000) a pesar de haber cambios en los niveles de malonil-CoA de acuerdo con la disponibilidad energética. Esto posiblemente sea debido a una regulación alostérica de la actividad ACC por la concentración de AGCL y citrato (Saha y Ruderman, 2003). Por lo tanto, medimos directamente los niveles de CPT1B, ya que de igual forma que CPT1A, está regulada no sólo por malonil-CoA sino que su expresión también está modulada por la concentración de ácidos grasos. En base al análisis de AMPK-CPT1B en músculo esquelético, como vía de activación de la oxidación de ácidos grasos, los ratones CPT1C KO muestran una activación mayor de esta vía en situación basal respecto los ratones WT, la cual se mantiene invariable durante el ayuno. Respecto a la vía de supresión de la glucólisis PDK4-PDH, los ratones deficientes de CPT1C a pesar de no mostrar una reducción significativa en la inducción de PDK4, PDH está claramente activa en situación de ayuno en comparación con los ratones WT. Estos datos juntamente con el análisis del glucógeno muscular, donde no se observan diferencias entre genotipos, indican que habría una mayor captación y oxidación de glucosa procedente de la circulación sanguínea. Si así fuere, cabría esperar una reducción en la glucemia, sin embargo, estudios previos muestran valores de glucemia similares entre ratones salvajes y CPT1C KO ayunados durante 24 horas, por lo cual se analizaron los niveles de gluconeogénesis hepática de estos ratones. Efectivamente los ratones deficientes de CPT1C presentan una mayor inducción de la gluconeogénesis. Sin embargo, esta mayor producción de glucosa hepática no se ve reflejada en un aumento de la glucemia probablemente por una mayor captación de glucosa muscular. Valorando todos estos resultados de forma global, parece factible que los músculos de los ratones CPT1C KO captan y metabolizan en mayor medida la glucosa circulante durante el ayuno, lo que podría resultar en un incremento de los niveles de malonil-CoA intracelulares e inhibir en última instancia a CPT1B. Esta alteración en la metabolización de los nutrientes debería ser confirmada mediante la determinación de la concentración de malonil-CoA como de triglicéridos en los músculos de

los ratones CPT1C KO. Sin embargo, esta hipótesis correlacionaría con la menor actividad CPT1B y menor oxidación de ácidos grasos observada en el músculo sóleo de ratones CPT1C KO durante la alimentación rica en grasa (Gao *et al.*, 2009).

Los datos presentados hasta el momento demuestran una evidente desregulación del metabolismo de nutrientes a nivel hepático y muscular en ratones deficientes de CPT1C durante un ayuno de 24 horas, marcada principalmente por la desregulación de los enzimas responsables del cambio metabólico AMPK y PDK4. Ambos enzimas están regulados por la relación insulina/glucagón, los niveles plasmáticos de glucosa, AGL y glucocorticoides. Según los estudios realizados por Wolfgang y colaboradores, los niveles de AGL y TAG, así como la glucosa en sangre se mantienen en la misma medida en los ratones deficientes de CPT1C que los controles, por lo que cabe la posibilidad que la disrupción de la activación de AMPK y PDK4 sea debido a una señalización hormonal incorrecta por parte del glucagón o los glucocorticoides.

El hipotálamo es el encargado de orquestar las distintas respuestas homeostáticas en función del estado energético del organismo (Kang, Routh *et al.*, 2004; Uyama, Geerts *et al.*, 2004). El hecho de que el ayuno incremente la expresión de CPT1C en el MBH es indicativo, junto con los datos previamente publicados acerca de la respuesta de CPT1C a grelina y leptina (Ramírez *et al.*, 2013; Gao, Zhu *et al.*, 2011), que CPT1C responde a situaciones de déficit energético. Tanto el ayuno como la grelina activan a AMPK y SIRT1 en el hipotálamo, de tal modo que SIRT1 actúa corriente arriba de AMPK (Velásquez *et al.*, 2011). Ésta a su vez sería capaz de inducir la expresión de CPT1C mediante la activación de p53 (Lohse *et al.*, 2011), en paralelo a la inducción de CPT1A (López *et al.*, 2008), la cual promueve la oxidación de ácidos grasos y la expresión de UCP2 para tamponar la formación de los radicales libres mitocondriales formados (Andrews *et al.*, 2008). En este trabajo se demuestra que la ausencia de CPT1C en el MBH causa una alteración en el metabolismo energético neuronal, de tal forma que provoca una disrupción de la vía establecida SIRT1-AMPK-CPT1A-UCP2. La ausencia de CPT1C provoca un defecto en la inducción de la expresión de UCP2 que resulta en un mayor daño oxidativo en el MBH de ratones CPT1C KO, este dato concuerda con los datos presentados previamente por Lee y Wolfgang en 2012 donde mediante un estudio metabolómico revelaron que los ratones deficientes de CPT1C manifiestan mayor estrés oxidativo indicado por el incremento observado en la relación GSSG/GSH. Los resultados presentados por Zaugg y colaboradores también están en concordancia con el papel de CPT1C en la regulación del estrés oxidativo celular, en este caso en el contexto de células cancerosas.

Las neuronas son especialmente sensibles al estrés oxidativo, por lo tanto la homeostasis del estado redox intracelular es crucial para el adecuado mantenimiento de sus funciones. El estado redox es precisamente la relación entre el estado reducido de NAD(P)H y de tioles (SH) y sus parejas oxidadas NAD(P) y tioles (SS). El principal tiol celular es el glutati6n (GSH o GSSG). El glutati6n actúa como un importante tamp6n redox y la relaci6n GSH/GSSG se utiliza como un 6ndice del estado redox celular (la relaci6n GSH/GSSG en el citosol es 50/1, en la mitocondria 10:1 y en el RE es 1-3:1) (Hwang *et al.*, 1992). Teniendo todo esto en consideraci6n, a continuaci6n se proponen algunos mecanismos por los cuales la ausencia de CPT1C, que es una prote6na reticular, podr6a causar un desajuste en la regulaci6n de una prote6na mitocondrial (UCP2), as6 como un incremento de ROS intracelulares. Habitualmente la producci6n de ROS se asocia a la actividad de las enzimas de transporte electr6nico mitocondrial y, a pesar de que hay una gran cantidad de estudios que relacionan el estr6s oxidativo a la inducci6n del estr6s de RE, el mecanismo fisiopatol6gico a6n no ha sido aclarado por completo. Por otro lado, se han propuesto dos mecanismos por los cuales el RE ser6a el inductor de la generaci6n de ROS. En primer lugar, durante la formaci6n de enlaces disulfuro durante el plegamiento de las prote6nas en el RE se generar6an ROS como un subproducto de la transferencia de electrones de los grupos tiol al ox6geno molecular. Alternativamente, durante una situaci6n patol6gica de mal plegamiento de las prote6nas, donde se dan lugar ciclos repetitivos de formaci6n y rotura de enlaces disulfuro, se generar6an ROS debido al agotamiento de GSH (Santos *et al.*, 2009; Tu y Weissman, 2002). En segundo lugar, se ha argumentado que el ac6mulo de prote6nas mal plegadas provoca la liberaci6n de Ca^{2+} del RE al citosol, el cual ser6a captado por la mitocondria. La captaci6n de calcio por la mitocondria activa el sistema de transporte de electrones y la fosforilaci6n oxidativa produciendo ATP (el cual contribuir6a a las necesidades energ6ticas del plegamiento de prote6nas del RE), sin embargo un ac6mulo de Ca^{2+} sostenido causa alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, el agotamiento de ATP y la formaci6n de ROS. De este modo, el estr6s oxidativo se iniciara en el lumen del RE en consecuencia del mal plegamiento de prote6nas y el agotamiento de los niveles de GSH, resultando en una amplificaci6n de la producci6n de ROS por parte de las mitocondrias (Chen *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2011).

El an6lisis del metabolismo energ6tico del MBH en nuestro modelo animal, no s6lo desvel6 un mayor estr6s oxidativo en los ratones CPT1C KO durante el ayuno, sin6 que tambi6n observamos un incremento en los niveles de BiP, lo que apuntar6a hacia el modelo por el que la ausencia de CPT1C causa un incremento en el estr6s de RE. En concordancia con estos datos, el mayor estr6s oxidativo observado en los ratones deficientes de CPT1C producir6a

alteraciones en las relaciones NADH/NAD^+ y ATP/ADP que explicarían el defecto de la activación de AMPK y SIRT1 hipotalámicos de los ratones CPT1C KO durante el ayuno.

Otro sensor del ambiente metabólico celular es mTOR, éste es reprimido en situación de ayuno en el hipotálamo, de manera que permite la activación de la autofagia. Varios estudios han evidenciado la importancia de este proceso durante situaciones de carencia de nutrientes (Pattingre *et al.*, 2008; Alirezai *et al.*, 2010). Además, las neuronas son especialmente sensibles a los efectos nocivos de las proteínas y los orgánulos defectuosos, siendo el acúmulo de éstos una de las características principales de varias enfermedades neurodegenerativas. La escasez de autofagosomas y otras vacuolas autofágicas (VA) intermediarias en neuronas sanas ha planteado la posibilidad de que la autofagia en condición basal es baja (Nixon *et al.*, 2005), aunque también cabe la posibilidad que el aclaramiento de los autofagosomas sea altamente eficaz en las neuronas (Boland y Kumar, 2008). La forma lipidada de LC3 (LC3II) se asocia específicamente con los autofagosomas y esta proteína es, actualmente, el marcador de la autofagia más ampliamente utilizado en células de mamífero. Sin embargo, existe un equilibrio entre la formación y el aclaramiento del autofagosoma por los lisosomas (Chu, 2006) denominado flujo autofágico, que sólo mediante la valoración de este flujo podremos determinar el estado del proceso de la autofagia en un determinado momento. Debido a la complejidad de la determinación de los flujos de autofagia *in vivo*, medimos simplemente los niveles de LC3II como marcador de vacuolas autofágicas. Los resultados obtenidos muestran niveles inferiores de LC3II en el hipotálamo de ratones deficientes de CPT1C durante el ayuno en comparación con los WT. No obstante, debido a la dificultad de interpretación de este dato aislado, el papel de CPT1C sobre la autofagia será discutido más adelante, en el apartado número 4.

Como se puede apreciar en la revisión bibliográfica presentada en la introducción, la mayoría de estudios se han centrado en la regulación central de la ingesta, mientras que disponemos de pocos datos respecto a la regulación central del gasto energético, aspecto de la homeostasis energética en el cual nos hemos centrado en este trabajo. En resumen, los datos obtenidos, juntamente con otros previamente publicados, manifiestan un papel de CPT1C claramente implicado en la partición de nutrientes en el hígado y en el músculo en situación de ayuno, basado en la regulación de los principales enzimas responsables de la inducción del cambio metabólico. Asimismo, la ausencia de CPT1C produce estrés oxidativo a nivel hipotalámico, lo que se traduce en una desregulación de los principales sensores energéticos a nivel central, que en conjunto causan el defecto observado en el metabolismo periférico. Además, el análisis de los tejidos adiposos sugieren que la señalización de CPT1C (inducida

durante un balance energético negativo) principalmente está dirigida a promover la movilización de las grasas del tejido adiposo blanco, como indica la menor reducción de éste en los ratones CPT1C KO tras el ayuno, lo que correlacionaría con la tendencia de estos animales a perder menos peso. Asimismo, la deficiencia en la oxidación de las grasas en el hígado y el músculo de los ratones deficientes de CPT1C podría explicar la hipertrofia del tejido adiposo marrón observada en estos ratones. Por otro lado, a pesar del papel de CPT1C sobre la modulación de los neuropéptidos orexigénicos en respuesta a la señalización de grelina descrito en trabajos previos, los datos obtenidos en este trabajo sobre el análisis de la ingesta durante la realimentación, en los que no se observan diferencias entre genotipos, sugiere una compensación de las vías de regulación de los neuropéptidos y de la ingesta después de 24 horas de ayuno.

Por último, cabe comentar que la falta en la resolución del mecanismo efector por el cual la señalización de CPT1C se transmite a los tejidos periféricos, permite especular sobre el posible papel del sistema nervioso autónomo por un lado, o bien del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) por el otro. En este sentido, no se han observado diferencias en los niveles de hormona del crecimiento en sangre, lo que podría sugerir una correcta señalización hormonal entre el hipotálamo y la hipófisis de los ratones deficientes de CPT1C. Sin embargo, una disminución en los niveles plasmáticos de glucagón durante el ayuno correlacionaría perfectamente con el metabolismo periférico observado en estos animales. Del mismo modo también sería plausible que los ratones CPT1C KO presentaran hiperghrelinemia causada por la resistencia central a la señalización de ésta, ya que concordaría con los efectos a nivel periférico de esta hormona, tanto sobre la inhibición de AMPK como sobre la inducción a la adiposidad. Como se comenta en el siguiente apartado, la activación del sistema nervioso simpático no parece alterada en los ratones deficientes de CPT1C.

En la figura 73 se representa de forma esquemática el modelo propuesto sobre los efectos de la ausencia de CPT1C en el metabolismo energético y oxidativo hipotalámico, así como los efectos sobre el metabolismo energético de los tejidos periféricos.

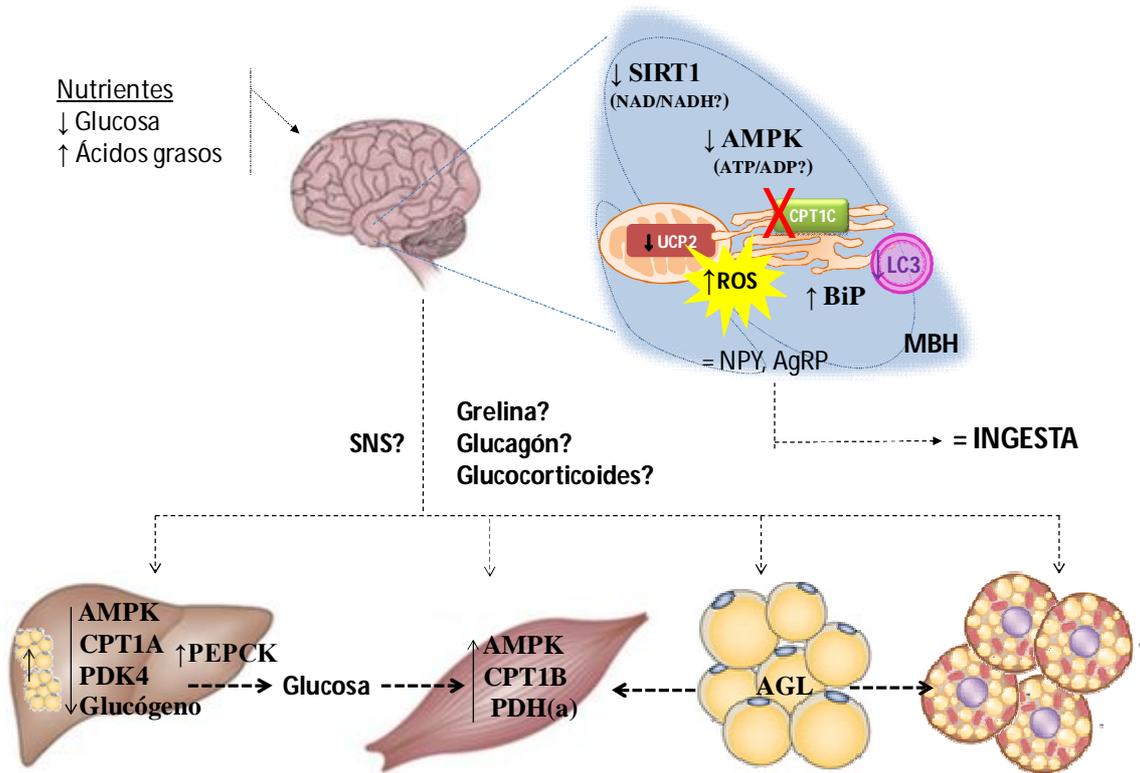


Figura 73. Modelo propuesto sobre los efectos de la deficiencia de CPT1C sobre el metabolismo hipotalámico y la regulación central del metabolismo periférico durante el ayuno. Los niveles de CPT1C en el MBH responden a la disponibilidad de nutrientes, ya que CPT1C incrementa su expresión durante una situación de ayuno. CPT1C es necesaria para el mantenimiento del estado redox intracelular, ya que su ausencia activa la expresión de BiP, indicando una mayor respuesta de estrés reticular que resulta en una disfunción del metabolismo mitocondrial, marcado por una reducción en los niveles de UCP2 y un incremento de ROS. El estado metabólico derivado de la ausencia de CPT1C causa una desregulación en la activación de AMPK y SIRT1 durante el ayuno, así como una reducción en los niveles del marcador de la autofagia LC3. La activación de CPT1C en el MBH favorece la movilización de grasas del tejido adiposo y la oxidación de las mismas en el hígado y el músculo, mientras que su ausencia impide la lipólisis del TAB y favorece la oxidación de la glucosa frente a las grasas a nivel periférico (a nivel hepático disminuye pAMPK, CPT1A, PDK4 y las reservas de glucógeno, mientras que aumenta el depósito de TAG. A nivel muscular, tanto pAMPK como CPT1B están aumentadas, sin embargo la mayor actividad PDH favorece la oxidación de glucosa intramiocelular contribuyendo al mantenimiento de la glucemia a pesar de la mayor gluconeogénesis hepática). La deficiencia de la oxidación de lípidos conlleva a la acumulación ectópica de éstos en el hígado y el tejido adiposo marrón. Los efectores de la transmisión de la señalización de CPT1C desde el hipotálamo a los tejidos periféricos permanecen desconocidos. Ni los neuropéptidos orexigénicos ni la ingesta se encuentran alterados por la deficiencia de CPT1C.

2. CPT1C ES NECESARIA PARA ENTRAR EN SITUACIÓN DE TORPOR

Una vez demostrado el papel de CPT1C en la partición de nutrientes en el hígado y el músculo durante el ayuno. Se quiso corroborar este efecto en otra situación fisiológica en la cual las grasas son la principal fuente de energía, como es el torpor. El torpor permite a los animales hibernantes adaptar su metabolismo al déficit de alimentos y a temperaturas

ambientales bajas. La adaptación metabólica que se ha descrito en estas condiciones extremas, caracterizada por una disminución de la tasa metabólica y la temperatura corporal, también se ha descrito en los ciclos circadianos diarios de ayuno/alimentación durante la vigilia/sueño (Bass i Takahashi, 2010; Bailey *et al.*, 2014). En esta dirección, recientemente se ha publicado un estudio en el que animales con alteraciones en la homeostasis del sueño presentan un incremento de CPT1C en el hipotálamo (Shimizu *et al.*, 2013). Por otro lado, SIRT1 está directamente relacionado con el sistema regulador de los ciclos circadianos tanto a nivel central como periférico (Nakahata *et al.*, 2009). En nuestro modelo de estudio, hemos demostrado que la ausencia de CPT1C comporta una desregulación de SIRT1 durante el ayuno, por lo que hemos considerado oportuno el estudio del papel de CPT1C durante la situación de torpor.

Existe una importante conexión entre el ritmo fisiológico, el control de la temperatura y el gasto energético. De hecho, la necesidad de una adecuada integración a diversos estímulos sensoriales se hace evidente cuando los estímulos presentes están en conflicto. La exposición al frío requiere la inducción de mecanismos generadores de calor, sin embargo, un estado de ayuno requiere la inducción de mecanismos para ahorrar energía. Por lo tanto, un animal en ayunas en un ambiente frío debe integrar las entradas sensoriales conflictivas y efectuar una respuesta termorreguladora apropiada. De hecho, la termogénesis inducida por el frío se bloquea potentemente durante el ayuno, que a su vez desencadena una disminución en el gasto de energía y la temperatura corporal (Madden, 2012). La importancia de esta respuesta adaptativa es crucial, ya que la prevención/impedimento de la hipotermia durante la hipoglicemia resulta en tasas de mortalidad aumentadas (Buchanan *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en animales deficientes de CPT1C muestran una menor reducción en la temperatura corporal frente a una situación inducida de torpor y al mismo tiempo una mayor hipoglucemia. Estos datos indican una clara incapacidad de estos animales a la adaptación a la situación ambiental, por lo que se deduce que CPT1C está involucrada de algún modo en la detección y la efectucción de la respuesta adaptativa a la misma. En este sentido y en concordancia con el papel de CPT1C durante un balance energético negativo, cabría esperar que la señalización a nivel central de CPT1C esté dirigida a reprimir los mecanismos de disipación de energía y por lo tanto la actividad del tejido adiposo marrón (TAM), el cual se activa en situación de abundancia de alimentos. Por lo tanto, en ausencia de CPT1C la inhibición del TAM no se efectuaría de forma adecuada. Por otro lado, según los estudios publicados por Gao y colaboradores, CPT1C es regulada a la baja en la señalización central de la leptina. Este hecho también estaría en concordancia con la idea de que CPT1C

promueve la inhibición de la actividad del TAM, ya que la leptina es claramente un activador de éste (Doring *et al.*, 1998; Harlan *et al.*, 2011). Del mismo modo, la leptina regula a la baja la actividad AMPK en el hipotálamo. Los resultados obtenidos sobre la fosforilación de AMPK en el hipotálamo de ratones CPT1C KO, muestran como ésta disminuye durante el ayuno. Probablemente esta disminución contribuya a la posible mayor activación del TAM observada en los ratones CPT1C KO durante el torpor. Varios estudios han corroborado el papel de AMPK en el MBH como un regulador negativo de la activación del TAM (López *et al.*, 2010; Martínez de Morentín *et al.*, 2012).

Los diversos estudios realizados sobre la termorregulación a nivel central en respuesta al frío y a la disponibilidad de nutrientes reflejan la existencia de un complejo sistema compuesto por distintas áreas y núcleos cerebrales (figura 74), entre ellos el MBH (Kelly y Bielajew, 1991; Hugie *et al.*, 1992). A pesar de ello hay un amplio consenso respecto a la implicación del sistema nervioso simpático y los receptores β 3-adrenérgicos en la transmisión de la señal desde el SNC hasta el TAM (Bartness *et al.*, 2010; Silva, 2006) que en última instancia activa la expresión y la actividad UCP1 (Cannon y Nedergaard, 2004). UCP1 permite la generación de calor en el TAM a expensas de la oxidación de las grasas de este tejido. A pesar de los escasos datos de los que disponemos, el análisis conjunto de los resultados obtenidos acerca de la temperatura corporal y de la glicemia, indicarían que la ausencia de CPT1C impide la adecuada inhibición del TAB, permitiendo un mayor consumo de grasas por este tejido, en detrimento de su uso para la obtención de energía, lo que repercutiría en un mayor consumo de glucosa por el resto de tejidos periféricos que conllevaría a la hipoglicemia observada en los ratones CPT1C KO durante la situación de torpor. A pesar, de la congruencia de los datos aportados en este trabajo respecto el papel de CPT1C en una situación de torpor, se debería profundizar en el análisis de los distintos mecanismos implicados en dicha adaptación metabólica con el fin de corroborar el modelo propuesto (figura 74).

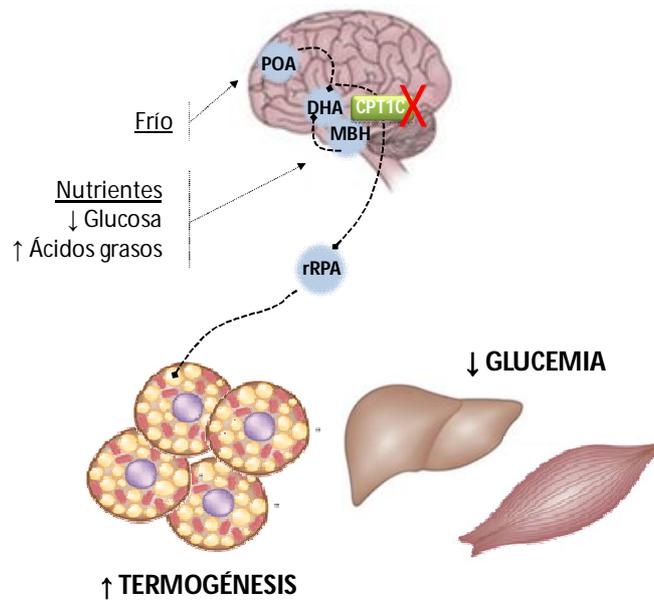


Figura 74. Modelo propuesto sobre los efectos de la deficiencia de CPT1C sobre la termogénesis y el metabolismo periférico durante el torpor. La ausencia de CPT1C da lugar a una inadecuada activación del tejido adiposo marrón durante la exposición al ayuno a temperaturas bajas, lo cual impide la correcta reducción de la termogénesis, resultando en una mayor hipoglucemia en comparación con animales control, probablemente debido al mayor consumo de glucosa en el hígado y el músculo, ya que la ausencia de CPT1C en el hipotálamo reduce la oxidación de las grasas en estos tejidos durante el ayuno. **POA:** área preóptica, **DHA:** Hipotálamo dorsoanterior, **MBH:** hipotálamo mediobasal, **rRPA:** núcleo del rafe *pallidus*.

3. PAPEL DE CPT1C EN EL ENVEJECIMIENTO

Por primera vez, en este trabajo, se presentan datos acerca del fenotipo de ratones deficientes de CPT1C a largo plazo. Se han recogido datos sobre el peso, la ingesta y la homeostasis de la glucosa desde los 3 meses hasta el año de edad de los animales. A punto final, a los 16 meses se ensayó la memoria de los animales y se analizaron algunos marcadores de envejecimiento a nivel hipotalámico.

La obesidad es un factor de riesgo en enfermedades metabólicas relacionadas con la edad como la diabetes tipo 2, el cáncer y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, no se conocen los mecanismos que explican los cambios dependientes de la edad en la regulación central del metabolismo que dan lugar a la obesidad. La glucosa en sangre elevada se asocia a la diabetes, mientras que la restricción dietética, asociada a mayor longevidad, reduce la glucosa en sangre. Por ello se planteó la hipótesis de que los efectos tóxicos acumulativos de la glucosa están involucrados de algún modo en el proceso de envejecimiento. Los mecanismos que median los efectos tóxicos acumulativos de la glucosa son sugeridos por dos principios generales de los procesos metabólicos. En primer lugar, los metabolitos inducen la maquinaria

propia de su metabolismo (Roche *et al.*, 1997; Pilkis y Granner, 1992) y en segundo lugar, la inducción de la expresión génica por la exposición a los metabolitos puede implicar una forma de memoria molecular llamada histéresis (Mobbs *et al.*, 1993). Cuando este concepto se aplica a la expresión de genes regulados por glucosa, implica la adopción de un mecanismo por el cual la exposición repetitiva a las exposiciones de glucosa postprandiales conduce a un aumento en la capacidad glucolítica asociado a la edad (acompañado consecuentemente de una reducción en la β -oxidación de los ácidos grasos), que a su vez conduce a un aumento en la generación de estrés oxidativo. Según este mecanismo, la restricción dietética aumenta la longevidad y reduce las patologías asociadas a la edad (Mobbs *et al.*, 2007).

Los ratones deficientes de CPT1C presentan un incremento en el peso corporal asociado a la edad independientemente de un aumento en la ingesta de alimentos. Destacando de este modo una vez más el papel de CPT1C en la regulación del gasto energético. Del mismo modo, estos resultados sugieren que la deficiencia de los ratones KO en la movilización y la oxidación de las grasas resulta en un efecto acumulativo a largo plazo. Los tejidos de estos animales no fueron pesados, sin embargo en las imágenes de los abdómenes se puede apreciar claramente un aumento de los tejidos adiposos de los ratones deficientes de CPT1C, tanto del tejido adiposo epididimal (visceral) como inguinal (subcutáneo). Como se comentaba anteriormente, *a priori*, parece que una estrategia dirigida a reducir los niveles plasmáticos de glucosa se relacionaría con un menor riesgo de padecer diabetes, sin embargo, dietas con bajo índice glucémico o ricas en alimentos grasos, además de causar mayor daño oxidativo debido a un aporte excesivo de grasas, éstas serán acumuladas de manera ectópica provocando resistencia a la insulina. En este punto cabe destacar que el incremento de peso observado en los ratones CPT1C ocurre bajo alimentación con dieta estándar de laboratorio, por lo que no han estado expuestos a una alimentación excesivamente grasa. Sin embargo, los datos obtenidos hasta los 12 meses de edad de los ratones, sobre la homeostasis de la glucosa, indican que a pesar de tener una mayor ganancia de peso, los ratones CPT1C KO son capaces de mantener la glucemia en la misma medida que los ratones control. Así lo indica la prueba de tolerancia a la glucosa realizada a los siete meses de edad y la prueba de tolerancia a la insulina a los 12 meses, si bien cabe destacar que en la segunda prueba ya aparece una tendencia a mayor resistencia a la insulina. Los valores superiores en la glicemia de los ratones CPT1C KO durante un ayuno realizado a los 6 meses de edad en comparación con los ratones WT, probablemente es debido al incremento de la gluconeogénesis anteriormente descrito.

El envejecimiento por sí mismo es responsable de la alteración de los mecanismos homeostáticos regulados a nivel central, varios procesos han sido identificados como

responsables de este deterioro. Entre ellos se encuentran principalmente el mantenimiento de la función mitocondrial, el daño oxidativo y la inflamación, la mayoría de ellos agravados en presencia de obesidad (Zhang *et al.*, 2008). Por ello, se procedió al análisis de los niveles de SIRT1, mTOR, BiP y NF- κ B en ratones de 16 meses de edad con el fin de averiguar si la ausencia de CPT1C está relacionada con una alteración de estos marcadores. Solamente se encontraron diferencias en fosfo-mTOR, el cual se encuentra aumentado en los ratones CPT1C KO a los 16 meses de edad respecto los animales control, lo que correlaciona perfectamente con la obesidad asociada a la edad que presentan estos ratones. En ningún otro caso se encontraron diferencias entre los ratones deficientes de CPT1C y los correspondientes controles, si bien es cierto que por lo general estos marcadores suelen verse alterados en su mayoría en edades más tardías (Li *et al.*, 2011). Por lo tanto, a nivel hipotalámico y en la edad estudiada, podríamos decir que la ausencia de CPT1C no está relacionada con signos de envejecimiento precoz. Del mismo modo, a pesar de que los resultados obtenidos en la prueba de memoria presentan mucha variabilidad intragrupal, tampoco se observan diferencias en el índice de discriminación observado en los ratones CPT1C KO respecto los WT, ni en el grupo de jóvenes ni en el de viejos, indicando que una posible alteración en los procesos cognitivos de estos animales no es dependiente de la edad.

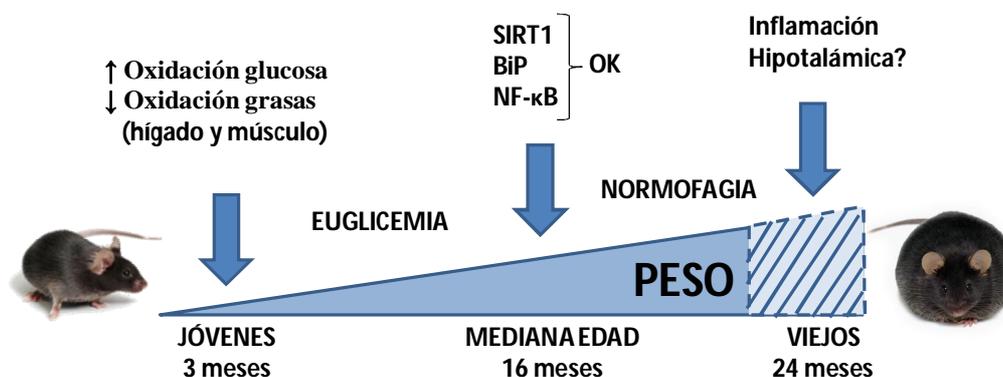


Figura 75. La ausencia de CPT1C causa obesidad asociada a la edad. La menor oxidación de grasas en el hígado y en el músculo de ratones, así como la menor movilización de las mismas en el TBE conlleva a un incremento de peso acumulativo en los ratones CPT1C KO. A pesar de que a los 16 meses de edad, los ratones CPT1C KO son más pesados que los controles, no presentan alteraciones en los marcadores de envejecimiento SIRT1, BiP y NF- κ B. Hasta los 12 meses de edad manifiestan una adecuada homeostasis de la glucosa, así como de ingesta de alimentos en relación a los ratones control.

4. CPT1C PARTICIPA EN EL METABOLISMO LIPÍDICO HIPOTALÁMICO

Varios grupos de investigación han intentado determinar la actividad CPT de CPT1C y ninguno de ellos lo ha logrado con éxito (Preece *et al.*, 2002; Wolfgang *et al.*, 2006 y 2008; Sierra *et al.*, 2008). Sin embargo, el hecho de que esta proteína conserve los residuos de unión tanto al sustrato palmitoil-CoA como al inhibidor malonil-CoA y además presente una afinidad similar para el malonil-CoA que el resto de isoformas, convierte a CPT1C en una proteína susceptible de sensar el estado energético celular dado tanto por las variaciones de glucosa como de ácidos grasos. De modo que mediante el primer experimento dirigido a resolver esta cuestión efectivamente demostramos por primera vez en células hipotalámicas en cultivo que CPT1C responde a la disponibilidad de nutrientes regulando a la alza su expresión tanto frente a una disminución en la concentración de glucosa como a una carga de lípidos intracelular.

Una vez validado el modelo celular y en base a la respuesta de CPT1C en ambos tratamientos, diseñamos un segundo experimento con el fin de caracterizar con más detalle la modulación de CPT1C juntamente con la expresión de marcadores de la respuesta UPR. Como se comenta en la introducción, el papel del RE como un orgánulo involucrado en sensar el estado energético y nutricional de la célula, está emergiendo recientemente de forma muy interesante (Hotamisligil y Erbay, 2008). Cada vez disponemos de más evidencias que ratifican la existencia de dos tipos distintos de respuesta UPR, por un lado y de manera más novedosa habría una respuesta temprana con carácter adaptativo dirigida a la supervivencia celular, y por el otro habría la respuesta clásica más tardía, la cual ha sido extensamente estudiada, frente a un estímulo estresante sostenido dirigida a inducir la muerte celular (Bravo *et al.*, 2012; Vannuvel *et al.*, 2013). Tanto la privación de glucosa como el tratamiento con palmitato, son dos condiciones que pueden provocar las dos respuestas UPR descritas en función de la duración del tratamiento. Tal y como se esperaba, en ambas situaciones se observa una inducción de los marcadores de UPR pIRE y pelf2 a tiempos cortos que decae con el tiempo. Del mismo modo y muy gratamente, observamos un patrón de expresión de CPT1C muy similar, indicando la posible participación de ésta en la respuesta UPR frente a los estímulos nutricionales ensayados. A pesar de la relevancia de los resultados obtenidos, son necesarios más estudios con el fin de confirmar y precisar el papel de CPT1C en este proceso.

Uno de los procesos clave en la respuesta UPR adaptativa, necesario para culminarla con éxito y lograr la supervivencia celular, es la comunicación entre el RE y la mitocondria. Esta comunicación se da mediante las membranas asociadas a las mitocondrias o MAMs, de manera que la reorganización espacial y el acoplamiento de estos orgánulos correlaciona con

un aumento en los niveles de ATP, de consumo de oxígeno y de poder reductor que mejoran la bioenergética celular (Bravo *et al.*, 2011). En base a este mecanismo nos preguntamos si CPT1C, a diferencia del resto de isoformas que regulan la oxidación de ácidos grasos mediante la internalización de los ácidos grasos a la mitocondria, podría regular la β -oxidación mediante la facilitación de las uniones RE-mitocondria. Esta hipótesis estaría fomentada por datos no publicados obtenidos en nuestro grupo de investigación, los cuales demuestran la localización de CPT1C en las MAM. Además los estudios publicados por Zaugg y colaboradores muestran claramente cómo la modulación de CPT1C regula la oxidación de ácidos grasos en células tumorales. Sin embargo, el ensayo de oxidación de ácidos grasos llevado a cabo en células hipotalámicas en las que se ha sobre-expresado o silenciado CPT1C, no muestra una clara participación de ésta en la β -oxidación ya que no se han observado diferencias en las células sobre-expresadas respecto las control. Mientras que el silenciamiento de CPT1C comporta un ligero incremento en la oxidación de oleato, el cual probablemente es debido a la inducción de CPT1A. Este mecanismo compensatorio ha sido descrito con anterioridad (Gao *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados del estudio de la oxidación de ácidos grasos no van en la misma dirección que la hipótesis planteada. Aunque cabría reflexionar sobre la adecuación de las condiciones y el diseño experimental, ya que la hipótesis se basa en la inducción de la UPR adaptativa en respuesta a un estímulo estresante previo. Sin embargo, el ensayo de oxidación fue llevado a cabo en condiciones “estándar” sin realizar ningún pre-tratamiento que representase un estímulo estresante para las células.

Otro de los procesos claves en la adaptación metabólica a un estado de déficit energético celular es la autofagia. Todavía hay controversia acerca del origen y la biogénesis del autofagosoma, si bien uno de los modelos propuestos es precisamente su formación en las MAM (Hamasaki *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo*, muestran una disminución de la activación de LC3 en el MBH de los ratones CPT1C KO respecto los ratones WT. Esto podría significar o bien una menor activación de la autofagia o bien una mayor degradación lisosomal del autofagosoma. Si consideramos que ha sido descrito que en las neuronas sanas los autofagosomas normalmente son eliminados de manera eficiente, evitando así una acumulación de vacuolas autofágicas intermediarias incluso cuando la autofagia está fuertemente inducida (Mizushima *et al.*, 2004; Nixon *et al.*, 2005), una disminución en los niveles de LC3II en los hipotálamos de los ratones CPT1C KO indicaría una menor activación de la autofagia, asumiendo que el sistema lisosomal funciona correctamente. El modelo celular *in vitro* y la disponibilidad de los lentivirus de sobre-expresión e inhibición de CPT1C nos ha permitido evaluar los flujos de autofagia en presencia o ausencia de CPT1C. Por

un lado, no se han observado variaciones en el flujo de autofagia en células GT1-7 que sobreexpresan CPT1C, mientras que el silenciamiento de ésta causa un leve aumento en la activación de LC3 respecto las células control, lo que indicaría una mayor formación de autofagosomas. Este dato resulta contradictorio con el obtenido *in vivo*, aunque debido a las limitaciones en la interpretación de los datos *in vivo* y de los modelos celulares *in vitro*, resulta complicada la comparación de los datos entre los dos sistemas. Por lo tanto, necesariamente se requieren más aproximaciones por tal de dilucidar el papel de CPT1C en la activación de la autofagia y si hay algún tipo de relación entre la mayor activación de LC3 y el incremento de la oxidación de oleato observado en células GT1-7 que tienen silenciada la expresión de CPT1C.

En relación a la biogénesis de los cuerpos lipídicos (CL), se conoce bien que tiene lugar en el RE, sin embargo el proceso de formación aún está sin resolver. Este implica la formación de un orgánulo recubierto de una monocapa lipídica a partir de una membrana bicapa, aunque también se han descrito procesos de fusión en la formación de cuerpos lipídicos de mayor tamaño (Wilfling *et al.*, 2014). A lo largo del RE, en los lugares de formación de los cuerpos lipídicos, múltiples reacciones enzimáticas y numerosos intermediarios lipídicos bioactivos son sintetizados. Por ejemplo, al menos once acil-CoA sintetetasas (ACS) en mamíferos pueden activar los principales ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y potenciar la síntesis de lípidos neutros (Watkins *et al.*, 2007). Por otro lado, en humanos por lo menos doce genes de tres familias aciltransferasa producen enzimas involucrados en la formación de cuerpos lipídicos (Sturley y Hussain, 2012), lo cual refleja la gran especificidad de los enzimas involucrados. Cuando los CL se expanden, el contenido de fosfolípidos también aumenta, punto que es crítico durante las etapas iniciales del crecimiento de los CL. En los mamíferos, la fosfatidilcolina es el principal fosfolípido (50-60%) que compone los CL, seguido por la fosfatidiletanolamina (20-30%), el fosfatidilinositol, y las especies con grupos colina y etanolamina (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2007). El análisis de la formación de cuerpos lipídicos realizado en este trabajo mediante la tinción con BODIPY® en células hipotalámicas en cultivo, revelan que el silenciamiento de CPT1C mediante lentivirus provoca una disminución en el contenido de CL tras la inducción de éstos con oleato. Este resultado correlaciona perfectamente con el trabajo publicado recientemente por Rinaldi y colaboradores, en el que describen como una forma mutada de CPT1C, presente en una familia que padece una paraplejía espástica autosómica dominante, está relacionada con un menor número de CL y de menor tamaño (Rinaldi *et al.*, 2015). Estos datos juntamente con las evidencias mostradas en otros trabajos acerca del papel de CPT1C en el metabolismo de los esfingolípidos (Carrasco *et*

al., 2012 y 2013), sugieren que CPT1C participa de algún modo en el proceso de biogénesis de CL en el RE de las neuronas.

A pesar de no obtener resultados claramente definitorios acerca del papel de CPT1C en el metabolismo lipídico, a partir de los datos aportados por este trabajo y por otros, a continuación (figura 76) se ilustra un modelo que propone la posible participación de CPT1C en distintos procesos celulares involucrados en el metabolismo lipídico en respuesta a la disponibilidad de nutrientes.

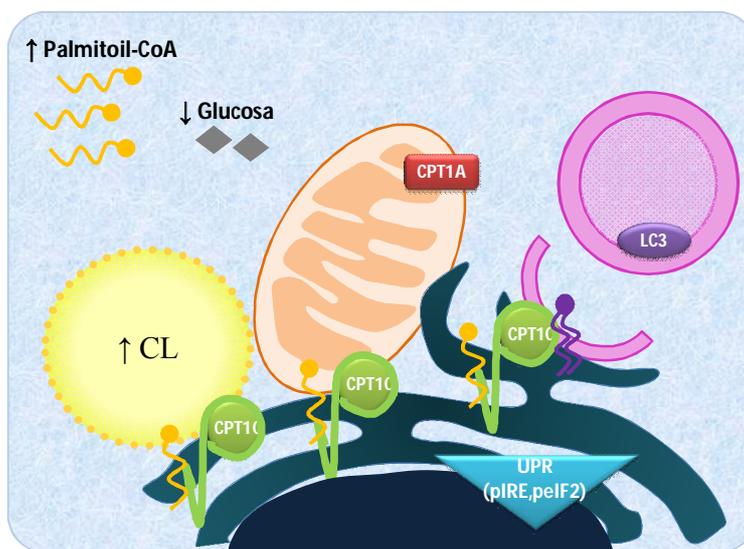


Figura 76. Modelo propuesto del papel de CPT1C en el metabolismo lipídico hipotalámico. CPT1C responde a la disponibilidad de nutrientes, aumentando su expresión en respuesta a un declive en la concentración de glucosa, así como a un incremento en la concentración de lípidos intracelulares, mostrando un patrón de inducción similar al presentado por los marcadores de la respuesta UPR pIRE y peIF2. Debido a la localización de CPT1C en las MAM (membranas asociadas a mitocondria) es susceptible de interactuar con las mitocondrias o de participar en la activación de la autofagia en determinadas situaciones de estrés metabólico. La ausencia de CPT1C provoca una disminución en el contenido de CL (cuerpos lipídicos) en neuronas hipotalámicas en cultivo.

5. CONCLUSIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES

En este trabajo se presenta una visión global del fenotipo de ratones deficientes de CPT1C y de la respuesta de CPT1C en función del metabolismo energético celular. Si analizamos de manera global todos los resultados obtenidos podemos concluir que CPT1C a nivel hipotalámico responde al balance energético negativo del organismo efectuando una respuesta homeostática sobre el metabolismo energético de los órganos periféricos. Por lo

tanto, CPT1C emerge como una posible diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y de trastornos relacionados con un desequilibrio en el balance energético.

Más concretamente, la acción de CPT1C repercute directamente en la correcta homeostasis de los lípidos del organismo a nivel global. Este hecho es altamente atractivo para seguir investigando los mecanismos involucrados en la regulación central del metabolismo de las grasas, ya que éste es mucho menos conocido en comparación con los mecanismos implicados en la homeostasis de la glucosa.

A pesar del trabajo realizado y los interesantes resultados obtenidos, se requieren nuevas aproximaciones para completar y profundizar en algunos aspectos que han quedado sin resolver: 1) los mecanismos efectores a nivel central desencadenados por CPT1C responsables de transmitir la señal a los tejidos periféricos, así como los niveles en sangre de grelina y glucagón durante el ayuno, 2) analizar el papel de CPT1C en la activación del tejido adiposo marrón, 3) comprobar si la ausencia de CPT1C causa acumulación ectópica de grasas a largo plazo y 4) dilucidar el papel de CPT1C en la respuesta UPR y la formación de cuerpos lipídicos.

De acuerdo con lo expuesto, a partir de las aportaciones de este trabajo, se pueden iniciar nuevas líneas de investigación destinadas a profundizar en el papel de CPT1C a nivel fisiológico sobre la regulación central de la termogénesis o del ritmo circadiano. Sin embargo, el desarrollo de aproximaciones a nivel molecular destinadas a dilucidar la función biológica de CPT1C se presenta de manera imperante para comprender el papel de esta proteína no sólo en la regulación de la homeostasis energética, sino también en funciones cognitivas y motoras o en el cáncer.

CAPÍTULO 6.
CONCLUSIONES

METABOLISMO PERIFÉRICO DE RATONES DEFICIENTES DE CPT1C

1. Los animales deficientes de CPT1C son incapaces de inducir la activación de la vía AMPK-CPT1A de oxidación de las grasas en el hígado durante el ayuno.
2. Los animales deficientes de CPT1C presentan una fuerte reducción en la expresión hepática de PDK4, quinasa responsable de inducir el cambio metabólico hacia la utilización de los lípidos como sustrato energético frente los carbohidratos, durante el ayuno.
3. El defecto en la inducción del cambio metabólico hepático resulta en una depleción de las reservas de glucógeno y un acúmulo de triglicéridos en el hígado de los ratones CPT1C KO durante el ayuno.
4. La ausencia de CPT1C provoca un aumento de la gluconeogénesis hepática durante el ayuno. Sin embargo, los ratones CPT1C KO presentan niveles de glicemia similares a los animales salvajes.
5. Los animales deficientes de CPT1C presentan una desregulación del metabolismo energético muscular. Por un lado manifiestan un incremento en la activación de AMPK y en la expresión de CPT1B respecto los animales WT durante la alimentación, que se mantiene invariable durante el ayuno. Por otro lado presentan un fuerte aumento de la actividad PDH durante el ayuno, lo cual induce la oxidación de sustratos glucídicos.
6. La ausencia de CPT1C resulta en una menor reducción del tejido adiposo blanco epididimal durante el ayuno y en un incremento de la masa del tejido adiposo marrón interescapular.
7. Durante el ayuno aumenta la expresión de CPT1C en el hipotálamo mediobasal (MBH).
8. Los ratones deficientes de CPT1C no presentan alteraciones en la expresión de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY en el MBH, ni en la ingesta de alimentos tras un ayuno de 24 horas.
9. La ausencia de CPT1C causa una disfunción en la actividad desacoplante mitocondrial y un mayor daño oxidativo en el hipotálamo mediobasal durante el ayuno.
10. La ausencia de CPT1C está relacionada con un aumento de la chaperona BiP, una disminución del marcador del autofagosoma LC3 lipidado (LC3II) y una desregulación de la activación de los sensores energéticos AMPK y SIRT1 en el MBH durante el ayuno.
11. Los animales deficientes de CPT1C mantienen la temperatura corporal y muestran una hipoglucemia mayor que los animales control durante una situación de torpor.

12. La ausencia de CPT1C conlleva a obesidad asociada a la edad sin presentar alteraciones en la ingesta.

EFFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CPT1C SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO DE NEURONAS HIPOTALÁMICAS

13. La expresión de CPT1C aumenta en respuesta a la depleción de glucosa en el medio y en respuesta al tratamiento con palmitato en neuronas hipotalámicas en cultivo (GT1-7).

14. El silenciamiento de CPT1C en la línea celular GT1-7 produce un leve incremento en la oxidación de ácidos grasos y en la activación de la autofagia.

15. El silenciamiento de CPT1C en la línea celular GT1-7 reduce la cantidad de cuerpos lipídicos intracelulares.

CAPÍTULO 7.
BIBLIOGRAFÍA

(1983). "Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat." *Nutr Rev* 41(4): 124-7.

A

Alirezaei, M., C. C. Kemball, et al. (2010). "Short-term fasting induces profound neuronal autophagy." *Autophagy* 6(6): 702-10.

Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." *Proc Soc Exp Biol Med* 77(2): 323-4.

Andrews, Z. B. and T. L. Horvath (2009). "Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(4): E621-7.

Andrews, Z. B., Z. W. Liu, et al. (2008). "UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals." *Nature* 454(7206): 846-51.

Antunes, M. and G. Biala (2012). "The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications." *Cogn Process* 13(2): 93-110.

Appenzeller-Herzog, C. and M. N. Hall (2012). "Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling." *Trends Cell Biol* 22(5): 274-82.

Asher, G., D. Gatfield, et al. (2008). "SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation." *Cell* 134(2): 317-28.

B

Bailey, S. M., U. S. Udoh, et al. (2014). "Circadian regulation of metabolism." *J Endocrinol* 222(2): R75-96.

Balsalobre, A., S. A. Brown, et al. (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." *Science* 289(5488): 2344-7.

Bartness, T. J., C. H. Vaughan, et al. (2010). "Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue." *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 1: S36-42.

Bartz, R., W. H. Li, et al. (2007). "Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic." *J Lipid Res* 48(4): 837-47.

Baskin, D. G., B. J. Wilcox, et al. (1988). "Insulin and insulin-like growth factors in the CNS." *Trends Neurosci* 11(3): 107-11.

Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." *Science* 330(6009): 1349-54.

Beall, C., D. L. Hamilton, et al. (2012). "Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour." *Diabetologia* 55(9): 2432-44.

Benani, A., S. Troy, et al. (2007). "Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake." *Diabetes* 56(1): 152-60.

Bentzinger, C. F., K. Romanino, et al. (2008). "Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy." *Cell Metab* 8(5): 411-24.

Bernard, C. (1854). "Leçons de physiologie expérimentale appliqués à la médecine". Baillere et Fils, Paris.

Bingham, N. C., K. K. Anderson, et al. (2008). "Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome." *Endocrinology* 149(5): 2138-48.

Bishop, N. A. and L. Guarente (2007). "Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans." *Nat Rev Genet* 8(11): 835-44.

Bishop, N. A. and L. Guarente (2007). "Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*." *Nature* 447(7144): 545-9.

Blagosklonny, M. V. (2013). "M(o)TOR of aging: MTOR as a universal molecular hypothalamus." *Aging (Albany NY)* 5(7): 490-4.

- Blagosklonny, M. V. (2003). "Cell senescence and hypermitogenic arrest." *EMBO Rep* 4(4): 358-62.
- Blagosklonny, M. V. (2012). "Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging." *Aging (Albany NY)* 4(3): 159-65.
- Blagosklonny, M. V. (2012). "Prospective treatment of age-related diseases by slowing down aging." *Am J Pathol* 181(4): 1142-6.
- Blouet, C., Y. H. Jo, et al. (2009). "Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit." *J Neurosci* 29(26): 8302-11.
- Blouet, C., H. Ono, et al. (2008). "Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis." *Cell Metab* 8(6): 459-67.
- Blouet, C. and G. J. Schwartz (2010). "Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis." *Behav Brain Res* 209(1): 1- 12.
- Boland, B., A. Kumar, et al. (2008). "Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 28(27): 6926-37.
- Brachmann, C. B., J. M. Sherman, et al. (1995). "The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability." *Genes Dev* 9(23): 2888-902.
- Bravo, R., T. Gutierrez, et al. (2012). "Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics." *Int J Biochem Cell Biol* 44(1): 16-20.
- Bravo, R., J. M. Vicencio, et al. (2011). "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress." *J Cell Sci* 124(Pt 13): 2143-52.
- Bray, G. A. (1996). "Static theories in a dynamic world: a glucodynamic theory of food intake." *Obes Res* 4(5): 489-92.
- Bray, G. A. (1997). "Amino acids, protein, and body weight." *Obes Res* 5(4): 373-6.
- Bray, M. S., W. F. Ratcliffe, et al. (2013). "Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice." *Int J Obes (Lond)* 37(6): 843-52.
- Broadwell, R. D. and M. W. Brightman (1976). "Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood." *J Comp Neurol* 166(3): 257-83.
- Brooks, N. L., C. M. Trent, et al. (2007). "Low utilization of circulating glucose after food withdrawal in Snell dwarf mice." *J Biol Chem* 282(48): 35069-77.
- Brown, M. K. and N. Naidoo (2012). "The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases." *Front Physiol* 3:263.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* 414(6865): 813-20.
- Bruning, J. C., D. Gautam, et al. (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." *Science* 289(5487): 2122-5.
- Buchanan, T. A., P. Cane, et al. (1991). "Hypothermia is critical for survival during prolonged insulin-induced hypoglycemia in rats." *Metabolism* 40(3): 330-4.
- Buhr, E. D., S. H. Yoo, et al. (2010). "Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators." *Science* 330(6002): 379-85.
- Bui, M., S. Y. Gilady, et al. (2010). "Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties." *J Biol Chem* 285(41): 31590-602.

C

- Camacho, A., S. Rodriguez-Cuenca, et al. (2012). "Ablation of PGC1 beta prevents mTOR dependent endoplasmic reticulum stress response." *Exp Neurol* 237(2): 396-406.

- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* 84(1): 277- 359.
- Canto, C., Z. Gerhart-Hines, et al. (2009). "AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity." *Nature* 458(7241): 1056-60.
- Canto, C., L. Q. Jiang, et al. (2010). "Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle." *Cell Metab* 11(3): 213-9.
- Cao, R., A. Li, et al. (2010). "Mammalian target of rapamycin signaling modulates photic entrainment of the suprachiasmatic circadian clock." *J Neurosci* 30(18): 6302-14.
- Cardenas, C., R. A. Miller, et al. (2010). "Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria." *Cell* 142(2): 270-83.
- Carrasco, P., J. Jacas, et al. (2013). "Carnitine palmitoyltransferase 1C deficiency causes motor impairment and hypoactivity." *Behav Brain Res* 256: 291-7.
- Carrasco, P., I. Sahun, et al. (2012). "Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition." *J Biol Chem* 287(25): 21224-32.
- Chen, D., A. D. Steele, et al. (2005). "Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1." *Science* 310(5754): 1641.
- Chen, G., Z. Chen, et al. (2011). "Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by beta-phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity." *Antioxid Redox Signal* 15(12): 2911-21.
- Chen, Y., M. B. Azad, et al. (2009). "Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy." *Cell Death Differ* 16(7): 1040-52.
- Chien, D., D. Dean, et al. (2000). "Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(2): E259-65.
- Chu, C. T. (2006). "Autophagic stress in neuronal injury and disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(5): 423-32.
- Claret, M., M. A. Smith, et al. (2007). "AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons." *J Clin Invest* 117(8): 2325-36.
- Clegg, D. J., K. Gotoh, et al. (2011). "Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity." *Physiol Behav* 103(1): 10-6.
- Cohen, D. E., A. M. Supinski, et al. (2009). "Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction." *Genes Dev* 23(24): 2812-7.
- Cohen, H. Y., C. Miller, et al. (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." *Science* 305(5682): 390-2.
- Cole, N. B., D. D. Murphy, et al. (2002). "Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein." *J Biol Chem* 277(8): 6344-52.
- Coleman, D. L. (1973). "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice." *Diabetologia* 9(4): 294-8.
- Coleman, D. L. (1978). "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice." *Diabetologia* 14(3): 141-8.
- Coleman, D. L. and K. P. Hummel (1969). "Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice." *Am J Physiol* 217(5): 1298-304.
- Collins, S., C. M. Kuhn, et al. (1996). "Role of leptin in fat regulation." *Nature* 380(6576): 677.
- Copeland, K. C. and K. S. Nair (1994). "Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism." *J Clin Endocrinol Metab* 78(5): 1040-7.
- Cota, D., E. K. Matter, et al. (2008). "The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity." *J Neurosci* 28(28): 7202-8.

- Cota, D., K. Proulx, et al. (2006). "Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake." *Science* 312(5775): 927-30.
- Cunningham, J. T., J. T. Rodgers, et al. (2007). "mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex." *Nature* 450(7170): 736-40.
- D**
- Dai, Y., M. J. Wolfgang, et al. (2007). "Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers." *Biochem Biophys Res Commun* 359(3): 469-74.
- Dallman, M. F., S. F. Akana, et al. (1995). "The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons." *Ann N Y Acad Sci* 771: 730-42.
- Davidson, T. L., S. E. Kanoski, et al. (2007). "A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation." *Curr Opin Pharmacol* 7(6): 613-6.
- Davis, A. M., M. L. Seney, et al. (2004). "Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus." *J Neurobiol* 60(4): 424-36.
- de Brito, O. M. and L. Scorrano (2008). "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria." *Nature* 456(7222): 605-10.
- de Brito, O. M. and L. Scorrano (2008). "Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion." *Antioxid Redox Signal* 10(3): 621-33.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2005). "Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus." *Endocrinology* 146(10): 4192-9.
- Decuyper, J. P., G. Monaco, et al. (2011). "IP(3) Receptors, Mitochondria, and Ca Signaling: Implications for Aging." *J Aging Res* 2011: 920178.
- Demaugre, F., J. P. Bonnefont, et al. (1990). "Immunoquantitative analysis of human carnitine palmitoyltransferase I and II defects." *Pediatr Res* 27(5): 497-500.
- Di Nardo, A., I. Kramvis, et al. (2009). "Tuberous sclerosis complex activity is required to control neuronal stress responses in an mTOR-dependent manner." *J Neurosci* 29(18): 5926-37.
- Diano, S. and T. L. Horvath (2012). "Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism." *Trends Mol Med* 18(1): 52-8.
- Dilman, V. M. (1971). "Age-associated elevation of hypothalamic, threshold to feedback control, and its role in development, ageing, and disease." *Lancet* 1(7711): 1211-9.
- Dil'Man, V. M. (1960). "[Age-connected hypercholesterinemia as an index of increased activity of the hypothalamic centers]." *Ter Arkh* 32: 72-7.
- Dilman, V. M. and V. N. Anisimov (1979). "Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology--I. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system." *Exp Gerontol* 14(4): 161-74.
- Doring, H., K. Schwarzer, et al. (1998). "Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice." *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(2): 83-8.
- Duan, W. (2013). "Sirtuins: from metabolic regulation to brain aging." *Front Aging Neurosci* 5:36.
- Dube, M. G., B. Xu, et al. (1999). "Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats." *Brain Res* 816(1): 38-46.
- E**
- Edery, I. (2000). "Circadian rhythms in a nutshell." *Physiol Genomics* 3(2): 59-74.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, et al. (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." *J Clin Invest* 105(12): 1827-32.

Elias, M. F., A. L. Goodell, et al. (2012). "Obesity, cognitive functioning and dementia: back to the future." *J Alzheimers Dis* 30 Suppl 2: S113-25.

Esser, V., N. F. Brown, et al. (1996). "Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes." *J Biol Chem* 271(12): 6972-7.

F

Farese, R. V., Jr. and T. C. Walther (2009). "Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T." *Cell* 139(5): 855-60.

Farooqi, I. S., J. M. Keogh, et al. (2003). "Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene." *N Engl J Med* 348(12): 1085-95.

Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." *Cell* 116(2): 337-50.

Fontana, L. and S. Klein (2007). "Aging, adiposity, and calorie restriction." *Jama* 297(9): 986-94.

Fontana, L., L. Partridge, et al. (2010). "Extending healthy life span--from yeast to humans." *Science* 328(5976): 321-6.

Fontan-Lozano, A., J. L. Saez-Cassanelli, et al. (2007). "Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor." *J Neurosci* 27(38): 10185-95.

Friedman, J. M. (2000). "Obesity in the new millennium." *Nature* 404(6778): 632-4.

Friedman, M. I., R. B. Harris, et al. (1999). "Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status." *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): R1046-53.

Fujimoto, T. and R. G. Parton (2011). "Not just fat: the structure and function of the lipid droplet." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(3).

G

Gao, S., W. Keung, et al. (2011). "Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301(1): R209-17.

Gao, S., K. P. Kinzig, et al. (2007). "Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(44): 17358-63.

Gao, S., G. Zhu, et al. (2011). "Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23): 9691-6.

Gao, X. F., W. Chen, et al. (2009). "Enhanced susceptibility of Cpt1c knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake." *Diabetologia* 52(5): 912-20.

Gautron, L. and J. K. Elmquist (2011). "Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance." *J Clin Invest* 121(6): 2087-93.

Geary, N., L. Asarian, et al. (1997). "The satiating potency of hepatic portal glucagon in rats is not affected by [corrected] insulin or insulin antibodies." *Physiol Behav* 61(2): 199-208.

Geiser, F. (1988). "Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition?" *J Comp Physiol B* 158(1): 25-37.

Geiser, F. (2004). "Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor." *Annu Rev Physiol* 66: 239-74.

Giorgi, C., D. De Stefani, et al. (2009). "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum." *Int J Biochem Cell Biol* 41(10): 1817-27.

Gratacos-Batlle, E., N. Yefimenko, et al. (2015). "AMPA interacting protein CPT1C

enhances surface expression of GluA1-containing receptors." *Front Cell Neurosci* 8: 469.

Greenberg, A. S., R. A. Coleman, et al. (2011). "The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans." *J Clin Invest* 121(6): 2102-10.

Guarente, L. (2008). "Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?" *Cell* 132(2): 171-6.

H

Haigis, M. C. and D. A. Sinclair (2010). "Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance." *Annu Rev Pathol* 5: 253-95.

Hales, T. G., H. Kim, et al. (1992). "Immortalized hypothalamic GT1-7 neurons express functional gamma-aminobutyric acid type A receptors." *Mol Pharmacol* 42(2): 197-202.

Hamasaki, M., N. Furuta, et al. (2013). "Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites." *Nature* 495(7441): 389-93.

Hansen, M., A. L. Hsu, et al. (2005). "New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen." *PLoS Genet* 1(1): 119-28.

Hardie, D. G. (2004). "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream." *J Cell Sci* 117(Pt 23): 5479-87.

Harlan, S. M., D. A. Morgan, et al. (2011). "Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation." *Circ Res* 108(7): 808-12.

Harrison, D. E., R. Strong, et al. (2009). "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice." *Nature* 460(7253): 392-5.

Hartman, M. L., J. D. Veldhuis, et al. (1992). "Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two-day fast in normal men." *J Clin Endocrinol Metab* 74(4): 757-65.

Harvie, M. N., M. Pegington, et al. (2011). "The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women." *Int J Obes (Lond)* 35(5): 714-27.

Havel, P. J. (2000). "Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance." *Proc Nutr Soc* 59(3): 359-71.

Havel, P. J. and G. J. Taborsky, Jr. (1989). "The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress." *Endocr Rev* 10(3): 332-50.

Havel, P. J., R. Townsend, et al. (1999). "High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women." *Diabetes* 48(2): 334-41.

Haynes, W. G., D. A. Morgan, et al. (1997). "Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin." *J Clin Invest* 100(2): 270-8.

He, W., T. K. Lam, et al. (2006). "Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity." *Nat Neurosci* 9(2): 227-33.

Heldmaier, G., M. Klingenspor, et al. (1999). "Metabolic adjustments during daily torpor in the Djungarian hamster." *Am J Physiol* 276(5 Pt 1): E896-906.

Herrero, A. and G. Barja (2000). "Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* 32(6): 609-15.

Hervey, G. R. (1959). "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats." *J Physiol* 145(2): 336-52.

Hill, J. O., D. Lin, et al. (1992). "Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat." *Int J Obes Relat Metab Disord* 16(5): 321-33.

Horton, T. J., H. Drougas, et al. (1995). "Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage." *Am J Clin Nutr* 62(1): 19-29.

- Horvath, T. L., Z. B. Andrews, et al. (2009). "Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS." *Trends Endocrinol Metab* 20(2): 78-87.
- Hotamisligil, G. S. (2010). "Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease." *Cell* 140(6): 900-17.
- Hotamisligil, G. S. (2008). "Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes." *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S52-4.
- Hotamisligil, G. S. and E. Erbay (2008). "Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases." *Nat Rev Immunol* 8(12): 923-34.
- Houten, S. M., M. Chegary, et al. (2009). "Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids." *Cell Mol Life Sci* 66(7): 1283-94.
- Hu, Z., S. H. Cha, et al. (2003). "Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12624-9.
- Hu, Z., Y. Dai, et al. (2005). "A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake." *J Biol Chem* 280(48): 39681-3.
- Hugie, T., I. Halvorson, et al. (1992). "Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats." *Brain Res* 575(1): 57-62.
- Hwang, C., A. J. Sinskey, et al. (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science* 257(5076): 1496-502.
- Hetherington AW and Ranson SW (1942). "the relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat". *J. Comp. Neurol.* 76:475-99
- I**
- Ibrahim, N., M. A. Bosch, et al. (2003). "Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels." *Endocrinology* 144(4): 1331-40.
- Inoki, K., T. Zhu, et al. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* 115(5): 577-90.
- Ishii, N., M. Fujii, et al. (1998). "A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes." *Nature* 394(6694): 694-7.
- J**
- Jacinto, E. and M. N. Hall (2003). "Tor signalling in bugs, brain and brawn." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2): 117-26.
- Jaillard, T., M. Roger, et al. (2009). "Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism." *Diabetes* 58(7): 1544-9.
- Jin, S. and E. White (2007). "Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress." *Autophagy* 3(1): 28-31.
- Jo, Y. H., Y. Su, et al. (2009). "Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus." *J Neurophysiol* 101(5): 2305-16.
- Johnson, J. B., W. Summer, et al. (2007). "Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma." *Free Radic Biol Med* 42(5): 665-74.
- K**
- Kaeberlein, T. L., E. D. Smith, et al. (2006). "Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food." *Aging Cell* 5(6): 487-94.
- Kahn, B. B., T. Alquier, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metab* 1(1): 15-25.
- Kahn, C. R., J. C. Bruning, et al. (2000). "Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis

- of diabetes mellitus." *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 6: 1377-84.
- Kang, L., V. H. Routh, et al. (2004). "Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons." *Diabetes* 53(3): 549-59.
- Kaushik, S., E. Arias, et al. (2012). "Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis." *EMBO Rep* 13(3): 258-65.
- Kaushik, S., J. A. Rodriguez-Navarro, et al. (2011). "Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance." *Cell Metab* 14(2): 173-83.
- Kelly, L. and C. Bielajew (1991). "Ventromedial hypothalamic regulation of brown adipose tissue." *Neuroreport* 2(1): 41-4.
- Kendrick, A. A., M. Choudhury, et al. (2011). "Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation." *Biochem J* 433(3): 505-14.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140(901): 578-96.
- Kim, K. W., L. Zhao, et al. (2011). "Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(26): 10673-8.
- King, B. M. (2006). "The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight." *Physiol Behav* 87(2): 221-44.
- Kohsaka, A., A. D. Laposky, et al. (2007). "High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice." *Cell Metab* 6(5): 414-21.
- Kojima, M., H. Hosoda, et al. (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 402(6762): 656-60.
- Kong, W., S. Stanley, et al. (2003). "A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation." *Faseb J* 17(12): 1688-90.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature* 404(6778): 635-43.
- Kudo, N., A. J. Barr, et al. (1995). "High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase." *J Biol Chem* 270(29): 17513-20.
- ## L
- Lage, R., C. Dieguez, et al. (2008). "AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis." *Trends Mol Med* 14(12): 539-49.
- Lam, T. K., A. Poci, et al. (2005). "Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis." *Nat Med* 11(3): 320-7.
- Lam, T. K., G. J. Schwartz, et al. (2005). "Hypothalamic sensing of fatty acids." *Nat Neurosci* 8(5): 579-84.
- Lamb, C. A., T. Yoshimori, et al. (2013). "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(12): 759-74.
- Lamia, K. A., U. M. Sachdeva, et al. (2009). "AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation." *Science* 326(5951): 437-40.
- Lane, M. D., M. Wolfgang, et al. (2008). "Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA." *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4: S49-54.
- Le Foll, C., B. G. Irani, et al. (2009). "Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(3): R655-64.
- Lee, G. D., M. A. Wilson, et al. (2006). "Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Aging Cell* 5(6): 515-24.
- Lee, J., K. B. Seroogy, et al. (2002). "Dietary restriction enhances neurotrophin

- expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice." *J Neurochem* 80(3): 539-47.
- Leloup, C., C. Magnan, et al. (2006). "Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing." *Diabetes* 55(7): 2084-90.
- Leloup, C., C. Turrel-Cuzin, et al. (2009). "Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion." *Diabetes* 58(3): 673-81.
- Lenaz, G. (2001). "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology." *IUBMB Life* 52(3-5): 159-64.
- Li, L., Y. Chen, et al. (2013). "Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation." *Cell Signal* 25(1): 50-65.
- Li, X. and N. Kazgan. (2011). "Mammalian sirtuins and energy metabolism." *Int J Biol Sci* 7(5): 575-87.
- Li, X., A. Khanna, et al. (2011). "Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging." *Aging (Albany NY)* 3(10): 985-1002.
- Lin, S. J., P. A. Defossez, et al. (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* 289(5487): 2126-8.
- Lin, S. J., M. Kaeberlein, et al. (2002). "Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration." *Nature* 418(6895): 344-8.
- Lloyd, J. M., K. Scarbrough, et al. (1991). "Age-related changes in proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the periaruate region of ovariectomized rats." *Endocrinology* 129(4): 1896-902.
- Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, et al. (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." *Science* 288(5475): 2379-81.
- Lohse, I., P. Reilly, et al. (2011). "The CPT1C 5'UTR contains a repressing upstream open reading frame that is regulated by cellular energy availability and AMPK." *PLoS One* 6(9): e21486.
- Longo, V. D., L. M. Ellerby, et al. (1997). "Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast." *J Cell Biol* 137(7): 1581-8.
- Longo, V. D., G. S. Shadel, et al. (2012). "Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Metab* 16(1): 18-31.
- Longuet, C., E. M. Sinclair, et al. (2008). "The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting." *Cell Metab* 8(5): 359-71.
- Lopez, M., R. Lage, et al. (2008). "Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin." *Cell Metab* 7(5): 389-99.
- Lopez, M., C. J. Lelliott, et al. (2007). "Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake." *Bioessays* 29(3): 248-61.
- Lopez, M., L. Varela, et al. (2010). "Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance." *Nat Med* 16(9): 1001-8.
- Lopez, M. and A. Vidal-Puig (2008). "Brain lipogenesis and regulation of energy metabolism." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11(4): 483-90.
- Luiken, J. J., S. L. Coort, et al. (2003). "Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling." *Diabetes* 52(7): 1627-34.
- Lyons, W. E., L. A. Mamounas, et al. (1999). "Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15239-44.

M

- Madden, C. J. (2012). "Glucoprivation in the ventrolateral medulla decreases brown adipose tissue sympathetic nerve

- activity by decreasing the activity of neurons in raphe pallidus." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302(2): R224-32.
- Makimura, H., T. M. Mizuno, et al. (2001). "Cerulein mimics effects of leptin on metabolic rate, food intake, and body weight independent of the melanocortin system, but unlike leptin, cerulein fails to block neuroendocrine effects of fasting." *Diabetes* 50(4): 733-9.
- Martin, S. and R. G. Parton (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 373-8.
- Martinez de Morentin, P. B., A. J. Whittle, et al. (2012). "Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase." *Diabetes* 61(4): 807-17.
- Masoro, E. J. (2005). "Overview of caloric restriction and ageing." *Mech Ageing Dev* 126(9): 913-22.
- Mayer, J. and D. W. Thomas (1967). "Regulation of food intake and obesity." *Science* 156(3773): 328-37.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase system. From concept to molecular analysis." *Eur J Biochem* 244(1): 1-14.
- McGarry, J. D. and D. W. Foster (1980). "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." *Annu Rev Biochem* 49: 395-420.
- McGarry, J. D., K. F. Woeltje, et al. (1989). "Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyl-transferase." *Diabetes Metab Rev* 5(3): 271-84.
- Mellinkoff, S. M., M. Frankland, et al. (1956). "Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite." *J Appl Physiol* 8(5): 535-8.
- Melvin, R. G. and M. T. Andrews (2009). "Torpor induction in mammals: recent discoveries fueling new ideas." *Trends Endocrinol Metab* 20(10): 490-8.
- Milanski, M., G. Degasperi, et al. (2009). "Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity." *J Neurosci* 29(2): 359-70.
- Miller, A. A. and S. J. Spencer (2014). "Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment." *Brain Behav Immun* 42: 10-21.
- Miller, J. C., J. M. Gnaedinger, et al. (1987). "Utilization of plasma fatty acid in rat brain: distribution of [14C]palmitate between oxidative and synthetic pathways." *J Neurochem* 49(5): 1507-14.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, et al. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* 428(6982): 569-74.
- Minor, R. K., M. Lopez, et al. (2011). "The arcuate nucleus and neuropeptide Y contribute to the antitumorigenic effect of calorie restriction." *Aging Cell* 10(3): 483-92.
- Mizuno, T. M., K. A. Kelley, et al. (2003). "Transgenic neuronal expression of proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice." *Diabetes* 52(11): 2675-83.
- Mizuno, T. M., S. P. Kleopoulos, et al. (1998). "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin." *Diabetes* 47(2): 294-7.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." *Mol Biol Cell* 15(3): 1101-11.
- Mobbs, C. V. (1993). "Genetic influences on glucose neurotoxicity, aging, and diabetes: a possible role for glucose hysteresis." *Genetica* 91(1-3): 239-53.
- Mobbs, C. V. and H. Makimura (2002). "Block the FAS, lose the fat." *Nat Med* 8(4): 335-6.

- Mobbs, C. V., J. W. Mastaitis, et al. (2007). "Secrets of the lac operon. Glucose hysteresis as a mechanism in dietary restriction, aging and disease." *Interdiscip Top Gerontol* 35: 39-68.
- Mobbs, C. V., C. L. Moreno, et al. (2013). "Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus." *Trends Endocrinol Metab* 24(10): 488-94.
- Moore, C. E., O. Omikorede, et al. (2011). "PERK activation at low glucose concentration is mediated by SERCA pump inhibition and confers preemptive cytoprotection to pancreatic beta-cells." *Mol Endocrinol* 25(2): 315-26.
- Mori, H., K. Inoki, et al. (2009). "Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance." *Cell Metab* 9(4): 362-74.
- Morselli, E., M. C. Maiuri, et al. (2010). "The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy." *Autophagy* 6(1): 186-8.
- Morselli, E., M. C. Maiuri, et al. (2010). "Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy." *Cell Death Dis* 1: e10.
- Mountjoy, P. D., S. J. Bailey, et al. (2007). "Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity." *Diabetologia* 50(1): 168-77.
- Mouton, P. R., M. E. Chachich, et al. (2009). "Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged dtg APP/PS1 mice." *Neurosci Lett* 464(3): 184-7.
- Muroya, S., T. Yada, et al. (1999). "Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y." *Neurosci Lett* 264(1-3): 113-6.
- Murphy, S., S. Martin, et al. (2009). "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats." *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 441-7.
- Myhill, N., E. M. Lynes, et al. (2008). "The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2." *Mol Biol Cell* 19(7): 2777-88.
- N**
- Nakahata, Y., M. Kaluzova, et al. (2008). "The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control." *Cell* 134(2): 329-40.
- Nakahata, Y., S. Sahar, et al. (2009). "Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK- SIRT1." *Science* 324(5927): 654-7.
- Nakazato, M., N. Murakami, et al. (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." *Nature* 409(6817): 194-8.
- Nasrallah, C. M. and T. L. Horvath (2014). "Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism." *Nat Rev Endocrinol* 10(11): 650-8.
- Ngoh, G. A., K. N. Papanicolaou, et al. (2012). "Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress." *J Biol Chem* 287(24): 20321-32.
- Nicolaidis, S. and P. C. Even (1990). "The ischymetric control of feeding." *Int J Obes* 14 Suppl 3: 35-49; discussion 50-2.
- Nijijima, A. and M. M. Meguid (1995). "An electrophysiological study on amino acid sensors in the hepato-portal system in the rat." *Obes Res* 3 Suppl 5: 741S-745S.
- Niswender, K. D., C. D. Morrison, et al. (2003). "Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia." *Diabetes* 52(2): 227-31.
- Nixon, R. A., J. Wegiel, et al. (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2): 113-22.
- Novin, D., D. A. VanderWeele, et al. (1973). "Infusion of 2-deoxy-D-glucose into the hepatic-portal system causes eating: evidence for peripheral glucoreceptors." *Science* 181(4102): 858-60.
- Nunes, P. M., T. van de Weijer, et al. (2012). "Increased intramyocellular lipids but unaltered in vivo mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of adipose triglyceride lipase-deficient mice."

Am J Physiol Endocrinol Metab 303(1): E71-81.

O

Obici, S., Z. Feng, et al. (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyl-transferase-1 decreases food intake and glucose production." *Nat Med* 9(6): 756-61.

Obici, S., Z. Feng, et al. (2002). "Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats." *Nat Neurosci* 5(6): 566-72.

Obici, S., Z. Feng, et al. (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." *Diabetes* 51(2): 271-5.

Obici, S., B. B. Zhang, et al. (2002). "Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production." *Nat Med* 8(12): 1376-82.

Ohsaki, Y., J. Cheng, et al. (2006). "Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B." *Mol Biol Cell* 17(6): 2674-83.

Ohsaki, Y., J. Cheng, et al. (2009). "Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure." *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 399-407.

Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." *Science* 164(3880): 719-21.

Olney, J. W. and L. G. Sharpe (1969). "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate." *Science* 166(3903): 386-8.

Oomura, Y., T. Ono, et al. (1969). "Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus." *Nature* 222(5190): 282-4.

Oomura, Y. and H. Yoshimatsu (1984). "Neural network of glucose monitoring system." *J Auton Nerv Syst* 10(3-4): 359-72.

Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin

action, and type 2 diabetes." *Science* 306(5695): 457-61.

Ozcan, U., L. Ozcan, et al. (2008). "Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis." *Mol Cell* 29(5): 541-51.

P

Pani, G. (2011). "From growing to secreting: new roles for mTOR in aging cells." *Cell Cycle* 10(15): 2450-3.

Park, E. A., R. L. Mynatt, et al. (1995). "Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I." *Biochem J* 310 (Pt 3): 853-8.

Parker, K. L., D. A. Rice, et al. (2002). "Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development." *Recent Prog Horm Res* 57: 19-36.

Parton, L. E., C. P. Ye, et al. (2007). "Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity." *Nature* 449(7159): 228-32.

Pattingre, S., L. Espert, et al. (2008). "Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes." *Biochimie* 90(2): 313-23.

Picard, A., C. Rouch, et al. (2013). "Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents." *Mol Metab* 3(2): 167-76.

Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Annu Rev Physiol* 54: 885-909.

Pimentel, G. D., K. Ganeshan, et al. (2014). "Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis." *Mol Cell Endocrinol* 397(1-2): 15- 22.

Pineau, L. and T. Ferreira (2010). "Lipid-induced ER stress in yeast and beta cells: parallel trails to a common fate." *FEMS Yeast Res* 10(8): 1035-45.

Pipeleers, D. G., F. C. Schuit, et al. (1985). "Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release." *Endocrinology* 117(3): 817-23.

- Pocai, A., T. K. Lam, et al. (2006). "Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats." *J Clin Invest* 116(4): 1081-91.
- Porrini, M., A. Santangelo, et al. (1997). "Weight, protein, fat, and timing of preloads affect food intake." *Physiol Behav* 62(3): 563-70.
- Price, N., F. van der Leij, et al. (2002). "A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I." *Genomics* 80(4): 433-42.
- R**
- Ramadori, G., C. E. Lee, et al. (2008). "Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability." *J Neurosci* 28(40): 9989-96.
- Ramirez, S., L. Martins, et al. (2013). "Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin." *Diabetes* 62(7): 2329-37.
- Ramnanan, C. J., D. S. Edgerton, et al. (2011). "Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism." *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 118-25.
- Ramsey, K. M., J. Yoshino, et al. (2009). "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis." *Science* 324(5927): 651-4.
- Rapoport, S. I. (1996). "In vivo labeling of brain phospholipids by long-chain fatty acids: relation to turnover and function." *Lipids* 31 Suppl: S97-101.
- Reamy, A. A. and M. J. Wolfgang (2011). "Carnitine palmitoyltransferase-1c gain-of-function in the brain results in postnatal microencephaly." *J Neurochem* 118(3): 388-98.
- Reynolds, A., D. Leake, et al. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol* 22(3): 326-30.
- Rinaldi, C., T. Schmidt, et al. (2015). "Mutation in CPT1C Associated With Pure Autosomal Dominant Spastic Paraplegia." *JAMA Neurol*.
- Rinaman, L., E. A. Baker, et al. (1998). "Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal." *Am J Physiol* 275(1 Pt 2): R262-8.
- Ritter, R. C., P. G. Slusser, et al. (1981). "Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain." *Science* 213(4506): 451-2.
- Roche, E., F. Assimakopoulos-Jeannet, et al. (1997). "Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1)." *J Biol Chem* 272(5): 3091-8.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." *Nature* 434(7029): 113-8.
- Roduit, R., C. Nolan, et al. (2004). "A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli." *Diabetes* 53(4): 1007-19.
- Rogers, P. J. and J. E. Blundell (1994). "Reanalysis of the effects of phenylalanine, alanine, and aspartame on food intake in human subjects." *Physiol Behav* 56(2): 247-50.
- Rogina, B. and S. L. Helfand (2004). "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(45): 15998-6003.
- Rolls, B. J. and E. A. Bell (1999). "Intake of fat and carbohydrate: role of energy density." *Eur J Clin Nutr* 53 Suppl 1: S166-73.
- Ropelle, E. R., J. R. Pauli, et al. (2008). "A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss." *Diabetes* 57(3): 594-605.
- Rothman, S. M., K. J. Griffioen, et al. (2012). "Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health." *Ann N Y Acad Sci* 1264: 49-63.
- Rutkowski, D. T. and R. S. Hegde (2010). "Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response." *J Cell Biol* 189(5): 783-94.

- Rutter, J., M. Reick, et al. (2002). "Metabolism and the control of circadian rhythms." *Annu Rev Biochem* 71: 307-31.
- S**
- Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, et al. (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." *Cell* 78(1): 35-43.
- Saha, A. K. and N. B. Ruderman (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership." *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 65-70.
- Salway, JG. "Metabolism at a Glance". Blackwell; Oxford: 1994.
- Samanta, S., A. J. Situ, et al. (2013). "Structural characterization of the regulatory domain of brain carnitine palmitoyltransferase 1." *Biopolymers* 101(4): 398-405.
- Sanchez-Macedo, N., J. Feng, et al. (2013). "Depletion of the novel p53-target gene carnitine palmitoyltransferase 1C delays tumor growth in the neurofibromatosis type I tumor model." *Cell Death Differ* 20(4): 659-68.
- Sanders, M. J., P. O. Grondin, et al. (2007). "Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade." *Biochem J* 403(1): 139-48.
- Santos, C. X., L. Y. Tanaka, et al. (2009). "Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase." *Antioxid Redox Signal* 11(10): 2409-27.
- Sasaki, T., O. Kikuchi, et al. (2014). "Hypothalamic SIRT1 prevents age-associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice." *Diabetologia* 57(4): 819-31.
- Satoh, A., C. S. Brace, et al. (2010). "SIRT1 promotes the central adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus." *J Neurosci* 30(30): 10220-32.
- Scarpace, P. J., M. Matheny, et al. (1997). "Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure." *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): E226-30.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, et al. (2007). "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4." *Embo J* 26(7): 1749-60.
- Scheuner, D., B. Song, et al. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." *Mol Cell* 7(6): 1165-76.
- Schieke, S. M., D. Phillips, et al. (2006). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity." *J Biol Chem* 281(37): 27643-52.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." *Cell* 103(2): 253-62.
- Schmutz, I., J. A. Ripperger, et al. (2010). "The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors." *Genes Dev* 24(4): 345-57.
- Schneeberger, M., M. O. Dietrich, et al. (2013). "Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance." *Cell* 155(1): 172-87.
- Schriner, S. E., N. J. Linford, et al. (2005). "Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria." *Science* 308(5730): 1909-11.
- Schroder, R. L., S. Friis, et al. (2008). "Automated patch-clamp technique: increased throughput in functional characterization and in pharmacological screening of small-conductance Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels." *J Biomol Screen* 13(7): 638-47.
- Schulz, T. J., K. Zarse, et al. (2007). "Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress." *Cell Metab* 6(4): 280-93.
- Schwartz, G. J. (2000). "The role of gastrointestinal vagal afferents in the

- control of food intake: current prospects." *Nutrition* 16(10): 866-73.
- Schwartz, M. W., D. P. Figlewicz, et al. (1992). "Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance." *Endocr Rev* 13(3): 387-414.
- Schwartz, M. W. and D. Porte, Jr. (2005). "Diabetes, obesity, and the brain." *Science* 307(5708): 375-9.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* 404(6778): 661-71.
- Sequist, E. R., G. S. Damberg, et al. (2001). "The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose transport/metabolism in humans." *Diabetes* 50(10): 2203-9.
- Segal, J. P., N. R. Stallings, et al. (2005). "Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus." *J Neurosci* 25(16): 4181-8.
- Serrano, M. (2012). "Dissecting the role of mTOR complexes in cellular senescence." *Cell Cycle* 11(12): 2231-2.
- Shi, Y. C., J. Lau, et al. (2013). "Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN." *Cell Metab* 17(2): 236-48.
- Shimizu, H., M. Egawa, et al. (1993). "Glucagon injected in the lateral hypothalamus stimulates sympathetic activity and suppresses monoamine metabolism." *Brain Res* 630(1-2): 95-100.
- Shimizu, N., S. Chikahisa, et al. (2013). "Maternal dietary restriction alters offspring's sleep homeostasis." *PLoS One* 8(5): e64263.
- Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* 106(2): 171-6.
- Sierra, A. Y., E. Gratacos, et al. (2008). "CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity." *J Biol Chem* 283(11): 6878-85.
- Silva, J. E. (2006). "Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation." *Physiol Rev* 86(2): 435-64.
- Singh, R. and A. M. Cuervo (2011). "Autophagy in the cellular energetic balance." *Cell Metab* 13(5): 495-504.
- Singh, R. and A. M. Cuervo (2012). "Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism." *Int J Cell Biol* 2012: 282041.
- Singh, R., S. Kaushik, et al. (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* 458(7242): 1131-5.
- Singh, R., D. Lakhanpal, et al. (2012). "Late-onset intermittent fasting dietary restriction as a potential intervention to retard age-associated brain function impairments in male rats." *Age (Dordr)* 34(4): 917-33.
- Smith, F. J., D. W. Driscoll, et al. (1988). "Short term effects of fructose on blood glucose dynamics and meal initiation." *Physiol Behav* 44(4-5): 625-31.
- Smith, G. P. and A. N. Epstein (1969). "Increased feeding in response to decreased glucose utilization in the rat and monkey." *Am J Physiol* 217(4): 1083-7.
- Sokoloff, L., M. Reivich, et al. (1977). "The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." *J Neurochem* 28(5): 897-916.
- Stark, R., S. E. Ashley, et al. (2013). "AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure." *Mol Cell Endocrinol* 366(2): 215-23.
- Sturley, S. L. and M. M. Hussain (2012). "Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum." *J Lipid Res* 53(9): 1800-10.

T

- Taib, B., K. Bouyakdan, et al. (2013). "Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes." *J Biol Chem* 288(52): 37216-29.

- Takahashi, J. S., H. K. Hong, et al. (2008). "The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease." *Nat Rev Genet* 9(10): 764-75.
- Tang, Y. and D. Cai (2013). "Hypothalamic inflammation and GnRH in aging development." *Cell Cycle* 12(17): 2711-2.
- Tanno, M., J. Sakamoto, et al. (2007). "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1." *J Biol Chem* 282(9): 6823-32.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* 83(7): 1263-71.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, et al. (2002). "The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition." *J Biol Chem* 277(46): 44507-12.
- Taylor, R. G., D. C. Walker, et al. (1993). "E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing." *Nucleic Acids Res* 21(7): 1677-8.
- Teng, N. I., S. Shahar, et al. (2011). "Efficacy of fasting calorie restriction on quality of life among aging men." *Physiol Behav* 104(5): 1059-64.
- Thaler, J. P. and M. W. Schwartz (2010). "Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up." *Endocrinology* 151(9): 4109-15.
- Thompson, D. A. and R. G. Campbell (1977). "Hunger in humans induced by 2-deoxy-D-glucose: glucoprivic control of taste preference and food intake." *Science* 198(4321): 1065-8.
- Thorens, B. (2008). "Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes." *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 6: S62-71.
- Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 410(6825): 227-30.
- Tschop, M., D. L. Smiley, et al. (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." *Nature* 407(6806): 908-13.
- Tschop, M., C. Weyer, et al. (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." *Diabetes* 50(4): 707-9.
- Tu, B. P. and J. S. Weissman (2002). "The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." *Mol Cell* 10(5): 983-94.
- ## U
- Uyama, N., A. Geerts, et al. (2004). "Neural connections between the hypothalamus and the liver." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 280(1): 808-20.
- ## V
- Vance, J. E. (1990). "Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria." *J Biol Chem* 265(13): 7248-56.
- Vannuvel, K., P. Renard, et al. (2013). "Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria." *J Cell Physiol* 228(9): 1802-18.
- Velasquez, D. A., G. Martinez, et al. (2011). "The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin." *Diabetes* 60(4): 1177-85.
- Vollenweider, P., D. Randin, et al. (1994). "Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans." *J Clin Invest* 93(6): 2365-71.
- ## W
- Wang, X. and C. G. Proud (2009). "Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator." *Trends Cell Biol* 19(6): 260-7.
- Watkins, P. A., D. Maignel, et al. (2007). "Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome." *J Lipid Res* 48(12): 2736-50.
- Wei, Y., Y. J. Zhang, et al. (2015). "The role of mitochondria in mTOR-regulated

- longevity." *Biol Rev Camb Philos Soc* 90(1): 167-81.
- Weindruch, R. and R. S. Sohal (1997). "Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging." *N Engl J Med* 337(14): 986-94.
- White, M. F. (2003). "Insulin signaling in health and disease." *Science* 302(5651): 1710-1.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, et al. (2012). "BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions." *Cell* 149(4): 871-85.
- Wilfling, F., J. T. Haas, et al. (2014). "Lipid droplet biogenesis." *Curr Opin Cell Biol* 29: 39-45.
- Willesen, M. G., P. Kristensen, et al. (1999). "Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat." *Neuroendocrinology* 70(5): 306-16.
- Williams, K. W., T. Liu, et al. (2014). "Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis." *Cell Metab* 20(3): 471-82.
- Wolfgang, M. J., S. H. Cha, et al. (2008). "Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight." *J Neurochem* 105(4): 1550-9.
- Wolfgang, M. J., T. Kurama, et al. (2006). "The brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c regulates energy homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19): 7282-7.
- Wolfgang, M. J. and M. D. Lane (2006). "Control of energy homeostasis: role of enzymes and intermediates of fatty acid metabolism in the central nervous system." *Annu Rev Nutr* 26: 23-44.
- Woods, S. C., M. Chavez, et al. (1996). "The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain." *Neurosci Biobehav Rev* 20(1): 139-44.
- Woods, S. C., E. Decke, et al. (1974). "Metabolic hormones and regulation of body weight." *Psychol Rev* 81(1): 26-43.
- Woods, S. C., E. C. Lotter, et al. (1979). "Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons." *Nature* 282(5738): 503-5.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, et al. (1998). "Signals that regulate food intake and energy homeostasis." *Science* 280(5368): 1378-83.
- Woods, S. C., L. J. Stein, et al. (1984). "Suppression of food intake by intravenous nutrients and insulin in the baboon." *Am J Physiol* 247(2 Pt 2): R393-401.
- Wren, A. M., C. J. Small, et al. (2000). "The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion." *Endocrinology* 141(11): 4325-8.
- Wullschlegel, S., R. Loewith, et al. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* 124(3): 471-84.
- ## X
- Xie, Z. L., S. L. Shao, et al. (2011). "Co-transfection and tandem transfection of HEK293A cells for overexpression and RNAi experiments." *Cell Biol Int* 35(3): 187-92.
- Xu, B., E. H. Goulding, et al. (2003). "Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor." *Nat Neurosci* 6(7): 736-42.
- ## Y
- Yamazaki, N., Y. Shinohara, et al. (1995). "High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone." *FEBS Lett* 363(1-2): 41-5.
- Yang, S. B., A. C. Tien, et al. (2012). "Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons." *Neuron* 75(3): 425-36.
- Yeo, G. S., C. C. Connie Hung, et al. (2004). "A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay." *Nat Neurosci* 7(11): 1187-9.

Yoon, H., D. S. Kim, et al. (2011). "Apoptosis Induced by Manganese on Neuronal SK-N-MC Cell Line: Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Mitochondria Dysfunction." *Environ Health Toxicol* 26: e2011017.

Yoshino, J., K. F. Mills, et al. (2011). "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice." *Cell Metab* 14(4): 528-36.

Z

Zaugg, K., Y. Yao, et al. (2011). "Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress." *Genes Dev* 25(10): 1041-51.

Zhang, E. E., Y. Liu, et al. (2010). "Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP

signalling and hepatic gluconeogenesis." *Nat Med* 16(10): 1152-6.

Zhang, G., J. Li, et al. (2013). "Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH." *Nature* 497(7448): 211-6.

Zhang, M., M. Poplawski, et al. (2009). "Role of CBP and SATB-1 in aging, dietary restriction, and insulin-like signaling." *PLoS Biol* 7(11): e1000245.

Zhang, X., G. Zhang, et al. (2008). "Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity." *Cell* 135(1): 61-73.

Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-32.

CAPÍTULO 8.
PUBLICACIÓN

Hypothalamic Ceramide Levels Regulated by CPT1C Mediate the Orexigenic Effect of Ghrelin

Sara Ramírez,^{1,2} Luís Martins,^{2,3} Jordi Jacas,^{1,2} Patricia Carrasco,^{1,2} Macarena Pozo,^{1,2} Josep Clotet,¹ Dolores Serra,^{2,4} Fausto G. Hegardt,^{2,4} Carlos Diéguez,^{2,3} Miguel López,^{2,3} and Núria Casals^{1,2}

Recent data suggest that ghrelin exerts its orexigenic action through regulation of hypothalamic AMP-activated protein kinase pathway, leading to a decline in malonyl-CoA levels and desinhibition of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A), which increases mitochondrial fatty acid oxidation and ultimately enhances the expression of the orexigenic neuropeptides agouti-related protein (AgRP) and neuropeptide Y (NPY). However, it is unclear whether the brain-specific isoform CPT1C, which is located in the endoplasmic reticulum of neurons, may play a role in this action. Here, we demonstrate that the orexigenic action of ghrelin is totally blunted in CPT1C knockout (KO) mice, despite having the canonical ghrelin signaling pathway activated. We also demonstrate that ghrelin elicits a marked upregulation of hypothalamic C18:0 ceramide levels mediated by CPT1C. Notably, central inhibition of ceramide synthesis with myriocin negated the orexigenic action of ghrelin and normalized the levels of AgRP and NPY, as well as their key transcription factors phosphorylated cAMP-response element-binding protein and forkhead box O1. Finally, central treatment with ceramide induced food intake and orexigenic neuropeptides expression in CPT1C KO mice. Overall, these data indicate that, in addition to formerly reported mechanisms, ghrelin also induces food intake through regulation of hypothalamic CPT1C and ceramide metabolism, a finding of potential importance for the understanding and treatment of obesity. *Diabetes* 62:2329–2337, 2013

Ghrelin is a hormone produced by the stomach that induces food intake through the growth hormone secretagogue receptor 1a in the hypothalamus (1,2). Ghrelin and the proteins that are involved in the downstream signaling pathway are clear targets for the treatment of obesity and food intake disorders. Recently, much effort has been invested in studying the molecular mechanism by which ghrelin enhances the expression of the orexigenic neuropeptides agouti-related protein (AgRP) and neuropeptide Y (NPY) in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC). It has been described that ghrelin binding to its receptor induces intracellular calcium release, which

activates hypothalamic calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 and the phosphorylation of the energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) (3–5). It also has been described that ghrelin specifically triggers a hypothalamic Sirtuin1/p53 pathway that is essential for AMPK phosphorylation (6,7). One of the main effects of AMPK activation in the hypothalamus is the modulation of fatty acid metabolism; when activated, phosphorylated AMPK (pAMPK) further phosphorylates and inactivates acetyl-CoA carboxylase (ACC), causing a decrease in malonyl-CoA levels and the desinhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) A enzyme (4,5). The overall outcome of that effect is increased fatty acid oxidation and accumulation of reactive oxygen species, which are mainly buffered by uncoupling protein 2 (UCP2) (5). All these metabolic changes ultimately activate transcriptional events in the cell nucleus by eliciting increased levels or activation of key transcription factors, such as cAMP-response element-binding protein (CREB) and its phosphorylated isoform (pCREB), forkhead box O1 (FoxO1) and its phosphorylated isoform, and brain-specific homeobox transcription factor. These are responsible, in part, for the increase of the orexigenic neuropeptides AgRP and NPY (8). The physiological relevance of hypothalamic AMPK signaling on the orexigenic effect of ghrelin stems from the finding that genetic or pharmacological inhibition of calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, AMPK, CPT1A, or UCP2, as well as increased concentrations of malonyl-CoA levels in the hypothalamus block ghrelin-induced feeding (3–5). Nevertheless, despite that compelling evidence, the exact molecular mechanism through which changes in fatty acid metabolism modulate AgRP and NPY expression is not completely understood.

Carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C) is a brain-specific CPT1 isoform that, quite opposite to mitochondrial CPT1A, localizes in the endoplasmic reticulum (ER) of neurons (9). CPT1C has very low CPT1 activity but has been demonstrated to bind malonyl-CoA (the physiological inhibitor of CPT1 enzymes) with a K_d within the dynamic range of hypothalamic malonyl-CoA concentration in fasted and refeed states (10,11). Consequently, CPT1C has been proposed to be a sensor of malonyl-CoA levels in hypothalamic neurons (12,13). At the physiological level, it is well-established that hypothalamic CPT1C is involved in the control of energy homeostasis because CPT1C knockout (KO) mice show reduced food intake and impaired peripheral metabolism (11,14). However, the hypothalamic molecular pathway through which CPT1C regulates food intake remains unclear. We recently have demonstrated that overexpression of CPT1C in ARC blocks the anorectic effects of leptin through a mechanism involving increased hypothalamic ceramide levels (15). Considering that ceramide levels in the mediobasal hypothalamus (MBH) are

From the ¹Basic Sciences Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain; the ²CIBERObn Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; the ³Department of Physiology, CIMUS, University of Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, Spain; and the ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. Corresponding authors: Miguel López, m.lopez@usc.es, and Núria Casals, ncasals@csc.uic.es.

Received 19 October 2012 and accepted 8 March 2013.

DOI: 10.2337/db12-1451

S.R. and L.M. contributed equally to this work.

© 2013 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

increased in response to fasting (15), a state in which circulating ghrelin levels are elevated, we hypothesized that CPT1C might be involved in the hypothalamic ghrelin signaling pathway. Here, we demonstrate that CPT1C mediates a short-term increase in hypothalamic ceramide levels in response to ghrelin and, notably, that this effect is critical for the effects of ghrelin on AgRP and NPY expression, as well as on feeding.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animal preparations. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC (European Union directive 86/609, European Union decree 2001–486) and Standards for Use of Laboratory Animals A5388–01 (National Institutes of Health) and were approved by the Local Ethics Committee. We used adult (25–30 g) CPT1C KO male mice and their wild-type (WT) littermates. They were housed in a controlled (12-h light/12-h dark) environment. The animals were fed ad libitum with standard laboratory chow and water.

Cannulation surgery. Mice were anesthetized by an intraperitoneal (IP) injection of ketamine/xylazine (ketamine 75 mg/kg body weight plus xylazine 10 mg/kg body weight). Brain infusion cannulae were stereotaxically placed in the lateral cerebral ventricle using the following coordinates: 0.58 mm posterior to bregma; 1 mm lateral to the midsagittal suture and to a depth of 2.2 mm; and

with bregma and lambda at the same vertical dimension. Former studies of our group have demonstrated that ghrelin administration by using this route does not affect fatty acid metabolism in other brain areas apart from MBH, such as amygdala, striatum, habenula, fields CA1, CA2, and CA3 of the hippocampus, hippocampus dentate gyrus, motor cortex, pyriform cortex, sensory cortex, substantia nigra, and zona incerta (thalamus) (4). Animals were individually caged and allowed to recover for 1 week before experiments.

Intracerebroventricular and IP treatments and sample recollection. For the ghrelin (Bachem, Bubendorf, Switzerland) experiments, mice received an intracerebroventricular (ICV) administration of 5 μ g (dissolved in 2 μ L of physiological serum) or an IP administration of 10 μ g (dissolved in 20 μ L of physiological serum) ghrelin. We have previously demonstrated that ICV ghrelin exerts a dose-dependent effect on food intake and hypothalamic fatty acid metabolism, with the dose of 5 μ g being the one that results in a greater response (4). The dose of 10 μ g ghrelin IP has been previously used in the literature to induce food intake and produces serum ghrelin levels in the range observed in fasted mice (16). For the myriocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) experiments, mice received an ICV administration of 4 μ g myriocin (dissolved in 1:3 DMSO:saline). For the C6:0 ceramide (*N*-hexanoyl-D-sphingosine; Sigma-Aldrich) experiments, mice received an ICV administration of 2.5 μ g C6:0 ceramide (dissolved in 1:3 DMSO:saline). Ghrelin and C6:0 ceramide were administered at the beginning of the light cycle when mice were satiated. When indicated, myriocin was administered 1 h before ghrelin administration. Mice were killed by cervical dislocation and tissue was collected. The whole brain was used for in situ hybridization analysis, the hypothalami were used

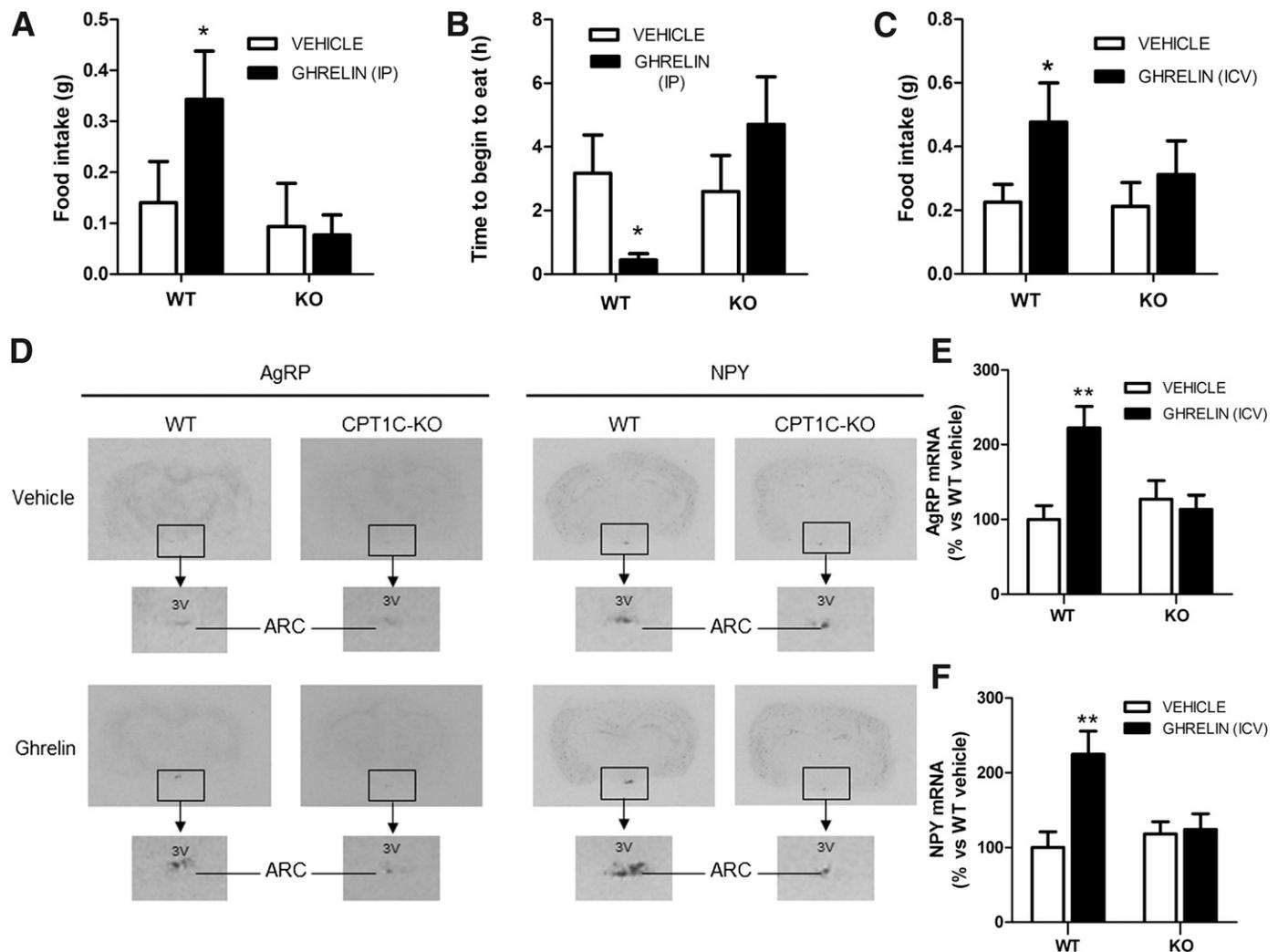


FIG. 1. Ghrelin does not induce orexigenic effects in CPT1C KO mice. **A:** The 2-h food intake in WT and CPT1C KO mice treated IP with vehicle (white bars) or with 10 μ g ghrelin (black bars). **B:** Time to begin to eat after IP injection of vehicle (white bars) or 10 μ g ghrelin (black bars). **C:** The 2-h food intake in WT and CPT1C KO mice treated with ICV vehicle (white bars) or with 5 μ g ICV ghrelin (black bars). ARC mRNA levels of AgRP (**D** and **E**) and NPY (**D** and **F**) of WT and CPT1C KO mice treated with ICV vehicle (white bars) or 5 μ g ghrelin (black bars). Samples were obtained 2 h after the treatment. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. WT mice treated with vehicle. 3V, third ventricle.

for Western blotting, and the MBH was used for real-time PCR analysis and ceramide measurements. To dissect the MBH, brains were placed in a coronal brain matrix (Roboz Surgical Instrument, Gaithersburg, MD) and were sectioned from bregma -1 mm to -2.5 mm. Then, a 1-mm-diameter tissue collector was used to obtain the MBH from each section.

Ceramide quantification. Ceramides were extracted and analyzed via the LC-ESI-MS/MS System (API 3000 PE Sciex; Spectralab Scientific, Markham, Ontario, Canada) in positive ionization, as described previously (17). Their concentrations were measured by multiple reaction monitoring experiments using *N*-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine (C17 ceramide) as internal standard (50 ng \cdot mL $^{-1}$). The method was linear over the range from 2 to 600 ng \cdot mL $^{-1}$.

Western blotting. Hypothalamic total protein lysates (30 μ g) were subjected to SDS-PAGE, electrotransferred on a polyvinylidene fluoride membrane, and probed with the following antibodies: phosphorylated ACC (pACC) α -Ser⁷⁹ 1:1,000; pAMPK α 1:1,000; BIP 1:1,000; FoxO1 1:1,000 (Cell Signaling, Danvers, MA); ATF-6 β 1:1,000; CHOP 1:500; pCREB-Ser¹²⁹ 1:500; pEIF2 α 1:2,000; pIKK α / β 1:1,000; IKK β 1:1,000; nuclear factor- κ B 1:1,000; pPERK 1:500; TLR4 1:1,000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti- β -actin 1:10,000; ATF4 1:1,000; and 0.2 μ g/mL anti- β -tubulin III (Sigma-Aldrich). Values are expressed relative to β -actin or β -tubulin levels. The blots were developed using the ECL Western blotting system (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Real-time quantitative PCR. We performed real-time PCR (TaqMan; Applied Biosystems, Carlsbad, CA) as described (18) using primers designed by

Applied Biosystems (AgRP Mm00475829_g1, NPY Mm00445771_m1, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 4352339E) or IDT Integrated Technologies (UCP2 63705740). Values were expressed in relation to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase levels.

In situ hybridization. Coronal brain sections (16 μ m) were probed with specific oligonucleotides for AgRP (5'-CGA CGC GGA GAA CGA GAC TCG CGG TTC TGT GGA TCT AGC ACC TCT GCC-3') and NPY (5'-AGA TGA GAT GTG GGG GGA AAC TAG GAA AAG TCA GGA GAG CAA GTT TCA TT-3') as previously published (4,18–21).

Statistical analysis. We used 8–10 animals per group in all experiments except for real-time PCR analysis, for which we used six animals. Data are expressed as mean \pm SEM in relation (%) to vehicle-treated mice. Statistical significance was determined by Student *t* test when two groups were compared and by ANOVA with post hoc two-tailed Bonferroni test when more than two groups were compared. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Ghrelin administration did not increase either food intake or the expression of orexigenic neuropeptides in CPT1C KO mice. To establish whether CPT1C was part of the hypothalamic ghrelin signaling pathway, we analyzed the orexigenic effect of ghrelin in CPT1C KO mice. We injected ghrelin IP and analyzed food intake and

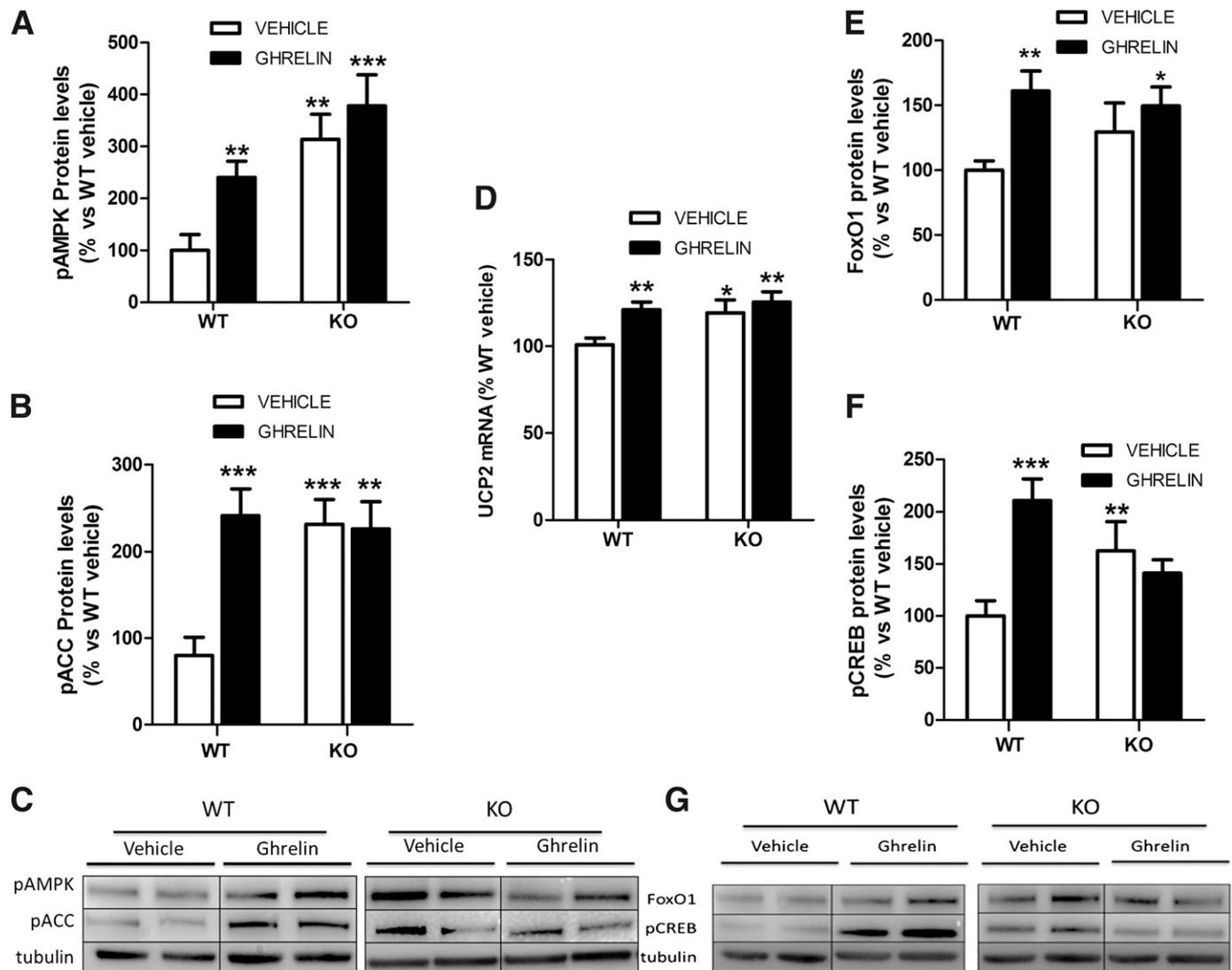


FIG. 2. The ghrelin signaling pathway in WT and CPT1C KO mice. Hypothalamic protein levels of pAMPK (A and C) and pACC (B and C), MBH mRNA levels of UCP2 measured by real-time PCR (D), and the hypothalamic protein levels of FoxO1 (E and G) and pCREB (F and G) in WT and CPT1C KO mice after 2 h of ICV injection of vehicle (white bars) or 5 μ g ICV injection of ghrelin (black bars). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. WT mice treated with vehicle.

the food-seeking behavior. We found that ghrelin injection to WT mice increased food intake two fold and highly reduced the time to begin eating. Both effects were completely blocked in CPT1C KO mice (Fig. 1A and B). Then, we repeated the experiment ICV injection of ghrelin and again found that CPT1C KO mice failed to respond to ghrelin treatment (Fig. 1C). Next, we analyzed the expression of the orexigenic neuropeptides AgRP and NPY by in situ hybridization. The ghrelin-induced increase in AgRP and NPY levels present in WT mice was completely blunted in CPT1C KO mice (Fig. 1D and E), which correlates with the lack of the orexigenic effect of ghrelin in those mice. These results indicate that CPT1C is involved in the ghrelin orexigenic effect.

The canonical ghrelin signaling pathway is impaired in CPT1C KO mice. Next, we analyzed the ghrelin signaling pathway in hypothalamus from CPT1C KO mice. Our data showed that central ghrelin treatment induced a marked stimulatory effect on the levels of pAMPK, pACC, UCP2, and the transcription factors FoxO1 and pCREB in WT mice. Those effects were impaired in CPT1C KO mice (Fig. 2A–G). Basal levels of pAMPK and pACC, putative upstream factors of CPT1C, were significantly increased in CPT1C KO mice when compared with WT mice, suggesting that AMPK pathway is constitutively activated in the hypothalamus of CPT1C KO mice (Fig. 2A–C). Notably, in keeping with the altered levels of pAMPK and pACC, the expression of UCP2, a downstream factor of this pathway related to mitochondrial fatty acid oxidation, and the levels of the transcription factors FoxO1 and pCREB also were increased in the hypothalamus of CPT1C KO mice when compared with vehicle-injected WT mice (Fig. 2D–G). Therefore, these data suggest that even the canonical signaling pathway of ghrelin is activated in CPT1C KO mice. The lack of CPT1C blocks the ghrelin induction of orexigenic neuropeptides and food intake.

Central administration of ghrelin increased ceramide levels in hypothalamus of WT but not CPT1C KO mice. Current evidence from our group has identified CPT1C as a key regulator of ceramide levels in neurons (22). To investigate whether ghrelin had any impact on hypothalamic ceramide concentration, we measured the levels of C18:0 ceramide, the most abundant ceramide in brain and neurons (23), in WT mice at different times after ghrelin administration. Our data showed that central ghrelin promoted a marked stimulatory and transitory action in C18:0 ceramide levels in the MBH, evident from the maximal effect detected at 30 and 60 min after ghrelin injection (Fig. 3A). Then, we performed a dose-response curve and found that MBH ceramide levels at 30 min after ghrelin administration increased progressively with the dose of ghrelin, with the increase statistically significant at the dose of 5 μ g (Fig. 3B). Next, we analyzed what happened in CPT1C KO mice. Opposite to WT mice, 5 μ g ghrelin failed to induce any effect in the C18:0 ceramide levels of CPT1C KO mice 30 min after its administration (Fig. 3C), indicating a requirement of CPT1C for the stimulatory effect of ghrelin on ceramide content in the MBH.

Inhibition of hypothalamic ceramide synthesis blocked the orexigenic effect of ghrelin. To investigate the existence of any mechanistic link between the orexigenic effect of ghrelin and the activation of ceramide synthesis, we investigated the effects of 4 μ g myriocin, a specific inhibitor of the de novo synthesis of ceramide (24), on ghrelin action. The selected dose of myriocin induced

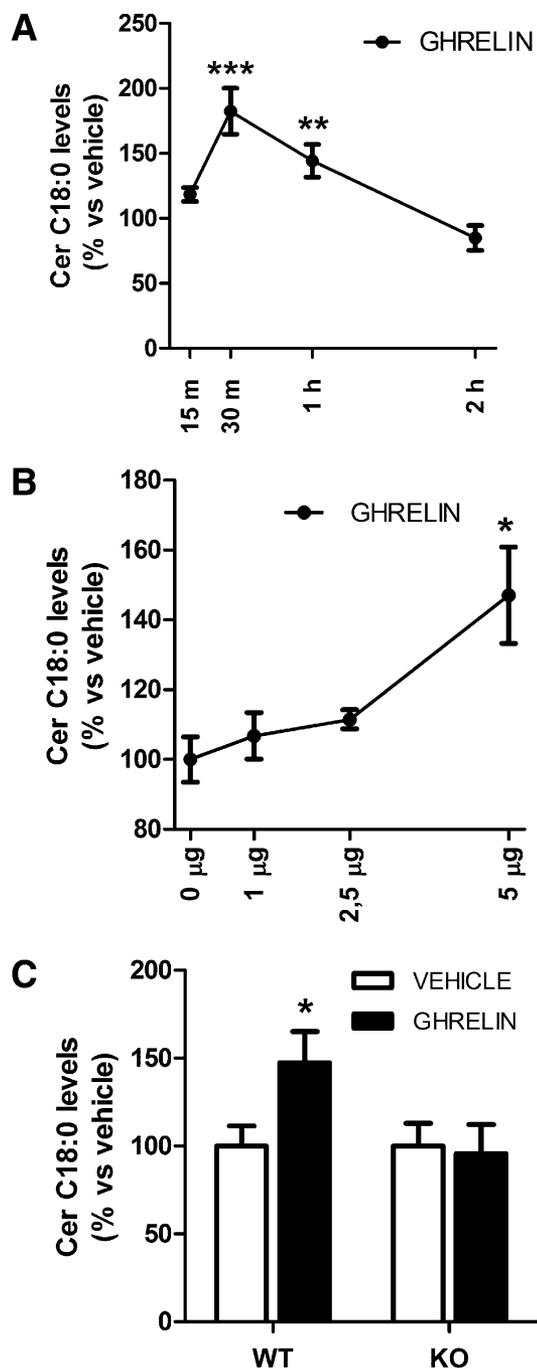


FIG. 3. MBH ceramide levels in response to ghrelin. **A:** Time course of MBH C18:0 ceramide levels in WT mice after ghrelin administration (ICV, 5 μ g). Percentage of respective increase in vehicle-treated mice is represented. **B:** MBH C18:0 ceramide levels in WT after 30 min of ICV administration of different doses of ghrelin. **C:** MBH C18:0 ceramide levels of WT and CPT1C KO mice after 30 min of ICV administration of vehicle (white bars) or 5 μ g ICV administration of ghrelin (black bars). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. WT vehicle. Cer, ceramide.

neither an anorectic effect per se at any evaluated time (Fig. 4A and data not shown) nor illness or malaise (data not shown), nor hypothalamic inflammation (measured as protein levels), nor ER stress (measured as protein levels), an indirect indicator of inflammation (Fig. 4B and C). Although this dose of myriocin was subeffective when injected alone, our data showed that ICV injection of myriocin 1 h before ghrelin administration decreased

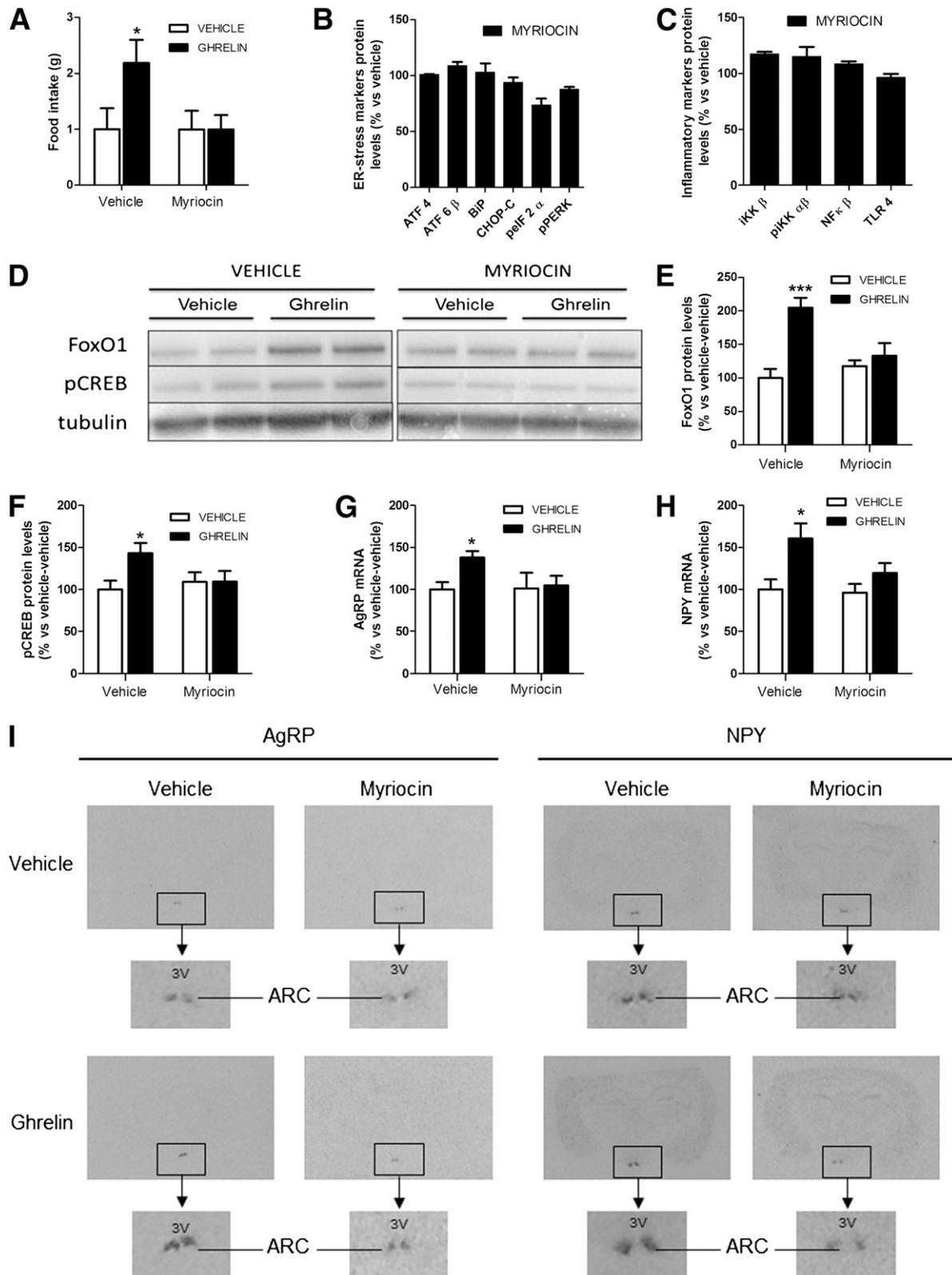


FIG. 4. Myriocin injection blocks the orexigenic effect of ghrelin. WT mice were pretreated with ICV vehicle or 4 μ g ICV myriocin 1 h before ICV administration of vehicle (white bars) or 5 μ g ICV administration of ghrelin (black bars). **A:** Food intake after 2 h of ghrelin injection. ICV injection of myriocin does not cause ER stress (**B**) or inflammation (**C**) in hypothalamus. Hypothalamic ER stress and inflammatory markers were measured by Western blot. ATF4, activating transcription factor 4; ATF6 β , activating transcription factor 6 β ; BiP, ER chaperone-binding immunoglobulin protein, also known as glucose-regulated protein 78 kDa, GRP78; CHOP-C, C/EBP homologous protein C; pEIF2 α , phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 α ; pPERK, phosphorylated RNA-dependent protein kinase-like ER kinase; IKK β , I κ B kinase β ; pIKK α β , phosphorylated I κ B kinase α β ; NF κ B, nuclear factor- κ B; TLR4, Toll-like receptor 4. Hypothalamic protein levels (**D–F**) of FoxO1 and pCREB measured by Western blot. ARC mRNA levels (**G–I**) of AgRP and NPY measured by in situ hybridization. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. vehicle-vehicle-treated mice. 3V, third ventricle.

the orexigenic effect of ghrelin (Fig. 4A) and its stimulatory effect on transcription factors FoxO1 and pCREB and on neuropeptides AgRP and NPY (Fig. 4D–I). These results indicate that ceramide synthesis also is a required component of the ghrelin hypothalamic signaling pathway.

Ceramide administration increases food intake in CPT1C KO mice. Bearing in mind that CPT1C has been involved in ceramide synthesis, we next investigated whether ceramide injection had any orexigenic effect in CPT1C KO mice; we used C6:0-ceramide, a cell-penetrating ceramide that is converted to long chain ceramides inside the cell (25). We used the submaximal dose of 2.5 μ g, which has been reported to block the satiety effects of leptin but lacks of orexigenic effect per se in WT animals (15). Of note, 2.5 μ g C6:0 ceramide via ICV injection produced MBH C18:0 ceramide levels in the range observed in ghrelin-treated mice (ICV ceramide: 0.53 ± 0.10 ng C18:0 ceramide/mg protein; ICV ghrelin: 0.41 ± 0.04 ng C18:0 ceramide/mg protein); in both cases, hypothalamic ceramide levels were significantly higher than those found in controls (vehicle-treated). Ceramide, which was injected at the beginning of the light cycle when animals were satiated, increased food intake and the expression of AgRP and NPY in CPT1C KO mice but, as expected, had no effect in WT mice (Fig. 5). These results indicate that ceramide is able to rescue feeding patterns when the canonical ghrelin signaling pathway (pAMPK/pACC/CPT1A/UCP2) is previously activated, as it happens in CPT1C KO mice (Fig. 2). By contrast, in fed WT mice, which have the ghrelin canonical pathway not activated, ceramide alone is unable to induce orexigenic neuropeptides expression and food intake. These results argue for two parallel signaling pathways for ghrelin, with the involvement of CPT1C and ceramide in one of the branches (Fig. 6). We propose that ghrelin must activate two parallel pathways, the mitochondrial pathway (with the activation of CPT1A and fatty acid oxidation) and the ER pathway (with the activation of CPT1C and ceramide synthesis), for its orexigenic effect to be effective.

DISCUSSION

In this study we demonstrate that the orexigenic effect of ghrelin is coupled to an ability of ghrelin to regulate hypothalamic CPT1C and ceramide synthesis, and that this action is required for the subsequent increase in levels of AgRP and NPY mRNA expression in the ARC via modulation of the transcription factors pCREB and FoxO1. Recent data have demonstrated that the orexigenic effect of ghrelin is mediated by the selective modulation of hypothalamic SIRT1/p53/AMPK and fatty acid metabolism pathways, as well as UCP2 levels, which culminate in increased AgRP and NPY expression in the ARC (4–7). Although it is clear that the modulation of hypothalamic fatty acid metabolism is a bona fide component of ghrelin signaling, it is unclear whether complex species might be involved in that action. In fact, this is a major constraint in our current knowledge about hypothalamic lipids and energy balance, which is restricted to a small corner of lipid pathways, namely de novo fatty acid synthesis (regulated by AMPK, ACC, fatty acid synthase, and malonyl-CoA decarboxylase) and fatty acid oxidation (regulated by CPT1A).

Current evidence from our group has implicated hypothalamic ceramides and CPT1C in the actions of leptin on

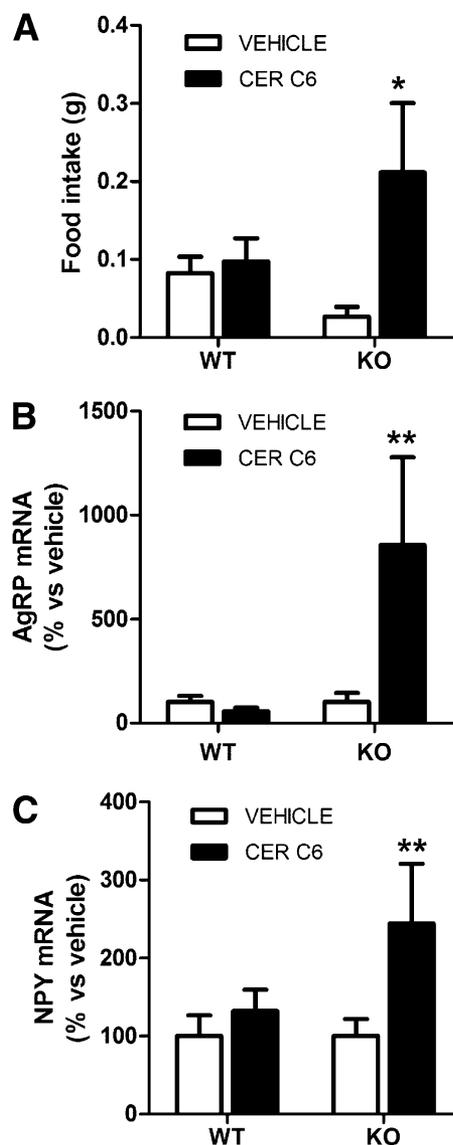


FIG. 5. Ceramide induces food intake in CPT1C KO mice. WT and CPT1C KO mice were treated with ICV vehicle (white bars) or 2.5 μ g ICV ceramide C6:0 (black bars) at the beginning of the light cycle. Food intake (A) was measured 3 h after the injection. AgRP (B) and NPY (C) mRNA levels in MBH were measured by real-time PCR in samples obtained 3 h after the treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated mice. CER, ceramide.

food intake (15). Quite opposite to CPT1A, which is located in the mitochondria, CPT1C resides in the ER of neurons (9). At the cellular level, CPT1C is involved in ceramide metabolism, which is demonstrated by the increased ceramide levels detected after CPT1C overexpression in vitro and the reduced ceramide concentration detected in neurons from CPT1C KO mice (22). Furthermore, our recent data also show that genetic (adenoviral-driven) overexpression of CPT1C in the ARC increases feeding through a mechanism involving increased ceramide levels and that this effect antagonizes the anorectic actions of leptin at central level (15). However, so far no evidence has linked the orexigenic effect of ghrelin to alterations in ceramide metabolism or hypothalamic CPT1C function. Thus, all the evidence led us to investigate the possible involvement of hypothalamic CPT1C and ceramides on the action of ghrelin.

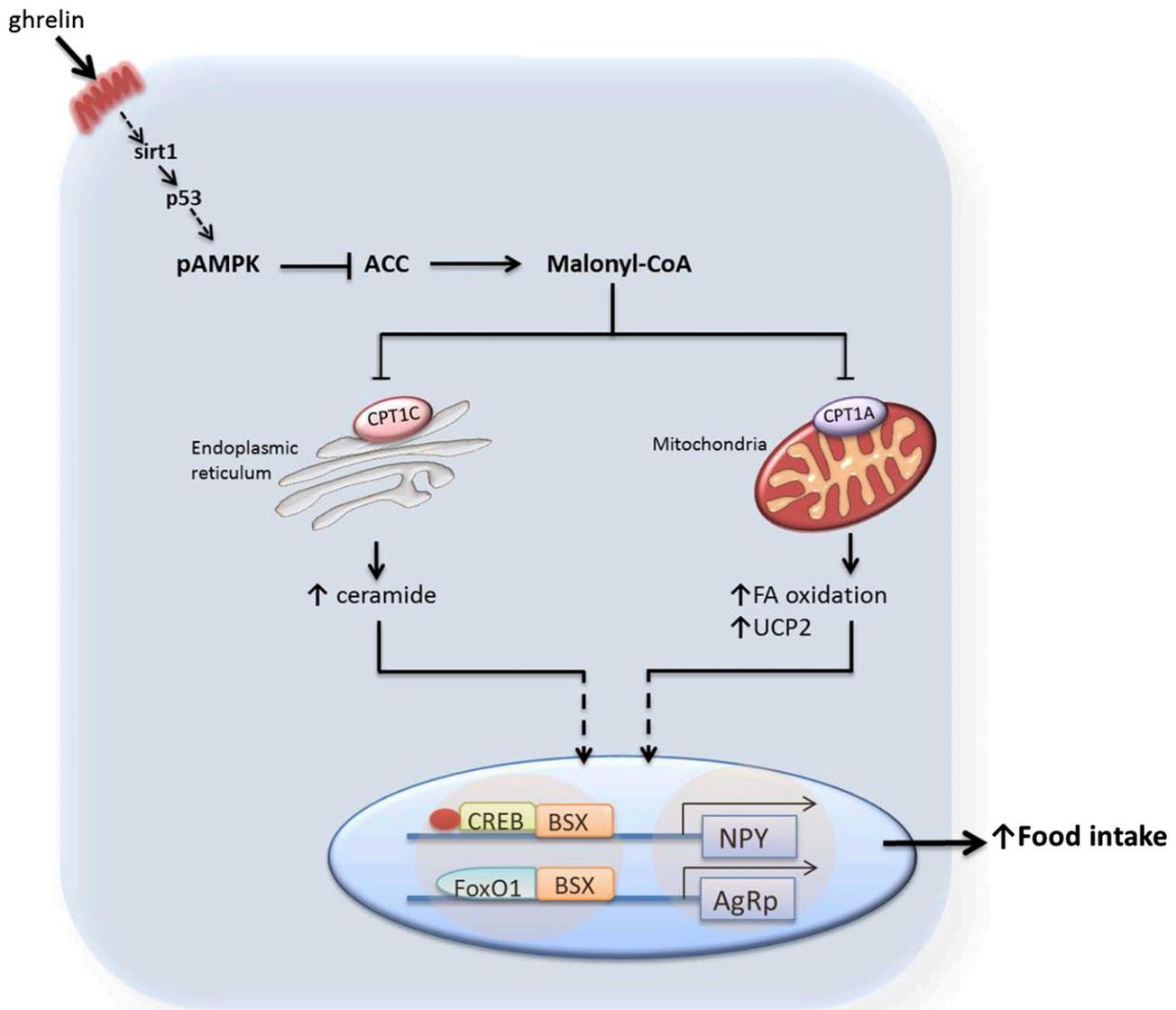


FIG. 6. Schematic diagram showing the involvement of CPT1C and ceramides in the hypothalamic ghrelin signaling pathway. Ghrelin stimulates the hypothalamic SIRT1/p53/AMPK axis, leading to decreased levels of hypothalamic malonyl-CoA, the physiological inhibitor of CPT1 enzymes. In the “classical” mechanism of ghrelin action, this effect promotes disinhibition of CPT1A, increased fatty acid (FA) oxidation, and altered reactive oxygen species levels. These metabolic changes ultimately activate the nuclear transcription machinery (pCREB, FoxO1, and brain-specific homeobox transcription factor [BSX]), increasing mRNA expression of *AgRP* and *Npy* genes. Here, we demonstrate the existence of a parallel downstream pathway involving CPT1C, a specific brain isoform located in the ER, which triggers a short-term increase in ceramide synthesis after ghrelin treatment. This new pathway is of physiological importance because the orexigenic action of ghrelin is totally blunted in CPT1C KO mice or in mice treated with an inhibitor of ceramide synthesis. The fact that central ceramide treatment induces food intake and triggers orexigenic neuropeptides expression in CPT1C KO mice, which have the canonical ghrelin signaling pathway activated during satiating conditions, but not in WT mice, indicates that both branches need to be activated for ghrelin to exert its orexigenic effect.

Here, we demonstrate that central ghrelin administration promotes a marked short-term increase in the MBH C18:0 ceramide concentration mediated by CPT1C, and that this increase in ceramide levels is necessary to induce hyperphagia and AgRP and NPY expression. In fact, inhibition of hypothalamic ceramide synthesis with myriocin negated the orexigenic action of ghrelin treatment and normalized AgRP and NPY expression in the ARC. Having shown that central inhibition of ceramide synthesis blocked the orexigenic action of ghrelin, we aimed to investigate whether ceramide treatment induced food intake in animals fed ad libitum. Our data show that central injection of ceramide increased the levels of AgRP and NPY and induced food intake in CPT1C KO mice, which had the

ghrelin canonical pathway constitutively activated. Quite opposite, ceramide had no effect in fed WT mice, indicating that ceramide is necessary but not sufficient to induce food intake. Altogether, these results indicate that, besides the canonical SIRT1/p53/AMPK/ACC/CPT1A/UCP2 pathway, ghrelin-induced food intake is mediated by specific modulation of CPT1C and ceramide concentration in the MBH (Fig. 6). Therefore, the reduction of hypothalamic malonyl-CoA levels after ghrelin treatment (4) would activate two parallel routes, fatty acid oxidation-mediated by CPT1A and ceramide synthesis mediated by CPT1C, and both routes require triggering for ghrelin to exert its orexigenic effects. As described previously, blocking fatty acid oxidation by inhibition of CPT1A (4) or by deletion of

UCP2 (5) blunts the orexigenic effects of ghrelin. The evidence presented here demonstrates that the deletion of CPT1C or the inhibition of ceramide synthesis itself also blunts food intake after ghrelin administration, indicating that both parallel routes are required for an appropriate orexigenic response of ghrelin. Considering that ghrelin and leptin are conceptualized as the "yin and yang" in the hypothalamic regulation of feeding (26,27), our data about ghrelin and ceramide are in agreement with those of our previous report showing that the anorectic action of leptin is associated with decreased ceramide concentration and CPT1C function in the hypothalamus (15).

The cellular implications of our findings are multiple. First, this is the first evidence linking the effect of an orexigenic hormone, such as ghrelin, with a molecular mechanism involving the normal function of the ER, i.e., ceramide synthesis. In this regard, ceramides and their derivative sphingomyelin are one of the major lipids in plasmatic membranes of neurons, traditionally having been considered as structural lipids. However, current data are challenging that view, demonstrating that ceramides can act as signaling molecules in a bulk of processes, such as differentiation, proliferation, apoptosis, and neuronal plasticity, and can regulate the function of various kinases, phosphatases, deacetylases, and others (28). In this sense, ceramides could regulate the expression of orexigenic neuropeptides AgRP and NPY by modulating the activity of the transcription factors involved. An alternative hypothesis might be a mechanism involving hypothalamic ER stress. Ceramides are one of the most reactive lipid species at the peripheral level, and impaired ceramide content in pancreatic β -cells and hepatocytes induces lipotoxicity and subsequently ER stress (29–31). Taking into account that hypothalamic ER stress also has been recently proposed as a central mechanism modulating energy homeostasis and particularly leptin resistance (32–35), it would be reasonable to hypothesize that CPT1C, ceramide-induced lipotoxicity, and ER stress might play a role in the effects of ghrelin at the hypothalamic level.

In summary, our study shows that CPT1C and ceramides are part of a new hypothalamic mechanism mediating the action of ghrelin on feeding through increased *Agrp* and *Npy* gene expression. Our data also describe activation of hypothalamic CPT1C and ceramides as mediators of food intake, which is of potential importance for the understanding and treatment of obesity.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding was provided by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement 281854, the ObERStress project (to M.L.), and 245009, the Neurofast project (to C.D. and M.L.), Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-30520-C02-01 (to D.S.); BFU2011-29102 (to C.D.); SAF2011-30520-C02-02 (to N.C.), Xunta de Galicia (10PXIB208164PR and 2012-CP070 [to M.L.]); and Fondo de Investigaciones Sanitarias (Instituto de Salud Carlos III; PI12/01814 [to M.L.]).

L.M. is a recipient of a fellowship from Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (SFRH/BD/65379/2009). M.P. is a recipient of a fellowship from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de la Recerca in Catalunya. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of Instituto de Salud Carlos III.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

S.R. and L.M. performed collection and assembly of data, data analysis, and interpretation. J.J. performed collection and assembly of data. P.C. performed collection and assembly of data, data analysis, and interpretation. M.P. performed collection of data. J.C. performed data interpretation. D.S. and F.G.H. performed data interpretation and acquired financial support. C.D. performed data interpretation. M.L. and N.C. were responsible for conception and design, data analysis and interpretation, and wrote the manuscript. N.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors emphatically thank Dr. Rubén Nogueiras (University of Santiago de Compostela, Spain), Dr. Andrew J. Whittle (University of Cambridge, UK), and Dr. Silje Skrede (University of Bergen, Norway) for comments and advice.

REFERENCES

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656–660
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908–913
- Anderson KA, Ribar TJ, Lin F, et al. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab* 2008;7:377–388
- López M, Lage R, Saha AK, et al. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 2008;7:389–399
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 2008;454:846–851
- Dietrich MO, Antunes C, Geliang G, et al. AgRP neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *J Neurosci* 2010;30:11815–11825
- Velásquez DA, Martínez G, Romero A, et al. The central Sirtuin 1/p53 pathway is essential for the orexigenic action of ghrelin. *Diabetes* 2011;60:1177–1185
- Sakkou M, Wiedmer P, Anlag K, et al. A role for brain-specific homeobox factor Bsx in the control of hyperphagia and locomotory behavior. *Cell Metab* 2007;5:450–463
- Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, et al. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* 2008;283:6878–6885
- Price N, van der Leij F, Jackson V, et al. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 2002;80:433–442
- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, et al. The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7282–7287
- Wolfgang MJ, Lane MD. The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis. *J Biol Chem* 2006;281:37265–37269
- Wolfgang MJ, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA and CPT1c in the treatment of obesity. *FEBS J* 2011;278:552–558
- Gao XF, Chen W, Kong XP, et al. Enhanced susceptibility of Cpt1c knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake. *Diabetologia* 2009;52:912–920
- Gao S, Zhu G, Gao X, et al. Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:9691–9696
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4679–4684
- Merrill AH Jr, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods* 2005;36:207–224
- López M, Lelliott CJ, Tovar S, et al. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 2006;55:1327–1336
- López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 2010;16:1001–1008

20. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012;149:871–885
21. Martínez de Morentin PB, Whittle AJ, Fernø J, et al. Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2012;61:807–817
22. Carrasco P, Sahún I, McDonald J, et al. Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition. *J Biol Chem* 2012;287:21224–21232
23. Ben-David O, Futerman AH. The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. *Neuromolecular Med* 2010;12:341–350
24. Hanada K, Nishijima M, Fujita T, Kobayashi S. Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells. A novel evaluation system using an SPT-defective mammalian cell mutant. *Biochem Pharmacol* 2000;59:1211–1216
25. Mitoma J, Ito M, Furuya S, Hirabayashi Y. Bipotential roles of ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage-dependent manners. *J Neurosci Res* 1998;51:712–722
26. Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: From anorexia to obesity—the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 2003;144:3749–3756
27. Nogueiras R, Tschöp M. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* 2005;310:985–986
28. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139–150
29. Lelliott C, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 (Suppl. 4):S22–S28
30. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 2008;6:e237
31. Martínez de Morentin PB, Varela L, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, López M. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:350–361
32. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008;135:61–73
33. Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, et al. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol* 2008;74:1610–1619
34. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35–51
35. Won JC, Jang PG, Namkoong C, et al. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1861–1865