

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Pediatría**



**CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE LOS  
ASTROCITOS HIPOTALÁMICOS EN LAS ALTERACIONES  
METABÓLICAS CENTRALES Y PERIFÉRICAS INDUCIDAS POR  
UNA DIETA RICA EN GRASA DURANTE LA ETAPA PRENATAL  
Y POSTNATAL**

**Memoria para optar al grado de doctor  
de la licenciada**

**CRISTINA GARCÍA CÁCERES**

**DIRECTORES:**

**Prof. Dr.D. Jesús Argente Oliver**

**Dra. Doña Julie Ann Chowen**

**Madrid, 2011.**



***RESUMEN***

---

## RESUMEN

El hipotálamo es el centro integrador de la señales sistémicas y centrales implicadas en el control del balance energético. Las hormonas circulantes (*e.g.*, leptina y ghrelina) actúan sobre la síntesis, secreción y reorganización sináptica de las neuronas hipotalámicas reguladoras del control metabólico. Asimismo, los astrocitos son conocidos por participar en los procesos neuroendocrinos mediante la remodelación sináptica y la producción de factores en respuesta a hormonas específicas que, a su vez, van a modular las respuestas neuronales locales. Sin embargo, se desconoce si los astrocitos, a través de cambios en su morfología y/o la producción de factores gliales, participan en la modulación de la conectividad sináptica del hipotálamo en respuesta a una dieta rica en grasa o a señales metabólicas como la leptina o ghrelina.

El objetivo de esta tesis doctoral es determinar si los astrocitos del hipotálamo responden a los cambios metabólicos inducidos por una dieta rica en grasa o en respuesta a elevadas concentraciones de leptina o ghrelina, modificando su actividad y morfología, así como, la producción de citoquinas, y de esta manera lograr modular la conectividad sináptica en el hipotálamo. Además, identificamos si este efecto es directo o está mediado por otros factores.

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57B1L6 y ratas Wistar macho en los que se determinó los efectos centrales y periféricos de la exposición a una sobrenutrición materna, una dieta rica en grasa o elevadas concentraciones de leptina o ghrelina sobre la activación y morfología de los astrocitos, así como su posible implicación en la respuesta inflamatoria y los cambios sinápticos en el hipotálamo. Para determinar si los astrocitos son capaces de responder de manera directa a estas hormonas se emplearon cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos procedentes de ratas Wistar macho a los que se trató con leptina o ghrelina.

Los resultados obtenidos demuestran que la leptina, ghrelina o la exposición a una dieta rica en grasa durante el periodo pre- y postnatal induce cambios en la activación y morfología de los astrocitos del hipotálamo. Además, muchos de estos cambios gliales están asociados con cambios sinápticos y de expresión de neuropéptidos en el hipotálamo, siendo estos efectos diferentes en función del tiempo de exposición al factor. Asimismo, hemos determinado que la leptina y la ghrelina ejercen un efecto directo sobre los astrocitos hipotalámicos participando en la modulación de sus niveles de proteínas estructurales como el GFAP y en la producción de citoquinas.

Por tanto, los astrocitos del hipotálamo pueden desempeñar una función prioritaria y relevante en el control metabólico, pudiendo ser utilizados como dianas de estudio para la comprensión de los mecanismos implicados en el desarrollo de patologías tales como la obesidad y la resistencia central a hormonas metabólicas.

**PALABRAS CLAVE: hipotálamo; astrocitos; dieta rica en grasa; ghrelina; leptina; remodelación sináptica.**

---

---

***ABREVIATURAS***

<b>%:</b> Porcentaje.	<b>db/db:</b> Ratones deficientes del receptor de leptina.
<b>µg:</b> Microgramos.	<b>DEPEX:</b> Medio de montaje para microscopía.
<b>µl:</b> Microlitros.	<b>DMEM:</b> Medio de Dulbecco modificado por Eagle.
<b>µm:</b> Micras.	<b>DMN:</b> Núcleo dorsomedial del hipotálamo.
<b>3V:</b> Tercer ventrículo.	<b>DPS:</b> Densidad postsináptica.
<b>ABC:</b> Avidina-biotina peroxidada.	<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>ACTH:</b> Hormona adrenocorticotropina.	<b>ELISA:</b> Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico.	<b>EM:</b> Eminencia media.
<b>ADNc:</b> Ácido desoxirribonucleico complementario.	<b>ERK:</b> Proteína quinasa reguladora de la señal extracelular.
<b>AgRP:</b> Proteína relacionada con agouti.	<b>FBS:</b> Suero fetal bovino.
<b>Akt:</b> Proteína quinasa de serina/treonina.	<b>g:</b> gramos.
<b>AMPA:</b> Receptor ionotrópico ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.	<b>GA:</b> Ghrelina acilada.
<b>AMPK:</b> Proteína quinasa activada por 5'-adenosín monofosfato.	<b>GABA:</b> Ácido gamma-aminobutírico.
<b>ANOVA:</b> Análisis de la varianza.	<b>GALP:</b> Péptido similar a galanina.
<b>APF:</b> área perifornical del hipotálamo.	<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
<b>ApoE:</b> Apolipoproteína E.	<b>G-CSF:</b> Factor de estimulación de granulocitos.
<b>ARC:</b> Núcleo arcuato del hipotálamo.	<b>GDP:</b> Proteína guanosina difosfato.
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico.	<b>GFAP:</b> Proteína ácida fibrilar de glía.
<b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero.	<b>GFAP+:</b> Inmunoreactividad para la proteína ácida fibrilar de glía.
<b>ATP:</b> Adenosina trifosfato.	<b>GFP:</b> Proteína verde fluorescente.
<b>BDNF:</b> Factor neurotrófico derivado del cerebro.	<b>GH:</b> Hormona de crecimiento.
<b>BHE:</b> Barrera hematoencefálica.	<b>Ghrelina<sup>-/-</sup>:</b> Ratones deficientes de ghrelina.
<b>BSA:</b> Albumina sérica bovina.	<b>GHRH:</b> Hormona hipotalámica liberadora de la hormona de crecimiento.
<b>Ca<sup>2+</sup>/CaMK II:</b> Calcio calmodulina quinasa.	<b>GHRP-6:</b> Péptido secretagogo de la hormona de crecimiento -6.
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> Calcio.	<b>GHS-R:</b> Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento.
<b>CART:</b> Transcrito regulado por anfetamina y cocaína.	<b>GLP-1:</b> Péptido del tipo glucagón 1.
<b>CKK:</b> Colecistoquinina.	<b>GOAT:</b> Enzima ghrelina O-aciltransferasa.
<b>cm<sup>3</sup>:</b> Centímetros cúbicos.	<b>gp130:</b> Glicoproteína 130.
<b>CNTF:</b> Factor neurotrófico ciliar.	<b>GT:</b> Ghrelina total.
<b>CO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de carbono.	<b>GTP:</b> Proteína guanosina trifosfato.
<b>CRH:</b> Hormona liberadora de corticotropina.	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peróxido de hidrógeno.
<b>CT-1:</b> Cardiotrofina-1.	
<b>DAB:</b> Diaminobencidina.	
<b>DAG:</b> Diacilglicerol.	

<b>HCl:</b> Ácido clorhídrico.	<b>MSH:</b> Hormona estimuladora de melanocitos.
<b>HRP:</b> Peróxido de rábano.	<b>NaCl:</b> Cloruro sódico.
<b>I:</b> Yodo.	<b>ng:</b> Nanogramos.
<b>icv:</b> Intracerebroventricular.	<b>NG2:</b> Proteoglicano de condroitín-sulfato.
<b>IF:</b> Inmunofluorescencia.	<b>NGS:</b> Suero de cabra.
<b>IGF-I:</b> Factor de crecimiento similar a la insulina-I.	<b>nm:</b> Nanometros.
<b>IgG:</b> Anti-inmunoglobulina G.	<b>nM:</b> Nanomolar.
<b>IH:</b> Inmunohistoquímica.	<b>NMDA:</b> Receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato.
<b>IL1<math>\beta</math>:</b> Interleuquina 1 $\beta$ .	<b>NOS:</b> Oxido nítrico sintasa.
<b>IL6:</b> Interleuquina 6.	<b>NPY:</b> Neuropeptido Y.
<b>IMC:</b> Índice de masa corporal.	<b>NTS:</b> Núcleo del tracto solitario.
<b>iNOS:</b> Óxido nítrico sintasa inducible.	<b>ob/ob:</b> Ratones deficientes de leptina.
<b>ip:</b> Intraperitoneal.	<b>Ob-R:</b> Receptor de leptina.
<b>IP<sub>3</sub>:</b> Inositol 1,4,5-trifosfato.	<b>°C:</b> Grados centígrados.
<b>IRS:</b> Proteína del substrato del receptor de insulina.	<b>OCT:</b> Compuesto para el corte a temperatura óptima.
<b>JAK-2:</b> <i>Janus</i> quinasa 2.	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud.
<b>K<sup>+</sup>:</b> Potasio.	<b>OSM:</b> Oncostatina- M.
<b>Kcal:</b> Kilocalorías.	<b>OX:</b> Orexina.
<b>kDa:</b> Kilodalton.	<b>p100:</b> Placas de 100x20 milímetros.
<b>kg:</b> Kilogramos.	<b>p60:</b> Placas de 60x15 milímetros.
<b>LCR:</b> Líquido cefalorraquídeo.	<b>PACAP:</b> Polipeptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria.
<b>LHA:</b> Área hipotalámica lateral.	<b>PB:</b> Tampón fosfato 0,1 Molar pH 7,4.
<b>LIF:</b> Factor inhibitorio de la leucemia.	<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino 0,1 Molar pH 7,4.
<b>LPS:</b> Lipopolisacáridos.	<b>PC1:</b> Prohormona convertasa 1.
<b>M:</b> Molar.	<b>PCNA:</b> Antígeno nuclear de proliferación celular.
<b>m<sup>2</sup>:</b> Metros cuadrados.	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>mA:</b> Miliamperios.	<b>PFA:</b> Paraformaldehido.
<b>MAGUK:</b> Proteína de la gualinato-quinasa asociada a membrana.	<b>pg:</b> Picogramos.
<b>MAPK:</b> Proteína quinasa activada por mitógenos.	<b>PGK1:</b> Fosfoglicerato quinasa 1.
<b>MCH:</b> Hormona liberadora de melanina.	<b>pH:</b> Potencial de hidrógeno.
<b>MCR:</b> Receptor de melanocortina.	<b>PI3K:</b> Proteína fosfatidilinositol 3 quinasa.
<b>ME:</b> Microscopio electrónico.	<b>PIP<sub>2</sub>:</b> Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
<b>mGluR:</b> Receptor metabotrópico.	<b>PI-PLC:</b> Fosfolipasa C de fosfatidilinositol.
<b>ml:</b> Mililitros.	<b>PKA:</b> Proteín-quinasa A.
<b>mm:</b> Milímetros.	<b>PKC:</b> Proteín-quinasa C.
<b>mm<sup>2</sup>:</b> Milímetros cuadrados.	<b>PMSF:</b> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

**PND:** Día postnatal.

**POMC:** Pro-opiomelanocortina.

**PP:** Polipéptido pancreático.

**PPAR $\alpha$ :** Receptor  $\alpha$  activador de la proliferación de peroxisomas.

**PRL:** Prolactina.

**PSD95:** Proteína de densidad postsináptica 95.

**PTP-1B:** Proteína fosfatasa 1B.

**PVDF:** difluoruro de polivinilo.

**PVN:** Núcleo paraventricular del hipotálamo.

**PYY:** Péptido tirosina-tirosina.

**RIA:** Radioinmunoensayo.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real.

**SCM:** Sistema central de melanocortina.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SEM:** Error estándar de la media.

**SNAP25:** Proteína sinaptosomal asociada a 25.

**SNARE:** Receptor soluble de anclaje del factor sensible a N-etilmaleimida.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SOCS-3:** Proteína supresora de la señalización de las citoquinas de tipo 3.

**SST:** Somatostatina

**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

**TRH:** Hormona liberadora de tirotrópina.

**Tris:** Tris-(hidroximetil)-amino metano.

**Tyr:** Tirosina.

**VAMP:** Proteína de membrana asociada a la vesícula.

**VMN:** Núcleo ventromedial del hipotálamo.

**VTA:** Núcleo segmental ventral.

**WB:** Western blot.

**X:** Índice de ampliación del objetivo del microscopio.

**Y:** Receptor de neuropéptido Y.

**GRUPOS EXPERIMENTALES**

**ND:** Madres de ratón alimentadas con una dieta normal.

**HF:** Madres de ratón alimentadas con una dieta rica en grasa.

**NDm:** Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal.

**HFm:** Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa.

**nd:** Ratones alimentados con una dieta normal durante la etapa adulta.

**hf:** Ratones alimentados con una dieta rica en grasa durante la etapa adulta.

**C o Ct:** Grupo control.

**Lep o L:** Grupo leptina.

**G:** Grupo ghrelina.

**G *pair fed*:** Grupo ghrelina al que se le permitió comer diariamente, como máximo, la cantidad de pienso que consumía el grupo control.

**DG o D-ghrelina:** Grupo ghrelina desacilada.

---

---

***ÍNDICE***

I. INTRODUCCIÓN	
<b>1. La Obesidad</b>	<b>1</b>
1.1. El papel de la nutrición materna en la obesidad	2
1.2. El papel de la respuesta inmune en la obesidad	3
<b>2. Homeostasis energética</b>	<b>4</b>
2.1. Mediadores centrales y periféricos reguladores de la ingesta	4
2.2. Sistemas centrales y periféricos implicados en el control de la ingesta	5
2.3. El hipotálamo	6
2.3.1. El núcleo arcuato del hipotálamo	6
2.3.2. El Sistema central de Melanocortina	8
2.3.3. Acciones de la leptina y la ghrelina en el hipotálamo	9
<b>3. La leptina y la ghrelina: hormonas periféricas moduladoras del balance energético</b>	
<b>3.1. La leptina</b>	<b>11</b>
• Los receptores de la leptina	12
• Principales vías de señalización de la leptina	13
3.1.1. El papel de la leptina en el desarrollo	15
3.1.2. El papel de la leptina en la regulación del balance energético	15
3.1.3. El papel de la leptina en la obesidad	16
<b>3.2. La ghrelina</b>	<b>17</b>
• Los receptores de la ghrelina	18
• Las vías de señalización de la ghrelina	19
3.2.1. El papel de la ghrelina en la regulación del balance energético	20
3.2.2. El papel de la ghrelina en la obesidad	21
<b>4. La conectividad en el Sistema Nervioso Central: sinapsis química</b>	<b>22</b>
4.1. Proteínas de la neurona presináptica	23
4.2. Proteínas de la neurona postsináptica	24
4.3. La plasticidad sináptica	26
4.3.1. La plasticidad sináptica en el control metabólico	26
4.3.2. Implicación de la leptina en la plasticidad sináptica	26
4.3.3. Implicación de la ghrelina en la plasticidad sináptica	26
<b>5. Los astrocitos: células gliales indispensables en el Sistema Nervioso Central</b>	<b>27</b>
5.1. Sinapsis tripartita: la comunicación entre astrocitos y neuronas	28
5.2. La morfología de los astrocitos	29
5.3. Los astrocitos y el control metabólico	30
II. HIPÓTESIS	33
III. OBJETIVOS	34

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
<b>1. MATERIALES</b>	<b>35</b>
1.1. Reactivos	35
1.2. Anticuerpos	35
1.3. Sondas de expresión	36
<b>2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i></b>	<b>37</b>
<b>2.1. Dieta rica en grasa prenatal y postnatal</b>	<b>37</b>
2.1.1. <i>Diseño experimental</i>	37
2.1.2. <i>Genotipado de los ratones transgénicos</i>	39
2.1.3. <i>Control del peso y las glucemias durante el estudio</i>	39
2.1.4. <i>Sacrificio y colección de muestras</i>	39
2.1.5. <i>Extracción sérica para la determinación hormonal</i>	40
<b>2.2. Tratamiento intracerebroventricular (<i>icv</i>) con hormonas en ratas</b>	<b>40</b>
2.2.1. <i>Implantación de cánulas icv asociadas a minibombas osmóticas</i>	41
2.2.1.1. <i>Diseño Experimental: Modelo de infusión crónica icv de hormonas</i>	41
2.2.2. <i>Implantación de cánulas icv</i>	42
2.2.2.1. <i>Diseño Experimental: Modelo de infusión aguda icv de hormonas</i>	42
2.2.3. <i>Control del peso, ingesta y niveles de glucosa en sangre</i>	43
2.2.4. <i>Sacrificio y colección de muestras</i>	44
2.2.5. <i>Extracción sérica para la determinación hormonal</i>	44
<b>3. MODELO DE EXPERIMENTACIÓN <i>IN VITRO</i></b>	<b>44</b>
<b>3.1. Diseño Experimental: Cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos</b>	<b>44</b>
3.1.1. <i>Procesamiento de las muestras</i>	46
<b>4. PROTOCOLOS GENERALES</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de la ghrelina total y acilada</b>	<b>46</b>
<b>4.2. Ensayo para la inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación de insulina y leptina</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Obtención de las secciones de cerebro</b>	<b>47</b>
4.3.1. <i>Criostato</i>	47
4.3.2. <i>Vibratomo</i>	48
<b>4.4. Inmunohistoquímica para GFAP o vimentina en el hipotálamo</b>	<b>48</b>
4.4.1. <i>Análisis cuantitativo y morfológico de las células de GFAP en el ARC</i>	49
4.4.2. <i>Análisis de inmunoreactividad para vimentina en el ARC</i>	50
<b>4.5. Inmunohistoquímica para GFP en el hipotálamo</b>	<b>50</b>
4.5.1. <i>Análisis del perímetro y la cobertura glial de las células de NPY o POMC en el ARC</i>	51
<b>4.6. Doble inmunofluorescencia para GFP y AgRP</b>	<b>51</b>

4.6.1. Cuantificación del número de contactos de AgRP en la membrana de las células de POMC en el ARC.....	52
<b>4.7. Obtención de la fracción proteica total.....</b>	<b>52</b>
4.7.1. Tejido.....	52
4.7.2. Cultivos celulares.....	52
<b>4.8. Western blotting.....</b>	<b>53</b>
<b>4.9. Extracción y purificación del ARN.....</b>	<b>54</b>
<b>4.10. RT-PCR.....</b>	<b>54</b>
<b>4.11. Estadística.....</b>	<b>54</b>
 V. RESULTADOS	
<b><u>1. Respuesta a una dieta rica en grasa durante la etapa pre- y/o postnatal en ratones macho</u></b>	
<b>1.1. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en el peso, la glucemia y los niveles circulantes de las hormonas metabólicas.....</b>	<b>56</b>
<b>1.2. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en las neuronas del hipotálamo.....</b>	<b>58</b>
1.2.1. Niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos.....	58
1.2.2. Tamaño de las neuronas de NPY y POMC en el ARC.....	60
1.2.3. Número de contactos de AgRP en las neuronas de POMC en el ARC.....	61
<b>1.3. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en los astrocitos del hipotálamo.....</b>	<b>62</b>
1.3.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP.....	62
1.3.2. Número y morfología de las células de GFAP en el ARC.....	63
1.3.3. Cobertura glial alrededor de las células de NPY en el ARC.....	65
1.3.4. Cobertura glial alrededor de las células de POMC en el ARC.....	66
<b><u>2. Efecto del tratamiento crónico icv con leptina en ratas macho adultas</u></b>	
<b>2.1. Efecto crónico de la leptina en el peso, glucemia y niveles circulantes de insulina, leptina y ghrelina.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2. Efecto crónico de la leptina en el hipotálamo.....</b>	<b>69</b>
2.2.1. Niveles proteicos de STAT3, GFAP, vimentina, PCNA, $\beta$ -actina e IL-6.....	69
2.2.2. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC.....	70
2.2.3. Número de fibras inmunoreactivas para vimentina en el ARC.....	71
2.2.4. Niveles proteicos de sinapsina, sinaptotagmina, syntaxina, SNAP-25 y PSD-95.....	72
<b><u>3. Efecto del tratamiento agudo icv con ghrelina en ratas macho adultas</u></b>	
<b>3.1. Efecto agudo de la ghrelina en la ingesta, peso, glucemia y niveles circulantes de hormonas.....</b>	<b>73</b>

<b>3.2. Efecto agudo de la ghrelina en el hipotálamo</b> .....	<b>74</b>
3.2.1. Niveles proteicos de IL-6, GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina.....	74
3.2.2. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC.....	75
3.2.3. Cuantificación de la inmunoreactividad para vimentina en el ARC.....	77
3.2.4. Niveles proteicos de sinapsina, sinaptofisina, sinaptotagmina, syntaxina, SNAP-25 y PSD-95.....	77
<b>4. Efecto del tratamiento crónico icv con ghrelina en ratas macho adultas</b>	
<b>4.1. Efecto crónico de la ghrelina en la ingesta, peso, glucemia y niveles circulantes de hormonas</b> .....	<b>78</b>
<b>4.2. Efecto crónico de la ghrelina en el hipotálamo</b> .....	<b>80</b>
4.2.1. Niveles del mensajero de NPY, AgRP, POMC, CART, GFAP y GHS-R1a.....	80
4.2.2. Niveles del mensajero de los mediadores inflamatorios $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6.....	81
4.2.3. Niveles proteicos de GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina.....	82
4.2.4. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC.....	83
4.2.5. Niveles de las proteínas implicadas en la conectividad sináptica.....	84
<b>5. Efecto de la leptina y la ghrelina en los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos</b>	
<b>5.1. Efecto in vitro de la leptina en los astrocitos</b> .....	<b>85</b>
5.1.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP y del receptor <i>Obr-1b</i> .....	85
5.1.2. Niveles de expresión del mensajero de $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6.....	86
5.1.3. Niveles proteicos de STAT-3, GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina.....	86
<b>5.2. Efecto in vitro de la ghrelina en los astrocitos</b> .....	<b>87</b>
5.2.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP y del receptor GHS-R1a.....	87
5.2.2. Niveles de expresión del mensajero de $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6.....	88
5.2.3. Niveles proteicos de GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina.....	88
 VI. DISCUSIÓN.....	 90
 VII. CONCLUSIONES.....	 125
 VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	 126

## ***I. INTRODUCCIÓN***

## **1. La Obesidad**

En la actualidad la obesidad se ha convertido en uno de los problemas más importantes para la salud pública mundial, que afecta tanto a niños como a adultos, incrementándose en más de un 75% en todo el mundo desde 1980, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003). En Estados Unidos más del 30% de los adultos son considerados clínicamente obesos (Flegal y cols., 2010). Del mismo modo, la prevalencia de obesidad en los países europeos, como España, está aumentando de forma alarmante estas últimas décadas. Actualmente el 35% de la población española presenta sobrepeso y más del 13% son considerados obesos (OMS, 2010).

La OMS define la obesidad como una acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se manifiesta por un exceso de peso y volumen corporales (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil, 2009). Se considera que un sujeto tiene sobrepeso cuando su índice de masa corporal (IMC; kg de peso/m<sup>2</sup> de altura) está entre 25-29 mientras que, en un sujeto obeso, es igual o superior a 30. El IMC de un individuo va a depender de factores como la edad, el sexo, la raza, el origen étnico, la carga genética, el metabolismo, el ambiente, la dieta y el estilo de vida (Seidell y Deerenberg, 1994; Gallagher y cols., 1996; Flegal y Graubard, 2009).

En la actualidad, la obesidad se considera un importante problema de salud, no sólo debido al aumento de su incidencia en la población infantil y juvenil sino además, al alto gasto económico que supone, entre otras razones, por su asociación a otras enfermedades. La obesidad supone un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina, la hipertensión, las dislipidemias, las enfermedades cardiovasculares y pulmonares, la artrosis y la infertilidad entre otras (Chan y cols., 1994; Crowley, 2008).

En la etiología de la obesidad encontramos dos factores importantes que a su vez interactúan entre ellos:

- 1) **factores genéticos:** se conocen alteraciones en al menos 20 genes, que cosegregan con el fenotipo de obesidad (Argente, 2011; Stein y cols., 2011).
- 2) **factores ambientales:** críticos durante el desarrollo pre- y/o postnatal del individuo, así como en el adulto.

Por tanto, el desarrollo de obesidad en un individuo dependerá de su predisposición genética y de las condiciones ambientales obesógenas a las que está expuesto como

son, el consumo de una dieta rica en grasa y la falta de ejercicio (Mendieta-Zerón y cols., 2008).

### **1.1. El papel de la nutrición materna en la obesidad**

En etapas tempranas del desarrollo, como son el periodo prenatal y neonatal, el individuo es más susceptible a sufrir cambios permanentes en los sistemas implicados en regular el balance energético en respuesta a alteraciones nutricionales (Heijmans y cols., 2008; Lillycrop y cols., 2008; Tobi y cols., 2009). Esta susceptibilidad se debe a que, durante este periodo, tiene lugar el desarrollo y la maduración de los sistemas periféricos y centrales implicados en la regulación de la homeostasis energética (Mendieta-Zerón y cols., 2008). De este modo, cualquier alteración metabólica podría causar cambios irreversibles en el sujeto que podrían tener consecuencias en el adulto (Lucas, 1994). De hecho, se considera que la predisposición a desarrollar alteraciones metabólicas como la obesidad, la diabetes tipo 2, la hipertensión y/o la aterosclerosis en la etapa adulta, podrían “programarse” en el útero materno (Barker y cols., 1993; Barker, 1998; Patel y cols., 2000; Hales y Barker, 2001; Cameron y Demerath, 2002; Adair y Cole, 2003; Holemans y cols., 2003; Beall y cols., 2004; Levin, 2006; Ladyman y cols., 2010). Se ha observado que los cambios metabólicos que se producen en las primeras semanas de desarrollo del individuo, principalmente determinados por el estado nutricional de la madre (Hales y Barker, 2001), inducen cambios permanentes en la composición corporal, el tamaño y el número de adipocitos (Catalano y cols., 1992; Hammami y cols., 2001), así como, en la estructuración y funcionalidad de los circuitos centrales y periféricos reguladores de la ingesta (Plagemann y cols., 1999; Hales y Barker, 2001; Elmquist y Flier, 2004; Cripps y cols., 2005; McMillen y Robinson, 2005; Mühlhäusler y cols., 2005; Plagemann, 2006; Férézou-Viala y cols., 2007). Asimismo, diversos estudios han demostrado que la obesidad materna inducida por dieta o por diabetes gestacional está relacionada con la aparición de hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hiperfagia y un aumento en la adiposidad en la descendencia (Aalinkeel y cols., 2001; Catalano y cols., 2003a; Catalano y cols., 2003b; Oken y Gillman, 2003; Harvey y cols., 2007; Samuelsson y cols., 2008; Nivoit y cols., 2009).

La importancia de la nutrición materna se debe a que la glucosa, la leptina y el cortisol de la madre, entre otras señales, atraviesan la placenta influyendo en el desarrollo y metabolismo del feto. Además, aunque la insulina no es capaz de atravesar la placenta, la glucosa procedente de la madre actúa sobre el páncreas del feto estimulando la secreción de insulina y actuando como factor de crecimiento (Freinkel,

1980). Igualmente, se ha demostrado que la leptina puede pasar de la madre al hijo, a través de la leche, durante el periodo de lactancia (Teixeira y cols., 2002). Se sabe que durante el periodo postnatal una mayor o menor exposición a la leptina podría determinar cambios estructurales y funcionales irreversibles en los circuitos hipotalámicos implicados en la regulación de la homeostasis energética (Bouret y cols., 2004b; Pinto y cols., 2004).

## 1.2. El papel de la respuesta inmune en la obesidad

La obesidad está asociada con el desarrollo de un estado inflamatorio sistémico (Moreno y cols., 2002) y central (de Souza y cols., 2008) del individuo. Esto se debe a que el tejido adiposo, que se encuentra aumentado en los individuos obesos, además de almacenar energía, actúa como un órgano endocrino capaz de secretar al torrente sanguíneo sustancias bioactivas (citoquinas) que van a participar tanto en el control de la masa corporal como en la respuesta inflamatoria (Gregoire y cols., 1998).

Durante el desarrollo de la obesidad el tejido adiposo sufre modificaciones (hipertrofia, proliferación celular) que están asociadas con un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias, como es el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL) -1 $\beta$  y -6 (Kim y cols., 2008), que afectan a la funcionalidad de los tejidos centrales y periféricos (Ouchi y cols., 2003; Berg y Scherer, 2005). Estas citoquinas, a diferencia de los linfocitos B y T, pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) actuando en el Sistema Nervioso Central (SNC) en respuesta a estímulos inflamatorios tanto sistémicos como locales (Laflamme y Rivest, 2001), así como, a consecuencia de la ganancia excesiva de grasa (Wisse y Schwartz, 2009).

Diversos estudios han demostrado que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 actúan como mediadores comunes entre los sistemas neuroendocrino e inmune y están involucrados en la activación de los circuitos neuronales que modulan la inflamación, a través del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Turnbull y Rivier, 1999; Haddad y cols., 2002), y controlan la ingesta (Wisse, 2004), el sueño (Opp, 2005) y la termorregulación (Leon, 2002).

Estudios en roedores demuestran que la exposición a una dieta rica en grasa induce una inflamación hipotalámica permanente mediada por un incremento en la expresión de los genes de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en el hipotálamo (Souza y cols., 2005) que contribuyen a la aparición de alteraciones metabólicas como la obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión y las dislipidemias (Ouchi y cols., 2011). Sin embargo, no sólo

el exceso de nutrientes induce una respuesta inflamatoria central, sino también la secreción de citoquinas en respuesta a lesiones o agresiones que pueden afectar a la regulación del peso (McDermott y cols., 2006).

## **2. La homeostasis energética**

La homeostasis energética es un proceso fisiológico complejo que mantiene el equilibrio entre el aporte y gasto de energía (Broberger, 2005; Adan, 2006; Nogueiras y cols., 2007) y está estrictamente controlado y regulado por el SNC, que actúa como centro integrador de las señales endócrinas, metabólicas y neurales procedentes de los sistemas endócrino, nervioso y gastrointestinal (Nogueiras y cols., 2007; Valassi y cols., 2008).

### **2.1. Mediadores centrales y periféricos reguladores de la ingesta**

En humanos y roedores los mediadores centrales (neurotransmisores, péptidos, neurohormonas y neuroesteroides) y periféricos (péptidos, citoquinas y hormonas gastrointestinales) que actúan regulando la ingesta en el SNC son (Tritos y cols., 2003):

- 1) **Las señales saciantes** como la insulina (Schwartz y cols., 1992) la glucosa (Nijima, 1983) y los ácidos grasos, lipoproteínas y cetonas (Langhans y cols., 1985; Fislser y cols., 1989; Fislser y cols., 1995).
- 2) **Los péptidos** sintetizados por el sistema digestivo, tales como, el péptido tirosina-tirosina (PYY), la oxintomodulina, el polipéptido pancreático (PP), el péptido del tipo glucagón 1 (GLP-1) y la colecistoquinina (CCK), que son inhibidores del apetito, y la ghrelina, un péptido estimulador de la ingesta (Tritos y cols., 2003; Morton y cols., 2004; Crespo y cols., 2009).
- 3) **Las adipoquinas**, péptidos activos endocrinos, sintetizados principalmente por el tejido adiposo como son la leptina, la adiponectina, la resistina y la IL-6, entre otros (Kershaw y Flier, 2004; Fain, 2006; Iannone y Lapadula, 2010).
- 4) **Los neuropéptidos** sintetizados en el SNC como son los productos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC), el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART), el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP) en el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC); el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN); la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), el péptido similar a galanina (GALP) y la oxitocina principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN); y la hormona liberadora de melanina (MCH) y la

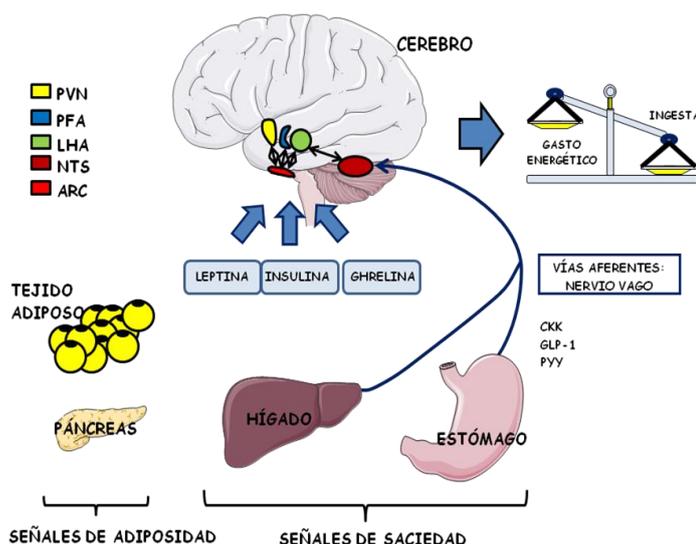
orexina (OX)-A en el área hipotalámica lateral (LHA) y perifornical (APF) (Elias y cols., 1999; Beck, 2000; Korner y cols., 2001; Williams y cols., 2004; Horvath, 2005; Segal y cols., 2005; Crowley, 2008; Valassi y cols., 2008; Hoffer y cols., 2009).

5) **Los neurotransmisores** monoaminérgicos que tienen efectos anorexigénicos como la serotonina u orexigénicos como la dopamina y la noradrenalina (Valassi y cols., 2008).

6) Y, finalmente, **otros** neuropéptidos y receptores implicados en la regulación de la ingesta incluyendo el sistema de endocannabinoides, la neuromedina U, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la urocortina, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Clemmons y Underwood, 1991; Smagin y cols., 1998; Cota y cols., 2003; Xu y cols., 2003; Hanada y cols., 2004).

## 2.2. Sistemas centrales y periféricos implicados en el control de la ingesta

Durante la ingesta las señales hormonales y neurales liberadas por los distintos órganos periféricos alcanzan el hipotálamo a través del torrente sanguíneo (*e.g.*, leptina, insulina, ghrelina) o a través del núcleo del tracto solitario (NTS) mediante las fibras aferentes que inervan el tracto gastrointestinal (*e.g.*, CKK, GLP-1, PYY) (Schwartz y cols., 2000; Broberger, 2005; Hillebrand y Geary, 2010). De esta manera, en el hipotálamo se integran las señales periféricas con las señales procedentes de áreas suprahipotalámicas y de otros núcleos hipotalámicos, creando así una red compleja de circuitos neuronales que elaborarán una respuesta integrada encargada de controlar la ingesta y el gasto energético (Woods y cols., 1998; Valassi y cols., 2008) (Figura 1).



**Figura 1: Esquemática de las vías por las cuales las señales de adiposidad y saciedad interactúan con los circuitos centrales implicados en la regulación de la homeostasis**

CKK: colecistoquinina; GLP-1: péptido del tipo glucagón 1; PYY: péptido tirosina-tirosina; ARC: núcleo arcuato del hipotálamo; LHA: área hipotalámica lateral; PVN: núcleo paraventricular; APF: área perifornical. NTS: núcleo del tracto solitario.

### 2.3. El hipotálamo: región clave en el control metabólico

Las poblaciones neuronales hipotalámicas más relevantes en el control de la ingesta se encuentran localizadas en el ARC, pero también están implicadas otras áreas hipotalámicas como el PVN, el LHA y el NTS (Schwartz y cols., 2000).

#### 2.3.1. El núcleo arcuato del hipotálamo

El ARC es el centro de recepción de los péptidos circulantes y de las señales neurales (Adan, 2006) debido a su localización privilegiada próxima a la eminencia media (EM) y al tercer ventrículo (3V), que le permite tener acceso tanto a los factores neuroendocrinos, producidos por el hipotálamo, como a los factores circulantes de la sangre y del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Cone, 2005).

- Entre las principales poblaciones neuronales localizadas en el ARC encontramos:

A. **Las neuronas de POMC y CART (POMC/CART)** que tienen acciones anorexigénicas y se localizan a lo largo de la región rostrocaudal y periventricular del ARC (Watson y cols., 1978; Nilaver y cols., 1979). Estas neuronas proyectan sus axones a unas neuronas que se localizan en el LHA y PVN (Crowley, 2008). En el LHA establecen conexiones con neuronas que expresan la hormona estimuladora de melanocitos (MSH) y orexinas A y B, y en el PVN con neuronas que expresan TRH, CRH y oxitocina (Crowley, 2008). Se ha demostrado que la TRH y la CRH actúan aumentando el gasto energético y disminuyendo la ingesta a través del eje tiroideo y del sistema nervioso simpático (Crowley, 2008).

El gen de POMC gracias a la acción de la prohormona convertasa 1 (PC1), produce múltiples péptidos en función del tejido en el que se exprese (Bertagna, 1994) como son la MSH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), la  $\beta$ -endorfina (Crowley, 2008) y la hormona adrenocorticotropina (ACTH) (Cone, 2005). En el sistema periférico este gen se expresa principalmente en la hipófisis, la piel y el folículo piloso (Cone, 2005), mientras que en el SNC, la expresión de POMC en el ARC se activa durante la ingesta y se inhibe en condiciones de ayuno (Cheung y cols., 1997; Schwartz y cols., 1997). En ratones la falta de funcionalidad de los péptidos derivados de POMC induce obesidad (Yaswen y cols., 1999).

Por otro lado, CART es otro de los péptidos que tiene efectos saciantes tanto en el sistema central como en el periférico. En roedores el 90 % de CART se coexpresa en las neuronas de POMC localizadas principalmente en el ARC (Valassi y cols., 2008). En humanos está descrito que mutaciones en el gen que codifica a CART están asociadas con una reducción en el metabolismo energético y el desarrollo de una obesidad severa (Yanik y cols., 2006). Sin embargo, CART no sólo está implicado en el control de la ingesta, sino también en otros aspectos fisiológicos como la regulación del consumo de drogas psicoestimulantes como la cocaína y la anfetamina (Jaworski y cols., 2003).

**B. Las neuronas de NPY y AgRP (NPY/AgRP)** que tienen acciones orexigénicas y se localizan en la zona ventromedial del ARC (Crowley, 2008). Estas neuronas establecen contactos sinápticos entre sí, además de proyectar sus axones e interactuar con neuronas hipotalámicas localizadas en el LHA, el PVN (Elmqvist, 1998; Schwartz y cols., 2000), el APF, el VMN, el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMN) y en otras áreas del SNC, como el NTS (Valassi y cols., 2008).

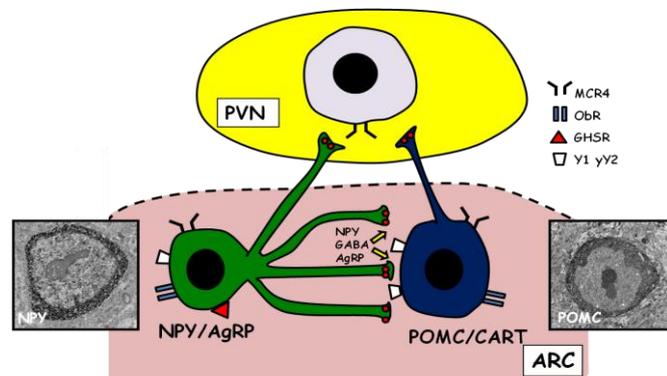
La ablación postnatal de las neuronas de NPY/AgRP induce una pérdida de peso dramática que culmina con la muerte del animal (Bewick y cols., 2005; Luquet y cols., 2005). Sin embargo, se ha observado que en ratones deficientes de NPY y/o AgRP, la delección de estos genes, no induce un fenotipo delgado como era de esperar (Qian y cols., 2002).

En el ARC, NPY es sintetizado por neuronas que liberan ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Valassi y cols., 2008). Este péptido es capaz de inhibir la termogénesis, incrementar la ingesta y promover la adipogénesis (Williams y cols., 2004). Se han aislado seis receptores de NPY, dos de los cuales (Y1 y Y5) median los efectos anabólicos de este péptido. Asimismo, se ha determinado que los antagonistas de Y1 y Y5 actúan como agentes contra la obesidad (Valassi y cols., 2008), pero el bloqueo de la actividad de NPY tiene efectos negativos, tales como la aparición de hipertensión arterial, alteración en la secreción hipofisaria e hipoglucemia (Parker y cols., 2002).

Por otro lado, AgRP se sintetiza en situaciones de ayuno y es un potente regulador del Sistema Central de Melanocortina (SCM). En roedores, AgRP se coexpresa en el 90 % de las neuronas de NPY en el ARC (Schwartz y cols., 2000; Luo y cols., 2011). En humanos, una expresión elevada de AgRP en el hipotálamo está relacionada con la aparición de obesidad (Katsuki y cols., 2001).

Además, estas dos poblaciones neuronales POMC/CART y NPY/AgRP establecen una innervación asimétrica entre sí (Figura 2) (Roseberry y cols., 2004). Las neuronas de POMC/CART reciben conexiones procedentes de las neuronas de NPY/AgRP, sin embargo esto no sucede a la inversa (Cone y cols., 2001). Las neuronas de POMC/CART están innervadas por terminales NPYérgicas y, a través de sus receptores de membrana para NPY, se inhibe su actividad neuronal (Csiffary y cols., 1990; Broberger y cols., 1997; Roseberry y cols., 2004).

Asimismo, ambas poblaciones neuronales presentan en su membrana receptores de melanocortina (MCR) que van a participar en la regulación de la actividad del SCM (Cowley y cols., 2001).



**Figura 2. Innervación asimétrica entre las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART en el núcleo arcuato del hipotálamo.** Las neuronas de NPY/AgRP son capaces de conectar a través de sus haces terminales con el soma celular de las neuronas de POMC/CART. Ambos tipos neuronales expresan receptores de membrana para distintas hormonas y neuropéptidos implicados en regular la actividad del Sistema Central de Melanocortina. ARC: núcleo arcuato del hipotálamo; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; NPY: Neuropéptido Y; POMC: Pro-opiomelanocortina; AgRP: proteína relacionada con agouti; CART: transcrito regulado por anfetamina y cocaína; ObR: receptor de leptina; GHSR: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (receptor de ghrelina); MCR4: receptor de melanocortina tipo 4; Y1 y Y2: receptores de NPY tipo 1 y 2.

### 2.3.2. El Sistema Central de Melanocortina

El SCM está constituido por circuitos neurales que forman un soporte neuroanatómico que es el encargado de procesar la información acerca de la situación energética del organismo (Cone, 2005; Williams y Schwartz, 2005; Adan, 2006; Sasaki y Kitamura, 2010).

Las neuronas del SCM se encuentran localizadas principalmente en el hipotálamo y expresan genes que codifican ligandos endógenos específicos de los receptores MCR.

En el SNC existen 5 tipos de receptores, aunque los más relevantes en la regulación de la homeostasis energética son MCR3 y MCR4 (Broberger, 2005; Cone, 2005; Nogueiras y cols., 2007; Crowley, 2008) los cuales se expresan en áreas cerebrales específicas implicadas en la ingesta como son el PVN y el LHA (Elmquist, 1998; Giraud y cols., 1998; Williams y Schwartz, 2005; Crowley, 2008).

Los ligandos endógenos de MCR implicados en el control metabólico son: la MSH ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -), que deriva del precursor de POMC con efectos anorexigénicos, y AgRP con efectos orexigénicos. La regulación del SCM sobre el metabolismo energético depende del balance que exista entre estos agonistas (MSH) y antagonistas (AgRP) (Williams y Schwartz, 2005; Adan, 2006; Ladyman y cols., 2010) que presentan una mayor afinidad por MCR4 (Mountjoy y cols., 1994; Crowley y cols., 2002; Kishi y cols., 2003; Nogueiras y cols., 2007).

En roedores la sobreactivación de los receptores MCR, así como, la eliminación de las neuronas que coexpresan NPY y AgRP, inducen una pérdida de peso e incluso anorexia (Yeo y cols., 1998). Por el contrario, se han descrito mutaciones en el gen que codifica al receptor MCR4 en humanos, que están asociadas con hiperfagia, obesidad, hiperinsulinemia y un aumento de adiposidad (Vaisse y cols., 1998; Yeo y cols., 1998; Farooqi y cols., 2000; Nogueiras y cols., 2007; Crowley, 2008).

Algunos fármacos han sido elaborados con el fin de regular la actividad del SCM y de este modo utilizarlos como tratamiento contra la obesidad (Adan, 2006), la diabetes y la caquexia (Cone, 2005). Sin embargo, sus efectos terapéuticos son discutibles, ya que, el SCM no sólo está implicado en la regulación y control de la ingesta, sino también regula la presión arterial, el ritmo cardiaco, la inflamación, la natriuresis y la función sexual (Cone, 2005).

### *2.3.3. Acciones de la leptina y la ghrelina en el hipotálamo*

En el hipotálamo, la leptina y la ghrelina actúan sobre las poblaciones neuronales, modulando la expresión y síntesis de sus neuropéptidos, y en consecuencia el apetito, la ingesta y el metabolismo sistémico.

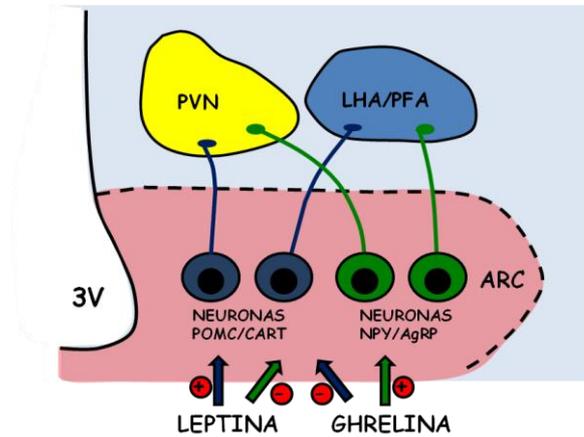
La leptina inhibe la expresión de los péptidos orexigénicos NPY, AgRP, orexina y GALP, y estimula la de los péptidos anorexigénicos POMC, CART, neurotensina, CRH y BDNF en el hipotálamo (Stephens y cols., 1995; Cusin y cols., 1996; Erickson y cols., 1996; Schwartz y cols., 1996b; Sahu, 1998; Mizuno y Mobbs, 1999; Meister, 2000; Cowley y cols., 2001; Kumano y cols., 2003).

La leptina es capaz de modular directamente la actividad de las neuronas de NPY y POMC a través de sus receptores, con el fin de regular el metabolismo energético y glucídico (Baskin y cols., 1999; Hill y cols., 2010; Williams y cols., 2010). Mediante estudios de electrofisiología e inmunohistoquímica se ha observado que, el 25-40% de las neuronas de POMC/CART en el hipotálamo mediobasal, presentan receptores de leptina funcionales (Williams y cols., 2010), así como, otros estudios inmunohistoquímicos han corroborado que la administración central de leptina produce la activación del 40% de las neuronas de POMC hipotalámicas (Xu y cols., 2007). Asimismo, en estudios en ratas se ha observado con técnicas de hibridación *in situ* que el 47% de las neuronas de NPY en el ARC expresan receptores funcionales de leptina, cuya expresión se ve incrementada en condiciones de ayuno (Baskin y cols., 1999).

Una vez que la leptina ha actuado sobre las neuronas del ARC, éstas informan a las neuronas que expresan MCR4, localizadas principalmente en el PVN (Jovanovic y Yeo, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que las neuronas del PVN (Ghamari-Langroudi y cols., 2011) y del LHA (Leininger y cols., 2009) también son capaces de responder directamente a la leptina con el fin de reducir la ingesta y el peso corporal. Por tanto, la leptina actúa sobre distintos núcleos hipotalámicos, aunque el ARC, el VMH y el DMH son considerados sus principales sitios de acción en la modulación del balance energético (Henry y Clarke, 2008).

La ghrelina estimula a las neuronas que expresan los neuropéptidos orexigénicos NPY, AgRP y orexina (Kamegai y cols., 2001; Nakazato y cols., 2001; Toshinai y cols., 2003) e inhibe a las neuronas que expresan los neuropéptidos anorexigénicos POMC y CRH en el hipotálamo (Cowley y cols., 2003).

La ghrelina actúa directamente sobre las neuronas de NPY del ARC, a través de los receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R), estimulando la expresión de NPY y AgRP y, de ésta manera, induce la ingesta y la ganancia de peso (Willeesen y cols., 1999). Sin embargo, la ghrelina no va actuar directamente sobre las neuronas de POMC/CART debido a que sus receptores GHS-R se localizan principalmente en las neuronas de NPY/AgRP, pero no en las neuronas de POMC/CART (<8%) (Willeesen y cols., 1999). Por tanto, la inhibición que ejerce la ghrelina sobre los neuropéptidos anorexigénicos será a través de la activación de las neuronas de NPY/AgRP que mediante la liberación de GABA van a antagonizar los efectos anorexigénicos de la leptina (Briggs y Andrews, 2011) (Figura 3).



**Figura 3. Efectos de la leptina y la ghrelina sobre las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo.**

La leptina y la ghrelina son capaces de modular la síntesis y liberación de los neuropeptidos hipotalámicos implicados en la regulación del balance energético. ARC: núcleo arcuato del hipotálamo; LHA: área hipotalámica lateral; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; APF: área perifornical del hipotálamo; 3V: tercer ventrículo; NPY: Neuropeptido Y; POMC: Pro-opiomelanocortina; AgRP: proteína relacionada con agouti; CART: transcrito regulado por amfetamina y cocaína.

### **3. La leptina y la ghrelina: hormonas periféricas moduladoras del balance energético**

#### **3.1. La leptina**

La leptina fue descubierta por Jeffrey Friedman y colaboradores en 1994 mediante el estudio de ratones mutantes para el gen de la leptina (*ob/ob*). La carencia de leptina sérica que presentaban estos ratones *ob/ob* está asociada con la aparición de hiperfagia, infertilidad, obesidad y diabetes tipo 2 (Ingalls y cols., 1950; Hummel y cols., 1966; Zhang y cols., 1994; Clément y cols., 1998). Este descubrimiento supuso un gran avance en el estudio de los factores derivados de los adipocitos implicados en la regulación de la homeostasis energética (Zhang y cols., 1994; Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2001; Frühbeck y cols., 2001; Mora y Pessin, 2002; Seeley y Woods, 2003; Banks, 2004).

La leptina es un polipéptido no glucosilado de 16 kDa codificado por el gen *ob* (Zhang y cols., 1994) que pertenece a la familia de las citoquinas. Presenta una estructura proteica muy similar al factor inhibitorio de la leucemia (LIF), al CNTF, a la oncostatina-M (OSM), a la cardiotrofina-1 (CT-1) y al de otras interleuquinas (IL-6, IL-11 e IL-12) (Zhang y cols., 1994; Madej y cols., 1995; Kline y cols., 1997; Frühbeck y cols., 1998; Prolo y cols., 1998).

Esta hormona es sintetizada y liberada principalmente por los adipocitos, aunque también son capaces de producirla otros tejidos como la placenta, la mucosa gástrica, el

epitelio mamario, la médula, el músculo esquelético, el hueso, el páncreas, el hipotálamo y la hipófisis (Smolinska y cols., 2004; Cammisotto y Bendayan, 2007).

Los niveles circulantes de leptina correlacionan con el IMC y con la masa de tejido adiposo (Argente y cols., 1997a; Frühbeck y cols., 1998; Frühbeck y cols., 2001; Banks, 2004; Pérez y cols., 2004). La cantidad de leptina circulante disponible en el organismo también está condicionada por otros factores como el sexo (Ostlund y cols., 1996; Kennedy y cols., 1997; Saad y cols., 1997; Martos-Moreno y cols., 2006; Martos-Moreno y cols., 2010), la edad (Ostlund y cols., 1996; Martos-Moreno y cols., 2006), el ejercicio (Hickey y cols., 1997; Keller y cols., 2005) y la absorción de glucosa (Wellhoener y cols., 2000).

#### • Los receptores de la leptina

La leptina actúa a través de receptores que se encuentran expresados en gran cantidad de tejidos. Su conformación estructural es muy similar a los receptores de las citoquinas de clase I como son los receptores de las interleuquinas -2, -3, -4, -6 y -7, el LIF (Tartaglia y cols., 1995), el factor de estimulación de granulocitos (G-CSF), la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL) y la eritropoyetina (Hegyí y cols., 2004). Existen al menos 6 isoformas de corte y empalme alternativas del gen que codifica el receptor de leptina (Ob-R) con dominios citoplasmáticos de diferentes longitudes, como son: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf (Lee y cols., 1996; Fei y cols., 1997). Estos receptores son glicoproteínas de membrana que tienen en común un dominio extracelular de unos 800 aminoácidos, un dominio transmembrana de 34 aminoácidos y un dominio intracelular variable característico de cada isoforma. Las distintas isoformas de Ob-R se pueden clasificar en tres grupos: las isoformas largas, las cortas y la secretada. Las isoformas cortas del receptor son Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf, y median el transporte intracelular y la degradación de la leptina en el interior de los lisosomas (Barr y cols., 1999). Los receptores Ob-Ra y Ob-Rc, se expresan principalmente en el plexo coroideo y en los microvasos, donde participan en la absorción de la leptina mediando su transporte a través de la BHE (Devos y cols., 1996; Hileman y cols., 2002; Bjørbaek y Kahn, 2004).

Sin embargo, es la isoforma larga del receptor, Ob-Rb, la que se considera responsable de los efectos centrales de la leptina sobre la ingesta (Tartaglia y cols., 1995; Glaum y cols., 1996; Mercer y cols., 1996; Elmquist y cols., 1997; Frühbeck, 2008). Este receptor se expresa principalmente en áreas hipotalámicas como el ARC, el LHA, el VMN y el DMN (Mercer y cols., 1996; Schwartz y cols., 1996b).

El receptor Ob-Re es una isoforma secretada que no posee dominio intracelular por lo que es conocida como el receptor soluble (Lee y cols., 1996). Este receptor se une a la leptina circulante, de modo que la leptina sistémica circulará libre o unida a Ob-Re (Sinha y cols., 1996). La leptina que circula libre puede degradarse rápidamente mediante proteólisis. Por tanto, el ratio entre la leptina circulante libre y la que se encuentra unida a Ob-Re es lo que determina la bioactividad y disponibilidad de la leptina, y este ratio dependerá del estado nutricional y metabólico del individuo (Houseknecht y cols., 1996).

Los receptores de leptina en el hipotálamo son considerados esenciales en el control de la termogénesis y la función neuroendocrina (Elmqvist y cols., 1998a; Friedman y Halaas, 1998; Karsenty, 2001). Sin embargo, las distintas isoformas de Ob-R también se expresan en otras regiones cerebrales como el hipocampo, el cerebelo, el encéfalo y la amígdala (Elmqvist y cols., 1998a; Håkansson y cols., 1998; Shanley y cols., 2002), así como, en distintos tejidos periféricos como el tejido adiposo, el hígado, el estómago, el ovario y la placenta entre otros (Zhang y cols., 1994; Mantzoros, 1999).

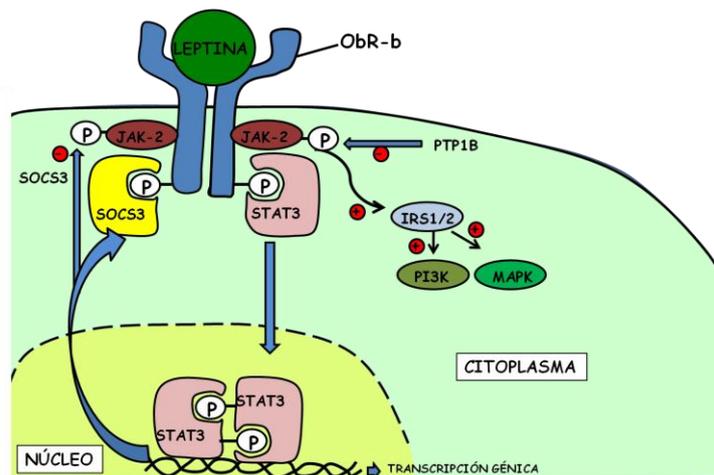
#### • Principales vías de señalización de la leptina

Durante los últimos años se ha avanzado considerablemente en el estudio de las vías de señalización en las que actúa la leptina, así como, en la comprensión de los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en el funcionamiento de la misma.

La leptina (Figura 4) puede actuar uniéndose a la isoforma larga de su receptor, Ob-Rb, o a los receptores de la familia de las citoquinas de clase I debido a su gran homología con la glicoproteína 130 (gp130), subunidad de la familia del receptor de IL-6 (Houseknecht y Portocarrero, 1998). La unión de la leptina a su receptor activa a la tirosina quinasa intracelular tipo 2 de la familia de las *Janus* quinasas (JAK-2) que fosforila residuos de tirosina del receptor funcional de leptina y al mismo tiempo se autofosforila activando a los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), incluyendo STAT-3, -5 y -6, que son los que se han descrito en relación con Ob-Rb (Sweeney, 2002). Una vez que se fosforila STAT, por acción de JAK, se induce su dimerización y translocación al núcleo favoreciéndose la transcripción de sus genes diana (Houseknecht y Portocarrero, 1998). Diversos estudios demuestran que únicamente Ob-Rb es capaz de activar la vía de JAK-STAT, ya que, para ello se requiere la presencia del dominio intracelular del receptor (Ghilardi y cols., 1996; Lee y cols., 1996; Vaisse y cols., 1996).

La vía de las tirosinas quinasas JAK/STAT está controlada y regulada por proteínas supresoras de la señalización de las citoquinas de tipo 3 (SOCS-3), involucradas en el mecanismo inhibitorio de la señalización de la leptina (Bjørbaek y cols., 1998; Sahu, 2004; Münzberg y Myers, 2005; Myers y cols., 2008). Varios estudios han demostrado la importancia de SOCS-3 para determinar el grado de sensibilidad de un tejido a esta hormona (Bjørbaek y cols., 1998; Bjørbaek y cols., 1999). Además de SOCS-3, la proteína fosfatasa 1B (PTP-1B) también participa en la regulación inhibitoria de la señalización de la leptina, defosforilando a JAK-2 (Kaszubska y cols., 2002; Zabolotny y cols., 2002).

Por otro lado, existen otras vías que se activan mediante la fosforilación de JAK-2 como son la regulada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como es la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), y la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que a su vez fosforila a la quinasa de serina/treonina (Akt) (Watowich y cols., 1996; Sanchez-Margalet y Martin-Romero, 2001). La ruta PI3K/Akt representa el comienzo de una cascada de señalización que va a mediar los efectos de varias citoquinas proinflamatorias. El receptor de leptina, a través de JAK-2, puede fosforilar a las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) e iniciar la vía de señalización IRS-PI3K/Akt (Szanto y Kahn, 2000; Niswender y cols., 2001; Enriori y cols., 2006; Myers y cols., 2008). Se ha demostrado que la activación de la vía PI3K por acción de la leptina es fundamental en la regulación del metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad periférica a la insulina.



**Figura 4. Vías de señalización de la leptina.** La leptina puede actuar uniéndose a la isoforma larga de su receptor (Ob-Rb) fosforilando y activando a JAK-2. JAK2 fosforilado activa a STAT3 que se dimeriza y transloca al núcleo donde va a regular la transcripción de distintos genes diana, entre ellos SOCS3 que ejerce, junto con la PTP1B, un efecto inhibitorio sobre la señalización de la leptina. JAK2 cuando se fosforila también es capaz de fosforilar a IRS1/2, responsable de la activación de PI3K, y la vía de las MAPKs. IRS1/2: proteínas del sustrato del receptor de insulina 1/2; JAK2: tirosina quinasa intracelular

tipo 2 de la familia de las *Janus* quinasas; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; PI3K: proteína fosfatidilinositol 3 quinasa; PTP1B: proteína fosfatasa 1B; SOCS3: proteína supresora de la señalización de las citoquinas de tipo 3; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3.

### *3.1.1. El papel de la leptina en el desarrollo*

En los ratones, la leptina empieza a sintetizarse a partir de la segunda semana postnatal cuando todavía no se han establecido las conexiones sinápticas entre las neuronas del ARC (Bouret y cols., 2004a). Estudios en ratones han demostrado que la administración periférica de leptina incrementa la actividad neuronal en el PVN y LHA en el día 10 y 16 de vida respectivamente, coincidiendo con el momento en el que se produce la maduración de las conexiones eferentes procedentes del ARC (Bouret y cols., 2004a). Por tanto, la leptina durante el periodo perinatal actúa principalmente como factor neurotrófico implicado en la génesis y el desarrollo neuronal (Bereiter y Jeanrenaud, 1979; Garris, 1989; Ahima y cols., 1999; Steppan y Swick, 1999), siendo sus efectos sobre la ingesta mínimos o inexistentes en este periodo (Mistry y cols., 1999; Proulx y cols., 2002; Bouret y cols., 2004b). Esto explica por qué los ratones *ob/ob* al nacer presentan un peso normal (Bouret y Simerly, 2004), aunque muestran alteraciones neuroanatómicas importantes.

Algunos estudios han demostrado que los ratones *ob/ob* tienen las neuronas del PVN y LHA menos inervadas por las neuronas del ARC que los ratones control (Bouret y cols., 2004b). Sin embargo, si a estos ratones se les administra leptina se consigue incrementar la inervación de estas neuronas hasta valores normales, pero sólo durante el periodo perinatal, ya que, no se observa ningún efecto si la leptina se administra durante la etapa adulta (Bouret y cols., 2004b).

Por tanto, la leptina además de ser clave en la regulación del balance energético también es un importante factor trófico durante el desarrollo del SNC, especialmente para los circuitos implicados en el control metabólico (Ahima y cols., 1998).

### *3.1.2. El papel de la leptina en la regulación del balance energético*

Los efectos metabólicos de la leptina sobre el SNC han sido ampliamente descritos en humanos (Heymsfield y cols., 1999), primates no-humanos (Tang-Christensen y cols., 1999), roedores (Campfield y cols., 1995; Halaas y cols., 1995) y ovejas (Henry y cols., 1999).

La leptina circulante atraviesa la BHE (Banks, 2006; Kalra, 2008) por un sistema de transporte saturado mediado por el Ob-Ra (Tartaglia y cols., 1995; Henry y Clarke, 2008). Una vez llega al cerebro, la leptina actúa (Zhang y cols., 1994; Schwartz y cols., 2000; Faouzi y cols., 2007) inhibiendo la ingesta e incrementando el gasto energético (Schwartz y Porte, 2005). Se considera que la leptina incrementa el gasto energético a expensas de aumentar la termogénesis del tejido adiposo (Sahu, 2002).

Estudios en roedores han demostrado que la falta de receptor Ob-Rb, específicamente en las neuronas de NPY/AgRP y POMC/CART, promueve la acumulación de tejido adiposo (Balthasar y cols., 2004; van de Wall y cols., 2008) y una hiperfagia transitoria que desaparece en la etapa adulta (van de Wall y cols., 2008). Sin embargo, si los ratones presentan una falta de Ob-Rb en todo el SNC (*db/db*) la hiperfagia y obesidad se va mantener durante toda la vida (Cohen y cols., 2001; Balthasar y cols., 2004). Este hecho corrobora que no sólo la leptina ejerce sus efectos metabólicos sobre las neuronas del ARC sino también, sobre las neuronas localizadas en otros núcleos hipotalámicos como el PVN, el DMH, el VMH y el LHA (Elmqvist y cols., 1998b; Iqbal y cols., 2001; Bingham y cols., 2008).

Asimismo, se ha descrito que la leptina ejerce otras acciones neuroendocrinas, ya que, alteraciones en su sensibilidad, producidas por mutaciones, restricción calórica o un peso corporal bajo, afectan a la capacidad reproductiva del individuo (Gueorguiev y cols., 2001). Por tanto, la integridad del sistema de la leptina no es únicamente fundamental para el mantenimiento del peso corporal y la adiposidad, sino también para la funcionalidad de otros sistemas fisiológicos.

### *3.1.3. El papel de la leptina en la obesidad*

Los ratones *ob/ob* y *db/db* presentan hiperfagia y obesidad severa (Chua y cols., 1996; Coll y cols., 2007). Del mismo modo, en humanos, las mutaciones que afectan a la funcionalidad de esta hormona están asociadas con obesidad mórbida (Zhang y cols., 1994; Chen y cols., 1996; Lee y cols., 1996) y pueden ser tratadas con leptina recombinante humana de forma eficaz (Farooqi y cols., 1999). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los individuos obesos desarrollarán una resistencia a la leptina, siendo ineficaz el tratamiento con esta hormona. Por tanto, la resistencia a la leptina contribuye a la patogénesis de la obesidad y a la aparición de la diabetes tipo 2 (Ceddia y cols., 2002; Benomar y cols., 2005).

Esta resistencia a leptina se cree que se debe a una reducción en el transporte de esta hormona a través de la BHE y a una falta de respuesta por parte de las neuronas hipotalámicas (El-Haschimi y cols., 2000). Los niveles de expresión de Ob-Ra y Ob-Re van a regular, al menos en parte, la disponibilidad de la leptina en el cerebro. Los individuos con obesidad inducida por dieta tienen menores niveles de expresión de Ob-Re (Heaney y Golde, 1993) y Ob-Ra en el hipotálamo (Schwartz y cols., 1996a; Madiehe y cols., 2000; Banks y cols., 2006). Además, durante el desarrollo de la obesidad, se incrementan los niveles circulantes de citoquinas y otros factores de crecimiento hematopoyéticos que van a unirse a Ob-Re (Tu y cols., 2008) modificando su conformación y evitando que se una a la leptina circulante libre.

Del mismo modo, estudios en animales con obesidad exógena han dejado patente que, en muchos casos, existe una falta de respuesta a la leptina en las neuronas hipotalámicas implicadas en la regulación de la ingesta, ya que, a pesar de presentar los niveles circulantes de leptina elevados, los niveles de  $\alpha$ -MSH en el ARC son muy bajos (Enriori y cols., 2007). Sin embargo, otros autores demuestran que la sensibilidad a la leptina no siempre se ve alterada por la ganancia de peso (Cummings y cols., 2011). En estos casos la leptina puede utilizarse como herramienta terapéutica para mejorar la sensibilidad a insulina en ratones con diabetes tipo 2 (Cummings y cols., 2011).

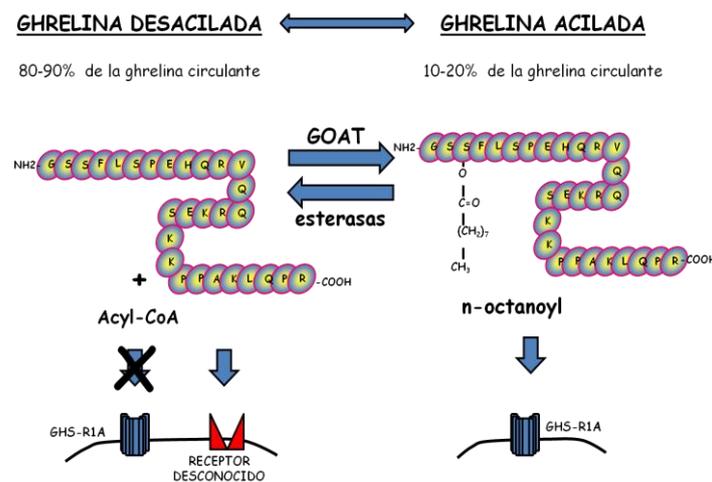
### 3.2. La ghrelina

La ghrelina, descubierta por Kojima y colaboradores en 1999, es un ligando endógeno del receptor de secretagogos de GH sintetizado principalmente por las células oxínticas del estómago (Date y cols., 2000). También puede ser secretada por otros tejidos periféricos como el tracto intestinal, el páncreas, el ovario y la corteza adrenal (Kojima y cols., 1999; Date y cols., 2000; Date y cols., 2002; Gaytan y cols., 2003; Tortorella y cols., 2003). En el SNC se han identificado neuronas capaces de producir ghrelina en la hipófisis, en el ARC y en un grupo de neuronas adyacentes al tercer ventrículo entre los núcleos DMH, VMN, PVN y ARC (Kojima y cols., 1999; Korbonits y cols., 2001; Cowley y cols., 2003).

La ghrelina es una molécula de 28 aminoácidos que existe en forma acilada y desacilada, en función de la unión o no a su serina 3 de un ácido octanoico, responsable del efecto estimulador de la ghrelina en la secreción de GH en la hipófisis (Kojima y cols., 1999; Kojima y Kangawa, 2002; Muccioli y cols., 2002). El proceso responsable de la octanoacilación de la ghrelina depende de la acción de una enzima, la ghrelina O-aciltransferasa (GOAT), sintetizada por el estómago que va a mediar la acción biológica

de la ghrelina a través de la isoforma 1a de GHS-R (GHS-R1a) (Gutierrez y cols., 2008; Yang y cols., 2008).

En el plasma sólo del 2 al 20% de la ghrelina total se encuentra en la forma acilada (Hosoda y cols., 2000; Akamizu y cols., 2005; Nishi y cols., 2005; Sato y cols., 2005) debido a que se metaboliza más rápidamente en la circulación (Akamizu y cols., 2004). Además, en la sangre y en el estómago existen desacilasas (esterasas) que son las encargadas de eliminar el ácido octanoico de la ghrelina y de este modo conseguir desacilarla (Salehi y cols., 2004; Qader y cols., 2008) (Figura 5).



**Figura 5. Proceso de acilación y desacilación de la ghrelina circulante.** En el estómago la enzima GOAT (ghrelina O-aciltransferasa) es la encargada de añadir el grupo acilo a la ghrelina, mientras que, las desacilasas (esterasas) serán las encargadas de eliminarlo. La presencia del grupo octanoico de la ghrelina va a determinar su unión con los receptores de secretagogos de la hormona de crecimiento 1a (GHS-R1A).

La secreción de ghrelina no solo depende de la ingesta (Tschöp y cols., 2000; Ariyasu y cols., 2001; Cummings y cols., 2001) y del IMC del individuo (Ariyasu y cols., 2001; Otto y cols., 2001; Hansen y cols., 2002; Martos-Moreno y cols., 2011), sino también, de la edad (Rigamonti y cols., 2002), el sexo (Barkan y cols., 2003; Chan y cols., 2004; Martos-Moreno y cols., 2010) y los niveles de GH (Korbonits y cols., 2004), glucosa (Nakagawa y cols., 2002; Martos-Moreno y cols., 2011) e insulina circulante (Anderwald y cols., 2003; Granado y cols., 2010).

• **Los receptores de la ghrelina**

La ghrelina se une a los GHS-R, que fueron identificados por Howard y colaboradores en 1996. Existen dos formas de procesamiento del gen GHS-R que dan

lugar a GHS-R1a y a la isoforma 1b de GHS-R (GHSR-1b) (Howard y cols., 1996; Petersenn y cols., 2001).

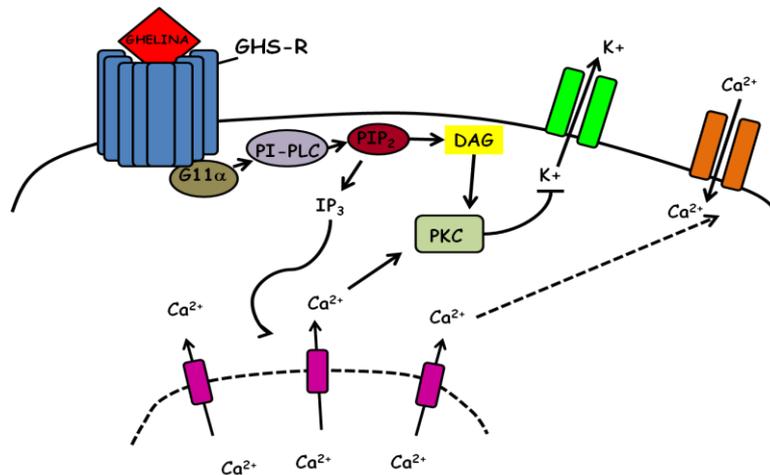
El residuo de ácido octanoico de la ghrelina es esencial para la unión y activación del subtipo GHS-R1a, conocido como el receptor funcionalmente activo que se expresa principalmente en el hipotálamo y en la hipófisis (Kojima y cols., 1999; Matsumoto y cols., 2001; Muccioli y cols., 2002). Este receptor media las acciones endocrinas y algunas no endocrinas inducidas por la ghrelina (Camiña, 2006). Asimismo, la ghrelina desacilada también ejerce acciones biológicas no endocrinas, participando en la proliferación y el metabolismo celular (Baldanzi y cols., 2002; Muccioli y cols., 2002; Bedendi y cols., 2003; Cassoni y cols., 2004; Thompson y cols., 2004), así como, se cree que ejerce posibles efectos endocrinos. La identificación del receptor, o receptores, responsables de las acciones biológicas de la ghrelina desacilada está todavía por esclarecer.

La ghrelina también va a ejercer otras acciones en los tejidos periféricos como el tracto gastrointestinal, además de estar implicada en la activación del sistema inmune (Date y cols., 2001; Dixit y cols., 2004).

#### • Las vías de señalización de la ghrelina

La unión de la ghrelina a GHS-R1a (Figura 6) induce un cambio conformacional en las hélices  $\alpha$  transmembrana de este receptor que promueve la conversión de guanosina difosfato (GDP), convirtiéndose en guanosina trifosfato (GTP). Esta activación inicia una cascada de señalización en la que actúan segundos mensajeros que median la regulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , dando lugar a un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (McKee y cols., 1997; Camiña, 2006).

También se conoce el efecto proliferativo y diferenciador de la ghrelina en diversos tipos celulares, a través de la activación de las cascadas de señalización de la PI3K/Akt y las MAPKs (Andreis y cols., 2003; Mazzocchi y cols., 2004). De especial relevancia es la capacidad de la ghrelina para modular la actividad de la proteína quinasa activada por 5'-adenosín monofosfato (AMPK), enzima clave en la regulación de la homeostasis energética. Aunque su mecanismo no es del todo conocido, se sabe que la ghrelina promueve la activación de esta proteína en el hipotálamo, incrementando el apetito (Andersson y cols., 2004; Carling, 2005). Por el contrario, la ghrelina disminuye la AMPK en el hígado, generando un estado lipogénico y glucogénico (Barazzoni y cols., 2005). También se ha descrito que la ghrelina activa la óxido nítrico sintasa (NOS) en el hipotálamo dando lugar a un incremento del apetito (Gaskin y cols., 2003).



**Figura 6.** Vía de señalización de la ghrelina implicada en la movilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La ghrelina activa a su receptor dando lugar a su interacción con una proteína  $G\alpha_q/11$ , que a su vez activa a la fosfolipasa C de fosfatidilinositol (PI-PLC) generando dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ). Esta activación va a inducir la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los compartimentos intracelulares sensibles a  $\text{IP}_3$  y la activación de la proteína-quinasa C (PKC). La PKC inhibe los canales de  $\text{K}^+$  que causan la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L y tipo T. Flechas punteadas: flujo alternativo de  $\text{Ca}^{2+}$  que favorece la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática.

### 3.2.1. El papel de la ghrelina en la regulación del balance energético

En individuos sanos los niveles circulantes de ghrelina se incrementan durante el ayuno con el fin de promover la iniciación de la ingesta. En cambio, durante el consumo de nutrientes, los niveles disminuyen al igual que lo hace el apetito. De este modo, la administración de ghrelina exógena aumenta el apetito y la ingesta, tanto en individuos sanos como obesos (Wren y cols., 2001; Tassone y cols., 2003; Schmid y cols., 2005).

La ghrelina es liberada desde el estómago al torrente sanguíneo, atraviesa la BHE y se une a sus receptores en el hipotálamo (Banks y cols., 2002; Tortorella y cols., 2003; Korbonits y cols., 2004). También es sintetizada localmente en el hipotálamo actuando directamente en núcleos hipotalámicos específicos (Cowley y cols., 2003; Korbonits y cols., 2004).

La ghrelina ejerce un efecto a corto plazo regulando la ingesta, pero también induce otros efectos a largo plazo sobre el peso, ya que, favorece la adipogénesis (Tschöp y cols., 2000; Lall y cols., 2004) y la hipertrofia de los adipocitos (Granado y cols., 2010). La administración periférica y diaria de ghrelina induce un aumento en la

adiposidad (Granado y cols., 2010), a expensas de reducir el metabolismo lipídico (Tschöp y cols., 2000).

Algunos estudios han demostrado que la ghrelina desacilada también tiene un papel importante en el balance energético (Asakawa y cols., 2005; Zhang y cols., 2005). Sin embargo, existe controversia acerca del mismo, ya que, se ha descrito que la administración central de ghrelina desacilada puede tanto aumentar (Toshinai y cols., 2006) como una inhibir la ingesta de las ratas (Asakawa y cols., 2005). Asimismo, se ha demostrado que la disfuncionalidad de la ghrelina desacilada puede estar asociada con el desarrollo de obesidad (Klok y cols., 2007).

Sin embargo, la ghrelina no resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética. Los ratones “knockout” de ghrelina (ghrelina<sup>-/-</sup>) o con alteraciones en la funcionalidad de GHS-R, no muestran alteraciones metabólicas de ningún tipo en una situación de ayuno, presentando una disminución normal de sus niveles séricos de leptina e insulina (Sun y cols., 2004). Asimismo, los ratones adultos con alteraciones en la funcionalidad de GHS-R únicamente muestran una ligera reducción en el peso corporal relacionado con la falta de liberación de GH inducida por la ghrelina (Klok y cols., 2007). Por tanto, estos resultados sugieren que podrían existir otros agentes estimuladores del apetito capaces de compensar la falta de funcionalidad de la ghrelina (Klok y cols., 2007).

### *3.2.2. El papel de la ghrelina en la obesidad*

En la obesidad los niveles circulantes de ghrelina están disminuidos para reducir los efectos orexigénicos de esta hormona en el SNC y disminuir el peso (Tschöp y cols., 2001). Sin embargo, este hecho puede contribuir, en parte, a la aparición de la obesidad (Furuhata y cols., 2000) y la diabetes tipo 2 (Pöykkö y cols., 2003), puesto que, los niveles bajos de ghrelina reducen la producción y secreción de GH en la hipófisis (Argente y cols., 1997b; Veldhuis y Bowers, 2010). Estudios en ratones obesos han demostrado que la administración de ghrelina es capaz de restaurar la secreción de GH, sin embargo, debido a sus efectos orexigénicos puede empeorar la obesidad (Iwakura y cols., 2007).

Los pacientes obesos, al contrario de lo que sucede en ocasiones con la leptina, no muestran una pérdida en la sensibilidad a la ghrelina ni tampoco una alteración en el transporte de esta hormona a través de la BHE. Los individuos obesos pueden ser más sensibles a la ghrelina, ya que, se ha demostrado que con una dosis de ghrelina mínima se incrementa su ingesta, mientras que, en individuos con normopeso esta dosis es

ineficaz (Druce y cols., 2006). Esta hipersensibilidad a ghrelina asociada al desarrollo de obesidad puede ser debida a un aumento en la expresión de GHS-R en humanos (Klok y cols., 2007). Sin embargo, en roedores se ha comprobado que la sobreexpresión de GHS-R no afecta a la ingesta ni promueve modificaciones en el tejido adiposo (Lall y cols., 2004).

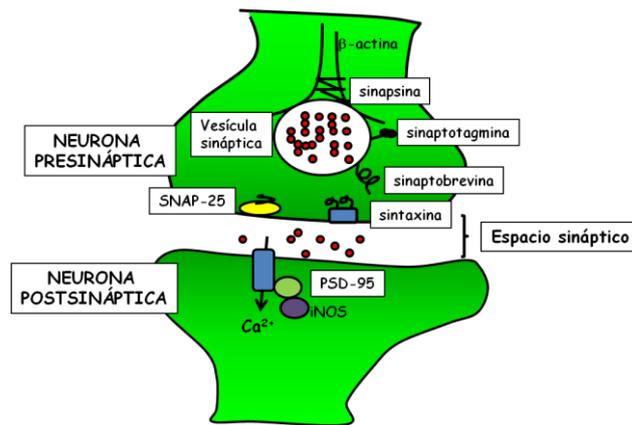
En ratones, tanto sanos como obesos, la administración de antagonistas de GHS-R logran reducir la ingesta (Asakawa y cols., 2003), pero hasta ahora se desconoce su efecto en humanos. Otros estudios que han utilizando antagonistas específicos de GHS-R1a han determinado que existen componentes capaces de bloquear completamente la liberación de GH en respuesta a la ghrelina, pero que no logran modificar el efecto que ejerce esta hormona sobre la ganancia de peso (Halem y cols., 2005). De modo, que se especula que la acción de la ghrelina sobre la regulación de la ingesta podría estar mediado por otro receptor, distinto de GHS-R1a, hasta ahora desconocido (Klok y cols., 2007).

#### **4. La conectividad en el Sistema Nervioso Central: sinapsis química**

La sinapsis química es la forma de comunicación más abundante entre las neuronas del SNC. Se compone de una neurona presináptica, una neurona postsináptica y un espacio sináptico que las separa, al cual liberan neurotransmisores que transmiten la señal nerviosa.

La transmisión sináptica química se inicia por la liberación de neurotransmisores procedentes de la neurona presináptica (Katz y cols., 1969). Esta excitación requiere la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$ , que promueven la fusión de las vesículas que contienen los neurotransmisores, con la membrana presináptica (Augustine y cols., 1985). Una vez en el espacio sináptico los neurotransmisores son endocitados por la neurona postsináptica o bien son recaptados por la neurona presináptica o por los astrocitos adyacentes a través de transportadores activos específicos para su reciclaje (Ceccarelli y cols., 1973; Heuser y Reese, 1973; Schweizer y Ryan, 2006).

Existen sinapsis de tipo excitatorio e inhibitorio que van a utilizar distintos neurotransmisores. Los más abundantes son el L-glutamato (sinapsis excitatorias) y el GABA (sinapsis inhibitorias). El balance fisiológico óptimo entre estos dos tipos de sinapsis es indispensable para una correcta regulación que ejerce el cerebro sobre el resto de tejidos y órganos. En esta regulación sináptica existen un gran número de proteínas que son esenciales para la transmisión de la señal nerviosa (Figura 7).



**Figura 7. Proteínas implicadas en la conectividad sináptica.** Las proteínas de la neurona presináptica están implicadas en el transporte y la liberación de las vesículas sinápticas y en la fusión de las vesículas con la membrana de la neurona presináptica. Las proteínas postsinápticas estarán implicadas en la recepción de la señal en la neurona postsináptica. SNAP 25: proteína sinaptosomal asociada a 25; PSD95: proteína de densidad postsináptica 95; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

#### 4.1. Proteínas de la neurona presináptica

En la neurona presináptica existe una familia de más de 60 proteínas, las SNAREs (Receptores Solubles de Anclaje del Factor Sensible a N-etilmaleimida) involucradas en la exocitosis del neurotransmisor. Durante la exocitosis del neurotransmisor, unas proteínas interaccionan con otras formando el complejo SNARE (Zamponi, 2003). Previo a este proceso, debe existir una agrupación de vesículas próximas al botón sináptico que almacenen el neurotransmisor, de lo que se encarga la familia de las sinapsinas que se expresan en diferentes terminaciones sinápticas (Südhof y cols., 1989; Hosaka y Südhof, 1998; Kao y cols., 1998; Kao y cols., 1999; Cesca y cols., 2010). Estas proteínas anclan las vesículas sinápticas al citoesqueleto de actina, manteniéndolas cerca del botón sináptico y evitando que éstas se liberen en ausencia de estímulo nervioso. Cuando reciben el impulso nervioso las sinapsinas son fosforiladas por una proteín-quinasa A (PKA) dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina ( $Ca^{2+}$ /CaMK II), liberando los neurotransmisores contenidos en las vesículas que viajarán a la membrana postsináptica (Czernik y cols., 1987; Fdez y Hilfiker, 2006).

Entre las proteínas que conforman el complejo SNARE podemos distinguir dos tipos: las v-SNAREs localizadas en la membrana de las vesículas sinápticas y las t-SNAREs localizadas en la membrana plasmática de la neurona presináptica (Rothman, 1994).

En las v-SNAREs, destacan dos familias principalmente, las proteínas de membrana asociadas a la vesícula (VAMP), llamadas también sinaptobrevinas y las sinaptotagminas.

- Las sinaptobrevinas son una familia de proteínas sinápticas implicadas en el anclaje y fusión de la vesícula a la membrana presináptica, formando complejos estables con algunas t-SNAREs y con la sinaptotagmina.

- Las sinaptotagminas son una familia de proteínas presinápticas conocidas por actuar como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que determinan el inicio de la exocitosis vesicular. Están implicadas en el anclaje de las vesículas a la membrana presináptica mediante la interacción con syntaxina (Geppert y cols., 1994) y con la proteína sinaptosomal asociada a 25 (SNAP25) (Verona y cols., 2000), que pertenecen a la familia de las t-SNAREs (Jahn y Südhof, 1994; Chen y Scheller, 2001). Por tanto, en las t-SNAREs destacamos:

- Las syntaxinas presentan un dominio transmembrana C-terminal el cual podría formar parte del poro de fusión durante la exocitosis de neurotransmisores. Estas proteínas interactúan con la sinaptobrevina y con SNAP25 formando el complejo SNARE (Sutton y cols., 1998). La unión dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con la sinaptotagmina promueve la interacción de las syntaxinas con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje permitiendo la aproximación física entre la maquinaria de fusión de membranas y los canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la despolarización del botón sináptico (Han y cols., 2004).

- Por último, SNAP25 es una proteína de 25 kDa asociada a los sinaptosomas y cuya acción es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Linial, 1997). Se localiza anclada a la membrana presináptica y contribuye a la formación del complejo de exocitosis formado por 2  $\alpha$ -hélices. Sólo se encuentra en sinapsis glutamatérgicas, donde inhibe los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo P/Q y L, implicados en la regulación de la secreción hormonal de las células endocrinas (Leabu, 2006).

#### **4.2. Proteínas de la neurona postsináptica**

La segunda fase de la transmisión sináptica es la recepción de la señal mediante la unión del neurotransmisor a su receptor en la membrana postsináptica. Dependiendo del tipo de sinapsis, se liberan a la hendidura sináptica distintos neurotransmisores, existiendo distintas proteínas implicadas en transmitir la señal específica en función del

neurotransmisor. Diversos estudios han evidenciado que en respuesta a la ghrelina las neuronas promueven la formación de sinapsis de tipo excitatorio, concretamente sinapsis glutamatérgicas (Aguilar y cols., 2005), por lo que nos centramos en ellas al ser también las más abundantes en el SNC.

En este tipo de sinapsis el L-glutamato liberado al espacio sináptico, puede unirse a varios tipos de receptores en la membrana postsináptica: los receptores ionotrópicos y los metabotrópicos.

Los receptores ionotrópicos son receptores canal que al activarse permiten la entrada de iones al citoplasma de la neurona postsináptica. Existen 3 clases: los receptores de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), los receptores de tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y los receptores de tipo kainato (ácido kaínico).

Los receptores de tipo NMDA están incluidos en un citoesqueleto especializado subyacente a la membrana de la célula postsináptica conocido como densidad postsináptica (DPS). Esta DPS está constituida por diferentes tipos de proteínas que interaccionan entre sí y con el citoesqueleto formando un complejo multimolecular. Uno de los principales componentes de la DPS es la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) (Lau y Zukin, 2007). La PSD-95 pertenece a la familia de proteínas de las gualinato-quinasa asociadas a la membrana (MAGUK) y es la responsable de formar el complejo entre el receptor NMDA y la NOS neuronal. Esta proteína requiere  $Ca^{2+}$  para su activación, y está implicada en la transmisión del impulso nervioso en la neurona postsináptica (Elias y Nicoll, 2007).

Los receptores metabotrópicos (mGluR) son los que promueven la activación de cascadas de segundos mensajeros en la neurona postsináptica. La activación de estos receptores de membrana supone un cambio de potencial de acción en la neurona postsináptica, la cual se despolariza y favorece que se transmita la señal nerviosa.

La terminación de la señal es un proceso altamente regulado y necesario para que las neuronas no pierdan su excitabilidad por estar permanentemente despolarizadas. En este proceso influyen diversos factores: por un lado, la vida media química del neurotransmisor, ya que, algunos van a ser degradados en el espacio sináptico, como la acetilcolina y algunos péptidos, siendo reciclados por la neurona presináptica; por otro lado, la desensibilización de los receptores; y por último existen transportadores activos, generalmente en la membrana de la neurona presináptica y en la glía adyacente, que

retiran el neurotransmisor del espacio sináptico, favoreciendo el cese de la transducción de la señal a la neurona postsináptica.

### **4.3. La plasticidad sináptica**

La plasticidad sináptica es la habilidad que tienen las neuronas de modificar su capacidad de conexión y comunicación entre ellas. A lo largo de nuestra vida, la conectividad sináptica del cerebro va a cambiar de manera constante, siendo esencial para el desarrollo y la interacción del individuo con el ambiente. De este modo, la plasticidad de nuestro cerebro será mayor durante el desarrollo y disminuirá en el adulto.

#### *4.3.1. La plasticidad sináptica en el control metabólico*

Las neuronas que forman parte de los circuitos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta son sensibles a sufrir alteraciones en su conectividad sináptica en respuesta a cambios nutricionales (Tung y cols., 2008; Jovanovic y Yeo, 2010). Como hemos mencionado anteriormente, la leptina y la ghrelina actúan modificando la conectividad entre las neuronas del SNC regulando las distintas respuestas fisiológicas del individuo. Sin embargo, estos cambios sinápticos pueden también estar involucrados en el desarrollo de patologías como la obesidad (Pinto y cols., 2004).

#### *4.3.2. Implicación de la leptina en la plasticidad sináptica*

En ratones adultos *ob/ob* se ha observado que la administración de leptina favorece el desarrollo de espinas dendríticas que contribuyen al incremento de la eficiencia sináptica neuronal en el hipocampo (Li y cols., 2001). Del mismo modo, se ha demostrado que la leptina es capaz de promover cambios en la densidad y motilidad de filopodios dendríticos en neuronas en cultivo (O'Malley y cols., 2007).

Además, cada vez existen más estudios que resaltan la importancia de la leptina en la remodelación sináptica en otras regiones cerebrales como el hipotálamo (Bouret y cols., 2004a; Pinto y cols., 2004; Horvath y Gao, 2005; Sternson y cols., 2005) donde en ratones *ob/ob* la administración de leptina induce una reorganización sináptica en el ARC, incluso antes de que se detecten los efectos de esta hormona sobre la ingesta o el peso de los ratones (Pinto y cols., 2004).

#### *4.3.3. Implicación de la ghrelina en la plasticidad sináptica*

Los niveles circulantes de ghrelina también son capaces de regular la conectividad sináptica del SNC. En roedores se ha observado que, en condiciones de restricción

calórica, cuando los niveles de ghrelina en plasma son muy elevados, se producen modificaciones tanto en la expresión de orexina como en la remodelación sináptica de las neuronas del LHA (Horvath y Gao, 2005). Además, parece ser que estos cambios sinápticos en las neuronas de orexina también afectan a las neuronas de NPY del ARC (Horvath y Gao, 2005). Asimismo, existen estudios en ratones *ob/ob* que han demostrado que la administración de ghrelina induce una reorganización del número de sinapsis excitatorias e inhibitorias en el ARC (Pinto y cols., 2004).

En otros estudios se ha observado los efectos de la administración de ghrelina en el núcleo segmental ventral (VTA), donde esta hormona es capaz de inducir cambios en la actividad neuronal, en la formación de nuevas sinapsis y en el recambio celular de las neuronas dopaminérgicas implicadas en el circuito mesolímbico regulador del comportamiento de búsqueda de recompensa. Además, la acción que tiene la ghrelina sobre la conectividad de las neuronas de dopamina parece estar mediada por GHS-R1a (Abizaid y cols., 2006).

## **5. Los astrocitos: células gliales indispensables en el Sistema Nervioso Central**

En el SNC existen, además de las neuronas, otros tipos celulares, que ocupan la mayor parte del cerebro adulto, conocidos comúnmente como la glía. Existen distintos tipos de glía en el cerebro: los astrocitos, los oligodendrocitos, la microglía y las células positivas para el proteoglicano de condroitín-sulfato (NG2). Todas estas células actúan de manera conjunta, llevando a cabo multitud de funciones esenciales para la fisiología y desarrollo del SNC. Sus funciones son muy diversas, desde actuar como soporte trófico de las neuronas, hasta modular la conectividad y eficacia sináptica neuronal (Freeman, 2010).

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y ocupan más del 50% del volumen total del cerebro (Freeman, 2010). La mayoría son identificados por la expresión de un filamento intermedio característico y exclusivo de este tipo celular, la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), aunque no todos los astrocitos la expresan.

Los astrocitos, al igual que las neuronas, presentan multitud de fenotipos a lo largo de las diferentes regiones cerebrales (Mong y Blutstein, 2006), lo que implicará una expresión diferencial de sus receptores para moléculas como el ATP, el glutamato, el GABA, la glicina, la melanocortina, la norepinefrina, el NPY, los glucocorticoides, los andrógenos, el IGF-I, los estrógenos y la leptina, entre otros (Hösli y Hösli, 1987; Langub y Watson, 1992; Jursky y Nelson, 1996; Diano y cols., 1998; Anderson y Swanson, 2000; Donahue y

cols., 2000; Schousboe, 2000; Verkhratsky y Steinhäuser, 2000; Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Kruijver y cols., 2002; Chaban y cols., 2004; Garcia-Segura y McCarthy, 2004; Cheunsuang y Morris, 2005; Lorenz y cols., 2005; Caruso y cols., 2007).

### 5.1. La Sinapsis tripartita: la comunicación entre astrocitos y neuronas

La comunicación bidireccional entre los astrocitos y las neuronas es lo que se conoce como “Sinapsis tripartita” (Araque y cols., 1999). La Sinapsis tripartita se compone de tres elementos: los elementos presinápticos, los elementos postsinápticos y los astrocitos adyacentes que van a intercambiar información con el fin de participar en la regulación de la transmisión de las señales (Perea y cols., 2009) (Figura 8).

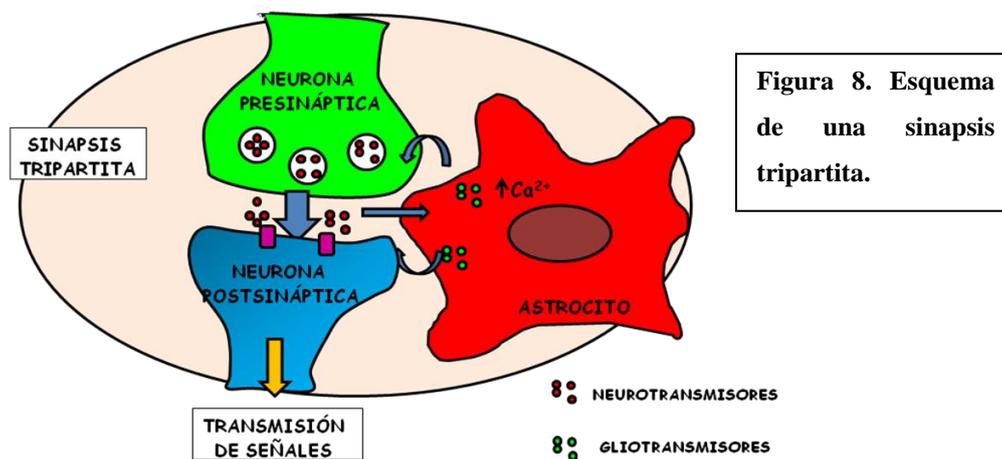


Figura 8. Esquema de una sinapsis tripartita.

Los astrocitos son células excitables pero, a diferencia de las neuronas, su excitabilidad no se basa en cambios en su potencial de membrana, sino en cambios en sus concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Halassa y cols., 2007). Además, son capaces de liberar gliotransmisores (péptidos, quimioquinas y citoquinas) con el fin de activar de manera directa los receptores neuronales adyacentes. Por tanto, los astrocitos están implicados en la modulación de la eficacia sináptica y el mantenimiento de la homeostasis tanto de iones, ya que, forman parte de la BHE, como neurotransmisores (Haydon y Carmignoto, 2006; Filosa y Blanco, 2007). Son importantes en todos los aspectos de la función neuronal, incluyendo el desarrollo, el metabolismo, la neurotransmisión y la neuroprotección (Garcia-Segura y cols., 1996; Haydon, 2001; Ullian y cols., 2001; Volterra y Meldolesi, 2005).

La relación estrecha que existe entre los astrocitos y las neuronas se empieza a observar desde las primeras etapas del desarrollo del SNC. Este hecho se ha demostrado en diversos estudios donde se ha observado que, la maduración de los procesos astrocitarios y el establecimiento del dominio espacial de los astrocitos en el cerebro, coinciden en el tiempo con la formación de las primeras sinapsis (Freeman, 2010). En el cerebro de roedores, las sinapsis se empiezan a formar desde las primeras semanas del desarrollo (Lund y Lund, 1972; Warton y McCart, 1989; Ullian y cols., 2001), sin embargo, no es hasta la tercera y cuarta semana postnatal cuando se produce la mayor cantidad de contactos sinápticos entre neuronas, coincidiendo con la maduración de los astrocitos. Por tanto, los astrocitos son células esenciales en la sinaptogénesis del SNC (Haydon, 2001; Freeman, 2010) y son capaces de modular los cambios sinápticos que suceden en los distintos procesos neuroendocrinos (García-Segura y McCarthy, 2004).

## 5.2. La morfología de los astrocitos

La morfología de los astrocitos es muy característica. Del soma celular irradian ramificaciones primarias que se van dividiendo gradualmente y disminuyen su grosor a medida que se aproximan a las sinapsis neuronales (Freeman, 2010). Estas ramificaciones variarán en función de la maduración de los astrocitos o en respuesta a estímulos. Por consiguiente, la morfología de estas células va a ser muy heterogénea y con capacidad de modificarse rápidamente en respuesta a la actividad neuronal próxima (Verkhratsky y Steinhäuser, 2000; Yang y cols., 2009; Freeman, 2010), pero también pueden modificarla mediante cambios en la señalización de  $Ca^{2+}$  (Theodosios y cols., 2008; Nimmerjahn y cols., 2009), modificando sus transportadores de glutamato (Wang y cols., 2006; Petzold y cols., 2008) o su cobertura alrededor de las sinapsis, que parece incrementarse después de una estimulación neuronal (Wenzel y cols., 1991; Genoud y cols., 2006; Lushnikova y cols., 2009).

Los astrocitos también pueden cambiar su morfología en respuesta a procesos inflamatorios o tras un daño cerebral (Ridet y cols., 1997; Sofroniew y Vinters, 2010). Ante estas situaciones adversas se produce la activación y proliferación de la glía, fenómeno conocido como astrogliosis. Esta hipertrofia que sufren los astrocitos (Escartin y cols., 2006) normalmente va acompañada de un incremento en la expresión de las proteínas estructurales GFAP y vimentina (Halassa y Haydon, 2010) que le confieren un aspecto fibroso.

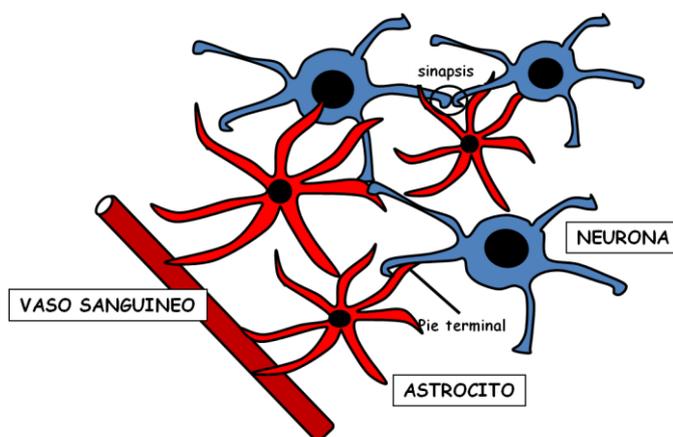
La formación de astroglía reactiva es inducida por cualquier daño del SNC con el fin de proteger esa zona de las influencias nocivas procedentes del resto del organismo.

Por ello, tras una lesión cerebral se genera una cicatriz glial formada principalmente por astrocitos fibrosos hipertróficos. Esta cicatriz glial, a pesar de su capacidad de aislamiento, ejerce efectos perjudiciales para la regeneración axonal ya que, impide el restablecimiento de nuevas conexiones (Silver y Miller, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que si tras una lesión se elimina la astroglia reactiva, la entrada de células inflamatorias a través de la BHE se incrementa, provocando una mayor extensión del proceso inflamatorio y una mayor pérdida neuronal (Pekny y Nilsson, 2005). Es por ello que actualmente existe controversia acerca de las implicaciones beneficiosas de la astrogliosis (Robel y cols., 2011).

### 5.3. Los astrocitos y el control metabólico

Inicialmente los astrocitos eran considerados elementos secundarios a las neuronas, sin embargo en los últimos años se ha demostrado su importancia en el funcionamiento de multitud de procesos fisiológicos (Freeman, 2010). Las funciones de los astrocitos en el SNC han sido ampliamente estudiadas en los últimos años, sin embargo, su implicación en el control metabólico es menos conocida.

Los astrocitos tienen una distribución muy heterogénea, formando parte de la BHE y localizándose principalmente en lugares próximos a las neuronas y a los vasos sanguíneos desde donde van a transportar, a través de sus receptores, transportadores y canales iónicos, iones y otras sustancias procedentes de la circulación periférica. Estos nutrientes serán utilizados para su propia supervivencia y para el mantenimiento del metabolismo neuronal, regulando la homeostasis del espacio extracelular (Fields y Stevens-Graham, 2002) (Figura 9).



**Figura 9. Esquema de la distribución de los astrocitos y las neuronas en el Sistema Nervioso Central.**

Recientemente se han descrito los astrocitos como sensores lipídicos del SNC (Yi y cols., 2011), ya que, aunque las cetonas son metabolizadas tanto por los astrocitos como por las neuronas (Lopes-Cardozo y cols., 1986), el receptor  $\alpha$  activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ) (Peters y cols., 1997; Berger y Moller, 2002) y la apolipoproteína E (apoE) (Boyles y cols., 1985), encargadas de la regulación del metabolismo lipídico en el cerebro, se expresan específicamente en estas células gliales.

Otra de las funciones destacadas de los astrocitos en el control metabólico es su papel en la regulación del metabolismo glucídico, siendo necesaria una comunicación entre astrocitos y neuronas para la utilización de la glucosa (Prebil y cols., 2011). La glucosa es una fuente fundamental de energía para las células del SNC (Pénicaud y cols., 2002) y necesaria para el mantenimiento de la homeostasis durante la actividad sináptica (Bak y cols., 2006). En el cerebro ésta molécula es captada por los astrocitos para su propio metabolismo, pero también la almacenan en forma de glucógeno con el fin de regular los niveles de glucosa en el SNC (Mangia y cols., 2009). Además, en el hipotálamo existe una población de neuronas glucosensibles que utilizan la glucosa como una molécula señal para regular su actividad neuronal (Wang y cols., 2004; Thorens, 2008). Por tanto, los astrocitos, principales encargados de regular la cantidad de glucosa disponible en el medio extracelular (Lam y cols., 2005), serán esenciales para la correcta actividad de estas y otras neuronas en el SNC. Pero la glucosa no es siempre el principal sustrato energético del cerebro, ya que, bajo circunstancias particulares, ciertos intermediarios metabólicos pueden sustituir a la glucosa y actuar como sustratos alternativos en el metabolismo energético del cerebro (Magistretti y Pellerin, 1999). Uno de estos sustratos metabólicos es el lactato que puede ser producido por los astrocitos y utilizado directamente por las neuronas del SNC (Pellerin, 2005). De modo que, cuando es requerido, los astrocitos metabolizan sus depósitos de glucógeno pudiendo modificar la captación y transporte de glucosa, y produciendo lactato que será utilizado por las neuronas que lo convertirán en piruvato para generar ATP (Pellerin, 2005).

Sin embargo, los astrocitos no sólo son esenciales para el suministro y regulación de metabolitos al cerebro, sino que también, están implicados en la regulación del balance energético del organismo.

Durante el desarrollo de una obesidad exógena se producen alteraciones metabólicas que producen un incremento del metabolismo lipídico y generan la síntesis de cuerpos

cetónicos por parte del hígado, los cuales serán liberados al torrente sanguíneo (Sunny y cols., 2010). Este exceso de nutrientes altera la permeabilidad de la BHE (Moore y cols., 1976), lo que permite una mayor entrada de metabolitos (*e.g.*, cetonas, ácidos grasos) que afectarán a las células del SNC (Moore y cols., 1976), entre ellas los astrocitos. Asimismo, se ha descrito que este aumento en el transporte de lípidos y otros factores derivados de este incremento (Schachtrup y cols., 2010) promueven una astrogliosis en el hipotálamo y otras regiones del SNC (Hsuchou y cols., 2009), e induce un aumento de la expresión de Ob-R en los astrocitos del hipotálamo (Hsuchou y cols., 2009).

Además, los astrocitos también pueden modificar el control metabólico local mediante la síntesis de factores tróficos tales como BDNF y CNTF (Rudge y cols., 1992; Ip y cols., 1993; Rudge y cols., 1995), y citoquinas (Iannone y Lapadula, 2010) que van a ejercer sus propios efectos metabólicos centrales. Igualmente estudios recientes han demostrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-6 en los astrocitos y que presentan una astrogliosis previa, resultan resistentes a desarrollar una obesidad inducida por dieta (Hidalgo y cols., 2010), lo que podría explicar la importancia de la funcionalidad de estas células gliales en el desarrollo de patologías, tales como la obesidad y/o la resistencia a hormonas metabólicas.

Por tanto, la obesidad o la ingesta de una dieta rica en grasa induce cambios en la funcionalidad de los astrocitos, que pueden alterar el transporte de hormonas metabólicas al cerebro y participar en la activación de estas células en el hipotálamo lo que podría afectar al metabolismo energético de todo el sistema (Yi y cols., 2011).

## ***II. HIPÓTESIS***

---

Los astrocitos hipotalámicos desempeñan una función relevante en la adaptación del organismo a los cambios metabólicos, respondiendo a diferentes señales circulantes como la leptina y la ghrelina, y participando en los cambios morfológicos y bioquímicos en el hipotálamo.

### ***III. OBJETIVOS***

---

### 3. OBJETIVOS

1. Investigar si los cambios metabólicos inducidos por malnutrición materna durante la gestación y la lactancia están asociados con cambios en la organización sináptica y la morfología de los astrocitos del hipotálamo en la descendencia.
2. Identificar si los efectos inducidos por la ingesta de una dieta rica en grasa en la etapa adulta están condicionados por la nutrición materna durante la gestación y la lactancia.
3. Determinar el efecto de un aumento prolongado de leptina sobre el metabolismo energético, la activación y morfología de los astrocitos en el hipotálamo, y su posible implicación en la remodelación sináptica.
4. Analizar y comparar el efecto a corto y largo plazo de la ghrelina y ghrelina desacilada sobre el metabolismo energético, la activación y morfología de los astrocitos, y su posible implicación en cambios sinápticos en el hipotálamo.
5. Estudiar la influencia de la leptina y la ghrelina sobre la producción de mediadores inflamatorios en el hipotálamo.

#### ***IV. MATERIALES Y MÉTODOS***

## 1. MATERIALES

### 1.1. Reactivos

Los reactivos generales, de grado analítico, fueron de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) o Sigma-Aldrich, Inc. (Saint Louis, MO, Estados Unidos), salvo los que se indican a continuación.

Los reactivos y productos necesarios para los análisis por Western blotting, exceptuando los indicados, se adquirieron en Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hércules, CA, Estados Unidos).

Los materiales para los cultivos primarios se adquirieron en Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) y los medios de cultivo se utilizaron de Gibco (Invitrogen Co., Auckland, Nueva Zelanda).

### 1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados y las concentraciones empleadas para Western blotting e inmunohistoquímica se muestran en la Tabla 1.

ANTÍGENO	MARCA	HUESPED	DILUCIÓN	TÉCNICA
Actina	NeoMarkers	ratón	1:1000	WB
AgRP	Phoenix	cobaya	1:1000	IF
Fosfo-STAT 3 (Tyr <sup>705</sup> )	Cell Signaling	conejo	1:500	WB
GAPDH	Anaspec	conejo	1:1000	WB
GFAP	Sigma	ratón	1:1000	WB e IH
GFP	Molecular Probes	conejo	1:1000; 1:4000	IF e IH
IL-6	Peptotech	conejo	1:1000	WB
PCNA	Santa Cruz	ratón	1:1000	WB
PSD-95	Calbiochem	ratón	1:1000	WB
Sinapsina-I	Calbiochem	conejo	1:1000	WB
Sinaptofisina	Thermo	conejo	1:1000	WB
Sinaptotagmina	Calbiochem	ratón	1:1000	WB
SNAP-25	Calbiochem	conejo	1:1000	WB
Sintaxina	Calbiochem	conejo	1:1000	WB
STAT3	RD system	ratón	1:1000	WB
Vimentina	Sigma	ratón	1:1000	WB e IH

**Tabla 1. Anticuerpos primarios.** WB: Western blotting; IF: Inmunofluorescencia; IH: Inmunohistoquímica; AgRP: proteína relacionada con agouti; IL-6: interleuquina 6; STAT-3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; GFAP: proteína ácida fibrilar de glía; GFP: proteína verde fluorescente; PCNA; antígeno nuclear de proliferación celular; PSD-95: proteína de la densidad postsináptica 95.

**Compañía de los anticuerpos:** Anaspec (San José, CA, Estados Unidos); Calbiochem Merck KgaA (Darmstadt, Alemania); Cell Signaling Technology Inc. (Billerica, MA, Estados Unidos); Molecular Probes (Eugene, OR, Estados Unidos); NeoMarkers (Fremont, CA, Estados Unidos); Peprotech GmbH (Colonia, Alemania); Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Burlingame, CA, Estados Unidos); RD System (Minneapolis, MN, Estados Unidos); Santa Cruz (Santa Cruz, CA, Estados Unidos); Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, Estados Unidos).

Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes:

- Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón o conejo, conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): Pierce Biotechnology (Rockford, IL, Estados Unidos).
- Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón o conejo, conjugado con biotina: Pierce Biotechnology.
- Anticuerpos de cabra anti-IgG de cobaya o conejo, conjugado con Alexa-Fluor-568 o Alexa-Fluor-488: Molecular Probes.

### 1.3. Sondas de expresión

Todos las sondas de expresión empleadas para los estudios de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (RT-PCR) fueron proporcionados por Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos) y se muestran en la Tabla 2.

GEN	REFERENCIA
Actina	Rn00667869_m1
AgRP	Rn01431703_g1
CART	Rn00567382_m1
GAPDH	Rn99999916_s1
GFAP	Rn00566603_m1
GH	Rn01495894_g1
GHSR	Rn00821417_m1
IL-1 $\beta$	Rn01336189_m1
IL-6	Rn00446190_m1
NPY	Rn01410145_m1
ObR	Rn01433205_m1
POMC	Rn00595020_m1
PGK-1	Rn00821429_g1
TNF $\alpha$	Rn00443258_m1

**Tabla 2. Sondas de expresión empleadas para la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa a tiempo real (RT-PCR).** AgRP: proteína relacionada con agouti; CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina; GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; GFAP: proteína ácida fibrilar de glía; GH: hormona de crecimiento; GHSR: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento; IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina tipo I; IL-1 $\beta$ : interleuquina 1  $\beta$ ; IL-6: interleuquina 6; NPY: neuropéptido Y; ObR: receptor de leptina; POMC: pro-opiomelanocortina; PGK1: fosfoglicerato quinasa 1; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral

## **2. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO***

### **2.1. Dieta rica en grasa prenatal y postnatal**

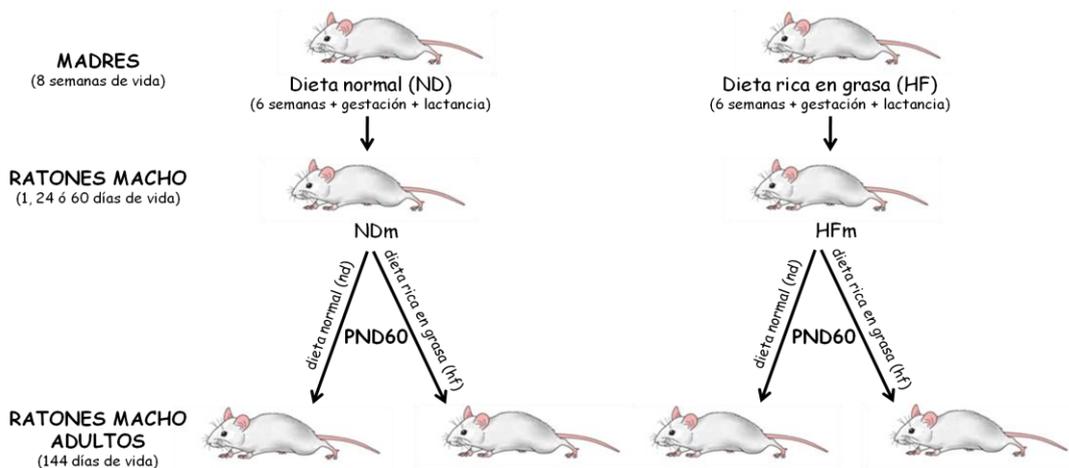
Todos los ratones utilizados se criaron y mantuvieron en el animalario de la Universidad de Yale (New Haven, CT, Estados Unidos) en condiciones estándar de 22-24°C de temperatura, humedad relativa del ambiente entre 50 y 55%, ciclos constantes de 12 horas de luz-oscuridad y libre disponibilidad de pienso y agua. Los ratones empleados fueron de la cepa C57B1L6 (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, Estados Unidos) que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de POMC o NPY. El genotipado de los animales se llevo a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El diseño experimental fue realizado en el laboratorio del Dr. Tamas Horvath, director del Departamento de Medicina Comparativa de la Universidad de Yale y fue aprobado por el comité ético de dicha universidad. Todos los animales recibieron un trato cuidadoso y se procuró emplear el menor número posible para el estudio evitándoles un sufrimiento innecesario.

#### *2.1.1. Diseño experimental*

Ratones hembra postpuberales (8 semanas de vida) se alimentaron con una dieta alta o baja en grasa *ad libitum* durante 6 semanas. La dieta rica en grasa (Rodent Chow #D12451; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, Estados Unidos) contenía 4,75 Kcal/g de energía (35% de carbohidratos, 20% de proteína y 45% de grasa), mientras que, la dieta baja en grasa (dieta normal; Purina Lab Chow #5001; Ralston Purina Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) contenía 3,3 Kcal/g de energía (59,8% de carbohidratos, 28% de proteína y 12,1% de grasa). La grasa contenida en la dieta procedía del aceite de coco y de la soja. Tras 6 semanas, las hembras procedentes de ambos grupos, fueron preñadas por machos alimentados durante toda su vida con una dieta normal. En ese momento, tanto el peso como la glucemia en ayunas eran significativamente mayores en las hembras alimentadas con una dieta rica en grasa (HF) que en hembras alimentadas con una dieta normal (ND) (peso; ND:  $23,9 \pm 0,5$  vs HF:  $30 \pm 1,6$ g;  $p < 0,005$  y glucemia; ND:  $130 \pm 7,6$  vs HF:  $172,4 \pm 8,8$  mg/dl;  $p < 0,008$ ). Durante la gestación y lactancia de las crías las madres se mantuvieron con sus respectivas dietas. En este estudio sólo se utilizaron los machos, los cuales se sacrificaron transcurridos 1, 24, 60 y 144 días de vida.

A los 21 días las crías fueron destetadas y colocadas en jaulas con una dieta normal *ad libitum*. A la mitad de los animales sacrificados a los 144 días de vida se les introdujo una dieta rica en grasa (la misma que utilizamos con las madres) en el día 60 de vida (Figura 10).



**Figura 10.** Modelo experimental del efecto de una dieta rica en grasa durante el periodo pre- y/o postnatal en ratones macho de 1, 24, 60 y 144 días de vida. ND: madres alimentadas con una dieta normal; HF: madres alimentadas con una dieta rica en grasa; NDm: ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal; HFm: ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa; nd: dieta normal a partir del día 60 de vida; hf; dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. PND: día postnatal.

Por tanto, el modelo experimental resultó de la siguiente manera:

**A) Grupo de ratones macho de 1 día de vida** constituido por dos grupos en función de la dieta de la madre (n= 6/grupo):

- 1) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm).
- 2) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa (HFm).

**B) Grupo de ratones macho de 24 días de vida** constituido por dos grupos en función de la dieta de la madre (n= 9/grupo):

- 1) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm).
- 2) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa (HFm).

Tras el destete, todos los animales se alimentaron con una dieta normal *ad libitum*.

**C) Grupo de ratones macho de 60 días de vida** constituido por dos grupos en función de la dieta de la madre (n= 8/grupo):

- 1) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm).
- 2) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa (HFm).

Tras el destete, todos los animales se alimentaron con una dieta normal *ad libitum*.

**D) Grupo de ratones macho de 144 días de vida** constituido por cuatro grupos en función de la dieta de la madre y del tipo de dieta durante la etapa adulta (n= 8/grupo):

1) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal y alimentados *ad libitum* con una dieta normal (NDm/nd).

2) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal y alimentados *ad libitum* con una dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida (NDm/hf).

3) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa y alimentados *ad libitum* con una dieta normal (HFm/nd).

4) Ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa y alimentados *ad libitum* con una dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida (HFm/hf).

### 2.1.2. Genotipado de los ratones transgénicos

A los ratones al nacer se les extrajo el ADN procedente de la cola con el fin de analizar su genotipo por PCR. Esta técnica nos permitió determinar la presencia o ausencia de GFP en el promotor de NPY o POMC. Las sondas empleadas fueron:

- Sonda GFP-directa: 5'-AAG TTC ATC TGC ACC ACC G-3'.

- Sonda GFP-inversa: 5'-TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG -3'.

Los parámetros de la reacción de PCR fueron los siguientes: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C, cada uno durante 35 ciclos.

Finalmente, el resultado de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 2%.

### 2.1.3. Control del peso y las glucemias durante el estudio

A todos los animales se les hizo un control del peso, cada 2 ó 3 días, desde el nacimiento hasta el momento del sacrificio, a excepción de los que se sacrificaron el día 1 de vida que se pesaron en el momento del sacrificio. La glucemia fue medida tras 12 horas de ayunas, en los días 1, 24, 60 y 144 de vida. El glucómetro empleado fue el One Touch Ultra 2, LifeScan INC. (Milpitas, CA, Estados Unidos).

### 2.1.4. Sacrificio y colección de muestras

#### A. Tejido para congelación

Para los estudios de RT-PCR los ratones se anestesiaron por inhalación con isoflurano (Baxter, Deerfield, IL, Estados Unidos) y se les extrajo el cerebro, manteniéndolo congelado a -80 °C hasta su empleo.

### *B. Tejido para perfusión*

Para los estudios de inmunohistoquímica los ratones se anestesiaron por inhalación con isofluorano (Baxter) y perfundieron a través de la arteria aorta (ruta transcardial) con 100 ml de solución salina (NaCl al 0,9% en agua destilada), seguido de 100 ml de paraformaldehído (PFA) al 4%, glutaraldehído al 0,1% y ácido pícrico al 15% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB). Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en post-fijación por inmersión durante 24 horas en fijador sin glutaraldehído. Una vez fijados, se lavaron tres veces con PB y dos veces con solución crioprotectora (30% de etilenglicol, 30% de sacarosa en PB) para finalmente ser almacenados a -15°C hasta su utilización.

#### *2.1.5. Extracción sérica para la determinación hormonal*

La sangre se extrajo mediante punción cardiaca antes del sacrificio de los animales. A continuación, se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C para separar el suero, el cual se recolectó y guardó a -80°C hasta su utilización.

### **2.2. Tratamiento intracerebroventricular (*icv*) con hormonas en rata**

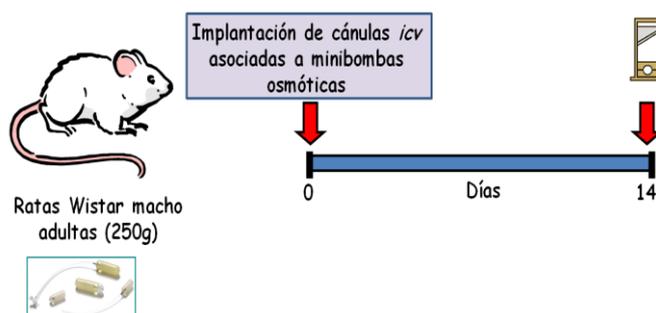
Se emplearon ratas Wistar macho jóvenes, de 250 gramos (g) de peso, procedentes de Harlan Iberica S.A. (Barcelona, España). En el animalario de la Universidad Complutense de Madrid se mantuvieron en condiciones estándar de 22-24°C de temperatura, humedad relativa del ambiente entre 50 y 55%, ciclos constantes de 12 horas de luz-oscuridad y se alimentaron con pienso artificial equilibrado para roedores que contenía 2,9 Kcal/g de energía (60% de carbohidratos, 16,1% de proteína y 3,1% de grasa) (Panlab A04, Barcelona, España) y libre disponibilidad de agua. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité local (Real Decreto 1201/2005, Boletín Oficial del Estado n.º. 252) y se procuró emplear el menor número de animales posible en cada diseño experimental. Los animales operados recibieron un trato cuidadoso y se procuró evitarles un sufrimiento innecesario. Todos los animales se anestesiaron antes de cualquier intervención quirúrgica. El estado de sedación se determinó como la ausencia de reflejo de retirada en respuesta a un estímulo táctil en la cola y la planta del pie y ausencia del reflejo palpebral al estimular la superficie del ojo.

### 2.2.1. Implantación de cánulas *icv* asociadas a minibombas osmóticas

Tras 2 semanas de acondicionamiento en el animalario, los animales se anestesiaron con un combinado de ketamina (0,08 ml/100 g de peso de la rata) (Imalgène 1000, Merial, Lyon, Francia) y xilacina (0,04 ml/100 g de peso de la rata) (Rompun, Bayer, Kiel, Alemania) vía intraperitoneal (*ip*). A continuación, se colocaron en un aparato estereotáxico Kopf, con la barra de los dientes incisivos situada en la posición de -3,5 mm. Se tomaron las coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Después de rasurar y limpiar la zona con etanol, se realizó una incisión con bisturí en el cuero cabelludo y se practicó una trepanación longitudinal en el cráneo con una broca. Las coordenadas empleadas fueron 0,16 mm lateral y 0,08 mm posterior al bregma. Con unas tijeras de punta roma se abrió un canal subcutáneo por la zona de la espalda y se colocó la bomba con unas pinzas de hemostasia. Seguidamente se desplazó la cánula de la bomba de forma que el infusor de la misma quedara en contacto con el orificio realizado en el cráneo. Finalmente, se añadió cemento dental para que no se desplazara el infusor y se suturó la piel de la cabeza con seda trenzada. La bomba empleada fue una mini-bomba osmótica procedente de Alzet DURECT Co. (Cupertino, CA, Estados Unidos) con una velocidad de infusión de 12  $\mu$ l/día.

#### 2.2.1.1. Diseño experimental: Modelo de infusión crónica *icv* de hormonas

Todos los animales se sometieron a la implantación de cánulas asociadas a minibombas osmóticas que contenían los distintos tratamientos y tras la operación se colocaron en jaulas (dos animales/jaula). Tras 14 días de tratamiento, todos los animales se sacrificaron por decapitación o perfusión (Figura 11).



**Figura 11.** Modelo experimental de infusión intracerebroventricular (*icv*) crónica de hormonas durante 14 días en ratas macho adultas.

### Tratamientos:

A) Para analizar el **efecto crónico y central de la leptina** (Sigma) se utilizaron los siguientes grupos:

- 1) Grupo control (Ct; n=6): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron solución salina (vehículo) durante 14 días.
- 2) Grupo leptina (Lep; n=6): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron leptina a una dosis de 15 µg/día durante 14 días.

B) Para analizar el **efecto crónico y central de la ghrelina y la ghrelina desacilada** (ANASPEC) se utilizaron los siguientes grupos:

- 1) Grupo control (Ct; n=16): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron solución salina (vehículo) durante 14 días.
- 2) Grupo ghrelina (G; n=16): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron ghrelina a una dosis de 5 µg/día durante 14 días.
- 3) Grupo ghrelina pair-fed (G *pair fed*; n=8): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron ghrelina a una dosis de 5 µg/día durante 14 días y a las que se les permitió comer diariamente, como máximo, la cantidad de pienso que consumía el grupo control el día anterior.
- 4) Grupo ghrelina desacilada (DG; n=16): ratas a las que se les implantó cánulas *icv* asociadas a bombas osmóticas que infundieron ghrelina desacilada a una dosis de 5 µg/día durante 14 días.

Durante todo el estudio a los animales se les permitió comer pienso y agua *ad libitum*, a excepción del grupo de ghrelina *pair fed* al que se le restringió la ingesta sólida.

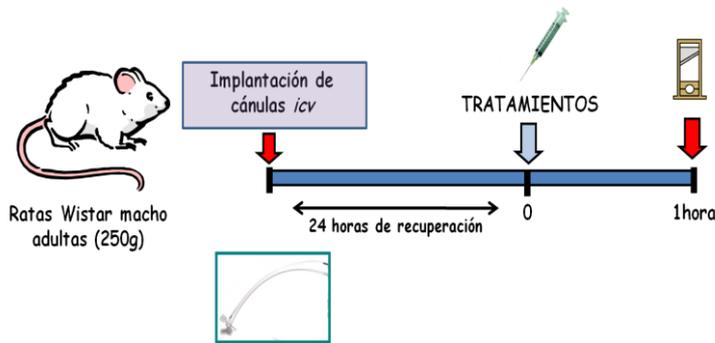
#### 2.2.2. Implantación de cánulas *icv*

El procedimiento para la incorporación de las cánulas *icv* fue exactamente igual al descrito en el apartado anterior (2.2.1.), a excepción, en este caso, de la implantación sólo de la cánula. No se realizó el canal subcutáneo para la bomba sino que una vez realizado el orificio en el cráneo, éste se selló con el infusor de la cánula dejando el otro extremo de la misma con acceso desde el exterior.

##### 2.2.2.1. Diseño experimental: Modelo de infusión aguda *icv* de hormonas

Tras la implantación de cánulas *icv*, los animales se colocaron durante 24 horas en jaulas individuales para evitar que pudieran acceder a las cánulas y para favorecer su

recuperación. Posteriormente se les administró una dosis de 7  $\mu$ l del tratamiento mediante una microjeringa procedente de Hamilton Co (Reno, NV, Estados Unidos). Una hora después de la administración, todos los animales se sacrificaron por decapitación o perfusión. (Figura 12).



**Figura 12.** Modelo experimental de infusión intracerebroventricular (icv) aguda de hormonas en ratas macho adultas.

**Tratamientos:**

A) Para analizar el **efecto agudo y central de la ghrelina y la ghrelina desacilada** (ANASPEC) se utilizaron los siguientes grupos:

- 1) Grupo control (Ct; n=12): ratas a las que se les inyectó *icv* el vehículo (salino) y transcurrida 1 hora se sacrificaron.
- 2) Grupo tratado con ghrelina (G; n=12): ratas a las que se les inyectó *icv* ghrelina a una dosis de 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l y transcurrida 1 hora se sacrificaron.
- 3) Grupo tratado con ghrelina desacilada (DG; n=12): ratas a las que se les inyectó *icv* ghrelina desacilada a una dosis de 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l y transcurrida 1 hora se sacrificaron.

*2.2.3. Control de peso, ingesta y niveles de glucosa en sangre*

En los estudios de tratamiento con hormonas todos los animales se sometieron a un control de peso, ingesta y glucemia. En el caso del modelo crónico con ghrelina y ghrelina desacilada se midieron cada 2 días, en el modelo agudo con esta hormona antes del tratamiento y en el sacrificio, y en los animales tratados con leptina únicamente se midió el peso y la glucemia cada 2 días. Los niveles de glucosa en sangre se midieron utilizando un glucómetro (Glucocard Memory 2; Menarini Diagnostic, Florencia, Italia).

#### 2.2.4. Sacrificio y colección de muestras

##### A. Tejido para congelación

Para los estudios de Western blotting, RT-PCR e inmunohistoquímica (en el modelo *in vivo* de infusión crónica con leptina) las ratas se sacrificaron con guillotina y se les extrajo el cerebro, el cuál se mantuvo congelado a -80 °C hasta su empleo.

##### B. Tejido para perfusión

Para los estudios de inmunohistoquímica en el modelo *in vivo* de infusión crónica y aguda de ghrelina y ghrelina desacilada, las ratas se anestesiaron profundamente con 5% de pentobarbital sódico (Sigma) y se perfundieron a través de la arteria aorta (ruta transcardial) con 200 ml de solución salina (0,9 % NaCl en agua destilada), seguido de 200 ml de PFA al 4% en PB. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron, bajo las condiciones descritas anteriormente (apartado 2.1.4.B), hasta su utilización.

#### 2.2.5. Extracción sérica para la determinación hormonal

Se separó el suero de la sangre procedente del tronco o del corazón del animal, bajo las condiciones descritas en el apartado 2.1.5., guardándose a -80°C hasta su utilización.

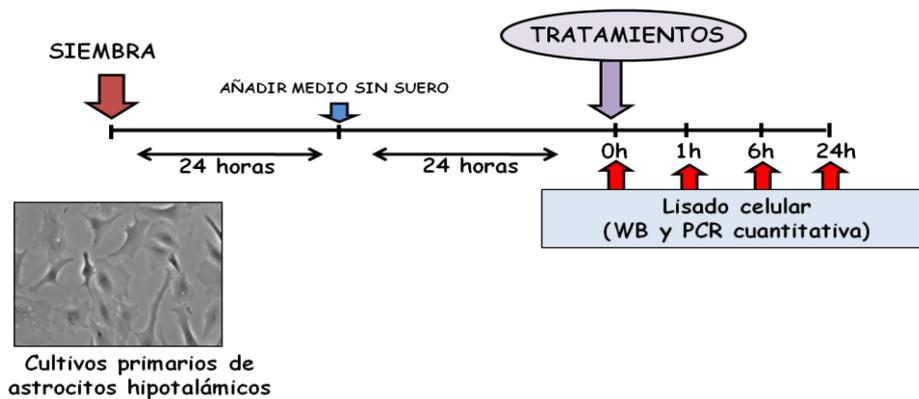
### **3. MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN IN VITRO**

Para los estudios *in vitro* se emplearon cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos obtenidos a partir de ratas Wistar macho de dos días de vida. Todos los animales empleados procedían de madres criadas y cruzadas en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid bajo las condiciones descritas en el apartado 2.2.

#### **3.1. Diseño experimental: Cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos**

Los hipotálamos procedentes de ratas macho de 2 días de vida se aislaron y homogenizaron en Medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) y Ham F-12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Linus, Cultek SLU, Madrid, España) y 1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml) bajo condiciones de esterilidad. Seguidamente se centrifugó a 1000 rpm durante 7 minutos y se resuspendió el pellet de células hipotalámicas en medio de cultivo nuevo. A continuación, se añadió 1 ml de células resuspendidas en 9 ml de medio de cultivo por cada flask de crecimiento de 75 cm<sup>3</sup> siendo mantenidas en unas condiciones de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en un incubador de cultivos (Rasmussen y cols., 1990).

Durante esos días se realizaron cambios periódicos (cada 2-3 días) del medio de cultivo para su correcto mantenimiento. Al decimo día se colocaron los flasks en un agitador (SI-300, Jeoi Tech, Medline Scientific, Oxon, Reino Unido) a una temperatura de 37°C y a una velocidad constante de 280 rpm durante 6 horas para favorecer la eliminación de oligodendrocitos y microglía. A continuación, el medio de cultivo se retiró y las células que estaban todavía adheridas a la superficie del flask (población astrocitaria > 95%) se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se levantaron en suspensión con 1 ml de tripsina al 0,05% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% (Biochrom AG, Cultek S.L, Madrid, España) durante 2 minutos a 37°C. Tras la tripsinización, las células se recogieron en medio de cultivo y se centrifugaron a 1150 rpm durante 5 minutos. El pellet se recogió en 1ml de medio de cultivo donde la concentración celular fue determinada mediante la utilización de un hemocitómetro y posteriormente se sembraron en placas previamente tratadas con poly-L-lysine hydro-bromide (10 µg/ml, Sigma). Para los estudios por Western Blotting se utilizaron placas de 60x15 mm (p60), sembrando  $4,35 \times 10^5$  células/placa, mientras que para los estudios por RT-PCR se emplearon placas de 100x20 mm (p100), sembrando  $10^6$  células/placa. Tras 24 horas en el incubador, las placas se lavaron 2 veces con PBS y se mantuvieron otras 24 horas con medio de cultivo sin suero (DMEM-F12 + 1% de antibióticos). Finalmente se añadieron los tratamientos y tras de 1, 6 ó 24 horas las células se recogieron y se lisaron (Figura 13).



**Figura 13.** Modelo experimental del efecto *in vitro* de distintos tratamientos hormonales en los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos. WB: Western blotting; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

### Tratamientos:

Los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos se trataron durante 1, 6 ó 24 horas con leptina (National Hormone & Pituitary Program, Torrance, CA, Estados

Unidos), ghrelina o ghrelina desacilada (ANASPEC). Previamente se optimizó la dosis y se establecieron los siguientes grupos:

Respuesta *in vitro* a la **leptina**:

- 1) Control: células tratadas con solución salina (vehículo) durante 1 (Ct1h), 6 (Ct6h) ó 24 (Ct24h) horas.
- 2) Tratamiento con leptina: células tratadas con leptina a una dosis de 10 ó 100 ng/ml durante 1 (Lep1h), 6 (Lep6h) ó 24 (Lep24h) horas.

Respuesta *in vitro* a la **ghrelina** o **ghrelina desacilada**:

- 1) Control: células tratadas con vehículo (salino) durante 1 (Ct1h), 6 (Ct6h) ó 24 (Ct24h) horas.
- 2) Tratamiento con ghrelina: células tratadas con ghrelina a una dosis de 100 nM durante 1 (G1h), 6 (G6h) ó 24 (G24h) horas.
- 3) Tratamiento con ghrelina desacilada: células tratadas con ghrelina desacilada a una dosis de 100 nM durante 1 (DG1h), 6 (DG6h) ó 24 (DG24h) horas.

Todos los experimentos se repitieron un mínimo de 4 veces y dentro de cada ensayo los tratamientos se hicieron por triplicado.

### 3.1.1. Procesamiento de las muestras

En los estudios *in vitro*, una vez añadido el tratamiento, todas las placas se lavaron tres veces con PBS y se procesaron para Western blotting y RT-PCR (ver a continuación apartado 4.8. y 4.9.).

## 4. PROTOSCOLOS GENERALES

### 4.1. Radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de la ghrelina total y acilada

Se realizó una cuantificación de la ghrelina total y acilada presente en el suero de los animales según el protocolo del fabricante (Linco Research, St. Charles, MO, Estados Unidos), consistente en un ensayo de desplazamiento de la hormona de las muestras por un trazador marcado radiactivamente. Brevemente, en tubos de borosilicato se mezclaron el tampón de ensayo, las muestras y el anticuerpo, anti-ghrelina o anti-ghrelina acilada, y se incubó 24 horas a 4°C. El trazador, en concreto ghrelina marcada con <sup>125</sup>I, se añadió a los tubos y se incubó nuevamente 24 horas a 4°C. Por último, se añadió el agente precipitante y se incubó nuevamente a 4°C durante 20

minutos, tras los cuales se centrifugaron las muestras a 4725 rpm 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se retiraron y se procedió a medir las cuentas por minuto presentes en los precipitados en un contador de radiación gamma (Packard, Canberra, Australia). La sensibilidad de este método es de 93 pg/ml para el ensayo de ghrelina total, con unos coeficientes intraensayo e interensayo de 6,4% y 16,3%, respectivamente; y de 7,8 pg/ml para el ensayo de ghrelina acilada, con unos coeficientes intraensayo e interensayo de 7,4% y 13,4%, respectivamente.

#### **4.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la determinación de insulina y leptina**

Siguiendo las instrucciones del fabricante (Linco Research), se procedió de un modo análogo para la cuantificación de ambas hormonas. Brevemente, se añadió tampón de ensayo a los pocillos de las placas y se añadieron las muestras. En el caso de la leptina, se realizó una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con una solución antiséptica que permitió la unión del antígeno con el anticuerpo, lavando después. El resto del protocolo fue común. Se añadió la solución con el anticuerpo correspondiente biotinilado (anti-IgG o anti-insulina de rata o ratón), se incubó 90 minutos a temperatura ambiente y se lavó. Tras los lavados, se agregó la solución con estreptavidina conjugada con peroxidasa, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó. Por último, se añadió el sustrato de la peroxidasa y se detuvo la reacción con ácido cuando la absorbancia de las muestras alcanzó las 1,2 unidades de densidad óptica al medirla a 370 nm. Por último, se procedió a la lectura de los resultados con un espectrofotómetro Tecan Infinite M200 (Salzburgo, Austria) a 450 nm y 590 nm como referencia.

#### **4.3. Obtención de las secciones de cerebro**

##### *4.3.1. Criostato*

Los cerebros sin perfundir, congelados a -80°C, se atemperaron a -15°C en la cámara del criostato (Leica CM1900, Madrid, España) durante 45 minutos. Tras este período, se realizó un corte para eliminar el rombencéfalo y otro corte, anterior al quiasma óptico, para eliminar la corteza cerebral anterior al hipotálamo. Los cerebros se adhirieron al portamuestras del criostato con un compuesto para el corte a temperatura óptima (OCT) (Tissue Tek, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Estados Unidos), por la región posterior, y se procedió a desbastar el tejido hasta alcanzar el hipotálamo a la altura de la unión de los dos nervios ópticos en el quiasma. A partir de

este momento, se recogieron las secciones, de 20  $\mu\text{m}$  de grosor, en portaobjetos Superfrost cargados positivamente (Erie Scientific Co., Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Estados Unidos). Las secciones se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4.3.2. Vibratomo

Los cerebros perfundidos, almacenados a  $-15^{\circ}\text{C}$ , se atemperaron y se lavaron con PB para eliminar los restos de solución crioprotectora. A continuación, se cortaron a un grosor de 40 (rata) ó 50 (ratón)  $\mu\text{m}$  con un vibratomo Leica VT1000S (Heidelberg, Alemania). Para ello los cerebros se colocaron de forma que, una vez eliminado el rombencéfalo y la parte anterior al hipotálamo, quedaran adheridos al portaobjetos del vibratomo por su región más posterior. Las secciones empezaron a ser recogidas cuando se alcanzó el hipotálamo en PB, almacenándose hasta su uso a  $-15^{\circ}\text{C}$  en solución crioprotectora.

#### 4.4. Inmunohistoquímica para GFAP o vimentina en el hipotálamo

La inmunohistoquímica se llevo a cabo en flotación, en secciones coronales de cerebro obtenidas a partir del vibratomo, y sobre portaobjetos en secciones cortadas en congelación en el criostato. Las incubaciones con los anticuerpos y los lavados en flotación se realizaron en agitación moderada, utilizando una solución de lavado. Esta solución estaba compuesta por Triton X-100 al 0,3 % y albumina sérica bovina (BSA) al 0,3% en PB. En primer lugar, las secciones congeladas, que se encontraban adheridas a portaobjetos, se fijaron 15 minutos a temperatura ambiente con PFA al 4% en PB. Salvo este paso, los dos tipos de tejido, congelado y perfundido, siguieron el mismo protocolo. Brevemente, las secciones de tejido se incubaron en solución de lavado con 3% de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y 30% de metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente para inhibir la actividad peroxidasa endógena del tejido. A continuación, se lavaron profusamente con solución de lavado y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo (Triton X-100 al 3% y BSA al 3% en PB). Seguidamente se añadió el anticuerpo primario que detectaba la proteína GFAP o vimentina en solución de bloqueo con un suplemento de 3% de suero de cabra (NGS) durante 48 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados y se incubó el tejido durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente unido a biotina (1:1000) a temperatura ambiente. Seguidamente se

procedió a lavar tres veces y se añadió el complejo de avidina-biotina peroxidada (ABC; Pierce Biotechnology) diluido 1:500 en solución de lavado con 5% de BSA. El producto de reacción de la peroxidasa se reveló incubando las muestras en una solución de diaminobencidina (DAB) al 0,03% (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% en PB. A continuación, las secciones en flotación se montaron en portaobjetos previamente cubiertos con poly-L-lisine hydro-bromide (50 µg/ml; Sigma) y se deshidrataron. Por último, todas las muestras se cubrieron con un cubreobjetos utilizando DEPEX (BDH Laboratory Supplies, Poole, Reino Unido) para ser observadas con un microscopio óptico Leica (DMRB-E, Heidelberg, Alemania). Los ensayos incluían tejidos de animales de todos los grupos experimentales, y se incubaron en paralelo incluyendo controles negativos para excluir el marcaje inespecífico.

#### 4.4.1. Análisis cuantitativo y morfológico de las células de GFAP en el ARC

Se utilizaron 5 secciones por animal distribuidas a lo largo del ARC. Se tomó como coordenadas 2,3 – 3,3 mm del bregma de acuerdo con el atlas esterotáxico del cerebro de la rata realizado por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Se analizaron 50 campos por animal empleando el objetivo 40X del microscopio óptico (Leica). Las imágenes se realizaron con una cámara digital (JAI corporation, modelo CV-S3200, Japón) y se procesaron mediante el uso del software Image-Pro Plus versión 5.0 (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, Estados Unidos). A continuación, se procedió al conteo del número de células inmunoreactivas para GFAP (GFAP+) por campo analizado (ver Tabla 3), el número de proyecciones que presentaba cada una de ellas y la longitud de las mismas mediante el uso del programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). Todos los estudios cuantitativos y morfométricos se realizaron sin conocer la procedencia de las muestras experimentales.

Cuantificación del número de células GFAP+ /campo	Área de campo
Dieta rica en grasa durante el periodo pre-y/o postnatal (ver apartado 2.1.1)	26 mm <sup>2</sup>
Tratamiento crónico <i>icv</i> con leptina (ver apartado 2.2.1)	19,5 mm <sup>2</sup>
Tratamiento agudo y crónico <i>icv</i> con ghrelina y ghrelina desacilada (ver apartado 2.2.1 y 2.2.2)	18,1 mm <sup>2</sup>

**Tabla 3.** Área del campo empleado para el análisis del número de células inmunoreactivas para la proteína acídica fibrilar de glía (GFAP+) en el núcleo arcuato del hipotálamo. *icv*: tratamiento intracerebroventricular.

#### 4.4.2. Análisis de inmunoreactividad para vimentina en el ARC

Se analizaron 5 secciones por animal distribuidas a lo largo del ARC. Se tomaron las mismas coordenadas que en el apartado anterior (apartado 4.4.1) y se analizaron 15 campos por animal (área de campo: 100 $\mu$ m x 100 $\mu$ m) empleando el objetivo 40X del microscopio óptico (Leica). Las imágenes se realizaron con una cámara digital (JAI corporation) y se procesaron mediante el uso del software Image-Pro Plus versión 5.0 (Media Cybernetics). A continuación, se procedió al análisis de inmunoreactividad para vimentina en el ARC mediante dos métodos. En el modelo *in vivo* de infusión crónica con leptina se cuantificó el número de fibras positivas para vimentina por campo analizado que se proyectaban perpendiculares al 3V (número de fibras/1000  $\mu$ m<sup>2</sup>). Mientras que, en el modelo *in vivo* de infusión aguda con ghrelina y ghrelina desacilada, se cuantificó la densidad total de inmunoreactividad para vimentina por campo analizado del ARC (unidades/ $\mu$ m<sup>2</sup>).

Para ambos análisis se empleó el programa Image J y se excluyó para el análisis la línea de cuerpos celulares inmunoreactivos para esta proteína que tapizan el 3V. Todos los estudios cuantitativos se realizaron sin conocer la procedencia de las muestras experimentales.

#### 4.5. Inmunohistoquímica para GFP en el hipotálamo

La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo en flotación, en secciones coronales de cerebro de ratón (50  $\mu$ m) que contenían el ARC. Brevemente, las secciones se lavaron con PB y se congelaron 3 veces en nitrógeno líquido con solución crioprotectora. Seguidamente, las secciones se lavaron profusamente y se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en PB durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Tras inhibir la actividad peroxidasa endógena se lavaron de nuevo y se incubaron con el anticuerpo primario para GFP durante 48 horas a 4°C. Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados y se incubó el tejido durante 2 horas con el anticuerpo secundario unido a biotina a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a lavar tres veces y se añadió el complejo ABC en PB. El producto de reacción de la peroxidasa se reveló incubando las secciones en una solución de DAB al 0,03% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% en PB. Una vez revelada la peroxidasa se lavó y añadió tetraóxido de osmio al 1% en PB durante 15 minutos. Seguidamente, se deshidrató con alcoholes y se añadió acetato de uranilo al 1% y etanol al 70% con el fin de incrementar el contraste ultraestructural del tejido. Tras la deshidratación las secciones se incluyeron en

Durcupan y se cortaron ultrafinas en un microtómo (Leica Microsystem Inc., Bannockburn, IL, Estados Unidos). Finalmente, los cortes ultrafinos del ARC se coleccionaron en minirejillas pretratadas con Formvar y se analizaron con el microscopio electrónico (ME) Tecnai 12 Biotwin (Hillsboro, OR, Estados Unidos). Los experimentos incluían tejidos de animales de todos los grupos experimentales, y se incubaron en paralelo, sin conocer el grupo experimental al que pertenecían.

#### *4.5.1. Análisis del perímetro y la cobertura glial de las células de NPY o POMC en el ARC*

Para estos análisis se utilizó microfotografías (objetivo de 11500X) procedentes del ME, a partir de tejido teñido con células inmunoreactivas para GFP. Se cuantificó el perímetro de las células y la cobertura glial de la membrana plasmática de dichas células usando el programa Image J. En primer lugar se midió el perímetro en micras de la membrana plasmática de la célula inmunoreactiva que se iba a analizar para, seguidamente, determinar qué proporción de ese perímetro estaba en contacto directo con la superficie astrocitaria ( $\mu\text{m}$ ). Los resultados se expresaron como cobertura astrocitaria en micras por cada 100  $\mu\text{m}$  de membrana de la célula inmunoreactiva analizada.

#### **4.6. Doble inmunofluorecencia para GFP y AgRP**

Se emplearon secciones de tejido en flotación que se lavaron con PB y se incubaron con BSA al 3%, Triton X-100 al 1% en PB durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este paso, las secciones se mantuvieron toda la noche a 4°C en agitación suave con los anticuerpos primarios para GFP y AgRP. Al día siguiente se lavaron e incubaron en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con distintos fluorocromos en una dilución 1:500. Los experimentos incluían tejidos de animales de todos los grupos experimentales y se incubaron en paralelo. Para identificar las concentraciones óptimas de los distintos anticuerpos empleados se realizaron previamente distintas pruebas de concentración, eligiendo concentraciones que presentaban un marcaje específico y que mostraron el menor fondo inespecífico. En cada ensayo se incluyeron controles negativos, los cuales carecían de inmunofluorecencia. Para la visualización de la inmunofluorecencia se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss MicroImaging LLC., Thornwood, NY, Estados Unidos).

*4.6.1. Cuantificación del número de contactos de AgRP en la membrana de las células de POMC en el ARC*

Para este estudio se utilizaron secciones del ARC doblemente teñidas con GFP (verde) y AgRP (rojo). Se fotografiaron 5 campos (68  $\mu\text{m}$  x 54  $\mu\text{m}$ ) por animal con el objetivo de 100X (microscopio confocal). En primer lugar se midió el perímetro en micras de las células inmunoreactiva (GFP) y, posteriormente, se estimó el número de puntos rojos (AgRP) que se encontraban en contacto directo con la membrana plasmática de la célula analizada. Los resultados de este estudio se expresaron como número de contactos AgRP por cada micra de membrana celular analizada.

**4.7. Obtención de la fracción proteica total**

*4.7.1. Tejido*

Los hipotálamos procedentes de los cerebros congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se aislaron teniendo en consideración las siguientes directrices: 1) realización de un corte en la parte anterior del cerebro a la altura del quiasma óptico; 2) una sección posterior al hipotálamo y anterior a los cuerpos mamilares; 3) dos cortes sagitales paralelos a los ventrículos laterales y, finalmente, 4) un último corte que se realizó dorsalmente a la altura de la comisura anterior (Glowinski e Iversen, 1966). Inmediatamente después, los hipotálamos se homogenizaron en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis que contenía PBS, Tritón X-100 1%, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1%, azida sódica 0,5%, deoxicolato sódico 0,5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los homogenizados resultantes se congelaron 24 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y a continuación, se centrifugaron a 14000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, se recogieron los sobrenadantes que constituyeron la fracción proteica total, y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La concentración de proteínas de las muestras se midió mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Brevemente, cada muestra diluida en agua se mezcló con el reactivo concentrado (Bio-Rad Laboratories), según las indicaciones del fabricante. La mezcla se agitó y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, midiendo después la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro Tecan Infinite M200. La recta patrón se realizó con concentraciones de 0-25  $\mu\text{g}$  de BSA.

*4.7.2. Cultivos celulares*

Tras los correspondientes tratamientos, las células sembradas en placas p60 se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron en 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (ver apartado 4.7.1.).

Se recogieron las células y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  un mínimo de 24 horas. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos y los sobrenadantes resultantes se congelaron nuevamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez congeladas las muestras se introdujeron en un liofilizador 24 horas y, posteriormente, se resuspendieron en 22  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La concentración proteica de las muestras se midió mediante el método de Bradford (ver apartado 4.7.1.).

#### 4.8. Western blotting

Se utilizó una cantidad correspondiente a 10-40  $\mu\text{g}$  de proteína (homogenizado de tejido o cultivo celular) que se mezcló con tampón 2X de Laemmli (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; glicerol 12,5%, SDS 10% y azul de bromofenol 10%). La mezcla se hirvió durante 5 minutos y se separaron las distintas proteínas en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (8-12%) en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF; Bio-Rad Laboratories) a 350 mA, durante 90 minutos. Las membranas se tiñeron de rojo Ponceau para comprobar que las proteínas se transfirieron correctamente y para realizar las correcciones de la carga en los pocillos si fuera necesario. A continuación, se destiñeron con ácido acético 10% y se bloquearon 2 horas a temperatura ambiente en una solución de T-TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 0,1 M; Tween 20 0,1%) con 5% de leche en polvo desnatada o BSA 5% en el caso de proteínas fosforiladas. Seguidamente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en tampón de bloqueo durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras tres lavados con T-TBS de 20 minutos, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa en tampón de bloqueo con 5 % de leche en polvo desnatada durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 20 minutos con T-TBS. Finalmente, la actividad peroxidasa se visualizó por quimioluminiscencia (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA, Estados Unidos) y la cuantificación se llevo a cabo mediante el uso del programa Gel Logic 1500 Image analysis system (KODAK, Rochester, NY, Estados Unidos). Los resultados de cada ensayo se normalizaron con la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de expresión constitutiva en las células, a excepción del modelo *in vivo* de exposición crónica *icv* con leptina y el modelo *in vitro* en respuesta a la ghrelina, en los cuales se empleo el Ponceau.

#### **4.9. Extracción y purificación del ARN**

Para la extracción de ARN de los tejidos se aislaron los hipotálamos en hielo y en condiciones de esterilidad, siguiendo las directrices indicada en el apartado 4.7.1. En el caso de los cultivos celulares, el ARN se extrajo directamente de las células adheridas a las placas p100 que previamente habían sido lavadas con PBS. La fracción de ARN total se extrajo mediante el método comercial Trizol Reagent de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante (Invitrogen) y siguiendo el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría de alta sensibilidad (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos).

#### **4.10. RT-PCR**

Los niveles relativos de ARN mensajero (ARNm) se cuantificaron a partir de muestras celulares o de tejido mediante RT-PCR. Brevemente, el ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 1 ó 2 µg de ARN total de cada muestra mediante la reacción en cadena de transcriptasa reversa (high capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems) que se llevo a cabo en un termociclador (Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad). La cadena de ADNc generada se amplificó para cada gen con una sonda específica TaqMan Master Mix Universal PCR (Applied Biosystems) en un termociclador (ABI Prism 7500 Thermal Cycler, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Cada muestra se amplificó por duplicado. Para normalizar los valores de expresión de cada gen con respecto al contenido total de ADNc, los valores se compararon con los de GAPDH, empleado como control endógeno en los cultivos celulares, o los del fosfoglicerato quinasa 1 (PGK 1) en el caso de utilizar tejido hipotalámico. El análisis de los datos de expresión génica relativa se realizó comparando los valores  $\Delta Ct$  con respecto al gen control, obteniendo los resultados calculando el logaritmo en base 2  $^{-\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

#### **4.11. Estadística**

Las muestras procedentes de cada animal o cultivo celular se analizaron por separado. En los ensayos de Western blotting y RT-PCR se normalizó con respecto a los valores control de cada gel o ensayo. Para todas las pruebas empleadas se utilizó el programa estadístico SPSS versión 13.0. Se aplicaron pruebas paramétricas a las muestras que cumplían los requisitos de normalidad y homocedasticidad (igualdad de

varianzas). La igualdad de varianzas se determinó con un valor de estadístico de Levene que ofreciera una  $p > 0,05$ . Para varianzas homogéneas se procedió de la siguiente manera: los experimentos que comparaban sólo 2 grupos, se analizaron con la prueba T de Student de dos colas. Los experimentos que incluían más de 2 grupos experimentales se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En caso de que resultara significativa la prueba, se detallaron las diferencias entre parejas de muestras con comparaciones *post hoc*, mediante el test de Bonferroni.

Para comparar dos variables como el efecto del tiempo y el tratamiento hormonal o para determinar el efecto de la dieta de la madre y el cambio de dieta en la etapa adulta, empleamos una ANOVA de dos vías, obteniendo el nivel de interacción entre las dos variables y después se procedió al análisis de cada variable por separado en una ANOVA de una vía o de medidas repetidas en el análisis de cambios de peso. Finalmente todos los datos se mostraron como el valor de la media y las barras de error representaron el error estándar de la media (SEM). El nivel de significación estadística se estableció tomando siempre valores de la  $p$  menores de 0,05.

## ***V. RESULTADOS***

---

## **1. Respuesta a una dieta rica en grasa durante la etapa pre- y/o postnatal en ratones macho**

La ingesta de una dieta rica en grasa produce alteraciones metabólicas que pueden afectar a los circuitos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta y el gasto energético (Kieffer y cols., 1996; Spiegelman y Flier, 1996; Ahima y Flier, 2000). Durante las etapas tempranas del desarrollo, el organismo es más susceptible a los cambios nutricionales inducidos por la madre o por el entorno, que pueden producir alteraciones permanentes en el SNC, incluido el hipotálamo (Heijmans y cols., 2008; Lillycrop y cols., 2008; Tobi y cols., 2009). Sin embargo, se desconoce los efectos que produce la ingesta de una dieta rica en grasa por parte de la madre a corto y largo plazo sobre la descendencia, así como, si estos cambios condicionan la respuesta del animal a un cambio de dieta en el futuro.

En este estudio nos propusimos analizar los efectos de la dieta materna sobre las neuronas y astrocitos del hipotálamo, así como, la respuesta del animal a un cambio de dieta durante la etapa adulta.

### **1.1. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en el peso, la glucemia y los niveles circulantes de las hormonas metabólicas**

#### *Ratones de 1, 24 y 60 días de vida*

El peso, la glucemia y los niveles circulantes de insulina que presentaron los ratones de 1, 24 y 60 días de vida se muestran en la Tabla 4.

No observamos un efecto de dieta de la madre en el peso de los ratones, ni tras el nacimiento, ni a los 24 ó 60 días de vida. Sin embargo, al día 1 de vida los ratones HFm mostraron disminuidos significativamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas al compararlo con los ratones NDm ( $p < 0,001$ ). En cambio, los ratones de 24 y 60 días de vida no presentaron diferencias significativas en la glucemia.

Con respecto a los niveles circulantes de insulina únicamente observamos un efecto de la dieta de la madre a los 24 días de vida. A esta edad los ratones HFm presentaron mayores niveles séricos de insulina que los ratones NDm ( $p < 0,02$ ).

	PND1		PND 24		PND60	
	NDm	HFm	NDm	HFm	NDm	HFm
<b>Peso (g)</b>	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,8	11,9 ± 0,5	11,8 ± 0,5	25,6 ± 0,3	25,1 ± 0,3
<b>Glucemia (mg/dl)</b>	91,8 ± 3,7	61,0 ± 3,1***	144,5 ± 10,3	125,0 ± 14,8	134,5 ± 5,3	118,1 ± 8,9
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,99 ± 0,2	0,69 ± 0,1	0,63 ± 0,1	1,28 ± 0,3*	1,37 ± 0,2	0,99 ± 0,1

**Tabla 4.** Peso, glucemia y niveles circulantes de insulina que mostraron los ratones en los días 1, 24 y 60 de vida (n= 6-12 animales/grupo). NDm= dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia. HFm= dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media ± SEM. Diferencia significativa entre NDm versus HFm de la misma edad (T de Student): \* =  $p < 0,02$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### *Ratones de 144 días de vida*

Los pesos, las glucemias y los niveles de hormonas circulantes implicadas en el metabolismo energético que presentaron los ratones de 144 días de vida se muestran en la Tabla 5.

Encontramos un efecto de la dieta de la madre ( $F_{(3,27)}$ : 4,326;  $p < 0,05$ ) y del cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,27)}$ : 45,670;  $p < 0,001$ ) en el peso de los ratones. Los ratones alimentados con una dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida (hf) pesaron significativamente más que los ratones alimentados con una dieta normal (nd), independientemente de su procedencia materna (ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Asimismo, observamos un efecto de la dieta de la madre en los niveles de glucosa en sangre que mostraron los ratones en ayunas ( $F_{(3,26)}$ : 6,205;  $p < 0,02$ ). Los ratones HFm, independientemente de su dieta en la etapa adulta, presentaron mayores niveles de glucosa en sangre que los ratones NDm (ANOVA;  $p < 0,04$ ).

En cuanto a los niveles circulantes de leptina e insulina encontramos un efecto del cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,26)}$ : 23,210 y  $p < 0,0001$  y  $F_{(3,57)}$ : 9,337;  $p < 0,004$ , respectivamente). Asimismo, observamos un efecto de la dieta de la madre en los niveles séricos de leptina ( $F_{(3,26)}$ : 8,559;  $p < 0,008$ ). Los ratones HFm presentaron disminuidos los niveles séricos de leptina comparado con los ratones NDm. Además, encontramos que el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta supuso un incremento de los niveles séricos de insulina y leptina en los ratones (ANOVA:  $p < 0,03$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente).

	PND144				ANOVA
	NDm/nd	HFm/nd	NDm/hf	HFm/hf	
<b>Peso (g)</b>	36,4 ± 1,5	38,2 ± 2,1	45,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	49,5 ± 0,8 <sup>a,b</sup>	p<0,0001
<b>Glucemia (mg/dl)</b>	145,0 ± 9,0	163,3 ± 6,8 <sup>a</sup>	156,1 ± 14,9	214,7 ± 17,9 <sup>a</sup>	p<0,04
<b>Insulina (ng/ml)</b>	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,5	3,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	p<0,03
<b>Leptina (ng/ml)</b>	12,3 ± 4,1	2,5 ± 0,7	29,0 ± 2,9 <sup>a,b</sup>	18,8 ± 4,7 <sup>b</sup>	p<0,0001

**Tabla 5.** Peso, glucemia y niveles circulantes de insulina y leptina que mostraron los ratones de 144 días de vida (n=6-10/grupo). NDm= dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia; HFm= dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia; nd= dieta normal después del destete; hf= dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media ± SEM. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: *a* = diferencia significativa versus NDm/nd; *b* = diferencia significativa versus HFm/nd.

## 1.2. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en las neuronas del hipotálamo

### 1.2.1. Niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos

#### Ratones de 1, 24 y 60 días de vida

Los niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos en los días 1, 24 y 60 de vida se muestran en la Tabla 6.

Los niveles del mensajero de los neuropéptidos orexigénicos no se vieron afectados por la dieta de la madre, ni tras el nacimiento, ni a los 24 días de vida. Sin embargo, a los 60 días de vida, aunque los niveles del mensajero de NPY no se vieron modificados por efecto de la dieta de la madre, los niveles de AgRP sí que se mostraron disminuidos significativamente en los ratones HFm al compararlos con los ratones NDm (p<0,03).

En cuanto a los niveles de los neuropéptidos anorexigénicos, en el día 1 de vida los ratones HFm presentaron un incremento en la expresión del mensajero de POMC y CART con respecto a los ratones NDm (p<0,004 y p<0,02, respectivamente). A los 24 días de vida observamos que los ratones HFm presentaron mayores niveles del mensajero de POMC y menores niveles de CART al compararlos con los ratones NDm (ambos p<0,05).

A los 60 días de vida no existió un efecto de la dieta de la madre en los niveles de ARNm de POMC en el hipotálamo, sin embargo los ratones HFm presentaron menores niveles de ARNm de CART que los ratones NDm (p<0,05).

	PND1		PND 24		PND60	
	NDm	HFm	NDm	HFm	NDm	HFm
NPY	100 ± 7,1	106,8 ± 7,5	100 ± 8,5	96,8 ± 4,6	100 ± 9,4	99,2 ± 12,1
AgRP	100 ± 6,9	106,4 ± 12,9	100 ± 7,6	86,7 ± 6,8	100 ± 16,9	52,2 ± 8,0*
POMC	100 ± 9,2	140,4 ± 6,9**	100 ± 4,7	182,9 ± 28,9*	100 ± 9,4	97,7 ± 13,7
CART	100 ± 5,5	143,0 ± 15,7*	100 ± 5,9	84,4 ± 3,0*	100 ± 2,4	81,1 ± 8,0*

**Tabla 6.** Niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos que presentaron los ratones de 1, 24 y 60 días de vida (n=6-12/grupo). NDm= dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia; HFm= dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia; NPY= neuropéptido Y; AgRP= proteína relacionada con agouti; POMC= pro-opiomelanocortina; CART= transcrito regulado por cocaína y anfetamina. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media ± SEM y están referidos en % NDm de cada edad. Diferencia significativa entre NDm versus HFm de la misma edad (T de Student): \* = p<0,05; \*\* = p<0,004.

#### *Ratones de 144 días de vida*

A los 144 días de vida los niveles de expresión génica de los neuropéptidos orexigénicos (NPY y AgRP) se vieron afectados por el cambio de dieta en la etapa adulta (NPY:  $F_{(3,22)}$ : 23,417; p<0,0001 y AgRP:  $F_{(3,17)}$ : 10,723; p<0,005). Los ratones hf, independientemente de su procedencia materna, presentaron disminuidos los niveles del mensajero de NPY y AgRP comparado con los ratones nd (Tabla 4; ANOVA: p<0,002 y p<0,03, respectivamente).

En cuanto a los neuropéptidos anorexigénicos, observamos un efecto de la dieta de la madre en los niveles del mensajero de POMC y CART ( $F_{(3,16)}$ : 8,474; p<0,02 y  $F_{(3,17)}$ : 5,122; p<0,04, respectivamente). Sin embargo, sólo en el caso de CART observamos un efecto del cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,17)}$ : 5,986; p<0,03). Los ratones HFm presentaron menores niveles de ARNm de POMC y CART que los ratones NDm (ANOVA: p<0,04 y p<0,008, respectivamente), sin embargo, el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta en estos ratones supuso la normalización de los niveles del mensajero de CART en el hipotálamo (Tabla 7).

	PND144				ANOVA
	NDm/nd	HFm/nd	NDm/hf	HFm/hf	
NPY	100 ± 16,9	107,2 ± 9,6	52,6 ± 5,7 <sup>a,b</sup>	51,2 ± 4,4 <sup>a,b</sup>	p<0,002
AgRP	100 ± 12,1	116,8 ± 15,4	73,8 ± 9,9	60,0 ± 8,6 <sup>b</sup>	p<0,03
POMC	100 ± 15,6	85,2 ± 8,7	127,8 ± 13,9	57,4 ± 14,5 <sup>a,c</sup>	p<0,04
CART	100 ± 6,6	74,2 ± 6,4 <sup>a,d</sup>	104,8 ± 4,8	101,2 ± 6,1	p<0,008

**Tabla 7.** Niveles de expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos que presentaron los ratones de 144 días de vida (n= 3-6/grupo). NDm= dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia;

HFm= dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia; nd= dieta normal después del destete; hf= dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida; NPY= neuropéptido Y; AgRP= proteína relacionada con agouti; POMC= pro-opiomelanocortina; CART= transcrito regulado por cocaína y amfetamina. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % NDM/nd. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: *a* = diferencia significativa versus NDM/nd; *b* = diferencia significativa versus HFm/nd; *c* = diferencia significativa versus NDM/hf; *d* = diferencia significativa versus HFm/hf.

### 1.2.2. Tamaño de las neuronas de NPY y POMC en el ARC

#### Ratones de 24 y 60 días de vida

El perímetro de las células de NPY en el ARC no se vio modificado por efecto de la dieta de la madre, ni a los 24, ni a los 60 días de vida (Tabla 8).

En cuanto al perímetro de las células de POMC, observamos un efecto de la dieta de la madre únicamente a los 24 días de vida de los ratones. Los ratones HFm presentaron las células de POMC del ARC con un mayor perímetro que los ratones NDM ( $p < 0,04$ ).

NÚCLEO ARCUATO DEL HIPOTÁLAMO	PND 24		PND60	
	NDm	HFm	NDm	HFm
Perímetro célula de NPY ( $\mu\text{m}$ )	35,5 $\pm$ 1,1	31,7 $\pm$ 2,2	35,3 $\pm$ 3,7	33,9 $\pm$ 0,6
Perímetro célula de POMC ( $\mu\text{m}$ )	34,1 $\pm$ 1,4	40,4 $\pm$ 1,8*	41,3 $\pm$ 1,2	39,7 $\pm$ 1,7

**Tabla 8.** Análisis del perímetro que mostraron las células de Neuropéptido Y (NPY) y Pro-opiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones de 24 y 60 días de vida ( $n=4$ /grupo). NDM = dieta normal de la madre durante la gestación y el destete. HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y el destete. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Diferencia significativa entre NDM versus HFm de la misma edad (T de Student): \* =  $p < 0,04$ .

#### Ratones de 144 días de vida

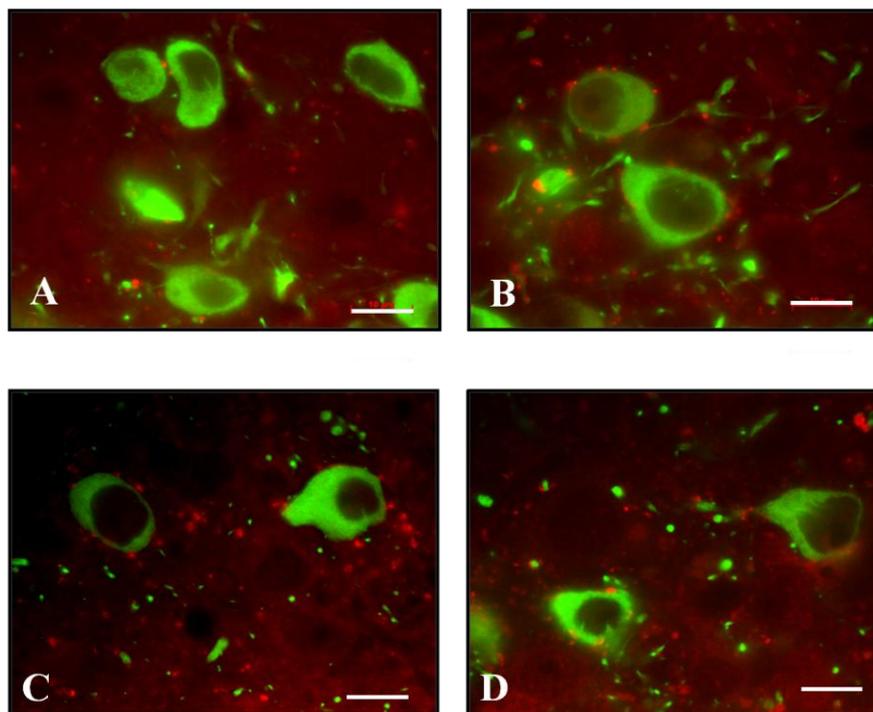
A los 144 días de vida el perímetro de las células de NPY en el ARC no se vio modificado, ni por efecto de la dieta de la madre, ni por el cambio de dieta en la etapa adulta (NDM/nd: 31,3  $\pm$  1,4; HFm/nd: 32,3  $\pm$  0,8; NDM/hf: 31,9  $\pm$  1,5; HFm/hf: 34,1  $\pm$  1,3  $\mu\text{m}$ /célula NPY). En cambio, observamos una interacción entre el efecto de la dieta de la madre y el cambio de dieta en la etapa adulta en el perímetro que presentaron las células de POMC en el ARC ( $F_{(3,16)}: 5,767$ ;  $p < 0,03$ ). Únicamente el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta en los ratones HFm indujo una disminución significativa del perímetro de las células de POMC en el ARC (NDM/nd:

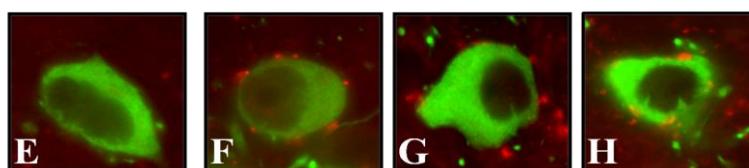
$35,5 \pm 2,3$ ; HFm/nd:  $39,7 \pm 1,1$ ; NDm/hf:  $38,1 \pm 1,2$ ; HFm/hf:  $34,1 \pm 1,7$   $\mu\text{m}/\text{célula}$  POMC; ANOVA:  $p < 0,02$ ).

### 1.2.3. Número de contactos de AgRP en las neuronas de POMC en el ARC

#### Ratones de 144 días de vida

El análisis del número de contactos sinápticos de AgRP por cada  $\mu\text{m}$  de perímetro de la membrana de la célula de POMC se llevó a cabo únicamente en los ratones de 144 días de vida (Figura 14). En este parámetro encontramos un efecto de la dieta de la madre ( $F_{(3,120)}$ : 6,203;  $p < 0,02$ ), un efecto del cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,120)}$ : 15,133;  $p < 0,0001$ ) y una interacción entre ambos factores ( $F_{(3,120)}$ : 5,395;  $p < 0,03$ ). Los ratones HFm que se alimentaron con una dieta normal mostraron un mayor número de contactos de AgRP por cada  $\mu\text{m}$  de perímetro de membrana de la célula de POMC que los ratones NDm que se alimentaron con la misma dieta. Sin embargo, el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta indujo un aumento significativo del número de contactos AgRP en estas células, independientemente de la procedencia materna de los ratones, pero en el caso de los ratones HFm este efecto se mantuvo y no fue acumulativo (NDm/nd:  $0,07 \pm 0,01$ ; HFm/nd:  $0,14 \pm 0,02$ ; NDm/hf:  $0,16 \pm 0,01$ ; HFm/hf:  $0,16 \pm 0,02$  n° de contactos de AgRP/ $\mu\text{m}$  de membrana de la célula de POMC; ANOVA:  $p < 0,0001$ ).





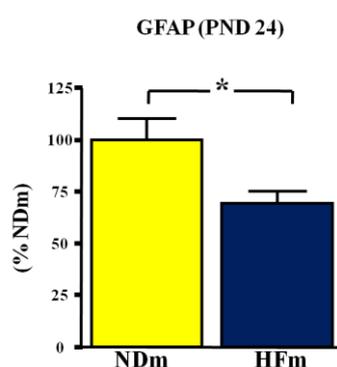
**Figura 14.** Doble inmunofluorescencia para la proteína relacionada con agouti (AgRP; rojo) y la proteína verde de fluorescencia (GFP; verde), que se expresa bajo el control del promotor de Pro-opiomelanocortina (POMC), en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones NDm/nd (A y E), HFm/nd (B y F), NDm/hf (C y G) y HFm/hf (D y H) a los 144 días de vida ( $n=3/\text{grupo}$ ). NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia; HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia; nd = dieta normal desde el destete; hf = dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. Escala (fotografías A-D): 10  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. Efecto de la dieta materna y del cambio de dieta en la etapa adulta en los astrocitos del hipotálamo

#### 1.3.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP

##### Ratones de 1, 24 y 60 días de vida

No observamos ningún efecto de la dieta de la madre en los niveles del mensajero de GFAP, ni tras el nacimiento (NDm:  $100 \pm 9,4$  vs HFm:  $109,2 \pm 12,7$  % NDm), ni a los 60 días de vida de los ratones (NDm:  $100 \pm 9,1$  vs HFm:  $87,8 \pm 8,7$  % NDm). En cambio, los ratones HFm de 24 días de vida mostraron menores niveles de ARNm de GFAP que los ratones NDm (Figura 15;  $p<0,02$ ).



**Figura 15.** Niveles del mensajero de la proteína acídica fibrilar de glía (GFAP) que mostraron los ratones de 24 días de vida ( $n=6-12/\text{grupo}$ ). NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y lactancia; HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % NDm. T de Student: \* =  $p<0,02$ .

##### Ratones de 144 días de vida

En cuanto a los ratones de 144 días de vida encontramos un efecto de la dieta de la madre ( $F_{(3,15)}: 4,871$ ;  $p<0,005$ ) y del cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,15)}: 6,291$ ;  $p<0,03$ ) en los niveles del mensajero de GFAP en el hipotálamo. El consumo de una

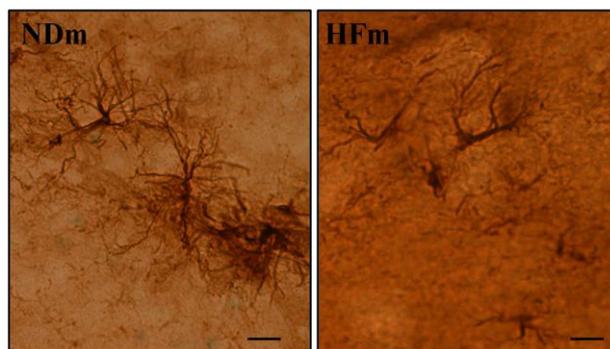
dieta rica en grasa durante la etapa adulta aumentó los niveles del mensajero de GFAP en el hipotálamo de los ratones, sin embargo este incremento fue mayor en los ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm/nd:  $100 \pm 5,4$ ; HFm/nd:  $78,7 \pm 9,7$ ; NDm/hf:  $138,4 \pm 15,0$ ; HFm/hf:  $103,8 \pm 8,0$ ; ANOVA:  $p < 0,02$ ).

### 1.3.2. Número y morfología de las células de GFAP en el ARC

Una vez detectados cambios significativos en los niveles del mensajero de GFAP en el hipotálamo de los ratones de 24 y 144 días de vida, analizamos el número y morfología de las células GFAP+ en el ARC (Figura 16).

#### Ratones de 24 días de vida

A los 24 días de vida no encontramos un efecto de la dieta de la madre, ni en el número de células GFAP+ por campo, ni en la longitud de las proyecciones que presentaron estas células (Tabla 9). En cambio observamos que los ratones HFm mostraron un menor número de proyecciones por célula GFAP+ que los ratones NDm ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16.** Fotografías representativas de células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones de 24 días de vida procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm) o una dieta rica en grasa (HFm) durante la gestación y lactancia. Escala de las imágenes = 10  $\mu$ m.

NÚCLEO ARCUATO DEL HIPOTÁLAMO	PND 24		T-Student
	NDm	HFm	
Nº células GFAP+/campo	$19,2 \pm 2,7$	$18,9 \pm 4,1$	NS
Nº proyecciones/célula GFAP+	$2,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1^*$	$p < 0,05$
Longitud media de las proyecciones/ célula GFAP+ ( $\mu$ m)	$19,6 \pm 1,8$	$23,5 \pm 3,2$	NS

**Tabla 9.** Análisis cuantitativo y morfológico de las células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones de 24 días de vida ( $n=4$ /grupo). NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y la lactancia. HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y la lactancia. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la

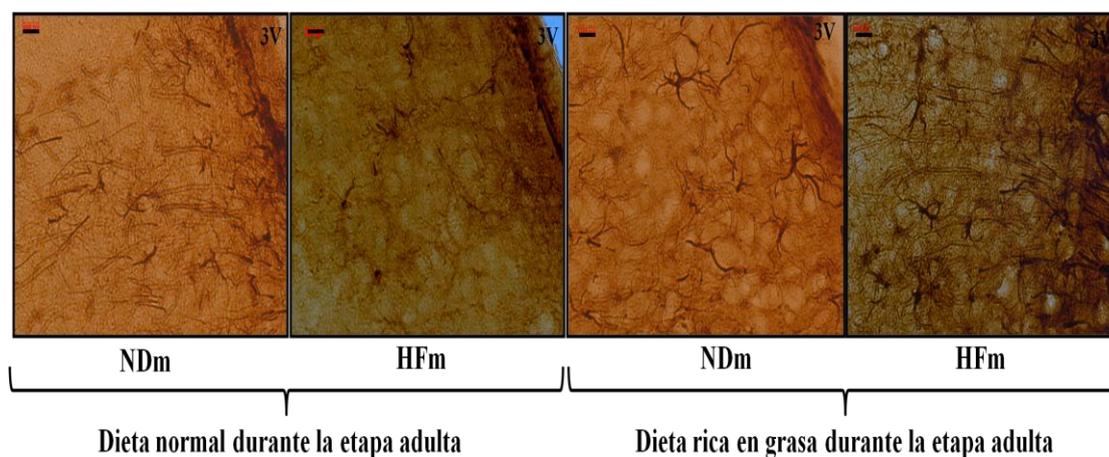
media  $\pm$  SEM. Diferencia significativa entre NDm versus HFm (T de Student): \* =  $p < 0,05$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### *Ratones de 144 días de vida*

La Figura 17 muestra imágenes representativas de las células GFAP+ en el ARC del hipotálamo de los ratones de 144 días de vida.

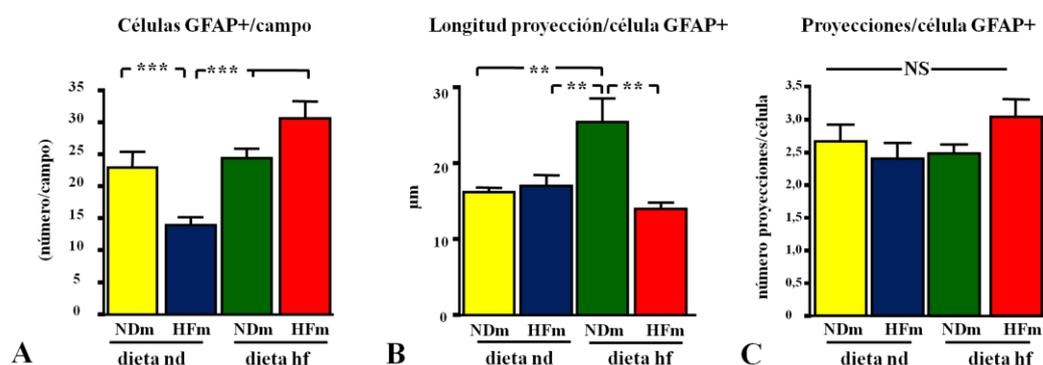
A esta edad observamos que el número de células GFAP+ por campo analizado se vio afectado por el cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,14)}$ : 22,168;  $p < 0,0001$ ). Además encontramos una interacción entre la dieta de la madre y el cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,14)}$ : 15,879;  $p < 0,001$ ). Los ratones HFm mostraron un menor número de células GFAP+ que los ratones NDm. Sin embargo, el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta en estos ratones HFm supuso un incremento en el número de células GFAP+ en el ARC (Figura 18A; ANOVA:  $p < 0,0001$ ).

En cuanto a la longitud de las proyecciones que mostraron las células GFAP+ encontramos un efecto de la dieta de la madre ( $F_{(3,14)}$ : 6,768;  $p < 0,03$ ) y una interacción entre este factor y el cambio de dieta en la etapa adulta ( $F_{(3,14)}$ : 8,858;  $p < 0,02$ ). El consumo de una dieta rica en grasa en los ratones NDm supuso un incremento en la longitud de las proyecciones que mostraron las células GFAP+ en el ARC con respecto los demás grupos experimentales (Figura 18B; ANOVA:  $p < 0,007$ ). En cambio, no observamos un efecto de la dieta de la madre, ni del cambio de dieta en la etapa adulta en el número de proyecciones que mostro cada célula GFAP+ en el ARC (Figura 18C).



**Figura 17.** Fotografías representativas de células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones de 144 días de vida. NDm = dieta normal de la

madre durante la gestación y el destete. HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y el destete. 3V= tercer ventrículo. Escala de las imágenes= 10  $\mu$ m.

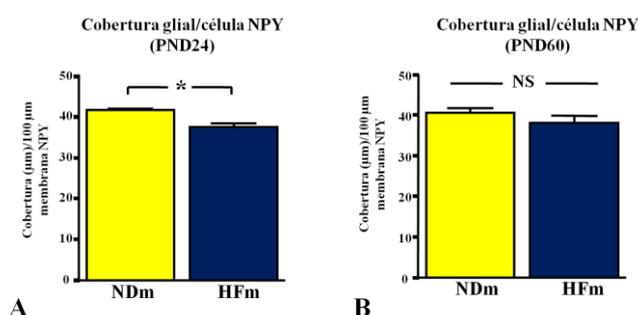


**Figura 18.** Cuantificación del número de células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) por campo analizado (A), longitud media (B) y número medio de proyecciones (C) que mostraron estas células en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones de 144 días de vida (n=4/grupo). NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y el destete; HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y el destete; nd = dieta normal desde el destete; hf = dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA: \*\*= $p < 0,007$ ; \*\*\*= $p < 0,0001$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 1.3.3. Cobertura glial alrededor de las células de NPY en el ARC

#### Ratones de 24 y 60 días de vida

A los 24 días de vida observamos un efecto de la dieta de la madre en la cobertura glial que mostraron las células de NPY del ARC. A esta edad los ratones HFm presentaron una menor cobertura glial alrededor de las células de NPY que los ratones NDm (Figura 19A;  $p < 0,02$ ). Por el contrario en los ratones de 60 días de vida no encontramos ningún efecto de la dieta de la madre en este parámetro (Figura 19B).

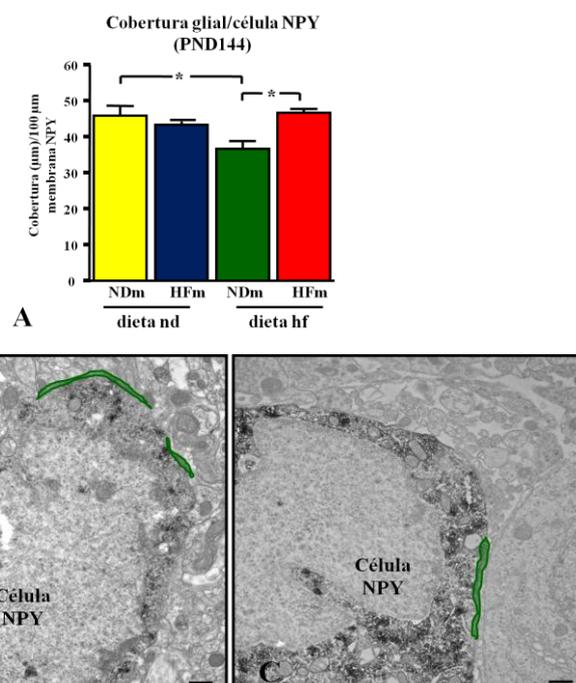


**Figura 19.** Cuantificación de la cobertura glial por cada 100  $\mu$ m de membrana de las células de Neuropeptido Y (NPY) en el núcleo arcuato del hipotálamo de los ratones de 24 (A) y 60 (B) días de vida

(n=4/grupo). PND: día postnatal de vida. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. T de Student: \* =  $p < 0,02$ ; NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### Ratones de 144 días de vida

A los 144 días de vida observamos una interacción entre la dieta de la madre y el cambio de dieta en la etapa adulta en la cobertura glial que mostraron las células de NPY en el ARC ( $F_{(3,11)}$ : 10,789;  $p < 0,008$ ). El consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta en los ratones NDm, indujo una disminución significativa en la cobertura glial alrededor de las células de NPY que no se observó en los ratones HFm (Figura 20;  $p < 0,02$ ).



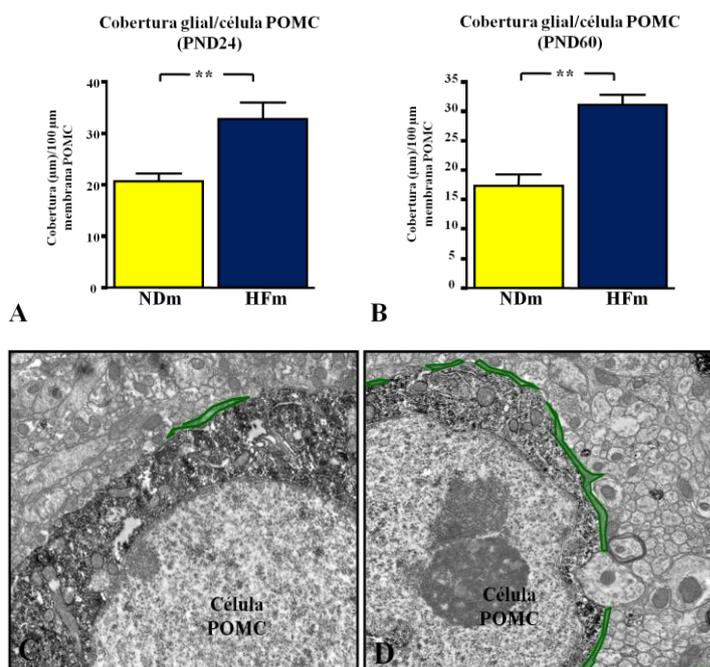
**Figura 20.** (A) Cuantificación de la cobertura glial por cada 100  $\mu\text{m}$  de membrana de las células de Neuropeptido Y (NPY) en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones de 144 días de vida (n=4/grupo). Fotografías representativas de la cobertura glial (verde) que mostraron las células NPY+ en el núcleo arcuato del hipotálamo en los ratones NDm/nd (B) y NDm/hf (C) de 144 días de vida. NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y el destete; HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y el destete; nd = dieta normal desde el destete; hf = dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA: \*= $p < 0,02$ . Escala de las imágenes: 500 nm.

### 1.3.4. Cobertura glial alrededor de las células de POMC en el ARC

#### Ratones de 24 y 60 días de vida

A los 24 y 60 días de vida de los ratones observamos un efecto de la dieta de la madre en la cobertura glial alrededor de las células de POMC del ARC. A estas edades

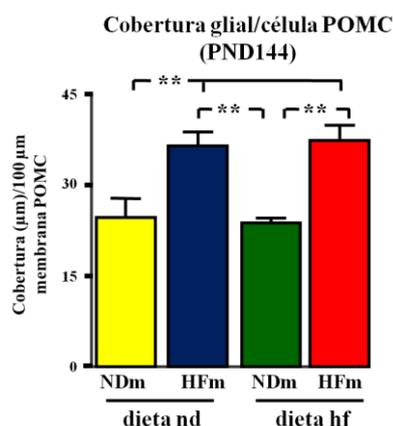
los ratones HFm presentaron una mayor cobertura glial alrededor de las células de POMC que los ratones NDm (24 días: Figura 21A;  $p < 0,006$ ; 60 días: Figura 21B;  $p < 0,002$ ).



**Figura 21.** Cuantificación de la cobertura glial por cada 100  $\mu\text{m}$  de membrana de las células de Pro-opiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones de 24 (A) y 60 (B) días de vida ( $n=4/\text{grupo}$ ). Fotografías representativas de la cobertura glial (verde) que rodea a las células de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo que mostraron los ratones de 24 días de vida procedentes de madres alimentadas con una dieta normal (NDm) (C) o una dieta rica en grasa (HFm) durante la gestación y la lactancia (D). PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. T de Student: \*\* =  $p < 0,006$ . Escala de las imágenes: 500 nm.

#### *Ratones de 144 días de vida*

A los 144 días de vida de los ratones, observamos un efecto de la dieta de la madre sobre la cobertura glial alrededor de las células de POMC en el ARC ( $F_{(3,9)}: 28,341$ ;  $p < 0,001$ ). Los ratones HFm, independientemente de su dieta en la etapa adulta, presentaron mayor cobertura glial alrededor de las células de POMC que los ratones NDm (Figura 22; ANOVA:  $p < 0,005$ ).



**Figura 22.** Cuantificación de la cobertura glial por cada 100  $\mu\text{m}$  de membrana de las células de Pro-opiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratones de 144 días de vida ( $n=4/\text{grupo}$ ). NDm = dieta normal de la madre durante la gestación y el destete; HFm = dieta rica en grasa de la madre durante la gestación y el destete; nd = dieta normal desde el destete; hf = dieta rica en grasa a partir del día 60 de vida. PND: día postnatal. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA: \*\*= $p<0,005$ .

## **2. Efecto del tratamiento crónico icv con leptina en ratas macho adultas**

En el desarrollo de la obesidad se producen alteraciones en los niveles circulantes de distintos factores metabólicos, entre ellos la leptina y la ghrelina (Argente y cols., 1997; Tschöp y cols., 2001; Martos-Moreno y cols., 2011), que también pueden afectar a la conectividad de los circuitos neuronales implicados en la regulación del balance energético (Pinto y cols., 2004). Por ello, quisimos determinar el efecto de la administración central de leptina y ghrelina en los astrocitos, y su posible implicación en la remodelación sináptica del hipotálamo.

### **2.1. Efecto crónico de la leptina en el peso, glucemia y niveles circulantes de insulina, leptina y ghrelina**

La ganancia de peso y los niveles circulantes de glucemia, insulina, leptina y ghrelina que mostraron las ratas en el momento del sacrificio se muestran en la Tabla 10.

Las ratas tratadas con leptina presentaron una menor ganancia de peso que las ratas control tras los 14 días de tratamiento ( $p<0,05$ ). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la ganancia de peso de las ratas en los tres últimos días de tratamiento (Ct:  $5,5 \pm 1,3$  g vs Lep:  $4,8 \pm 1,0$  g).

En el momento del sacrificio no apreciamos un efecto de la leptina, ni en la glucemia, ni en los niveles circulantes de leptina, insulina o ghrelina.

	Control	Leptina	T-Student
Ganancia de peso (g)	16,7 ± 3,7	2,2 ± 5,7*	p<0,05
Glucemia (mg/dl)	92,9 ± 2,4	90,3 ± 2,9	NS
Insulina (ng/ml)	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,4	NS
Leptina (ng/ml)	4,3 ± 0,3	6,3 ± 2,0	NS
Ghrelina total (GT) (pg/ml)	1593,5 ± 263,7	2021,2 ± 426,6	NS
Ghrelina acilada (GA) (pg/ml)	285,8 ± 41,4	344,3 ± 74,9	NS
Ratio GA / GT (%)	16,2 ± 1,5	20,7 ± 8,4	NS

**Tabla 10.** Ganancia de peso, glucemia y niveles circulantes de hormonas metabólicas que mostraron las ratas tratadas *icv* con vehículo (Control; n=6) o leptina (dosis: de 15 µg/día; n=6) durante 14 días. GT: ghrelina total; GA: ghrelina acilada. Los datos mostrados son la media ± SEM. T de Student: \* = p<0,05. NS: no existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales.

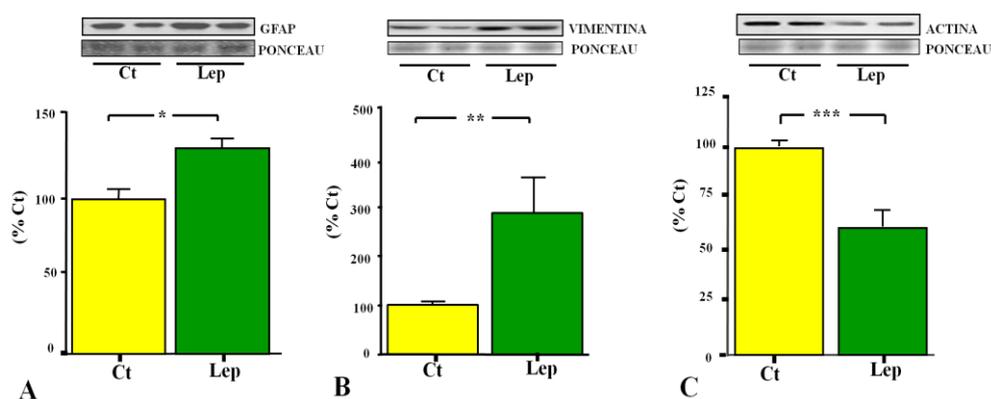
## 2.2. Efecto crónico de la leptina en el hipotálamo

### 2.2.1. Niveles proteicos de STAT3, GFAP, vimentina, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), β-actina e IL-6

Se midieron los niveles hipotalámicos de la proteína STAT-3 fosforilada en tirosina (Tyr 705) para determinar si tras los 14 días de tratamiento la sensibilidad a la leptina se vio afectada. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en los niveles de activación de esta proteína por el efecto del tratamiento crónico con leptina (Ct: 100 ± 7,8 vs Lep: 129,3 ± 10,1 % Ct).

En cuanto a los niveles proteicos de GFAP y vimentina en las ratas tratadas crónicamente con leptina, observamos un aumento significativo de los niveles de estas dos proteínas en el hipotálamo comparado con las ratas control (Figura 23A: p<0,05 y Fig. 23B: p<0,01, respectivamente). Sin embargo, la β-actina, proteína que actúa como soporte estructural de las células y frecuentemente se utiliza como control de carga, se encontró significativamente disminuida en respuesta al tratamiento con leptina (Figura 23C; p<0,001).

También se midieron los niveles del marcador de proliferación celular PCNA, el cual no se vio modificado significativamente por el tratamiento con esta hormona (Ct: 100 ± 18,3 vs Lep: 63,5 ± 7,4 % Ct).

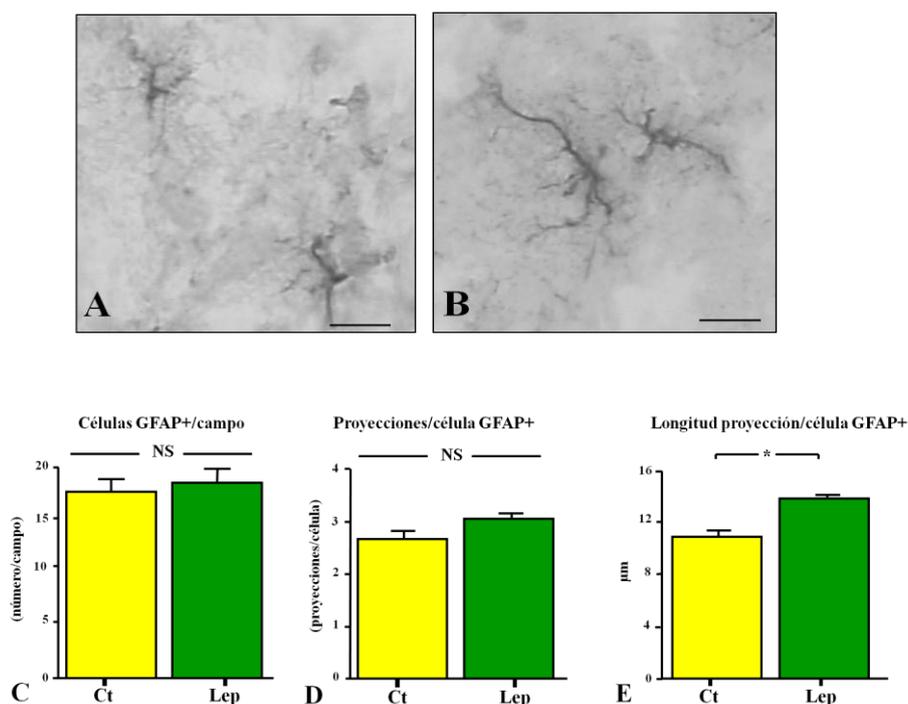


**Figura 23.** Niveles proteicos de (A) la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), (B) vimentina y (C)  $\beta$ -actina que mostraron las ratas control (Ct; n=6) y ratas tratadas *icv* con leptina (Lep: 15  $\mu$ g/día durante 14 días; n=6) en el hipotálamo. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y referidas en % Ct. T de Student: \* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001.

Finalmente, observamos que las ratas tratadas crónicamente con leptina mostraron disminuidos los niveles proteicos de IL-6 con respecto a las ratas control (Ct:  $100 \pm 11,5$  vs Lep:  $73,3 \pm 5,7$  % Ct; p<0,05).

### 2.2.2. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC

Una vez que observamos que los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo se incrementaron en respuesta a la leptina, quisimos determinar si este efecto se debía a cambios en el número y/o morfología de las células inmunoreactivas para GFAP en el ARC (Figura 24A y 24B). Observamos que, ni el número de células GFAP+, ni el número de proyecciones que presentaron estas células en el ARC, se vio afectado en respuesta al tratamiento crónico con leptina (Figura 24C y 24D). Sin embargo, la administración crónica de leptina sí que incrementó significativamente la longitud de estas proyecciones (Figura 24E; p<0,05).

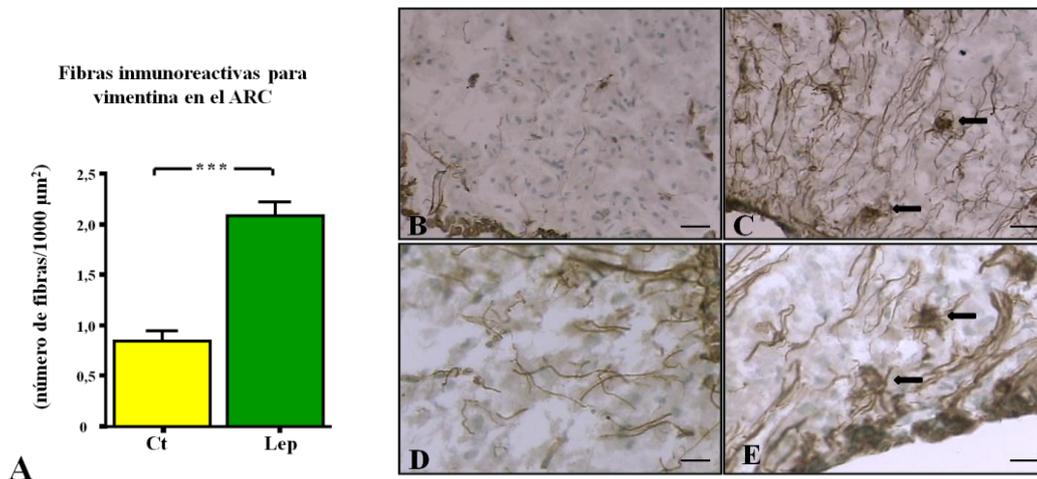


**Figura 24.** Fotografías representativas de las células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas control (Ct; n=3) (A) y de las ratas tratadas *icv* con leptina (Lep: 15  $\mu$ g/día durante 14 días; n=3) (B). Cuantificación del número medio de células GFAP+ por campo analizado (C), número medio de proyecciones (D) y longitud de estas proyecciones que presentaron estas células GFAP+ en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas control y de las ratas tratadas con leptina. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. T de Student: \* =  $p < 0,05$ . NS: no existen diferencias significativas entre los dos grupos experimentales. Escala de las imágenes: 20  $\mu$ m.

### 2.2.3. Número de fibras inmunoreactivas para vimentina en el ARC

Como la leptina indujo un incremento en los niveles proteicos de vimentina en el hipotálamo nos propusimos analizar, mediante inmunohistoquímica, el patrón de expresión de esta proteína en el ARC.

Las ratas tratadas crónicamente con leptina presentaron un mayor número de fibras inmunoreactivas para vimentina en el ARC, que se proyectaban perpendiculares al 3V, que las ratas control (Figura 25A;  $p < 0,0001$ ). Asimismo, determinamos que la administración crónica de leptina indujo un incremento en la expresión de vimentina en los astrocitos del ARC que no se observó en las ratas control. (Flechas negras; Figura 25B-E).

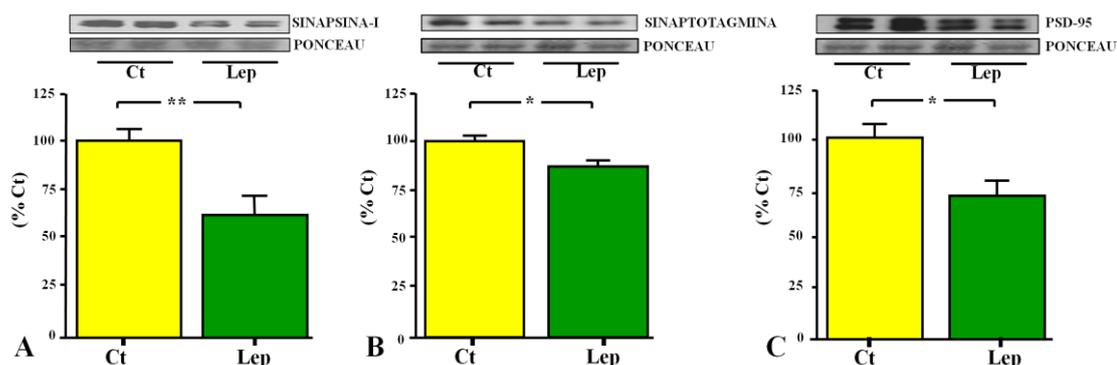


**Figura 25.** Cuantificación del número de fibras inmunoreactivas para vimentina que se proyectaban perpendiculares al tercer ventrículo de las ratas control (Ct; n=3) y de las ratas tratadas *icv* con leptina (Lep: 15  $\mu\text{g}/\text{día}$  durante 14 días; n=3) (A). Fotografías representativas de las células inmunoreactivas para vimentina en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas control (B y D) y de las ratas tratadas *icv* con leptina (C y E). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. T de Student: \*\*\* =  $p < 0,0001$ . Escala de las imágenes: 40 (B y C) y 20  $\mu\text{m}$  (D y E).

#### 2.2.4. Niveles proteicos de sinapsina, sinaptotagmina, syntaxina, SNAP-25 y PSD-95

Las ratas tratadas crónicamente con leptina mostraron los niveles de las proteínas presinápticas, sinapsina I y sinaptotagmina, disminuidos significativamente con respecto a las ratas control (Figura 26A;  $p < 0,01$  y Figura 26B;  $p < 0,02$ , respectivamente). Sin embargo, no encontramos cambios en los niveles de las demás proteínas presinápticas analizadas (syntaxina: Ct:  $100 \pm 4,0$  vs Lep:  $99,4 \pm 10,1\%$  Ct; SNAP-25: Ct:  $100 \pm 2,8$  vs Lep:  $122,8 \pm 9,0\%$  Ct).

Las ratas tratadas con leptina mostraron disminuidos significativamente los niveles de la proteína postsináptica PSD95 con respecto a las ratas control (Figura 26C;  $p < 0,02$ ).



**Figura 26.** Niveles proteicos de sinapsina I (A), sinaptotagmina (B) y PSD 95 (C) medidos por Western blot procedentes del hipotálamo de las ratas control (Ct; n=6) y de las ratas tratadas *icv* con leptina (Lep: 15 µg/día durante 14 días; n=6). PSD95: proteína de la densidad postsináptica 95. Los datos mostrados son la media ± SEM y referidas en % Ct. T de Student: \* = p<0,02; \*\* = p<0,01.

### **3. Efecto del tratamiento agudo *icv* con ghrelina en ratas macho adultas**

La ghrelina es una hormona capaz de regular la conectividad de las neuronas del hipotálamo implicadas en el balance energético (Pinto y cols., 2004), de modo que, en este estudio determinamos el efecto rápido que ejerció esta hormona en la densidad de las proteínas sinápticas, y en la activación y morfología de los astrocitos del hipotálamo. Además, analizamos los efectos diferenciales que ejerció la ghrelina en las células hipotalámicas de las ratas en función de su estado de acilación.

#### **3.1. Efecto agudo de la ghrelina en la ingesta, peso, glucemia y niveles circulantes de hormonas**

La ganancia de peso, ingesta, glucemia y niveles circulantes de insulina, leptina y ghrelina que mostraron las ratas en el momento del sacrificio se muestran en la Tabla 11.

No observamos cambios significativos en la ganancia de peso, ni en la ingesta, ni en los niveles circulantes de insulina o leptina trascurrida una hora de la administración *icv* de ghrelina o ghrelina desacilada (D-ghrelina). En cambio, tanto las ratas tratadas con ghrelina como las ratas tratadas con D-ghrelina, mostraron significativamente incrementados sus niveles circulantes de ghrelina total en suero (ANOVA: p<0,0001). En cuanto al ratio de acilación de la ghrelina encontramos una disminución en el porcentaje de ghrelina acilada en suero en las ratas tratadas con ghrelina y D-ghrelina

(ANOVA:  $p < 0,003$ ). Finalmente, el tratamiento *icv* con ghrelina y D-ghrelina indujo una disminución de los niveles circulantes de IGF-I en las ratas (ANOVA:  $p < 0,004$ ).

	Control	Ghrelina	Ghrelina desacilada	ANOVA
Ganancia de peso (g)	-0,5 ± 0,8	-0,9 ± 0,8	-1,1 ± 0,5	NS
Ingesta (g)	1,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,5	NS
Glucemia (mg/dl)	97,4 ± 2,5	90,4 ± 4,2	91,9 ± 3,1	NS
Insulina (ng/ml)	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,7	NS
Leptina (ng/ml)	4,2 ± 0,5	3,6 ± 0,2	5,2 ± 0,7	NS
Ghrelina total (GT) (pg/ml)	1296,6 ± 115,6	4130,8 ± 785,4 <sup>a</sup>	3919,7 ± 437,7 <sup>a</sup>	$p < 0,0001$
Ghrelina acilada (GA) (pg/ml)	181,0 ± 15,6	238,4 ± 30,1	221,5 ± 28,1	NS
Ratio GA / GT (%)	14,2 ± 1,0	6,6 ± 2,2 <sup>a</sup>	6,1 ± 1,7 <sup>a</sup>	$p < 0,003$
IGF-I (ng/ml)	321,8 ± 32,1	250,3 ± 10,6 <sup>a</sup>	188,4 ± 26,2 <sup>a</sup>	$p < 0,004$

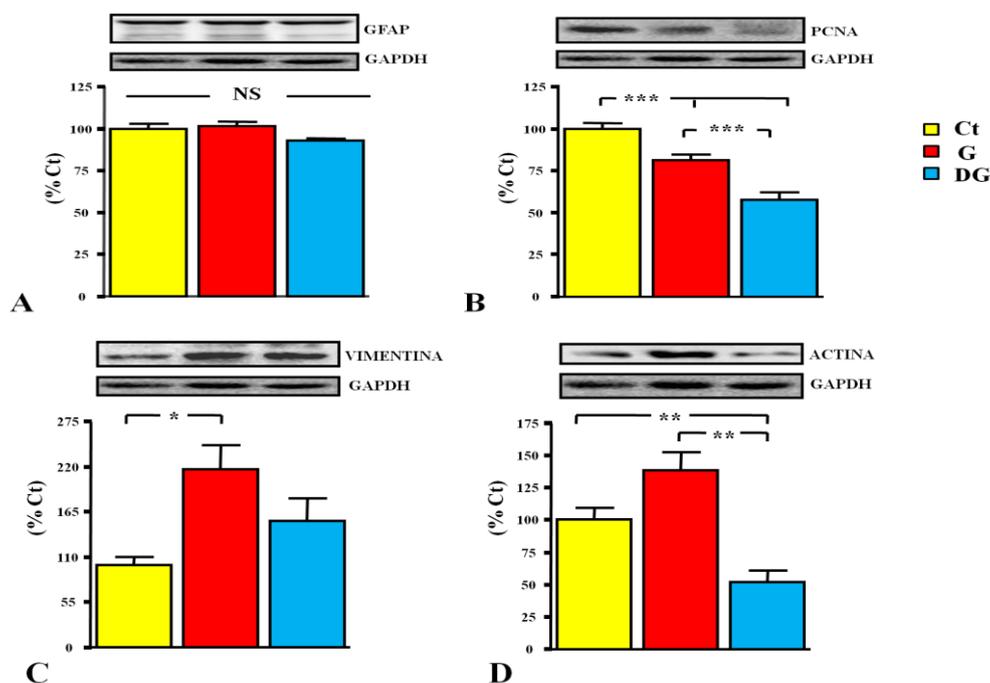
**Tabla 11.** Cambios en la ganancia de peso, la ingesta, la glucemia y los niveles circulantes de hormonas que mostraron las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Ct; n=6-12), ghrelina (n=6-12) o ghrelina desacilada a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (n=6-12). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: *a* = diferencia significativa versus Ct. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 3.2. Efecto agudo de la ghrelina en el hipotálamo

#### 3.2.1. Niveles proteicos de GFAP, vimentina, PCNA, $\beta$ -actina e IL-6.

Los niveles de GFAP en el hipotálamo no se vieron afectados por los tratamientos (Figura 27A). Sin embargo, las ratas tratadas con ghrelina y D-ghrelina presentaron disminuidos significativamente los niveles proteicos de PCNA, aunque el efecto inhibitor que ejerció la D-ghrelina sobre esta proteína fue significativamente mayor que el observado con ghrelina (Figura 27B; ANOVA:  $p < 0,0001$ ).

Además, encontramos que las ratas tratadas con ghrelina presentaron un incremento significativo de los niveles de vimentina en el hipotálamo comparado con las ratas control (Figura 27C; ANOVA:  $p < 0,05$ ). Asimismo, observamos que la D-ghrelina indujo una disminución de los niveles de  $\beta$ -actina en el hipotálamo (Figura 27D; ANOVA:  $p < 0,002$ ).



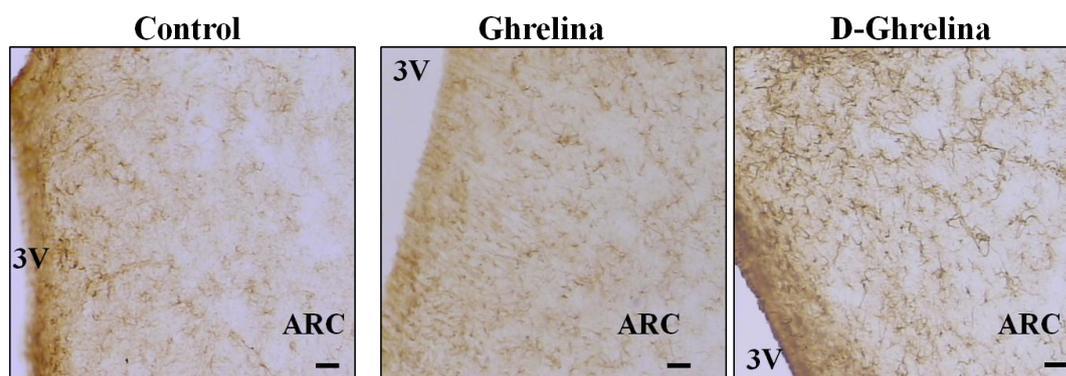
**Figura 27.** Niveles proteicos de (A) la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), (B) el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), (C) vimentina y (D) actina en el hipotálamo que mostraron las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Ct; n=4), ghrelina (G; n=4) o ghrelina desacilada (DG; n=4) a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Ct. ANOVA: \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,002$ ; \*\*\*= $p < 0,0001$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Finalmente observamos que el tratamiento con ghrelina y D-ghrelina incrementó los niveles proteicos de IL-6 en el hipotálamo de las ratas (Ct:  $100 \pm 3,8$ ; G:  $155,3 \pm 7,4$ ; DG:  $162,7 \pm 10,2$  % Ct; ANOVA:  $p < 0,004$ ).

### 3.2.2. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC

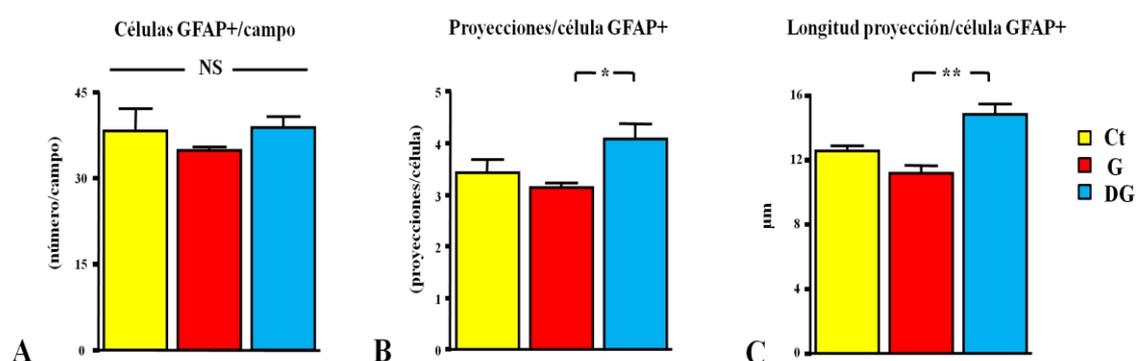
Aunque no observamos diferencias en los niveles proteicos de GFAP, sí que encontramos cambios en los niveles proteicos de vimentina y del marcador de proliferación celular PCNA en el hipotálamo. De modo que, mediante estudios cuantitativos y morfológicos, analizamos si el número y/o morfología de los astrocitos se vieron afectados por los tratamientos.

En la Figura 28 podemos observar fotografías representativas del marcaje de células inmunoreactivas para GFAP en el ARC de los distintos grupos experimentales.



**Figura 28.** Fotografías representativas de las células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) del núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Control), ghrelina o ghrelina desacilada (D-Ghrelin) a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . 3V: tercer ventrículo. Escala de las imágenes: 20  $\mu\text{m}$ .

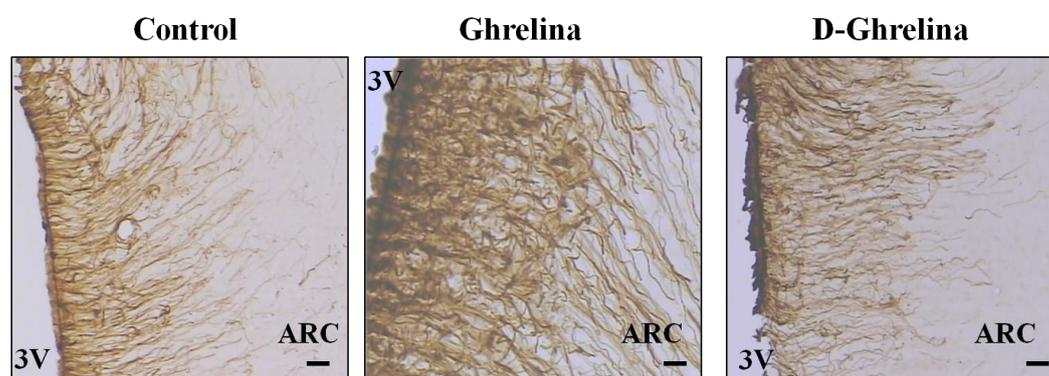
Como podemos observar en las ratas tratadas con D-ghrelina, aunque no existieron diferencias significativas en el número de células GFAP+ en el ARC (Figura 29A), sí detectamos cambios morfológicos en estas células. Las ratas tratadas con D-ghrelina presentaron un mayor número de proyecciones por cada célula GFAP+ (Figura 29B; ANOVA:  $p < 0,04$ ) y con estas proyecciones significativamente más largas que las ratas tratadas con ghrelina (Figura 29C; ANOVA:  $p < 0,005$ ).



**Figura 29.** Cuantificación del número de células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) por campo (A), número de proyecciones por cada célula GFAP+ (B) y longitud media de estas proyecciones (C) en el núcleo arcuato del hipotálamo que mostraron las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Ct;  $n=4$ ), ghrelina (G;  $n=4$ ) o ghrelina desacilada (DG;  $n=4$ ) a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA: \* =  $p < 0,04$ ; \*\* =  $p < 0,005$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 3.2.3. Cuantificación de la inmunoreactividad para vimentina en el ARC

En la Figura 30 se puede observar que el tratamiento con ghrelina incrementó la inmunoreactividad para vimentina en el ARC. El análisis cuantitativo demuestra que tras una hora de la administración de ghrelina aumentó significativamente la densidad inmunoreactiva para vimentina en el ARC con respecto al grupo de ratas control (T Student:  $p < 0,03$ ), mientras que, con D-ghrelina no encontramos diferencias significativas en este parámetro (Control:  $35,0 \pm 3,0$ ; Ghrelina:  $46,3 \pm 2,0$ ; D-Ghrelina:  $34,7 \pm 6,0$  inmunodensidad óptica/ $\mu\text{m}^2$ ).



**Figura 30.** Fotografías representativas de la inmunoreactividad para vimentina en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Control), ghrelina o ghrelina desacilada (D-Ghrelina) a una dosis de  $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . 3V: tercer ventrículo. Escala de las imágenes:  $20 \mu\text{m}$ .

### 3.2.4. Niveles proteicos de sinapsina, sinaptofisina, sinaptotagmina, syntaxina, SNAP-25 y PSD-95

Las ratas tratadas con ghrelina presentaron las proteínas presinápticas sinaptofisina y sinapsina disminuidas significativamente en el hipotálamo con respecto a las ratas control (ANOVA:  $p < 0,04$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).

En cuanto a las ratas tratadas con D-ghrelina observamos que las proteínas presinápticas sinaptotagmina y syntaxina se encontraban disminuidas significativamente con respecto a las ratas control (ANOVA:  $p < 0,03$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). En el caso de syntaxina esta disminución con D-ghrelina también fue estadísticamente significativa con respecto al grupo de ratas tratadas con ghrelina (Tabla 12).

En cuanto a la proteína presináptica SNAP25 y la proteína postsináptica PSD95, el tratamiento *icv* con ghrelina logró aumentar los niveles de estas dos proteínas en el hipotálamo (ANOVA;  $p < 0,007$  y  $p < 0,02$ , respectivamente).

	Control	Ghrelina	Ghrelina desacilada	ANOVA
Sinaptofisina	100 ± 4,1	74,7 ± 7,9 <sup>a</sup>	76,7 ± 5,7	p<0,04
Sinapsina	100 ± 5,1	77,3 ± 10,5 <sup>a</sup>	90,4 ± 11,5	p<0,05
Sinaptotagmina	100 ± 13,6	66,0 ± 9,1	51,6 ± 8,8 <sup>a</sup>	p<0,03
Sintaxina	100 ± 3,5	85,0 ± 5,0	44,7 ± 4,3 <sup>a,b</sup>	p<0,0001
SNAP25	100 ± 5,7	141,6 ± 6,5 <sup>a</sup>	120,8 ± 7,8	p<0,007
PSD95	100 ± 7,5	140,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	107,5 ± 11,5	p<0,02

**Tabla 12.** Niveles de las proteínas sinápticas del hipotálamo que mostraron las ratas tras 1 hora de la administración *icv* de vehículo (Control; n=4), ghrelina (n=4) o ghrelina desacilada (n=4) a una dosis de 0,4 µg/µl. Los datos mostrados son la media ± SEM y están referidos en % Ct. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: *a* = diferencias significativas versus Control; *b* = diferencia significativa versus Ghrelina.

#### **4. Efecto del tratamiento crónico *icv* con ghrelina en ratas macho adultas**

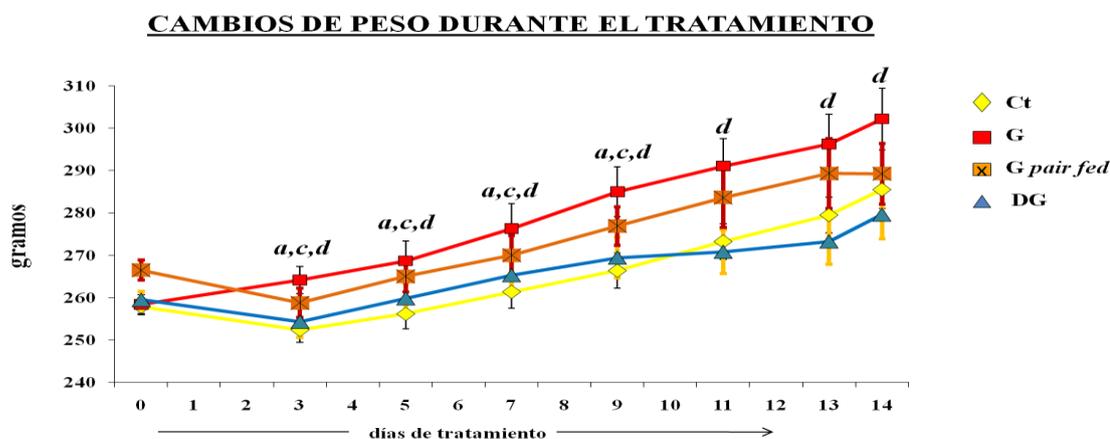
Como los efectos crónicos y agudos de las hormonas metabólicas pueden variar, quisimos analizar los efectos a largo plazo que ejerce la ghrelina sobre la activación y morfología de los astrocitos. También, en este estudio, identificamos qué cambios inducidos por esta hormona eran dependientes de sus acciones sobre la ingesta y la ganancia de peso.

##### **4.1. Efecto crónico de la ghrelina en la ingesta, peso, glucemia y niveles circulantes de hormonas**

La ingesta tanto diaria como acumulada durante los 14 días que duró el tratamiento, fue significativamente mayor en el grupo de ratas tratadas con ghrelina que la observada en el resto de grupos experimentales (Tabla 13; ANOVA de medidas repetidas  $F_{(1,20)}: 1227,4; p<0,0001$ ), sin embargo los tres últimos días de tratamiento la ingesta de estas ratas no fue diferente al del grupo de ratas control (G:  $24,5 \pm 0,8$  vs Ct:  $23,83 \pm 0,7$ ).

Asimismo, encontramos que el grupo de ratas tratadas con ghrelina presentó una mayor ganancia del peso, desde el tercer día hasta el noveno día de tratamiento que el resto de los grupos experimentales, incluido el grupo de ghrelina *pair fed*. A partir del noveno día y hasta el final del tratamiento (día 14) sólo observamos diferencias significativas en la ganancia de peso entre las ratas tratadas con ghrelina y las ratas

tratadas con D-ghrelina (Figura 31; ANOVA de medidas repetidas  $F_{(1,49)}$ : 5,945;  $p < 0,003$ ).



**Figura 31.** Cambios en el peso corporal a lo largo de los 14 días que duró el tratamiento que experimentaron las ratas control (Ct; n=16), las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  alimentadas *ad libitum* (G; n=16) y a las que se les restringió la ingesta (G *pair fed*; n=8), y las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  (DG; n=16). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA de una vía con medidas repetidas:  $p < 0,003$ . Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: a = diferencia significativa versus Ct; c = diferencia significativa versus G *pair fed*; d = diferencias significativas versus DG.

En la Tabla 13 se muestra la ganancia de peso absoluta, la ingesta acumulada y los niveles circulantes de hormonas que mostraron las ratas en el momento del sacrificio. Las ratas tratadas con ghrelina mostraron incrementados los niveles circulantes de leptina comparado con el resto de grupos experimentales (ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Del mismo modo, encontramos que las ratas tratadas con ghrelina mostraron sus niveles séricos de insulina incrementados significativamente con respecto a las ratas tratadas con D-ghrelina (ANOVA:  $p < 0,03$ ).

Los niveles circulantes de ghrelina total en suero estaban incrementados significativamente en el grupo de ghrelina *pair fed* y D-ghrelina con respecto al grupo control (ANOVA:  $p < 0,0001$ ).

No observamos un efecto de los tratamientos en el resto de parámetros metabólicos analizados (glucemia, ghrelina acilada y ratio de acilación).

	Control	Ghrelina	Ghrelina pair fed	Ghrelina desacilada	ANOVA
Ganancia de peso absoluto (g)	30,1 ± 4,5	51,4 ± 5,7 <sup>a,c,d</sup>	26,6 ± 4,0	12,8 ± 5,2	p<0,0001
Ingesta acumulada (g)	556,3 ± 14,0	651,4 ± 19,5 <sup>a,c,d</sup>	518,3 ± 9,9	491,0 ± 27,0	p<0,0001
Glucemia (mg/dl)	92,7 ± 2,2	95,6 ± 2,2	87,4 ± 3,3	90,2 ± 3,0	NS
Insulina (ng/ml)	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,4 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,3	1,5 ± 0,2	p<0,03
Leptina (ng/ml)	4,9 ± 0,7	10,3 ± 1,7 <sup>a,c,d</sup>	4,9 ± 0,6	3,3 ± 0,7	p<0,0001
Ghrelina total (GT) (pg/ml)	1444,7 ± 128,7	2271,1 ± 282,5	3237,1 ± 580,5 <sup>a</sup>	3520,1 ± 478,5 <sup>a</sup>	p<0,0001
Ghrelina acilada (GA) (pg/ml)	129,6 ± 9,4	168,5 ± 33,6	218,5 ± 51,8	262,6 ± 57,5	NS
Ratio GA / GT (%)	9,9 ± 1,0	7,4 ± 1,0	8,5 ± 2,0	12,6 ± 3,5	NS

**Tabla 13.** Ganancia de peso, ingesta acumulada, glucemia y niveles circulantes de las hormonas metabólicas que mostraron las ratas control (n=16), las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5 µg/día alimentadas *ad libitum* (n=16) y a las que se les restringió la ingesta (Ghrelina *p fed*; n=8), y las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5 µg/día (n=16). GT: ghrelina total; GA: ghrelina acilada. Los datos mostrados son la media ± SEM. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: a = diferencia significativa versus Control; c= diferencia significativa versus Ghrelina *pair fed*; d= diferencia significativa versus Ghrelina desacilada. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Tampoco encontramos cambios significativos en los niveles séricos de IGF-I en respuesta a los tratamientos (Ct: 738,4 ± 75,1; G: 641,8 ± 64,8; G *pair fed*: 646,6 ± 108,0; DG: 508,0 ± 30,2 ng/ml).

## 4.2. Efecto crónico de la ghrelina en el hipotálamo

### 4.2.1. Niveles del mensajero de NPY, AgRP, POMC, CART, GFAP y GHS-R1a

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo en los niveles de expresión del mensajero de los neuropéptidos anorexigénicos (POMC y CART) en el hipotálamo. Las ratas tratadas con ghrelina mostraron un aumento en la expresión del mensajero de CART comparado con las ratas tratadas con D-ghrelina (ANOVA; p<0,02). En cambio, las ratas tratadas con D-ghrelina mostraron una menor expresión del mensajero de POMC comparado con las ratas tratadas con ghrelina (ANOVA; p<0,04).

Los neuropéptidos orexigénicos (NPY y AgRP) no se encontraron afectados por los tratamientos (Tabla 14).

El grupo de ghrelina *pair fed* mostró una mayor cantidad de ARNm de GFAP en el hipotálamo que el grupo control y D-ghrelina (ANOVA: p<0,02). Sin embargo no

detectamos cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión del mensajero del receptor de ghrelina 1a (GHS-R1a) por efecto de los tratamientos.

	Control	Ghrelina	Ghrelina pair fed	Ghrelina desacilada	ANOVA
NPY	100 ± 2,9	92,8 ± 3,7	97,2 ± 11,3	84,9 ± 1,6	NS
AgRP	100 ± 5,8	124,6 ± 8,6	106,5 ± 16,9	83,1 ± 13,2	NS
POMC	100 ± 10,1	118,4 ± 7,2	80,7 ± 14,7	76,2 ± 10,2 <sup>b</sup>	p<0,04
CART	100 ± 6,7	125,6 ± 6,4 <sup>d</sup>	102,8 ± 10,9	90,1 ± 7,0	p<0,02
GFAP	100 ± 13,7	124,4 ± 10,2	220,0 ± 60,8 <sup>a,d</sup>	108,4 ± 14,9	p<0,02
GHS-R1a	100 ± 6,4	106,1 ± 7,4	84,3 ± 10,6	80,1 ± 6,4	NS

**Tabla 14.** Niveles de expresión génica de los neuropéptidos orexigénicos (NPY y AgRP) y anorexigénicos (POMC y CART), GFAP y GHS-R1a en el hipotálamo de las ratas control (n=6), las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5 µg/día alimentadas *ad libitum* (n=6) y a las que se les restringió la ingesta (Ghrelina *pair fed*; n=4), y las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5 µg/día (n=6). NPY= Neuropéptido Y; AgRP= proteína relacionada con agouti; POMC= Pro-opiomelanocortina; CART= transcrito regulado por cocaína y anfetamina; GHS-R1a: receptor de ghrelina 1a; GFAP: proteína ácida fibrilar de glía. Los datos mostrados son la media ± SEM y referidos en % Control. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: a = diferencia significativa versus Control; b= diferencia significativa versus Ghrelina; d= diferencia significativa versus Ghrelina desacilada. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

#### 4.2.2. Niveles del mensajero de los mediadores inflamatorios TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6

Observamos un efecto de la ghrelina, en las ratas con acceso a la comida *ad libitum*, y de la D-ghrelina en los niveles de expresión del mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el hipotálamo (Tabla 15). Las ratas tratadas con ghrelina y D-ghrelina presentaron mayores niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 que las ratas control (p<0,004 y p<0,02, respectivamente). Asimismo, en el caso de TNF- $\alpha$ , el incremento también fue significativamente mayor al detectado en el grupo ghrelina *pair fed*.

Por otro lado, aunque los niveles del mensajero de IL-1 $\beta$  estaban incrementados con todos los tratamientos, estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (Tabla 15).

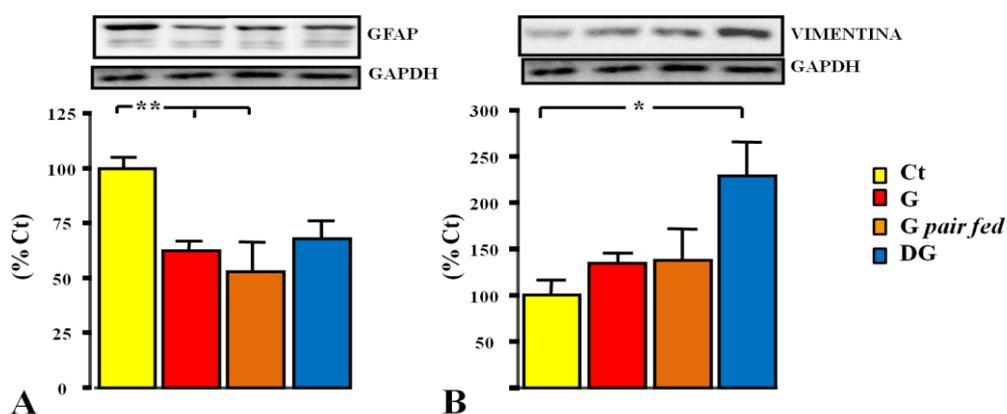
	Control	Ghrelina	Ghrelina pair fed	Ghrelina desacilada	ANOVA
TNF $\alpha$	100 $\pm$ 7,3	147,6 $\pm$ 9,6 <sup>a,c</sup>	91,8 $\pm$ 1,6	148,8 $\pm$ 11,8 <sup>a,c</sup>	p<0,004
IL-1 $\beta$	100 $\pm$ 8,9	450,0 $\pm$ 60,5	255,1 $\pm$ 147,3	323,5 $\pm$ 129,9	NS
IL-6	100 $\pm$ 14,9	151,3 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>	118,7 $\pm$ 10,4	155,6 $\pm$ 15,5 <sup>a</sup>	p<0,02

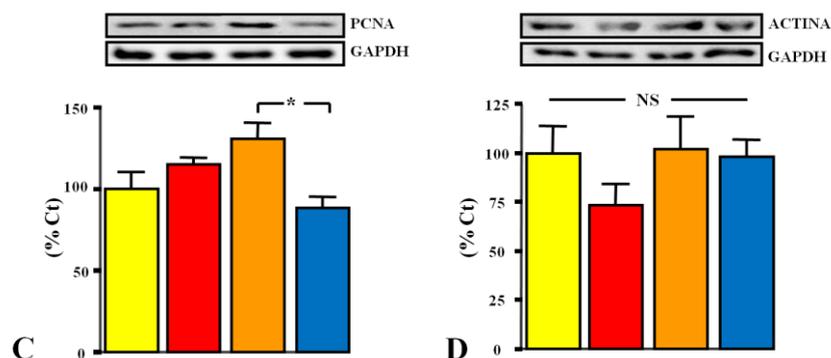
**Tabla 15.** Niveles de expresión del mensajero para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL)-1 $\beta$  y -6 en el hipotálamo de las ratas tratadas con vehículo (n=6), de las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5  $\mu$ g/día alimentadas *ad libitum* (n=6) y a las que se les restringió la ingesta (Ghrelina *pair fed*; n=4), y de las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5  $\mu$ g/día (n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y referidos en % Control. Comparaciones *posthoc* del ANOVA de una vía: a = diferencia significativa versus Control; c = diferencia significativa versus Ghrelina *pair fed*. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

#### 4.2.3. Niveles proteicos de GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina

El tratamiento crónico con ghrelina, independientemente de que a las ratas se les restringiese o no la ingesta, indujo una disminución en los niveles proteicos de GFAP comparado con las ratas control (Figura 32A; ANOVA: p<0,006).

En cambio, los niveles de vimentina se vieron aumentados, siendo este incremento significativo en las ratas tratadas con D-ghrelina al compararlos con las ratas control (Figura 32B; ANOVA: p<0,03). El grupo de ghrelina *pair fed* mostró incrementados significativamente los niveles de PCNA con respecto al grupo D-ghrelina (Figura 32C; ANOVA: p<0,02). No detectamos ningún efecto de los tratamientos en los niveles de  $\beta$ -actina en el hipotálamo (Figura 32D).

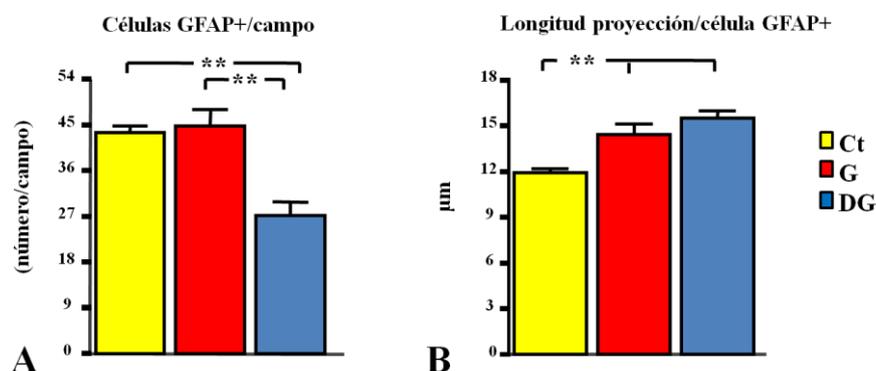


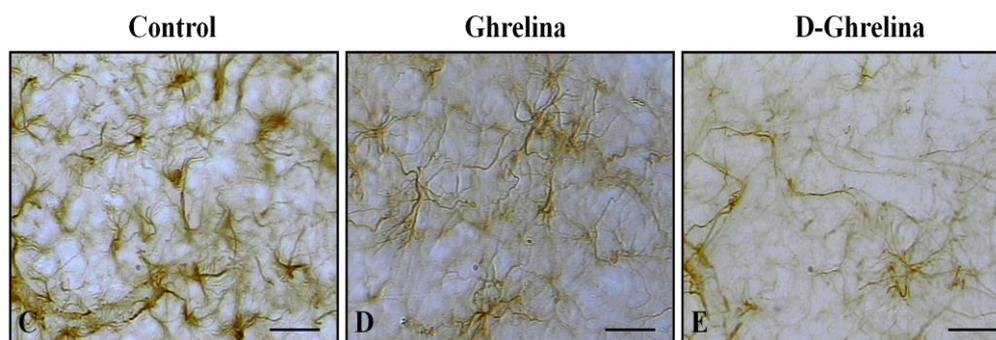


**Figura 32.** Niveles proteicos de (A) la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), (B) vimentina, (C) el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y (D)  $\beta$ -actina medidos por Western blot en el hipotálamo de las ratas control (Ct; n=6), de las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5  $\mu$ g/día alimentadas *ad libitum* (G; n=6) y a las que se les restringio la ingesta (*G pair fed*; n=4), y de las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5  $\mu$ g/día (DG; n=6). GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Ct. ANOVA: \*= $p < 0,03$ ; \*\*= $p < 0,006$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

#### 4.2.4. Número y morfología de las células GFAP+ en el ARC

El grupo de ratas tratadas crónicamente con D-ghrelina presentaron un menor número de células positivas para GFAP en el ARC que el resto de grupos experimentales (Figura 33A; ANOVA:  $p < 0,004$ ). Asimismo, las ratas tratadas con ghrelina y D-ghrelina presentaron la longitud media de las proyecciones de las células GFAP+ significativamente más largas que las encontradas en las ratas control (Figura 33B;  $p < 0,005$ ). No encontramos un efecto de los tratamientos en el número medio de proyecciones que presentaron las células GFAP+ en este núcleo hipotalámico (Ct:  $2,58 \pm 0,27$ ; G:  $3,04 \pm 0,13$ ; DG:  $2,92 \pm 0,25$  número de proyecciones/célula GFAP+).





**Figura 33.** Cuantificación del número de células GFAP+ por campo (A) y longitud media de las proyecciones que presentaban las células GFAP+ (B) en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas control (Ct; n=4), de las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  alimentadas *ad libitum* (G; n=4) y de las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  (DG; n=4). Fotografías representativas de las células inmunoreactivas para la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP+) en el núcleo arcuato del hipotálamo de las ratas Control (C), de las ratas tratadas *icv* con ghrelina alimentadas *ad libitum* (D) y de las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada (D-ghrelina) (E). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. ANOVA: \*\*= $p < 0,005$ . Escala de las imágenes: 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5. Niveles de las proteínas implicadas en la conectividad sináptica

Los niveles de las distintas proteínas presinápticas y postsinápticas analizadas en el hipotálamo en respuesta a la ghrelina y D-ghrelina, se muestran en la Tabla 16. Las ratas tratadas con ghrelina presentaron disminuidos significativamente los niveles de sinaptofisina al compararlos con los niveles encontrados en las ratas tratadas con D-ghrelina (ANOVA:  $p < 0,02$ ).

El grupo de ghrelina *pair fed* presentó unos niveles proteicos de sintaxina incrementados significativamente con respecto a los demás grupos experimentales (ANOVA:  $p < 0,007$ ). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de las demás proteínas sinápticas analizadas en el hipotálamo en respuesta a los tratamientos.

	Control	Ghrelina	Ghrelina <i>pair fed</i>	Ghrelina desacilada	ANOVA
Sinaptofisina	100 $\pm$ 5,0	79,1 $\pm$ 4,8 <sup>d</sup>	101,7 $\pm$ 10,7	110,4 $\pm$ 4,5	$p < 0,02$
Sinapsina	100 $\pm$ 13,6	81,4 $\pm$ 12,5	61,8 $\pm$ 16,6	68,8 $\pm$ 16,6	NS
Sinaptotagmina	100 $\pm$ 8,0	100,9 $\pm$ 6,7	87,1 $\pm$ 9,3	86,5 $\pm$ 6,1	NS
Sintaxina	100 $\pm$ 1,9	96,2 $\pm$ 7,4	128,0 $\pm$ 3,9 <sup>a,b,d</sup>	103,7 $\pm$ 5,6	$p < 0,007$
SNAP25	100 $\pm$ 5,0	79,1 $\pm$ 4,8	101,7 $\pm$ 10,7	110,4 $\pm$ 4,5	NS
PSD95	100 $\pm$ 1,0	113,7 $\pm$ 8,6	117,9 $\pm$ 9,2	140,3 $\pm$ 12,7	NS

**Tabla 16.** Niveles de las proteínas implicadas en la conectividad sináptica entre neuronas en el hipotálamo de las ratas control (n=6), de las ratas tratadas *icv* con ghrelina a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$

alimentadas *ad libitum* (n=6) y a las que se les restringió la ingesta (*Ghrelin pair fed*; n=4), y de las ratas tratadas *icv* con ghrelina desacilada a una dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{día}$  (n=6). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y referidos en % Control. Comparaciones *posthoc* del ANOVA: *a* = diferencia significativa versus Control; *b* = diferencia significativa versus Ghrelina; *d* = diferencia significativa versus Ghrelina desacilada. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

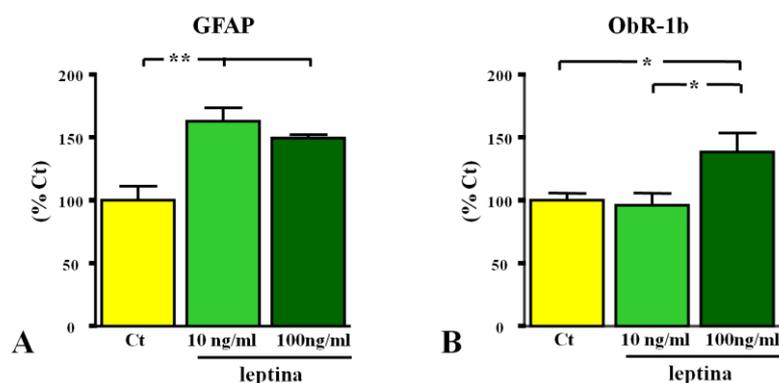
## **5. Efecto de la leptina y la ghrelina en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos**

Para determinar si la leptina y la ghrelina ejercen efectos directos en los astrocitos se procedió al estudio *in vitro* de estas hormonas sobre la inflamación, activación y proliferación de los astrocitos hipotalámicos.

### **5.1. Efecto *in vitro* de la leptina en los astrocitos**

#### **5.1.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP y de ObR-1b**

En los astrocitos en cultivo los niveles de expresión del mensajero de GFAP incrementaron significativamente en respuesta a 24 horas de exposición a la leptina a 10 ng/ml y 100 ng/ml (Figura 34A; ANOVA:  $p < 0,002$ ). Sin embargo, sólo encontramos un incremento significativo de la expresión de ObR-1b en los cultivos tratados durante 24 horas con una dosis de 100 ng/ml de esta hormona (Figura 34B; ANOVA:  $p < 0,02$ ).



**Figura 34.** Niveles de expresión del mensajero de (A) la proteína acídica fibrilar de glía (GFAP) y (B) del receptor de leptina 1b (ObR-1b) que mostraron los cultivos tratados durante 24 horas con vehículo (Ct; n=4) o con una dosis de 10 ó 100 ng/ml de leptina (n=4). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Ct. ANOVA: \*= $p < 0,02$ ; \*\*= $p < 0,002$ .

### 5.1.2. Niveles de expresión del mensajero de $TNF\alpha$ , $IL-1\beta$ e $IL-6$

Analizamos el efecto de la leptina en los niveles de expresión génica de algunos factores que participan en la respuesta inflamatoria como son  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$  en los cultivos de astrocitos hipotalámicos (Tabla 17). Observamos que tras 24 horas de exposición a la dosis mínima de leptina empleada (10 ng/ml), se indujo un aumento significativo en la expresión de  $IL-1\beta$  e  $IL-6$  ( $p < 0,004$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). En cambio los niveles de expresión del mensajero de  $TNF\alpha$  no se vieron modificados en respuesta a esta hormona.

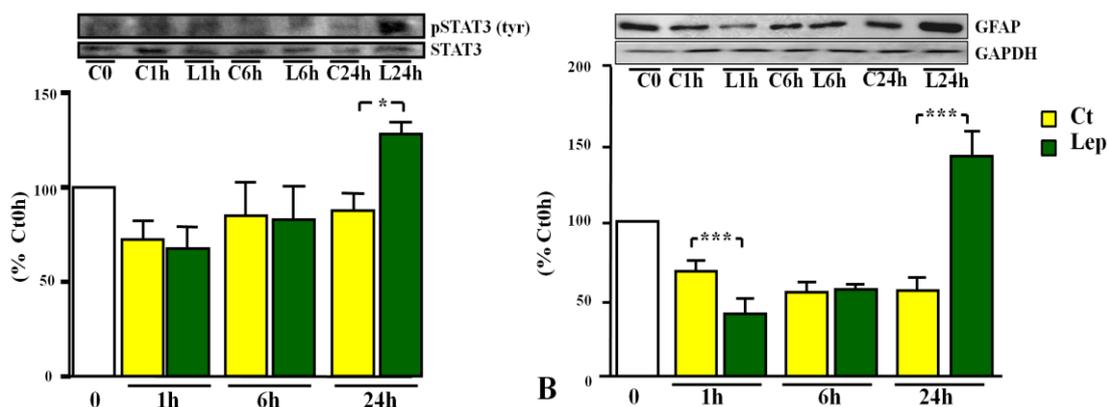
	Control	Leptina	T-Student
$TNF\alpha$	100 $\pm$ 3,0	109,0 $\pm$ 25,7	NS
$IL-1\beta$	100 $\pm$ 16,6	180,5 $\pm$ 20,7**	$p < 0,004$
$IL-6$	100 $\pm$ 7,2	143,1 $\pm$ 33,1*	$p < 0,05$

**Tabla 17.** Niveles de expresión del mensajero del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) y las interleuquinas (IL)  $-1\beta$  y  $-6$  en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos tratados con vehículo (Control; n=4) o leptina a una dosis de 10 ng/ml durante 24 horas (n=4). Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Control. T de Student: \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,004$ . NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 5.1.3. Niveles proteicos de $STAT-3$ , $GFAP$ , vimentina, $PCNA$ y $\beta$ -actina

Existió un efecto del tiempo en los niveles proteicos de pSTAT-3(Tyr705) en respuesta a la leptina ( $F_{(6,14)}$ : 4,082;  $p < 0,03$ ). Únicamente observamos un incremento en los niveles de pSTAT3 en los astrocitos en cultivo tratados durante 24 horas con leptina (Figura 35A; ANOVA:  $p < 0,05$ ).

Además encontramos una interacción entre el efecto de la leptina y el tiempo de exposición a la misma, en los niveles de  $GFAP$  ( $F_{(6,29)}$ : 6,010;  $p < 0,001$ ). Los niveles de  $GFAP$  disminuyeron significativamente trascurrida 1 hora de tratamiento con leptina, mientras que a las 6 horas los niveles se normalizaron a valores control. Finalmente, los niveles de  $GFAP$  incrementaron significativamente tras 24 horas de exposición a esta hormona (Figura 35B; ANOVA:  $p < 0,0001$ ).



**Figura 35.** Niveles proteicos (A) del transductor de señal y activador de la transcripción tipo 3 fosforilado en tirosina (pSTAT3 tyr; n=3) y (B) de la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP; n=7) que mostraron los cultivos tratados con vehículo (C) o con leptina (L) a una dosis de 100 ng/ml durante 1, 6 ó 24 horas. GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % control 0 horas (Ct0h). ANOVA: \*= $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

No encontramos un efecto de la leptina en los niveles proteicos de vimentina, PCNA o actina en los astrocitos en cultivo (Tabla 18).

	C0	C1h	L1h	C6h	L6h	C24h	L24h	ANOVA
Vimentina	100 $\pm$ 12,2	84,3 $\pm$ 19,2	79,7 $\pm$ 12,7	62,8 $\pm$ 26,8	64,3 $\pm$ 31,9	60,1 $\pm$ 23,7	95,7 $\pm$ 34,2	NS
PCNA	100 $\pm$ 6,1	88,5 $\pm$ 9,5	91,3 $\pm$ 13,7	115,8 $\pm$ 2,7	93,4 $\pm$ 10,7	82,1 $\pm$ 17,3	80,5 $\pm$ 19,2	NS
Actina	100 $\pm$ 7,4	104,3 $\pm$ 5,1	115,7 $\pm$ 18,1	109,8 $\pm$ 32,2	113,3 $\pm$ 21,4	110,7 $\pm$ 17,7	123,7 $\pm$ 16,2	NS

**Tabla 18.** Niveles proteicos de vimentina, del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y de actina en cultivos de astrocitos hipotalámicos tratados con vehículo (C; n=7) o leptina a una dosis de 100 ng/ml (L; n=7) durante 1, 6 ó 24 horas. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % control 0 horas (C0). NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

## 5.2. Efecto *in vitro* de la ghrelina en los astrocitos

### 5.2.1. Niveles de expresión del mensajero de GFAP y de GHS-R1a

Los niveles de expresión del mensajero de GFAP en los astrocitos no se vieron modificados tras 24 horas de exposición a ghrelina o D-ghrelina (C24h: 100  $\pm$  0,5; G4h: 94,4  $\pm$  6,7; DG24h: 101,7  $\pm$  2,5 % Ct). En cuanto a GHS-R1a no se detectó expresión génica en ninguno de los cultivos analizados.

### 5.2.2. Niveles de expresión del mensajero de $TNF\alpha$ , $IL-1\beta$ e $IL-6$

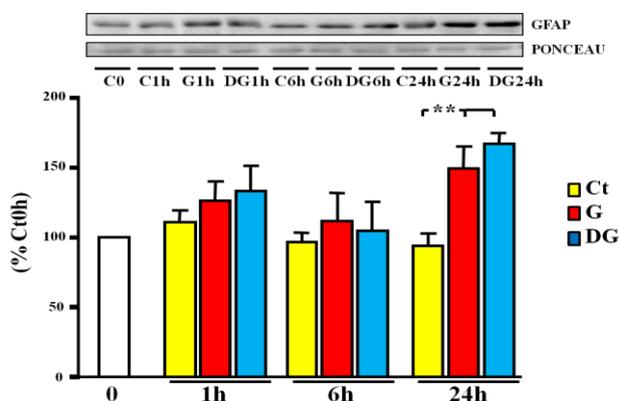
El efecto de la ghrelina y D-ghrelina en los niveles de expresión del mensajero de  $TNF\alpha$ ,  $IL-6$  e  $IL-1\beta$  se muestran en la Tabla 19. Como observamos los niveles de expresión del mensajero de  $IL-1\beta$  se redujeron significativamente tras 24 horas de exposición a la D-ghrelina (ANOVA:  $p < 0,02$ ). En cambio, no observamos afectados los niveles de expresión del mensajero de  $TNF\alpha$  e  $IL-6$  por efecto de la ghrelina o D-ghrelina.

	Control	Ghrelina	Ghrelina desacilada	ANOVA
$TNF\alpha$	100 ± 11,8	74,7 ± 8,3	88,2 ± 18,7	NS
$IL-1\beta$	100 ± 9,8	71,3 ± 6,5	63,5 ± 9,5 <sup>a</sup>	$p < 0,02$
$IL-6$	100 ± 13,6	183,6 ± 36,0	133,5 ± 41,3	NS

**Tabla 19.** Niveles de expresión del mensajero del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) y las interleuquinas (IL)  $-1\beta$  y  $-6$  en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos tratados con vehículo (Control;  $n=4$ ), ghrelina ( $n=4$ ) o ghrelina desacilada ( $n=4$ ) a una dosis de 100nM durante 24 horas. Los datos mostrados son la media ± SEM y están referidos en % Control. ANOVA:  $p < 0,02$ ; *a* = diferencias significativas versus Control; NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

### 5.2.3. Niveles proteicos de GFAP, vimentina, PCNA y $\beta$ -actina

Encontramos un efecto del tiempo ( $F_{(12,37)}$ : 4,450;  $p < 0,01$ ), de la ghrelina ( $F_{(12,37)}$ : 5,063;  $p < 0,04$ ) y de la D-ghrelina ( $F_{(12,37)}$ : 6,480;  $p < 0,02$ ) en los niveles proteicos de GFAP en los astrocitos en cultivo. Tras 24 horas de exposición a la ghrelina y D-ghrelina aumentaron los niveles de GFAP en los cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos (Figura 36; ANOVA:  $p < 0,008$ ).



**Figura 36.** Niveles proteicos de la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) en cultivos de astrocitos hipotalámicos tratados con vehículo (Ct;  $n=5$ ), ghrelina (G;  $n=5$ ) o ghrelina desacilada (DG;  $n=5$ ) a una

dosis de 100 nM durante 1, 6 ó 24 horas. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Ct0h. ANOVA: \*\*=  $p < 0,008$ .

No observamos cambios significativos por efecto de los tratamientos sobre los niveles proteicos de vimentina, PCNA o  $\beta$ -actina (Tabla 20). Únicamente encontramos un efecto del tiempo en los niveles de PCNA en los astrocitos en cultivo ( $F_{12,37}$ : 5,096;  $p < 0,005$ ).

	C0	C1h	G1h	DG1h	C6h	G6h	DG6h	C24h	G24h	DG24h	ANOVA
Vimentina	100 $\pm$ 0,5	105,7 $\pm$ 8,0	110,1 $\pm$ 7,6	107,5 $\pm$ 9,5	112,8 $\pm$ 12,1	140,6 $\pm$ 30,0	132,2 $\pm$ 25,4	115,7 $\pm$ 13,2	122,6 $\pm$ 16,4	123,5 $\pm$ 15,2	NS
PCNA	100 $\pm$ 0,5	98,0 $\pm$ 7,9	126,5 $\pm$ 21,3	117,0 $\pm$ 9,1	98,0 $\pm$ 7,7	100,4 $\pm$ 5,5	80,9 $\pm$ 7,4	138,2 $\pm$ 21,0	126,9 $\pm$ 11,1	118,0 $\pm$ 20,2	$p < 0,03$
Actina	100 $\pm$ 0,9	89,5 $\pm$ 6,6	86,3 $\pm$ 6,6	98,8 $\pm$ 3,0	82,7 $\pm$ 12,7	75,0 $\pm$ 15,7	71,6 $\pm$ 18,9	122,3 $\pm$ 29,8	132,1 $\pm$ 37,0	118,8 $\pm$ 29,0	NS

**Tabla 20.** Niveles proteicos de vimentina, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y  $\beta$ -actina en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos tratados con vehículo (Ct; n=5) , ghrelina (G; n=5) o ghrelina desacilada (DG; n=5) a una dosis de 100nM durante 24 horas. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SEM y están referidos en % Ct. NS: no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

## VI. DISCUSIÓN

---

---

**Efecto de la nutrición materna durante la gestación y la lactancia en el control metabólico, la organización sináptica y la morfología de los astrocitos del hipotálamo en la descendencia.**

La obesidad materna induce alteraciones metabólicas que pueden afectar a la maduración de los circuitos neurales hipotalámicos implicados en la regulación de la homeostasis energética en la descendencia (Bale y cols., 2010). Estudios en roedores han determinado que estas alteraciones inducidas por la dieta de la madre son, en muchos casos, permanentes y pueden predisponer al individuo a padecer enfermedades metabólicas futuras, tales como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Plagemann y cols., 1999; Hales y Barker, 2001; Elmquist y Flier, 2004; Cripps y cols., 2005; McMillen y Robinson, 2005; Mühlhäusler y cols., 2005; Plagemann, 2006; Férézou-Viala y cols., 2007; Taylor y Poston, 2007). Sin embargo, existe controversia acerca de los efectos de la obesidad materna sobre el metabolismo y el peso de las crías al nacer (Sullivan y cols., 2011). La diversidad de los resultados encontrados en la literatura se debe a que, en los distintos modelos experimentales, la composición de las dietas (*e.g.* cantidad de azúcares y ácidos grasos), el tiempo de exposición a las mismas y las especies de los animales empleados, son muy heterogéneas. Asimismo, son relativamente escasos los estudios que analizan el efecto de una dieta rica en grasa en el desarrollo del SNC, así como, sus consecuencias metabólicas en el adulto.

En estos estudios hemos observado que la ingesta materna de una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia induce alteraciones en la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos, la morfología y expresión de GFAP en los astrocitos, y la conectividad de las neuronas de POMC en el ARC de la descendencia. Asimismo, estos cambios resultan dependientes de la edad de las crías y, muchos de ellos, podrían condicionar la respuesta posterior del animal a una nutrición inapropiada.

*Efecto de la dieta materna sobre el peso y los niveles circulantes de hormonas metabólicas.*

Tras el nacimiento los ratones procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa mostraron una menor glucemia, sin cambios en el peso, ni en los niveles circulantes de insulina. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito en estudios similares (Holemans y cols., 2004; Bayol y cols., 2005; Maurer y Reimer, 2011); sin embargo, están en contraposición con lo encontrado por otros autores, en los que sí se observan modificaciones en el peso de las crías (Férézou-Viala y cols., 2007; Tamashiro y Moran, 2010).

Esta heterogeneidad en los resultados se debe, posiblemente, a que las dietas utilizadas son muy variables, ya que, en nuestro estudio, el contenido graso aportado en la dieta de la madre fue bastante inferior (45% de grasa) al utilizado por Tamashiro y Moran (60% de grasa) donde observan un incremento de peso en las crías (Tamashiro y Moran, 2010). Asimismo, aunque no existen variaciones de peso, no se descarta que las crías pudieran tener alterados otros parámetros antropométricos, como la longitud y la distribución de la grasa, tal y como se ha observado en crías procedentes de madres diabéticas que tampoco mostraron modificaciones de peso (Catalano y cols., 2003; Lampl y Jeanty, 2004).

La reducción observada en la glucemia de las crías HFm al nacer podría estar relacionada con los altos niveles circulantes de insulina de las madres, tal y como se ha referenciado en otros trabajos en ratas (Han y cols., 2007) y humanos (Silverman y cols., 1995). Estos estudios demuestran que las madres que presentan hiperinsulinemia durante la gestación pueden causar alteraciones en el metabolismo glucídico de la descendencia. En nuestro estudio no se descarta que fuera un efecto combinado de los cambios metabólicos inducidos por el sobrepeso de la madre (hiperinsulinemia, hiperleptinemia) y el consumo materno de una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia *per se*, ya que, un cambio en la dieta de la madre, como puede ser el consumo de una dieta rica en fibra (Maurer y Reimer, 2011) o en azúcares (Vickers y cols., 2011), también puede dar lugar a alteraciones en la glucemia de las crías, sin inducir cambios en el peso de las mismas. Por tanto, aunque existen diversos estudios en la literatura que asocian el estado metabólico de la madre con el desarrollo de alteraciones metabólicas en las crías, se debe tener en cuenta si estos cambios han sido inducidos por obesidad materna, diabetes gestacional, ingesta de una dieta rica en grasa o la combinación de algunos de estos factores, ya que, los efectos serán distintos en las crías (White y cols., 2009).

A los 24 días de vida, al igual que observamos en los ratones al nacer, la ingesta materna de una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia, no supuso un incremento en el peso de las crías. Sin embargo, a esta edad los ratones HFm presentaron hiperinsulinemia, sin cambios significativos en la glucemia, lo que podría indicar una resistencia periférica a la insulina. Este resultado ha sido observado en estudios similares; sin embargo, hay autores que indican que la resistencia a la insulina va asociada a cambios de peso (Simar y cols., 2011). Otros estudios demuestran que los cambios en la adiposidad y la distribución de la grasa en las crías, inducidos por una obesidad materna y el consumo de una dieta rica en grasa, están asociados con el desarrollo de una resistencia periférica a la insulina que se establece tras el destete

(Holemans y cols., 2004; Bayol y cols., 2005). En efecto, Bayol y cols. (2005) han demostrado que una dieta materna hipercalórica contribuye a un mayor depósito de lípidos intramusculares y una reducción del músculo esquelético en las crías tras el destete, lo que podría explicar por qué estas ratas no presentaron un incremento de peso, a pesar de que mostraron una mayor adiposidad.

En los ratones, los islotes pancreáticos no terminan de formarse hasta después del nacimiento (Kaung, 1994; Grove y Smith, 2003), y, dado que la exposición a elevadas concentraciones de glucosa durante la lactancia induce alteraciones en su funcionalidad (Patel y Srinivasan, 2010), es posible que, los efectos inducidos por la madre durante la gestación, junto con los factores metabólicos absorbidos por las crías a través de la leche materna, puedan haber influido en el desarrollo de las células  $\beta$  del páncreas. Asimismo, estas alteraciones metabólicas que suceden durante las etapas tempranas del desarrollo de los ratones, podrían estar modulando las respuestas centrales y el desarrollo de tejidos periféricos como el páncreas, alterando la respuesta glucídica del animal en el adulto. Esta afectación parece ser independiente de la dieta postnatal, tal y como observamos en los ratones HFm de 144 días de vida en los que, tanto los alimentados con una dieta normal como los alimentados con una dieta rica en grasa, presentaron incrementados los niveles de glucemia.

A los 60 días de vida tampoco observamos modificaciones de peso, ni cambios en los niveles circulantes de insulina y glucemia en las crías HFm. Diversos estudios han constatado que algunos de los cambios que se producen durante etapas tempranas del desarrollo se normalizan cuando los animales alcanzan la edad adulta (Vickers y cols., 2005; Saenger y cols., 2007; Glavas y cols., 2010). Asimismo, hemos observado que algunos de los efectos metabólicos condicionados por una sobrenutrición neonatal, resultado de crecer en una camada pequeña durante la lactancia (datos no publicados), o por un cambio en los niveles neonatales de leptina (Granado y cols., 2011), aparecen o se acentúan en etapas más tardías del desarrollo. Durante la pubertad se producen muchos cambios hormonales y metabólicos, algunos de los cuales podrían estar enmascarando o interactuando con los efectos que se producen en etapas más tempranas del desarrollo. Estos cambios, asimismo, podrían estar afectando al mismo desarrollo puberal. Además, el metabolismo basal cambia con la edad debido al envejecimiento fisiológico del sistema (Aasum y cols., 2003), por lo que, es posible que los cambios metabólicos tempranos también afecten a este proceso.

A los 144 días de vida los ratones HFm tampoco presentaron modificaciones de peso. Este resultado es similar a lo publicado por Kozak y cols. En efecto, dichos autores demostraron que la ingesta materna de una dieta rica en grasa durante la lactancia, no inducía cambios significativos en el peso de las crías, ni siquiera cuando éstas alcanzaron la edad adulta (Kozak y cols., 2010). Otros autores afirman que muchas de las alteraciones metabólicas que conducen a cambios en el peso de la descendencia sólo aparecen cuando el animal se encuentra en contacto con un ambiente obesogénico (Rooney y Ozanne, 2011). No obstante, los ratones HFm de 144 días de vida, a pesar de no presentar cambios de peso, sí que mostraron hiperglucemia e hipoleptinemia. Este aumento en los niveles de glucosa está de acuerdo con otros estudios en los que la sobrenutrición materna en roedores está asociada con una intolerancia a la glucosa en la descendencia (Buckley y cols., 2005; Taylor y cols., 2005; Samuelsson y cols., 2008; Nivoit y cols., 2009). Esta pérdida de tolerancia a la glucosa generalmente resulta de la combinación de una disfunción en las células  $\beta$  del páncreas y una resistencia a la insulina, observándose ambas en la descendencia de madres sobrenutridas (Rooney y Ozanne, 2011).

La hipoleptinemia ha sido observada en ratas recién nacidas procedentes de madres alimentadas con una dieta rica en grasa durante la gestación, donde tampoco observaron cambios de peso (Morris y Chen, 2009). Aunque en este estudio se determinaron los niveles de leptina en los ratones de 144 días de vida, es posible que, la hipoleptinemia aparezca en etapas más tempranas. Se ha descrito que la ingesta materna de una dieta rica en grasa durante la lactancia, induce cambios en la actividad génica de los adipocitos reduciendo los niveles circulantes de leptina, sin cambios de peso, ni de índice de adiposidad en las crías tras el destete (Kozak y cols., 2010). Además, la administración de leptina exógena en ratas lactantes también tiene efectos a largo plazo sobre el desarrollo y la funcionalidad de los adipocitos, incluyendo cambios en la expresión de los receptores de leptina (Granado y cols., 2011). Por consiguiente, es posible que los niveles circulantes de leptina de la madre, que probablemente se encontraban elevados por efecto de la ingesta de la dieta rica en grasa (Hoffler y cols., 2009), puedan haber afectado el desarrollo del tejido adiposo de las crías, reduciendo su capacidad de producir leptina. Sin embargo, si esta reducción en la producción de leptina contribuye al desarrollo de cambios metabólicos y/o condiciona la respuesta del animal a un cambio de dieta en etapas posteriores requiere ser investigado.

*Efecto de la dieta materna sobre las neuronas de POMC y NPY del ARC y los niveles de expresión de sus neuropéptidos en el hipotálamo.*

En los ratones las neuronas del ARC comienzan a expresar POMC y NPY en el día embrionario 12 (Khachaturian y cols., 1985) y 16 (Kagotani y cols., 1989), respectivamente. Sin embargo, no es hasta el día postnatal 15 cuando ambos neuropéptidos alcanzan su máxima expresión (Cottrell y cols., 2009). Las neuronas que expresan POMC y NPY en el ARC se encuentran localizadas fuera de la BHE, por lo que, tendrán una localización privilegiada a la hora de responder a los factores metabólicos circulantes que se encuentren en la sangre (Ibrahim y cols., 2003). Además, la BHE no termina de formarse hasta después del nacimiento de los ratones (Daneman y cols., 2010), así como, la maduración y el desarrollo de las neuronas hipotalámicas implicadas en el regulación del control metabólico (Bouret y cols., 2004b), por lo que, durante el desarrollo pre- y postnatal, el SNC estará más expuesto a las alteraciones metabólicas que se produzcan. Por esta razón, no es de extrañar, que una alimentación materna inadecuada durante este periodo crítico pueda causar alteraciones en el desarrollo de las neuronas del hipotálamo afectando a su número, fenotipo y los niveles de expresión de sus neuropéptidos.

La exposición a una dieta rica en grasa durante la gestación supuso un aumento en la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos en el hipotálamo de los ratones recién nacidos, mientras que, los neuropéptidos orexigénicos no se vieron afectados. Este aumento en la expresión de POMC y CART indica que, el estado metabólico de la madre, podría estar induciendo cambios en los circuitos hipotalámicos que regulan el control metabólico en la descendencia. Uno de los posibles candidatos a inducir estos cambios, podría ser la leptina materna, ya que, sus niveles se encontrarán incrementados por efecto de la dieta y/o la ganancia de peso en las madres de los ratones HFm (Considine y cols., 1996; Argente y cols., 1997), pudiendo afectar durante la gestación al desarrollo del feto y alterando específicamente la expresión de los neuropéptidos POMC y CART. Durante el desarrollo prenatal, la leptina actúa principalmente como un factor trófico potente, siendo sus principales dianas de acción las neuronas que coexpresan POMC y CART en el hipotálamo de los ratones (Ahima y cols., 1998; Bouret y cols., 2004a; Bouret, 2008). Otros autores demuestran que las madres con obesidad inducida por la dieta, acompañadas de hiperleptinemia, inducen alteraciones en el desarrollo de los circuitos hipotalámicos implicados en la regulación del balance energético de la

descendencia (Kirk y cols., 2009). Igualmente, existen otros factores metabólicos, que pueden verse incrementados por efecto de la ingesta excesiva de grasas como la IL-1 $\beta$  (Kim y cols., 2008), que además, pueden afectar directamente a las neuronas anorexigénicas del ARC, estimulando la expresión de los neuropéptidos derivados de POMC (Scarlett y cols., 2007; Bouret, 2010). Asimismo, un aumento en los niveles de glucosa en los fetos puede inducir un aumento en la expresión de POMC en el hipotálamo de los mismos (Mühlhäusler y cols., 2005).

De modo que, el exceso de nutrientes (*e.g.* ácidos grasos, glucosa), hormonas (*e.g.* leptina, insulina) y citoquinas inflamatorias que se pueden encontrar alterados en la madre por el consumo de una dieta rica en grasa (Ikemoto y cols., 1996; Kelly y cols., 2004; Sullivan y cols., 2011), podrían haber afectado a la expresión de POMC y CART de las crías HFm. Además, esta sobreexpresión de POMC en los ratones HFm al nacer, podría estar involucrada en la inhibición de la producción hepática de glucosa, reduciendo los niveles de glucosa en la sangre, tal y como se ha observado tras la administración central de péptidos derivados de POMC en roedores (Fan y cols., 1997; Obici y cols., 2001).

No obstante, cabe destacar que los niveles de expresión génica de estos neuropéptidos hipotalámicos se midieron por RT-PCR, por lo que, desconocemos si los cambios en sus niveles se debieron a alteraciones en el número de células de POMC/CART o a una reducción en la expresión de estos neuropéptidos por cada una de estas células. Además, existen distintas proteínas derivadas de POMC, por lo que, desconocemos que productos de este gen se vieron afectados por los cambios en la expresión de este neuropéptido.

A los 24 días de vida, los ratones HFm mantuvieron incrementada la expresión hipotalámica del mensajero de POMC, pero además las neuronas que expresaron este neuropéptido en el ARC mostraron un mayor perímetro, efecto que podría estar asociado a una mayor actividad en estas neuronas (Erskine y Miller, 1995). A esa edad, los ratones ya habían sido destetados, por lo que, los cambios encontrados en estos parámetros podrían deberse a factores circulantes de las propias crías o a efectos permanentes inducidos por la madre durante la gestación y la lactación.

Se ha relacionado la hiperinsulinemia en la madre durante la lactancia con una hipertrofia en las neuronas de los núcleos hipotalámicos VMN y DMN de las crías tras el destete (Plagemann y cols., 1999). Tras este periodo, los ratones HFm presentaron hiperinsulinemia, la cual ejerce efectos directos sobre las neuronas de POMC (Obici y

cols., 2001). Este hecho podría estar implicado en los cambios detectados en los niveles de POMC, y posiblemente, en la hipertrofia de las neuronas que lo expresaron en el ARC.

No obstante, a esta edad (24 días de vida), es de interés reseñar que el efecto que ejerció la dieta materna sobre la expresión de CART fue diferente al observado en POMC y en los ratones al nacer, ya que, los niveles de dicho neuropéptido se encontraron disminuidos tras el destete. Si bien no puede descartarse la implicación de CART en el control de la ingesta, la disminución observada en sus niveles podría estar relacionada con su papel en otros sistemas fisiológicos, tales como la respuesta al estrés (Vrang y cols., 2003) o el comportamiento adictivo y psicoestimulante que implica la liberación neuronal de dopamina y GABA en el ARC (Vicentic y Jones, 2007).

Tras la lactancia, todos los ratones recibieron una dieta normal durante tres días. La separación de la madre y el cambio de dieta tras el destete podrían haber provocado una situación de estrés que, en el caso de los ratones HFm, pudo haber sido mayor, lo que habría provocado los cambios en los niveles de CART. De hecho, cuando a estos ratones HFm se les introdujo una dieta rica en grasa en la etapa adulta, normalizaron sus niveles de expresión de este neuropéptido en el hipotálamo.

A los 60 días de vida los ratones HFm no presentaron afectados los niveles de POMC como en edades anteriores. En cambio, sí que mostraron una reducción en los niveles de CART, como a los 24 días de vida, y de AgRP en el hipotálamo. De modo que, a pesar de no encontrar diferencias de peso, ni en los niveles circulantes de hormonas, estos ratones presentaron cambios en la expresión de estos péptidos, que podrían estar contribuyendo a acentuar o agravar la respuesta del animal a un cambio de dieta en el futuro. No obstante, no podemos asegurar que estos ratones presentaran cambios en la ingesta, ya que no fue medida, de modo que, desconocemos si las diferencias basales encontradas en dichos neuropéptidos lograron modificar su metabolismo energético.

La disminución en CART en el hipotálamo de ratones HFm de 144 días de vida podría estar relacionada con la hipoleptinemia en estos ratones. Esta hormona es una de las principales implicadas en inhibir la ingesta mediante la activación de las neuronas de POMC/CART (Houseknecht y cols., 1998). Además, estos ratones mostraron un aumento en el número de contactos AgRP que se encontraban alrededor del soma de las neuronas

de POMC en el ARC. Por tanto, a pesar de que dichos ratones no mostraron afectados los niveles de expresión de los neuropéptidos orexigénicos, las neuronas de NPY/AgRP, podrían estar ejerciendo un efecto inhibitor mayor sobre las neuronas de POMC a través de la liberación de AgRP (Cone, 2005), lo que podría estar afectando específicamente a la expresión de CART en el hipotálamo, ya que, los niveles de POMC se encontraron ligeramente disminuidos, pero este efecto no llegó a ser estadísticamente significativo.

*Efecto de la dieta materna sobre la activación y morfología de los astrocitos del hipotálamo.*

Los astrocitos participan en la regulación de las funciones neuroendocrinas (Theodosis y Poulain, 1984; Majdoubi y cols., 1997; Garcia-Segura y cols., 1999), sin embargo, se desconoce su función en el control de la ingesta y el balance energético.

En roedores, la mayoría de los procesos astrocitarios, así como, la maduración y establecimiento del dominio espacial de los astrocitos en el SNC, tienen lugar durante la tercera o cuarta semana postnatal (Bushong y cols., 2004; Freeman, 2010). Por consiguiente, se considera que es durante este periodo cuando los cambios hormonales y/o la ingesta materna de una dieta rica en grasa, podrían estar afectando al desarrollo de estas células gliales en el hipotálamo. Además, los astrocitos se encuentran localizados próximos a los vasos sanguíneos y a las neuronas, regulando todos los aspectos de la función neuronal, desde su metabolismo hasta su conectividad, la cual puede ir asociada con cambios en la morfología de dichas células gliales (Theodosis y cols., 2008; Nimmerjahn y cols., 2009). En consecuencia, cualquier cambio que se produzca en la expresión, morfología y/o número de astrocitos hipotalámicos puede resultar decisivo en la funcionalidad de las neuronas de esta región cerebral.

Tras el destete (24 días de vida), los ratones HFm mostraron una menor expresión de GFAP en el hipotálamo, efecto que podría estar asociado con el menor número de sus proyecciones en el ARC, tal y como hemos observado a esta edad. Por lo tanto, si tenemos en cuenta que los astrocitos maduros se caracterizan por presentar una mayor complejidad estructural y una mayor expresión del mensajero de GFAP (Plagemann y cols., 2000), y dado que las ratas tras el destete todavía están en desarrollo, es posible que, una menor expresión hipotalámica de GFAP y del número de proyecciones que presentaron estas células en el ARC, esté relacionado con una menor diferenciación o

maduración de estas células gliales en el hipotálamo. Además, durante el desarrollo postnatal, los astrocitos son esenciales en la proliferación y maduración de las neuronas hipotalámicas, así como, en la organización sináptica (Chowen y cols., 1996). De modo que, los cambios observados en los astrocitos podrían estar implicados, al menos en parte, en las modificaciones detectadas en las neuronas de POMC y CART en el hipotálamo. Existen estudios que afirman que una mayor extensión de la cobertura glial en las neuronas está relacionada con una menor actividad neuronal (Wenzel y cols., 1991; Ventura y Harris, 1999; Genoud y cols., 2006; Lushnikova y cols., 2009), así como, que existe una relación inversa entre la cantidad de cobertura glial y la extensión de membrana neuronal disponible para recibir conexiones sinápticas en el hipotálamo (García-Segura y cols., 1999). Por tanto, para determinar si los astrocitos, a través de cambios en su cobertura alrededor de las neuronas, podrían estar modificando la actividad neuronal próxima, cuantificamos este parámetro en las neuronas de NPY y POMC en el ARC de los ratones.

A los 24 días de vida los ratones HFm presentaron una mayor cobertura glial alrededor de las células que expresan POMC en el ARC, a pesar de que mostraron una sobreexpresión de POMC. Por el contrario, las neuronas de NPY mostraron una menor cobertura glial por efecto de la dieta materna que, como hemos mencionado anteriormente, no supuso modificaciones en la expresión de este neuropéptido en el hipotálamo. Por tanto, y al igual que se ha observado en otros estudios (Nimmerjahn y cols., 2005; Wu y Zhuo, 2008), no siempre la extensión o retracción de la cobertura glial en la superficie de contacto de las neuronas supone modificaciones en la actividad o en los niveles de expresión de sus neuropéptidos. Sin embargo, no se descarta, que estos cambios de extensión glial alrededor de estas neuronas puedan estar afectando a la conectividad y expresión de neuropéptidos, ya que, desconocemos que tipo de sinapsis (excitatorias o inhibitorias) se vieron modificadas por estos cambios.

A los 60 días de vida, al igual que encontramos en los ratones HFm tras el destete, la dieta de la madre indujo un aumento en la cobertura glial alrededor de las neuronas de POMC del ARC; sin embargo, a esta edad no encontramos cambios en la cobertura glial de las neuronas de NPY. Además, estos cambios en la cobertura glial de las neuronas de POMC no estaban asociados con modificaciones en los niveles de expresión del mensajero de GFAP en el hipotálamo. Es posible que exista una reorganización de los filamentos de GFAP en los astrocitos alrededor de las células de POMC, lo que podría

estar relacionado con cambios en las fosforilaciones de esta proteína, que no necesariamente supone un aumento en su síntesis (Morán y cols., 1996; Tanji y cols., 2003).

El aumento en la extensión glial alrededor de las neuronas de POMC, sin cambios en la cobertura de las neuronas de NPY del ARC, se mantuvo en los ratones HFm de 144 días de vida. De modo que, este cambio estructural podría haberse establecido en la descendencia de manera permanente, durante el desarrollo y maduración de este núcleo hipotalámico, por efecto de la ingesta materna de una dieta rica en grasa.

A pesar del aumento detectado en la cobertura glial de las neuronas de POMC, observamos una reducción en el número de astrocitos en el ARC, así como, en la longitud de sus proyecciones. Es posible que estos cambios en el número y morfología de los astrocitos estén afectando a la cobertura de otros tipos neuronales, así como, a la asociación de la glía a los vasos sanguíneos. Igualmente, una reducción en el número de estas células podría estar causando cambios en la actividad de las neuronas adyacentes, ya que, estas células gliales son las principales encargadas de mantener la homeostasis del espacio extracelular (Fields y Stevens-Graham, 2002) y de formar la primera barrera celular en contacto con los vasos sanguíneos, lo que podría conllevar a modificaciones en su capacidad de captación y transporte de nutrientes en el hipotálamo, afectando al metabolismo neuronal (Yi y cols., 2011).

**Los efectos inducidos por la ingesta de una dieta rica en grasa en la etapa adulta están condicionados por la nutrición materna durante la gestación y la lactancia.**

*Efecto del cambio de dieta durante la etapa adulta sobre el peso y los niveles circulantes de hormonas.*

El consumo de una dieta rica en grasa en la etapa adulta, al igual que se ha observado en otros modelos de obesidad (Hoffler y cols., 2009), supuso un incremento en el peso e hiperleptinemia, independientemente de cuál fuera la procedencia materna de los ratones. Este cambio de dieta también produjo hiperinsulinemia e hiperglucemia. Sin embargo, en el caso de los ratones HFm se acentuó este incremento, ya que, estos ratones ya tenían aumentada la glucemia por efecto de la dieta materna. La obesidad materna puede inducir alteraciones en la funcionalidad de diversos tejidos periféricos (e.g. páncreas) en la descendencia (Han y cols., 2005) y, al igual que en estudios similares (Levin y Govek, 1998), es posible que el incremento acentuado en los niveles de glucemia

e insulina observado en los ratones HFm, pueda contribuir al desarrollo de una resistencia periférica a la insulina.

El aumento de leptina producido por el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta, podría estar relacionado con el aumento de peso y, posiblemente, pudo ser debido a una hipertrofia de los adipocitos inducida por la ingesta excesiva de grasas (Kubota y cols., 1999).

*Efecto del cambio de dieta durante la etapa adulta sobre las neuronas de POMC y NPY en el ARC y los niveles de expresión de sus neuropéptidos en el hipotálamo.*

La ingesta prolongada de una dieta hipercalórica también induce al desarrollo de una resistencia central a insulina y/o leptina (Kieffer y cols., 1996; Spiegelman y Flier, 1996; Ahima y Flier, 2000), así como alteraciones en el transporte de hormonas desde la circulación al SNC (Banks y cols., 1999). Estos cambios van a agravar los efectos derivados de la ingesta excesiva de grasas, conduciendo a un aumento progresivo del peso y de los niveles séricos de leptina e insulina.

En este estudio el consumo de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta supuso una disminución en los niveles de expresión del mensajero de NPY y AgRP en el hipotálamo de los ratones HFm. Aunque estos ratones mostraron unas concentraciones de leptina notablemente elevadas por efecto del cambio de dieta, las neuronas de NPY/AgRP no desarrollaron una resistencia a esta hormona.

No obstante, el consumo de una dieta rica en grasa en dichos ratones HFm supuso una disminución en los niveles de POMC en el hipotálamo, mientras que, en los ratones procedentes de madres control, este cambio de dieta no afectó significativamente a este neuropéptido. Estudios recientes han demostrado que el consumo de una dieta rica en grasa en el adulto puede inducir una resistencia central a la insulina, que se determina por la falta de respuesta de las neuronas de POMC en el hipotálamo, a pesar de que los niveles séricos de insulina y leptina estén incrementados (Clegg y cols., 2011). Por tanto, estos ratones podrían haber desarrollado una resistencia central a la insulina o leptina en poblaciones neuronales específicas, ya que, en vez de encontrar los niveles de expresión de POMC incrementados por efecto de la acción de la leptina e insulina, hormonas que se encontraban incrementadas en dichos ratones, los encontramos disminuidos o sin modificaciones por efecto del cambio de dieta.

La disminución observada en el perímetro de las células de POMC del ARC por efecto del cambio de dieta en los ratones HFm, podría estar relacionada con cambios en la actividad o producción de neuropéptidos en estas células (**Henneman y cols., 1965**), lo que explicaría la disminución detectada en la expresión de POMC en estos ratones. Además, cabe destacar que el cambio de dieta en los ratones HFm modificó, de manera inversa, el patrón de expresión de POMC y CART en el hipotálamo, ya que, los niveles de expresión del mensajero de CART se vieron normalizados con el cambio de dieta.

En la etapa adulta, los ratones procedentes de madres control mostraron un aumento en el número de contactos de AgRP alrededor del soma de las neuronas de POMC en el ARC en respuesta a una dieta rica en grasa. Sin embargo, el cambio de dieta en los ratones HFm no indujo más cambios en este parámetro, manteniendo el aumento observado por efecto de la ingesta materna de una dieta rica en grasa. Por tanto, el consumo materno de una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia o la ingesta de grasas durante la etapa adulta, aumenta el número de contactos de AgRP en las neuronas de POMC, sin que la interacción de ambos factores suponga un efecto aditivo o sinérgico. Sin embargo, en los ratones procedentes de madres control, a diferencia de los ratones HFm, los cambios en el número de contactos de AgRP en las neuronas de POMC no parece asociado a las modificaciones observadas en los niveles de expresión de mensajero de POMC, indicando que otros factores metabólicos podrían estar implicados en los cambios detectados en la expresión de este neuropéptido.

*Efecto del cambio de dieta durante la etapa adulta sobre la activación y morfología de los astrocitos del hipotálamo.*

El consumo de una dieta rica en grasa altera los niveles circulantes de diversos factores, tales como la insulina, los glucocorticoides, los estrógenos y las citoquinas (**Tannenbaum y cols., 1997; Kubota y cols., 1999; Cohen, 2000; Hoffler y cols., 2009**), que son capaces de modular la expresión de GFAP en el cerebro (**Toran-Allerand y cols., 1991; Rozovsky y cols., 1995; Garcia-Segura y cols., 1996**). De modo que, estos factores también pueden estar implicados en inducir cambios en la activación y morfología de los astrocitos del hipotálamo.

El cambio de dieta en la etapa adulta indujo modificaciones en los niveles de expresión del mensajero de GFAP, el número de astrocitos y la longitud de sus proyecciones en el ARC, así como, la cobertura glial de las neuronas NPY y POMC en

este núcleo hipotalámico. Sin embargo, estos efectos fueron distintos en función de la procedencia materna de los ratones.

En los ratones procedentes de madres control, el cambio de dieta incrementó los niveles de expresión de GFAP en el hipotálamo, además de, aumentar la longitud de las proyecciones que presentaron los astrocitos en el ARC. Otros estudios confirman que la ingesta excesiva de grasas promueve la expresión de GFAP y la reactividad de los astrocitos en el cerebro (Hsuchou y cols., 2009; Horvath y cols., 2010). Por tanto, el consumo de una dieta rica en grasa podría haber promovido la reactividad de los astrocitos del hipotálamo relacionado con el aumento observado en los niveles de GFAP, así como, *in vitro* se asocian los cambios morfológicos de los astrocitos con una mayor reactividad astrogial (Pike y cols., 1994).

Uno de los posibles factores metabólicos implicados en los cambios de GFAP en el hipotálamo podría ser la leptina, incrementada en este estudio por el consumo de una dieta rica en grasa. La leptina circulante aumenta en situaciones de obesidad y en respuesta a una dieta rica en grasa (Argente y cols., 1997; Hoffler y cols., 2009), pudiendo afectar al desarrollo de neuronas y astrocitos (Bouret, 2010; Pan y cols., 2011) e induciendo cambios sinápticos en los circuitos metabólicos (Pinto y cols., 2004). Además, los astrocitos expresan el receptor de la leptina (Cheunsuang y Morris, 2005) y su expresión en el hipotálamo incrementa en respuesta a una dieta rica en grasa (Hsuchou y cols., 2009), por lo que, no es de extrañar, que algunas de las modificaciones observadas en estas células gliales puedan ser el resultado de los cambios detectados en los niveles circulantes de esta hormona.

Los cambios morfológicos en los astrocitos están relacionados, en ocasiones, con cambios en la conectividad de las neuronas (McCall y cols., 1996; Pan y cols., 2011; Horvath y cols., 2010). En los ratones NDm, las modificaciones gliales observadas por efecto del cambio de dieta, podrían estar implicadas en modular la actividad neuronal y la expresión de neuropéptidos en el hipotálamo. Recientemente se ha demostrado que los cambios en la actividad de los astrocitos del hipotálamo, mediado por cambios en los niveles de GFAP, están relacionados inversamente con la actividad de las neuronas implicadas en la síntesis de los péptidos anorexigénicos (Pan y cols., 2011). Sin embargo, no encontramos una relación inversa entre los niveles de GFAP y los cambios en la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos en los ratones NDm inducidos por el consumo de una dieta rica en grasa. Hemos observado que este cambio de dieta en la

etapa adulta, supuso una disminución en los niveles de GFAP y en la cobertura glial de las neuronas que expresan NPY en el ARC, pero también una disminución en la expresión de este neuropéptido. Asimismo, a pesar de no encontrar cambios en la cobertura glial en las neuronas de POMC, ni en la expresión de este neuropéptido en el hipotálamo, observamos un aumento del número de contactos de AgRP en dichas células. Esto sugiere que otros factores podrían estar implicados en controlar la expresión de NPY y POMC en respuesta a una dieta rica en grasa en estos ratones, ya que, la expresión de cualquier neuropéptido depende de múltiples factores.

Por otro lado, los ratones HFm presentaron una disminución en el número de astrocitos GFAP+ en el ARC cuando consumieron una dieta normal; sin embargo, el cambio a una dieta rica en grasa en la etapa adulta indujo un aumento significativo del mismo, pero sin cambios en la longitud de sus proyecciones, ni en la cobertura glial de las neuronas de NPY o POMC. De modo que, dado que los astrocitos son elementos esenciales en la estructuración de la BHE y se encargan, entre otras funciones, de regular el transporte de sustancias al cerebro, así como, dentro del mismo (Fields y Stevens-Graham, 2002; Yi y cols., 2011), es posible que los cambios en su número y morfología pudieran estar afectando a su extensión o número alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos (Horvath y cols., 2010) y a la entrada de factores y señales al cerebro (Araque y cols., 2001; Fields y Stevens-Graham, 2002). Estos posibles cambios en el transporte glial podrían modificar la respuesta del SNC a las alteraciones metabólicas sistémicas que se produzcan en el animal, como puede ser la ingesta de una dieta rica en grasa en la etapa adulta, lo que explicaría la diferente respuesta encontrada por efecto del cambio de dieta entre los ratones NDm y HFm. Esta hipótesis se apoya en estudios recientes en los que se ha observado que una astrogliosis previa en el hipotálamo, asociado con un aumento en la producción de IL-6, puede prevenir el incremento de peso inducido por el consumo de una dieta rica en grasa (Hidalgo y cols., 2010).

Por tanto, comparando las distintas respuestas al cambio de dieta en los ratones NDm y HFm, podemos decir que la ingesta de una dieta rica en grasa durante la etapa adulta induce modificaciones en los astrocitos del hipotálamo que son dependientes de las condiciones nutricionales de la madre durante la gestación y la lactancia. Asimismo, estos cambios gliales están relacionados, al menos en parte, con los cambios detectados en la conectividad de las neuronas y neuropéptidos hipotalámicos, lo que podría explicar porqué la respuesta metabólica del animal a un cambio de dieta durante la etapa adulta se vio también condicionada por la dieta materna.

**Efecto de un aumento crónico de leptina sobre el metabolismo energético, la activación y morfología de los astrocitos, y la remodelación sináptica en el hipotálamo.**

Uno de los efectos metabólicos que contribuye a la patogénesis de la obesidad es la hiperleptinemia y la falta de respuesta a esta hormona por parte de las neuronas hipotalámicas (Benomar y cols., 2005). Estudios llevados a cabo en humanos han determinado que los niveles de leptina, tanto en el plasma como en el LCR, se encuentran elevados en la mayoría de los individuos obesos, valores que alcanzan hasta un 318% y un 30% más altos respectivamente (Caro y cols., 1996), en función del índice de adiposidad (Schwartz y cols., 1996). Esta hiperleptinemia se observa también en modelos animales de obesidad y en respuesta a una dieta rica en grasa (Hoffler y cols., 2009), lo que podría estar implicado en los cambios observados en la activación de los astrocitos del hipotálamo. En otras regiones del SNC, la reactividad astrogliar está mediada por la activación de STAT-3, proteína efectora de la vía de señalización de la leptina (Herrmann y cols., 2008). Además, los astrocitos hipotalámicos no sólo expresan distintas formas del receptor de leptina (Cheunsuang y Morris, 2005), sino también se modifica el patrón de expresión de sus receptores en respuesta a los cambios metabólicos derivados del consumo de una dieta rica en grasa (Hsuchou y cols., 2009), como puede ser un aumento en los niveles circulantes de leptina.

En los estudios presentados en la presente Tesis Doctoral, observamos que el aumento crónico y central de leptina indujo cambios en las proteínas gliales y en la morfología de los astrocitos del hipotálamo que nos sugiere una mayor reactividad astrogliar en esta región. Además, estos cambios correlacionaron de manera inversa con la densidad total de las proteínas sinápticas, lo que podría indicar la implicación de los astrocitos en la remodelación sináptica hipotalámica.

*Efecto de la leptina en la regulación del peso y los niveles periféricos de hormonas metabólicas.*

La administración crónica *icv* de leptina, tal y como se ha observado en estudios similares (Burgos-Ramos y cols., 2011; Keung y cols., 2011), disminuyó significativamente la ganancia de peso de las ratas, tras los 14 días que duró el tratamiento. Sin embargo, la acción anorexigénica de la leptina sobre el peso, fue disminuyendo al final del tratamiento. Esta disminución podría deberse a la pérdida de respuesta a esta hormona por parte de las células del hipotálamo, ya que, en el momento del sacrificio, los niveles

de activación de STAT-3 no se vieron modificados en el hipotálamo de estas ratas. Además, la administración central y prolongada de leptina aumenta los niveles de SOCS-3 en el hipotálamo (Burgos-Ramos y cols., 2011), siendo esta proteína la que inhibe la vía de señalización de la leptina y parece determinar el grado de sensibilidad de un tejido a esta hormona (Bjørbaek y cols., 1998; Bjørbaek y cols., 1999). Durante la última etapa del estudio, la ganancia de peso del grupo de ratas tratadas con leptina no fue diferente al del grupo de ratas control, apoyando la hipótesis de que estas ratas desarrollaron una resistencia a la leptina.

En respuesta a la exposición prolongada *icv* a la leptina no observamos cambios significativos en la glucemia o en los niveles circulantes de leptina, insulina o ghrelina en las ratas. El hecho de no encontrar diferencias en estos parámetros, podría deberse a que los animales no permanecieron en ayunas antes del sacrificio, lo que también justificaría la variabilidad encontrada en los datos. No obstante, aunque las ratas presentaron una menor ganancia de peso por efecto del tratamiento, observamos que los niveles circulantes de leptina mostraron una tendencia a incrementar, al igual que se ha observado en estudios similares (Shi y cols., 1998), lo que podría indicar que existió un transporte de leptina desde el ventrículo lateral al torrente sanguíneo. Asimismo, se ha demostrado que tras una infusión aguda *icv* de leptina en ratas, los niveles de esta hormona incrementan rápidamente en la circulación (Burgos-Ramos y cols., 2011).

*Efecto de la leptina sobre las proteínas gliales y la morfología de los astrocitos del hipotálamo.*

La mayoría de los efectos metabólicos que ejerce la leptina están mediados por el hipotálamo, a través de sus receptores Ob-Rb, localizados principalmente en las neuronas (Håkansson y cols., 1996; Cheung y cols., 1997) y astrocitos (Cheung y Morris, 2005) del ARC (Elmqvist y cols., 1998). Es bien conocido que los astrocitos pueden responder a cambios en los niveles circulantes de hormonas, modificando la expresión de sus proteínas estructurales como GFAP y vimentina (Morrison y cols., 1985; Garcia-Segura y cols., 1999) que, en ocasiones, estarán asociados con la reactividad astrogliol (Halassa y Haydon, 2010).

La exposición prolongada a la leptina podría estar induciendo una astrogliosis reactiva en el hipotálamo, tal y como se ha observado en los estudios anteriores en respuesta a un aumento en la ganancia de peso inducido por la ingesta de una dieta rica

en grasa. Las ratas tratadas crónicamente con esta hormona, presentaron incrementados los niveles proteicos de GFAP y vimentina, así como, la longitud de las proyecciones de los astrocitos en el ARC. Estos resultados sugieren que la leptina podría estar promoviendo los niveles de expresión de GFAP en el hipotálamo. En los ratones obesos *ob/ob* donde los niveles de leptina son inexistentes, se ha observado que presentan una disminución en los niveles de GFAP en el cerebro (Ahima y cols., 1999), lo que apoyaría la hipótesis de que la leptina está involucrada en la regulación de esta proteína estructural en la glía. Además, este efecto es ejercido de manera directa sobre los astrocitos, ya que, la leptina modula tanto los niveles proteicos de GFAP como los niveles de ARNm de esta proteína, así como, sus propios receptores en astrocitos hipotalámicos en cultivo. El aumento *in vitro* de GFAP observado en los astrocitos en respuesta a la leptina coincide con un aumento en los niveles de activación de STAT-3.

Por tanto, tal y como se ha demostrado en otros estudios *in vivo* donde la expresión de GFAP y la regulación de la astrogliosis está mediada por la activación de este factor de transcripción en otras regiones del cerebro (Shafit-Zagardo y cols., 1988; Okada y cols., 2006; Gadea y cols., 2008; Herrmann y cols., 2008), la fosforilación de STAT-3 podría estar mediando los efectos directos ejercidos por la leptina en los astrocitos hipotalámicos. El hecho de no observar diferencias en los niveles proteicos de STAT-3 en respuesta a la leptina *in vivo*, aunque se encontraron incrementados los niveles de GFAP, podría deberse a que se cuantificó la cantidad total de STAT-3 fosforilado en el hipotálamo, no específicamente en los astrocitos. También, como hemos mencionado anteriormente, la exposición prolongada a esta hormona podría haber afectado a la funcionalidad de las neuronas sensibles a leptina debido al bloqueo de su vía de señalización a través de SOCS-3 (Burgos-Ramos y cols., 2011). Si la exposición prolongada a la leptina produce una resistencia en los astrocitos del hipotálamo, aún se desconoce. Cabe la posibilidad de que las neuronas y los astrocitos hipotalámicos respondan de manera inversa a esta hormona en algunas situaciones metabólicas, ya que, los estudios de Hsuchou y cols. (2009) demuestran que los niveles del receptor de leptina disminuyen en las neuronas hipotalámicas en respuesta a una obesidad inducida por una dieta rica en grasa, mientras que, en los astrocitos aumentan.

Las ratas tratadas crónicamente con leptina también presentaron una mayor expresión de vimentina en los astrocitos del ARC, lo que podría indicar también una mayor reactividad en estas células gliales. Sin embargo, *in vitro* no encontramos diferencias en los niveles proteicos de vimentina en los astrocitos por efecto de la

leptina. Es posible que, el aumento de vimentina observado en el modelo *in vivo* esté mediado por otros factores metabólicos o ser debido a un efecto de la leptina sobre otro tipo celular, que estaría actuando sobre los astrocitos. También es posible que para observar un aumento de vimentina en los astrocitos se requiera de un mayor tiempo de exposición a esta hormona, ya que, *in vivo* las ratas estuvieron expuestas durante 14 días a la leptina. Asimismo, estas ratas mostraron un mayor número de fibras inmunoreactivas para vimentina en el ARC, que proyectaban perpendiculares al 3V, lo que sugiere que los tanicitos también podrían estar implicados en el aumento de esta proteína en el hipotálamo. Los tanicitos son células endimarias modificadas que, a través de sus proyecciones, regulan el transporte de distintos factores metabólicos desde el LCR al hipotálamo medial (Rodríguez y cols., 2010), por lo que, una mayor inmunoreactividad en sus fibras podría estar indicando alteraciones en el transporte de nutrientes al hipotálamo a través de estas células.

Recientemente, se ha demostrado que la leptina induce una mayor actividad de los astrocitos hipotalámicos que podría afectar a la difusión o transporte de esta hormona al hipotálamo en animales obesos (Pan y cols., 2011). Por tanto, una exposición prolongada a la leptina podría alterar al transporte de sustancias al hipotálamo, así como, a su propio transporte. Sin embargo, requiere ser investigado si el transporte de factores metabólicos al hipotálamo en respuesta a la leptina varía en función del estado metabólico del individuo. Es decir, si una de la funciones de la glía es controlar el transporte de factores metabólicos al hipotálamo, los cambios en su número y morfología podrían modificar la capacidad que tienen estas células de responder a la leptina u otros factores. En los estudios anteriores hemos demostrado que la respuesta de los astrocitos a la ingesta de una dieta rica en grasa depende del estado metabólico temprano del animal. Estos cambios gliales, por ejemplo, podrían estar involucrados en la reducción de la sensibilidad del hipotálamo debido al aumento circulante de leptina inducido por la ingesta de una dieta rica en grasa y/o debido a un aumento de peso. También, hemos observado que los efectos de la leptina sobre la respuesta glial en ratas control depende del tiempo de exposición a la misma (García-Cáceres y cols., 2011), de modo que, es posible que el transporte de hormonas y otros factores metabólicos desde la periferia al hipotálamo varíe en función del estado basal (metabólico y hormonal) del animal. Asimismo, una resistencia a la leptina inducida por una exposición prolongada a esta hormona, podría deberse, al menos en parte, a alteraciones en la capacidad de transporte u otras funciones en los astrocitos.

*Efecto de la leptina en la densidad total de las proteínas implicadas en la conectividad sináptica en el hipotálamo.*

Los astrocitos están implicados de forma activa en el control de la actividad neuronal y en la transmisión sináptica (Araque y cols., 1999; Perea y cols., 2009; Halassa y Haydon, 2010). Estas células pueden responder a la actividad de las neuronas adyacentes mediante cambios en su morfología o mediante la liberación de gliotransmisores debido a cambios en sus concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Araque y cols., 1999). Estudios en ratones, han demostrado que la administración de leptina modifica el número de sinapsis excitatorias e inhibitorias que presentan las neuronas de NPY y POMC en el ARC (Pinto y cols., 2004). En otros estudios se ha constatado que, en respuesta a hormonas, como pueden ser los estrógenos, los astrocitos pueden modificar su cobertura neuronal y, estos cambios, estar inversamente relacionados con el número de sinapsis entre las neuronas del hipotálamo (García-Segura y cols., 1999). Además, recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de la funcionalidad de los astrocitos en la actividad de las neuronas sensibles a leptina en el hipotálamo (Shen y cols., 2009; Pan y cols., 2011).

En respuesta a la exposición crónica a un aumento de leptina hemos observado que, cuando los niveles de GFAP se encontraron incrementados y existió una mayor longitud de las proyecciones de los astrocitos, los niveles de sinapsina-I y sinaptotagmina se vieron reducidos, así como, los niveles de actina en el hipotálamo. Este resultado es inverso a lo observado con un tratamiento *icv* agudo con leptina, donde los niveles de GFAP disminuyeron, mientras que, las proteínas sinápticas aumentaron en el hipotálamo (García-Cáceres y cols., 2011). En estos estudios no identificamos el tipo de sinapsis, ni qué tipo de neuronas estaban modificadas, ya que, sólo cuantificamos la densidad total de distintas proteínas sinápticas. Sin embargo, se ha descrito que cambios en la cantidad total de estas proteínas indican, de manera indirecta, cambios relativos en la cantidad total de sinapsis que hay en una determinada área cerebral (Hirokawa y cols., 1989). Por tanto, los cambios inversos encontrados entre los niveles proteicos de GFAP y las proteínas sinápticas, apoyan la idea de que existe una relación inversa entre la cobertura glial de las neuronas y la densidad sináptica.

La reducción observada en los niveles de sinapsina-I y sinaptotagmina, en las ratas tratadas crónicamente con leptina, podría estar también relacionada con los cambios detectados en la actina, ya que, estas proteínas regulan la liberación de las

vesículas sinápticas ancladas a los filamentos de actina con el fin de controlar la exocitosis de los neurotransmisores a la hendidura sináptica (Hirokawa y cols., 1989). Por tanto, una menor densidad de contactos entre neuronas por efecto de la leptina, podría indicar la retracción de los botones sinápticos en el hipotálamo, lo que implicaría el acortamiento de los filamentos de actina. Asimismo, los cambios detectados en la actina podrían deberse también a la acción directa de la leptina sobre esta proteína, ya que, según se ha observado en estudios en el hipocampo, esta hormona es capaz de inducir la reorganización de los filamentos de actina en las neuronas (O'Malley y cols., 2007).

También observamos una disminución en los niveles de la proteína postsináptica PSD95 en el hipotálamo en respuesta a la exposición crónica a leptina, lo que podría indicar una disminución en las sinapsis glutamatérgicas en el hipotálamo, ya que, esta proteína postsináptica está implicada en la transmisión de la señal en respuesta al glutamato (van Zundert y cols., 2004). Diversos estudios han puesto de manifiesto la capacidad de los astrocitos para modular la transmisión glutamatérgica mediante la liberación de D-serina, ATP y glutamato (Araque y cols., 2001; Bezzi y Volterra, 2001). Asimismo, los astrocitos modifican la extensión de su cobertura alrededor de las neuronas, en función de la cantidad de glutamato liberado en las sinapsis (Ventura y Harris, 1999; Oliet y cols., 2001), con el fin de regular la activación de los receptores NMDA implicados en la excitabilidad de la neurona postsináptica (Mothet y cols., 2005; Halassa y Haydon, 2010; Henneberger y cols., 2010). Por tanto, una mayor longitud de las proyecciones de los astrocitos en el ARC en respuesta a la leptina, podrían estar interfiriendo en las sinapsis excitatorias entre las neuronas del hipotálamo, hipótesis que se apoya en resultados observados en nuestro laboratorio donde la leptina parece modular específicamente los transportadores de glutamato en el hipotálamo (resultados no publicados).

De modo que, la leptina mediante los cambios inducidos en los astrocitos, podría estar alterando la actividad de, al menos, las neuronas anorexigénicas, dado que se ha demostrado que estas células gliales son capaces de regular la actividad de estas neuronas en el ARC (Pan y cols., 2011).

Por tanto, la exposición a altos niveles de leptina, durante un periodo de tiempo prolongado, podría inducir una astrogliosis en el hipotálamo que estaría afectando a la capacidad de respuesta de las neuronas hipotalámicas sensibles a leptina y, posiblemente, contribuyendo al desarrollo de una resistencia central a la leptina.

**Los efectos a corto y largo plazo inducidos por un aumento de ghrelina y D-ghrelina sobre el metabolismo energético, la activación y morfología de los astrocitos, y los cambios sinápticos en el hipotálamo.**

La ghrelina es una hormona que actúa principalmente en la hipófisis y el hipotálamo estimulando la liberación de GH, la adiposidad y el apetito (Kojima y cols., 1999; Tschöp y cols., 2000). Las acciones endocrinas de la ghrelina dependen de su acilación y están mediadas por el receptor GHS-R1a. En cambio, la D-ghrelina ejerce funciones biológicas no endocrinas a través de receptores hasta ahora desconocidos, aunque, algunas de estas funciones, serán compartidas por ambas isoformas (Kojima y cols., 1999; Muccioli y cols., 2002). La ghrelina modifica la síntesis de neuropéptidos involucrados en el control metabólico, mediante cambios rápidos en la organización sináptica del hipotálamo (Pinto y cols., 2004). Sin embargo, existe controversia sobre la acción que ejerce la D-ghrelina en las neuronas de esta región cerebral. Asimismo, se desconoce el efecto de cada una de estas isoformas en los astrocitos hipotalámicos.

Hemos observado que la ghrelina tiene efectos diferenciales sobre el metabolismo energético, los astrocitos y las proteínas sinápticas del hipotálamo, en función de su acilación y del tiempo de exposición a esta hormona. Además, muchos de los efectos centrales que ejerce la ghrelina a largo plazo están mediados por los cambios metabólicos sistémicos que produce.

*Efectos de la ghrelina y D-ghrelina en el metabolismo energético y los niveles circulantes de hormonas metabólicas.*

La administración *icv* de ghrelina no indujo modificaciones en la ingesta de las ratas tras una hora de su administración, a pesar de que está ampliamente descrito que la ghrelina acilada estimula la ingesta mediante el vaciado gástrico y la síntesis de NPY, AgRP y orexina en el hipotálamo (Asakawa y cols., 2001; Inui, 2001; Nakazato y cols., 2001; Kojima y Kangawa, 2002; Toshinai y cols., 2003). Esta diferencia en los resultados obtenidos podría deberse a que el tiempo de exposición a esta hormona no fue suficiente para observar cambios en este parámetro, dado que la ghrelina actúa sobre la ingesta alcanzando su máximo efecto trascurridas al menos 4 horas de su administración central (Kamegai y cols., 2000; Lawrence y cols., 2002).

La administración central de D-ghrelina tampoco indujo cambios en la ingesta tras una hora de su administración. Este resultado coincide con estudios en los que se ha demostrado que la administración central de D-ghrelina no induce cambios en la ingesta

(Neary y cols., 2006), mientras que, otros afirman que la D-ghrelina aumenta (Toshinai y cols., 2006) o disminuye la misma (Asakawa y cols., 2005). Asimismo, en algunos casos, sólo se observan cambios en la ingesta en respuesta a la D-ghrelina si las ratas han sido mantenidas previamente en ayunas (Toshinai y cols., 2006). Aunque existe controversia sobre la función de esta isoforma en el balance energético, es posible que el escaso tiempo transcurrido tras la administración y el no haber mantenido previamente a las ratas en ayunas, pudieran conformar posibles causas de no encontrar cambios en este parámetro.

Por tanto, los efectos a corto plazo de la ghrelina o D-ghrelina sobre el control metabólico podrían depender del momento del día en que se administre el tratamiento, ya que, los niveles basales de muchas de las hormonas metabólicas varían a lo largo del día (Hastings y cols., 2007), del acondicionamiento metabólico del animal y de la vía de administración de esta hormona. Esta última hipótesis se apoya en estudios que demuestran que el efecto inhibitorio que ejerce la D-ghrelina, es mucho más efectivo si se administra intraperitonealmente (*ip*) que si se realiza *icv* (Asakawa y cols., 2005), pudiendo estar implicados otros mecanismos periféricos en la acción de la D-ghrelina sobre el balance energético o ser una consecuencia de la acilación de esta hormona en la periferia.

Por otro lado, la administración crónica de ghrelina incrementó la ingesta y la ganancia de peso de las ratas, efecto que no se observó con la D-ghrelina o en el grupo al que se le administró también ghrelina, pero al que sólo se le permitió comer la cantidad de pienso consumido por el grupo control (ghrelina *pair fed*). Por tanto, tal y como se ha demostrado previamente (Tschöp y cols., 2000; Horvath y cols., 2003; Castañeda y cols., 2010), la administración a largo plazo de la ghrelina induce un efecto sobre la regulación del peso que depende de su acción sobre el apetito y la ingesta. El aumento de peso y el incremento en los niveles séricos de leptina en las ratas tratadas con ghrelina, podría deberse al aumento en la cantidad de tejido adiposo visceral que mostraron (datos no publicados). Este resultado está de acuerdo con estudios que demuestran que, al igual que la ghrelina (Tschöp y cols., 2000; Lall y cols., 2001), la administración periférica del análogo sintético de la ghrelina, el péptido secretagogo de la GH (GHRP)-6, induce un incremento en la adiposidad y en los niveles séricos de leptina en las ratas (Granado y cols., 2010).

Por el contrario, las ratas tratadas crónicamente con D-ghrelina, presentaron una menor ingesta y ganancia de peso y, aunque estas diferencias no llegaron a ser

significativas con respecto al grupo control, sí que lo fueron con respecto al grupo de ratas tratadas con ghrelina. Por tanto, existe un claro efecto diferencial de la administración central y crónica de ghrelina y D-ghrelina sobre el metabolismo energético. No sólo las ratas tratadas con ghrelina presentaron mayor peso, ingesta y leptina sérica, sino también mayores niveles circulantes de insulina que las ratas tratadas con D-ghrelina. Esta diferencia en los niveles séricos de insulina podría estar relacionada con los efectos diferenciales que ejerció cada isoforma sobre la ingesta, ya que, se ha descrito que la ghrelina acilada estimula la ingesta, al menos en parte, a través de la liberación de insulina, regulando así el metabolismo glucídico en los tejidos periféricos (Adeghate y Ponery, 2002). Además, los cambios observados en los niveles circulantes de leptina e insulina debido a la exposición crónica de ghrelina no se observaron con el tratamiento agudo. Este resultado parece indicar que la ghrelina y D-ghrelina no están ejerciendo un efecto directo sobre los niveles periféricos de estas dos hormonas, sino que estos cambios podrían ser dependientes de sus efectos sobre el metabolismo energético.

El tratamiento agudo con ghrelina o D-ghrelina incrementó los niveles circulantes de ghrelina total. Dado que esta hormona es capaz de atravesar la BHE en ambas direcciones (Banks y cols., 2002), este rápido aumento podría derivar del transporte de la ghrelina o D-ghrelina administrada desde el ventrículo lateral a la circulación. Igualmente observamos un incremento en los niveles circulantes de ghrelina desacilada por efecto de ambos tratamientos, sin cambios en los niveles de ghrelina acilada. Este resultado, aunque puede ser el esperado en el caso de las ratas tratadas con D-ghrelina, resulta llamativo en las ratas tratadas con ghrelina, ya que, aproximadamente el 99% de la ghrelina inyectada era acilada. Por tanto, aunque está descrito que el transporte de la ghrelina a través de la BHE es distinto en función de su acilación (Banks y cols., 2002), es probable que la ghrelina inyectada podría haber sido desacilada en la circulación tras una hora de su administración, dado que su vida media es muy corta (Akamizu y cols., 2005; Toshinai y cols., 2006). Este resultado está de acuerdo con estudios previos donde se ha demostrado que la ghrelina se desacila rápidamente (aproximadamente 30 minutos en ratas) debido a la presencia de esterases en la circulación (Vriese y cols., 2004).

En respuesta al tratamiento crónico, los niveles circulantes de ghrelina total también estaban incrementados en los grupos de ghrelina *pair fed* y D-ghrelina. Sin embargo, las ratas tratadas con ghrelina, a las que se les permitió comer *ad libitum*, no

mostraron cambios significativos en este parámetro. Esta diferencia podría deberse a que la síntesis de ghrelina endógena depende del estado metabólico del animal (Date y cols., 2000). Por tanto, dado que los grupos de ghrelina *pair fed* y D-ghrelina son los que presentaron una menor ingesta y ganancia de peso durante el tratamiento, es posible que la cantidad de ghrelina endógena secretada por las células oxínticas del estómago en estos dos grupos fuera mayor.

Una de las funciones fisiológicas de la ghrelina es la regulación y estimulación de la síntesis y secreción hipofisaria de GH debido a su efecto directo sobre las células somatotropas de la hipófisis anterior (Dieguez y Casanueva, 2000) o mediante la activación de las neuronas secretoras de la hormona liberadora de GH (GHRH) y somatostatina (SST) en el hipotálamo (Tolle y cols., 2001; Wells y Houston, 2001; Osterstock y cols., 2010). Debido a la pulsatilidad de la GH (Plotsky y Vale, 1985; Sato y cols., 1988), los niveles circulantes de IGF-I se utilizan como medida indirecta de la secreción de este factor. Sin embargo, la administración aguda *icv* de ghrelina y D-ghrelina redujo los niveles circulantes de IGF-I, sin detectar modificaciones en este parámetro tras el tratamiento crónico con esta hormona. Estudios en humanos han relacionado inversamente los niveles circulantes de ghrelina con los de IGF-I, con independencia de los niveles de GH (Bellone y cols., 2002; Whatmore y cols., 2003; Pöykkö y cols., 2005). Los niveles circulantes de IGF-I no sólo se ven afectados por los niveles de GH, sino también por diversos factores metabólicos. Además, dado que la ghrelina desacilada puede ejercer efectos antagónicos a la ghrelina acilada (Asakawa y cols., 2005), es posible que se produzca ese antagonismo sobre la liberación de GH y la reducción de los niveles circulantes de IGF-I, a consecuencia del aumento en los niveles de ghrelina desacilada en estos animales. Esta posibilidad se apoya en estudios donde se ha demostrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan ghrelina desacilada desarrollan un fenotipo pequeño debido a sus niveles reducidos de GH e IGF-I en la circulación (Ariyasu y cols., 2005).

*Efecto de la ghrelina y D-ghrelina sobre la expresión de los neuropéptidos del hipotálamo.*

Se ha descrito que, tanto la ghrelina como la D-ghrelina, actúan sobre las neuronas del ARC y PVN (Asakawa y cols., 2005), estimulando a las neuronas que expresan los neuropéptidos orexigénicos NPY, AgRP y orexina (Kamegai y cols., 2001; Nakazato y cols., 2001; Toshinai y cols., 2003) e inhibiendo a las neuronas que expresan los

neuropéptidos anorexigénicos POMC y CRH en el hipotálamo (Cowley y cols., 2003). Sin embargo, existe controversia acerca del efecto de la D-ghrelina en el control metabólico (Ariyasu y cols., 2005; Toshinai y cols., 2006), ya que, se desconoce a través de qué población neuronal actúa.

A diferencia de lo descrito en algunos estudios previos (Kamegai y cols., 2000, 2001; Nakazato y cols., 2001; Chen y cols., 2004), no observamos cambios en la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos tras el tratamiento crónico con ghrelina y, a pesar de que estas ratas presentaron incrementados tanto el peso como la ingesta. Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con estudios en los que se ha determinado que la administración de ghrelina en ratones, que también presentan un aumento significativo de peso, no induce cambios en la expresión de los neuropéptidos NPY y AgRP debido a que desarrollan una cierta resistencia a ghrelina en el ARC (Bouret y cols., 2004a; Bouret y cols., 2008; Briggs y cols., 2010). Por tanto, la administración crónica de ghrelina podría estar desensibilizando los receptores GHSR en el SNC, lo que conducirá al desarrollo de una cierta resistencia a esta hormona en el hipotálamo. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el grupo de ratas tratadas con ghrelina, a las que se permitió comer *ad libitum*, no mostraron diferencias significativas en la ingesta los tres últimos días de tratamiento con respecto al grupo de ratas control.

Tampoco observamos cambios en ninguno de los neuropéptidos hipotalámicos analizados en respuesta a la D-ghrelina con respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento crónico con esta isoforma indujo diferencias significativas en los niveles del mensajero de POMC y CART en el hipotálamo con respecto al grupo de ratas tratadas con ghrelina. Estos cambios en POMC y CART podrían estar relacionados con el efecto diferencial que ejerció la administración de ghrelina y D-ghrelina sobre la regulación del peso de las ratas. Además, estos dos grupos mostraron alterados, de forma diferencial, los niveles basales de leptina e insulina, principales encargadas de regular la expresión y síntesis de POMC y CART en el hipotálamo (Schwartz y cols., 1992; Friedman, 1998). Por lo tanto, y dado que está descrito que los efectos anorexigénicos de la D-ghrelina sobre la regulación del peso son inversamente proporcionales a los efectos orexigénicos ejercidos por la ghrelina (Asakawa y cols., 2005), es posible que los cambios detectados en POMC y CART entre estos dos grupos no se deban a un efecto directo de la administración de ghrelina o D-ghrelina, sino a un efecto derivado de la diferencia de peso e ingesta observada entre ambos grupos.

*Efecto de la ghrelina y D-ghrelina sobre las proteínas gliales y la morfología de los astrocitos del hipotálamo.*

Tanto la ghrelina como la D-ghrelina modulan la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares (Baldanzi y cols., 2002; Cassoni y cols., 2002; Murata y cols., 2002; Miao y cols., 2007; Xu y cols., 2008). Los efectos mitóticos de la ghrelina han sido demostrados en preosteoblastos (Kim y cols., 2005; Maccarinelli y cols., 2005), precursores neuronales (Zhang y cols., 2004a; Sato y cols., 2006), preadipocitos (Kim y cols., 2004; Zhang y cols., 2004b), cardiomiocitos (Pettersson y cols., 2002) y células hipofisarias (Nanzer y cols., 2004). Mientras que, en líneas celulares de carcinomas procedentes de tejidos periféricos como próstata (Cassoni y cols., 2004), tiroides (Volante y cols., 2003), glándula mamaria (Cassoni y cols., 2001) y pulmón, la ghrelina actúa inhibiendo su proliferación (Ghè y cols., 2002). Muchos de los efectos que se han observado con la D-ghrelina se mimetizan con los observados con la ghrelina (Baldanzi y cols., 2002; Filigheddu y cols., 2007). No obstante, se desconoce el efecto de la ghrelina y D-ghrelina sobre la proliferación de las células del hipotálamo y, específicamente, sobre los astrocitos, así como, el efecto de estas hormonas sobre la activación y morfología de dichas células gliales.

Hemos observado que la ghrelina y D-ghrelina tienen efectos diferenciales sobre los astrocitos del hipotálamo. Sin embargo, aunque no encontramos diferencias en ninguno de estos dos grupos con respecto al grupo de ratas control, los efectos observados sugieren que el ratio de ghrelina/D-ghrelina es un factor importante en la regulación de la morfología de los astrocitos.

El tratamiento agudo con D-ghrelina indujo en los astrocitos del ARC un mayor número de sus proyecciones y, además, estas proyecciones presentaron una longitud significativamente mayor que el de las ratas tratadas con ghrelina. Esta diferencia en la morfología de los astrocitos entre estos dos grupos no cursaba con cambios en los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo, lo que pudo deberse a que los niveles de esta proteína se cuantificaron en todo el hipotálamo y no, específicamente, en el ARC. Además, como se analizó con anterioridad, los cambios morfológicos observados en los astrocitos no siempre van acompañados con cambios en los niveles totales de GFAP, ya que, la morfología de estas células gliales puede variar rápidamente mediante cambios en la fosforilación de GFAP (Zamoner y cols., 2007) y en la reorganización de los filamentos de esta proteína, tal y como se ha observado en otros estudios de astrocitos en respuesta a la leptina (O'Malley y cols., 2007). Además, en ocasiones, para inducir cambios en los niveles proteicos de GFAP se requiere más tiempo, debido a que los

niveles de esta proteína van a depender de los procesos de producción o degradación proteica que tengan lugar en el tejido (Safavi-Abbasi y cols., 2001).

En las ratas tratadas con D-ghrelina, a pesar de presentar los astrocitos del ARC con una mayor complejidad estructural, no mostraron un aumento de vimentina en el hipotálamo tras una hora de su administración, ni tampoco *in vitro*. Por tanto, los cambios morfológicos en los astrocitos podrían sugerir cambios en su funcionalidad, a pesar de no mostrar modificaciones en su activación o proliferación (Wang y Bordey, 2008).

Por el contrario, el tratamiento con ghrelina aumentó los niveles proteicos de vimentina en el hipotálamo tras una hora de su administración, al tiempo que indujo una mayor inmunoreactividad para esta proteína en el ARC, a pesar de que estas ratas no mostraron modificaciones en los niveles de GFAP, ni en la morfología de los astrocitos del ARC con respecto al grupo de ratas control. *In vitro* la ghrelina tampoco ejerció ningún efecto sobre los niveles proteicos de vimentina en los astrocitos hipotalámicos, lo que indicaría que los cambios de vimentina pudieron ser debidos al efecto que ejerció la ghrelina sobre otro tipo celular en el hipotálamo. En efecto, en estas ratas tratadas con ghrelina las fibras de los tanicitos que se proyectaban al hipotálamo medial perpendiculares al 3V, mostraron una mayor inmunoreactividad para vimentina tras una hora de la administración de esta isoforma. Por tanto, es posible que la ghrelina tenga un efecto sobre este tipo celular, que podría estar implicado en cambios en el transporte de nutrientes y otros factores circulantes al hipotálamo. Asimismo, esta hipótesis se apoya en estudios recientes que afirman que los cambios en el traspaso de sustancias entre el LCR y el parénquima cerebral están relacionados con modificaciones estructurales en los tanicitos, que pueden verse reflejados en cambios en la expresión de vimentina (Mullier y cols., 2010). Sin embargo, si esto pudiera ocurrir en respuesta a factores metabólicos, se desconoce los efectos fisiológicos resultantes.

La ghrelina y D-ghrelina indujeron una disminución en los niveles proteicos de PCNA en el hipotálamo tras una hora de su administración. Por tanto, y tal y como han descrito otros autores (Baldanzi y cols., 2002; Chung y cols., 2007), la ghrelina y D-ghrelina podrían estar modulando la proliferación de las células del hipotálamo. No obstante, este efecto no parece afectar a los astrocitos, ya que, no detectamos una disminución en el número de dichas células gliales en el ARC y además, ninguna de estas isoformas *in vitro* indujo cambios en la proliferación de los astrocitos hipotalámicos.

Al igual que se ha observado con la leptina, los efectos de la ghrelina y D-ghrelina sobre los astrocitos hipotalámicos fueron diferentes a corto y largo plazo. Así, las ratas tratadas crónicamente con ghrelina, independientemente de su ingesta, presentaron una disminución en los niveles proteicos de GFAP. Esta disminución no estaba asociada con un cambio en el número de astrocitos, al menos en el ARC, resultado que está de acuerdo con los estudios *in vitro* donde la ghrelina no indujo modificaciones en la proliferación de los astrocitos hipotalámicos. Sin embargo, aunque los niveles de GFAP disminuyeron en respuesta a la ghrelina *in vivo*, las células gliales del ARC mostraron una mayor longitud de sus proyecciones.

De modo que, es posible que los astrocitos de otros núcleos hipotalámicos puedan estar respondiendo de forma diferente a los que encontramos en el ARC, reduciendo su expresión de GFAP en respuesta a la ghrelina. Sin embargo, la ghrelina indujo un aumento en la expresión de esta proteína estructural en cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos. Por tanto, los efectos a largo plazo observados en los astrocitos en respuesta a la ghrelina, parecen no deberse a un efecto directo de esta hormona, pudiendo estar implicados otros factores metabólicos. Además, esta hipótesis está de acuerdo con el hecho de que estas ratas mostraron también aumentados los niveles circulantes de leptina, hormona que, como hemos observado en nuestros estudios, estimula la longitud de las proyecciones de los astrocitos en el ARC. Sin embargo, a diferencia del tratamiento crónico con leptina, donde observamos que los cambios de GFAP estaban asociados con un aumento de vimentina, no apreciamos cambios en vimentina en respuesta a la ghrelina. Esta observación nos sugiere que, tal vez, es necesario un mayor aumento de leptina para poder activar los astrocitos e inducir un aumento en la expresión de vimentina en estas células.

Al igual que la ghrelina, el tratamiento crónico con D-ghrelina indujo una disminución en los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo y un aumento en la longitud de las proyecciones de las células GFAP+ en el ARC. Sin embargo, la D-ghrelina indujo una disminución en el número de astrocitos GFAP+ en este núcleo hipotalámico, sin cambios en los niveles de PCNA en el hipotálamo. Aunque es posible que haya un aumento en la muerte de los astrocitos hipotalámicos, como hemos demostrado en otras enfermedades metabólicas (Lechuga-Sancho y cols., 2006; García-Cáceres y cols., 2008), esta disminución podría no deberse a un cambio en el número de astrocitos en el ARC, sino a una disminución en la expresión de GFAP/célula, lo que hace que no lo detectemos por inmunohistoquímica. Por el contrario, la D-ghrelina

aumentó los niveles proteicos de GFAP *in vitro*, de manera que, los cambios observados *in vivo* sobre este parámetro parecen ser debidos, al menos en parte, a los cambios metabólicos inducidos por esta hormona.

La disminución detectada en los niveles proteicos de GFAP en las ratas tratadas crónicamente con ghrelina y D-ghrelina no coincidió con los cambios observados en los niveles del mensajero de esta proteína. Los niveles proteicos de GFAP en el hipotálamo bajaron con ghrelina y D-ghrelina en las ratas que comían *ad libitum*, pero no encontramos cambios en sus niveles del mensajero.

El patrón de expresión de ARNm de una determinada proteína no siempre corresponde con los niveles de sus productos proteicos, ya que, los niveles de una proteína en un tejido o célula pueden verse influenciados por modificaciones post-transcripcionales o por procesos de degradación (Chen y cols., 2002). Asimismo, el grupo de ghrelina *pair fed* mostró niveles elevados de ARNm de GFAP en el hipotálamo, aunque los niveles de esta proteína disminuyeron, lo que podría deberse a que, en estas ratas, el recambio de esta proteína pudo verse incrementado en el hipotálamo. Además, este incremento del mensajero de GFAP no parece estar asociado con un efecto directo de la ghrelina, sino con la restricción de comida a la que fueron sometidas estas ratas.

En efecto, datos no publicados en nuestro laboratorio indican que un ayuno de 12 horas aumenta la expresión de GFAP en el hipotálamo. Es posible que la restricción alimentaria indujera una situación de estrés incrementando la secreción de glucocorticoides (Patel y Finch, 2002). Los glucocorticoides ejercen una influencia sobre el metabolismo glial promoviendo la expresión de GFAP tanto *in vivo* (Lambert y cols., 2000) como *in vitro* (Avola y cols., 2004). Por tanto, un aumento en los niveles circulantes de dichos glucocorticoides inducido por la restricción de comida y unido con la administración crónica de ghrelina, que también se ha descrito que induce ansiedad (Carlini y cols., 2002; Carlini y cols., 2004; Hansson y cols., 2011) facilitando la liberación de glucocorticoides y ACTH (Korbonits y cols., 2004), podría estar involucrado en el aumento de expresión de GFAP en el hipotálamo de estas ratas.

Las ratas tratadas crónicamente con D-ghrelina, a pesar de que presentaron una disminución en el número de astrocitos en el ARC y en los niveles de GFAP en el hipotálamo, mostraron un aumento en los niveles hipotalámicos de vimentina. Sin embargo, la D-ghrelina no tuvo ningún efecto sobre los niveles proteicos de vimentina en los astrocitos en cultivo. Por tanto, es posible que estos cambios de vimentina sean

debidos a alteraciones en la morfología de los tanicitos, como hemos descrito anteriormente, en respuesta a un aumento agudo de ghrelina.

Finalmente, mediante el uso de cultivos primarios de astrocitos hipotalámicos determinamos si los efectos centrales observados en los modelos *in vivo* se debían a la acción directa de la ghrelina y la D-ghrelina sobre los astrocitos del hipotálamo. La expresión del gen de la ghrelina y su receptor GHS-R se han detectado en el hipotálamo, incluido el ARC (Cowley, 2003; Mozid y cols., 2003; Kedzia y cols., 2009). Existen estudios que confirman la expresión de GHSR en las neuronas (Willesen y cols., 1999) y astrocitos del hipotálamo (Dixit y cols., 2006). Sin embargo, se desconoce el efecto directo que ejerce la ghrelina y D-ghrelina sobre los astrocitos hipotalámicos.

Tras una exposición de 24 horas a ghrelina o D-ghrelina observamos un aumento en los niveles proteicos de GFAP en los astrocitos en cultivo, sin cambios en los niveles de expresión del mensajero de esta proteína. El hecho de no detectar cambios en la expresión de GFAP, pero sí un incremento en sus niveles proteicos, puede ser debido, como hemos mencionado anteriormente, a que no siempre los cambios en el mensajero y en la proteína ocurren al mismo tiempo. Este aumento en GFAP indica que, ambas isoformas de la ghrelina, tienen un efecto directo sobre los astrocitos hipotalámicos en cultivo, lo que sugiere la implicación de un receptor diferente al GHS-R1a. Además, los niveles de expresión del mensajero GHS-R1a no fueron detectables en estos cultivos de astrocitos. De modo que, los cambios de GFAP inducidos por la ghrelina podrían depender de la activación de un receptor afín para ambas isoformas o a distintos receptores capaces de inducir el mismo efecto. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no encontrar expresión del mensajero de GHS-R1a no quiere decir que no lo expresen, ya que, la cantidad de expresión de GHS-R1a en los cultivos podría no haber sido suficiente para poder detectarlo mediante RT-PCR o que todavía no expresaron este receptor al tratarse de cultivos procedentes de crías de rata (2 días de vida).

Por tanto, aunque apenas existen estudios acerca de los efectos *in vitro* que ejerce la D-ghrelina, se ha demostrado que esta isoforma comparte con la ghrelina muchas de sus actividades celulares en los astrocitos, las cuales podrían ser independientes de la activación de GHS-R1a. Sin embargo, todavía queda por esclarecer el receptor implicado en estos cambios y el mecanismo por el cual la ghrelina y D-ghrelina inducen un aumento de los niveles proteicos de GFAP en los astrocitos hipotalámicos en cultivo.

*Efecto de la ghrelina y D-ghrelina en la densidad total de las proteínas implicadas en la conectividad sináptica del hipotálamo*

Hemos observamos que tras una hora de la administración de ghrelina incrementaron los niveles proteicos de PSD-95 en el hipotálamo, lo que podría deberse a un aumento en el número de sinapsis glutamatérgicas en las neuronas del hipotálamo, tal y como se ha descrito en otros estudios que demuestran que la ghrelina aumenta el número de sinapsis glutamatérgicas en el hipotálamo entre las neuronas de GHRH (Aguilar y cols., 2005), así como, entre las neuronas de orexina (Horvath y Gao, 2005). Asimismo, observamos que tras una hora de la administración de ghrelina aumentaron los niveles proteicos de SNAP-25 en el hipotálamo, que también podría estar induciendo la liberación de L-glutamato por parte de las neuronas presinápticas, dado que tras una excitación neuronal inducida por ghrelina se produce un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular que puede aumentar los niveles de SNAP-25 con el fin de disminuir la sensibilidad de las neuronas a la acción del glutamato (Verderio y cols., 2004). No obstante, las ratas tratadas con esta hormona presentaron niveles proteicos disminuidos de otras proteínas presinápticas como la sinaptofisina y sinapsina en el hipotálamo tras una hora de su administración. Estos efectos diferenciales observados en las proteínas presinápticas por efecto agudo de la ghrelina, podrían deberse a que las distintas poblaciones neuronales que constituyen el hipotálamo están respondiendo de manera diferente a esta hormona.

El tratamiento agudo con D-ghrelina redujo los niveles proteicos de sinaptotagmina y syntaxina en el hipotálamo, así como, los niveles de  $\beta$ -actina tras una hora de su administración. Dado que estas proteínas presinápticas están implicadas en la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica (Geppert y cols., 1994), esta reducción detectada en sus niveles podría indicar una disminución en los procesos de exocitosis de neurotransmisores entre las neuronas del hipotálamo.

La D-ghrelina también aumentó la longitud y el número de proyecciones de los astrocitos del ARC con respecto al grupo de ratas tratadas con ghrelina. Este hecho podría indicar que los astrocitos interfirieran en las sinapsis entre neuronas provocando así la retracción de sus axones o dendritas, lo que estaría de acuerdo con la disminución observada en los niveles proteicos de actina. El tratamiento agudo con D-ghrelina, a diferencia de la ghrelina, no indujo cambios en los niveles de PSD-95, lo que significa que la D-ghrelina no parece estar afectando a las sinapsis glutamatérgicas, posiblemente

porque las dianas neuronales de cada una de estas isoformas en el hipotálamo son distintas.

La administración central y crónica de ghrelina o D-ghrelina, a diferencia del modelo agudo, no manifestó modificaciones en los niveles de las distintas proteínas sinápticas analizadas en el hipotálamo. El hecho de no encontrar cambios en estas proteínas parece estar relacionado con los resultados obtenidos en la expresión de los neuropéptidos, ya que, tampoco se vieron muy afectados por la exposición crónica a esta hormona. Únicamente observamos que el grupo de ghrelina *pair fed* mostró un aumento en los niveles de syntaxina con respecto al grupo de ratas control, efecto que no se observó con ninguno de los demás tratamientos, incluido el grupo de ratas a las que también se administró ghrelina, pero se las permitió comer *ad libitum*, lo que podría indicar que la restricción de comida en este grupo podría estar detrás de dicho efecto.

Téngase en cuenta, que determinamos la densidad de las proteínas sinápticas en todo el hipotálamo, donde existe una gran diversidad de neuronas que actúan de manera muy heterogénea, por lo que resulta difícil relacionar los cambios fisiológicos inducidos por esta hormona con los cambios detectados en las proteínas sinápticas en el hipotálamo. Sin embargo, disponemos de evidencias sobre el hecho de que la leptina y la ghrelina están ejerciendo efectos directos sobre los astrocitos. Además, estos cambios gliales parecen estar relacionados con algunas de las modificaciones sinápticas detectadas a través de cambios en las proteínas sinápticas. Por tanto, será importante realizar estudios celulares para determinar qué tipos de neuronas están afectadas por estos cambios.

### **Influencia de la leptina y la ghrelina sobre la producción de mediadores inflamatorios en el hipotálamo.**

*Efecto de la leptina sobre la respuesta inflamatoria en el hipotálamo.*

La leptina es una citoquina que actúa en el control del balance energético. Además, es un regulador importante de la respuesta inmune (Tang y cols., 2007). Uno de los principales sitios de bioactividad de las citoquinas es el hipotálamo, ya que, es una región clave en la regulación de la respuesta inflamatoria en el SNC (Schöbitz y cols., 1993). Los cambios en los niveles centrales de citoquinas, interleuquinas y adipoquinas, pueden contribuir al desarrollo de patologías metabólicas como la obesidad (Frühbeck, 2008; Karalis y cols., 2009) y la resistencia a insulina/leptina en el hipotálamo (Souza y cols., 2005; Milanski y cols., 2009; Posey y cols., 2009; Oh-I y cols., 2010; Ropelle y cols., 2010; Thaler y

cols., 2010). Algunos de estos efectos centrales observados en obesidad, podrían estar inducidos por el efecto de la leptina sobre la producción de otras citoquinas. En este estudio la leptina indujo modificaciones en la expresión y síntesis de distintos mediadores de la respuesta inflamatoria en el hipotálamo e *in vitro* en los astrocitos hipotalámicos.

La exposición a concentraciones elevadas de leptina supuso una disminución en los niveles proteicos de IL-6 en el hipotálamo, resultado que está en contraposición con los estudios que afirman que la leptina induce la secreción y transcripción de IL-6 en distintos tipos celulares (Loffreda y cols., 1998; Zarkesh-Esfahani y cols., 2001; Mattioli y cols., 2005; Fenton y cols., 2006). Es probable que, el cambio observado en los niveles de IL-6 *in vivo* no se deba al efecto directo que ejerció la leptina sobre los astrocitos del hipotálamo, ya que, *in vitro* la leptina promovió de manera directa la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 en estas células gliales. Este efecto, podría estar mediado por un aumento *in vitro* en los niveles de STAT-3 fosforilado, tal y como demuestran otros autores en cultivos mixtos de astrocitos y microglía, donde la leptina parece promover la transcripción de IL-1 $\beta$  mediante la activación de STAT-3 (Hosoi y cols., 2003; Pinteaux y cols., 2007).

Junto a ello, la leptina no indujo modificaciones en los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en los astrocitos en cultivo. Se ha observado que en cultivos de microglía, la leptina sólo estimula la expresión del TNF- $\alpha$  cuando las células han sido previamente tratadas con lipopolisacáridos (LPS) (Lafrance y cols., 2010). De modo que, es posible que, bajo determinadas condiciones, la leptina también modifique la producción de este factor en los astrocitos; sin embargo, este hecho requiere ser investigado.

#### *Efecto de la ghrelina y D-ghrelina sobre la respuesta inflamatoria en el hipotálamo.*

La ghrelina y D-ghrelina regulan la respuesta inmune modulando la expresión de citoquinas en distintos tipos celulares como los linfocitos T (Xia y cols., 2004) y la microglía (Bulgarelli y cols., 2009). Además, las alteraciones en los niveles de estos mediadores inflamatorios pueden contribuir al desarrollo de patologías metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina (Hotamisligil y cols., 1993; Hotamisligil y Spiegelman, 1994; Xu y cols., 2003). Sin embargo, se desconoce la función de la ghrelina en la respuesta inflamatoria mediada por los astrocitos.

El tratamiento crónico con ghrelina y D-ghrelina indujo un aumento en la expresión hipotalámica del mensajero de TNF $\alpha$  e IL-6. En el caso de las ratas tratadas

crónicamente con ghrelina el aumento de peso, la adiposidad o el incremento de insulina u otros factores séricos podrían haber contribuido al aumento de la expresión génica de estos mediadores inflamatorios en el hipotálamo, ya que, el grupo de ghrelina *pair fed* no mostró estos cambios. Esta hipótesis se apoya en estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio donde hemos observado que una sobrenutrición neonatal también induce un aumento de peso en las ratas que parece estar asociado con un aumento en los niveles proteicos de IL-6 en el hipotálamo (Tapia-González y cols., 2011). Asimismo, otros estudios demuestran que existe una relación entre el aumento de expresión de citoquinas en el hipotálamo y la aparición de obesidad y resistencia a la insulina (Ouchi y cols., 2011).

El tratamiento crónico con D-ghrelina también incrementó la expresión del mensajero de TNF $\alpha$  e IL-6, lo que podría deberse a un efecto directo de esta isoforma, ya que estas ratas no presentaron diferencias de peso, ni cambios en los niveles periféricos de hormonas metabólicas con respecto al grupo de ratas control. El hecho de que una hora después de la administración de ambas isoformas los niveles proteicos de IL-6 aumentaron en el hipotálamo, apoya la hipótesis de que la ghrelina y D-ghrelina promueven de manera directa la expresión de esta citoquina, a pesar de algunos estudios *in vivo* demuestran lo contrario (Dembinski y cols., 2003; Li y cols., 2004; Kasimay y cols., 2006; Wu y cols., 2007). Sin embargo, este efecto no parece ser consecuencia de la acción directa de esta hormona sobre los astrocitos del hipotálamo, ya que, *in vitro* la ghrelina y D-ghrelina no indujeron cambios significativos en los niveles de expresión de IL-6. Por tanto, ambas isoformas de esta hormona podrían haber promovido la activación de otro tipo celular como la microglía (Bulgarelli y cols., 2009).

Al contrario de lo observado *in vivo*, la exposición a ghrelina y D-ghrelina *in vitro* redujo la expresión del mensajero de IL-1 $\beta$  en los astrocitos hipotalámicos, aunque en el caso de la ghrelina este efecto no llegó a ser estadísticamente significativo. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios *in vitro* donde se ha descrito que la ghrelina es capaz de inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  en linfocitos T y monocitos humanos (Dixit y cols., 2004). Aunque no hay muchos estudios sobre la función de la D-ghrelina en la regulación de estos mediadores inflamatorios, nuestros resultados indican que la D-ghrelina podría estar ejerciendo un efecto directo y antiinflamatorio sobre los astrocitos hipotalámicos, inhibiendo la expresión de IL-1 $\beta$ .

En conjunto nuestros resultados indican que los astrocitos hipotalámicos responden a las señales metabólicas como la leptina y la ghrelina modificando su morfología y funcionalidad, y liberando factores que participarán en la formación o eliminación de sinapsis neuronales, así como, en los procesos inflamatorios. Por tanto, estas células gliales pueden desempeñar una función prioritaria y relevante en el control metabólico, siendo menester ulteriores procesos de investigación en aras a obtener una mejor comprensión de los mecanismos implicados en el desarrollo de patologías, tales como la obesidad y la resistencia a hormonas metabólicas.

---

---

***VII. CONCLUSIONES***

1. Las modificaciones metabólicas en la descendencia de madres alimentadas con una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia podrían ser debidas, al menos en parte, a la reducción de los astrocitos en el ARC y a los cambios en los contactos sinápticos en las neuronas de POMC y NPY inducidos por efecto de la dieta materna.
2. La exposición a una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia agrava las consecuencias metabólicas centrales y periféricas inducidas por el consumo de una dieta rica en grasa en los descendientes en la etapa adulta.
3. La hiperleptinemia podría estar implicada en alguna de las modificaciones anatómicas observadas en el hipotálamo de los animales obesos, ya que, esta citoquina, modula la morfología de los astrocitos hipotalámicos tanto *in vivo* como *in vitro* y, estos cambios, podrían alterar la respuesta o la sensibilidad del hipotálamo a las señales metabólicas.
4. La ghrelina y D-ghrelina tienen efectos diferenciales sobre el metabolismo energético y la morfología de los astrocitos hipotalámicos, siendo muchos de los efectos a largo plazo dependientes de la ingesta y/o el aumento de peso.
5. La leptina y la ghrelina modulan de manera directa la producción de citoquinas en los astrocitos hipotalámicos, sugiriendo un mecanismo alternativo de participación de ambas hormonas en el control metabólico central.

***VIII. BIBLIOGRAFÍA***

---

- Aalinkeel, R., M. Srinivasan, F. Song y M. S. Patel. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. 2001. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281 (3): E640-E48.
- Aasum, E., A. D. Hafstad, D. L. Severson y T. S. Larsen. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. 2003. *Diabetes.* 52 (2): 434-41.
- Abizaid, A., Z.-W. Liu, Z. B. Andrews, M. Shanabrough, E. Borok, J. D. Elsworth, R. H. Roth, M. W. Sleeman, M. R. Picciotto, M. H. Tschöp, X.-B. Gao y T. L. Horvath. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. 2006. *J Clin Invest.* 116 (12): 3229-39.
- Adair, L. S. y T. J. Cole. Rapid child growth raises blood pressure in adolescent boys who were thin at birth. 2003. *Hypertension.* 41 (3): 451-56.
- Adan, R. A. H. Constitutive receptor activity series: endogenous inverse agonists and constitutive receptor activity in the melanocortin system. 2006. *Trends Pharmacol Sci.* 27 (4): 183-86.
- Adeghate, E. y A. S. Ponery. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. 2002. *J Neuroendocrinol.* 14 (7): 555-60.
- Aguilar, E., M. Tena-Sempere y L. Pinilla. Role of excitatory amino acids in the control of growth hormone secretion. 2005. *Endocrine.* 28 (3): 295-302.
- Ahima, R. S. y J. S. Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. 2000. *Trends Endocrinol Metab.* 11 (8): 327-32.
- Ahima, R. S., C. Bjorbaek, S. Osei y J. S. Flier. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. 1999. *Endocrinology.* 140 (6): 2755-62.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran y J. S. Flier. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. 1998. *J Clin Invest.* 101 (5): 1020-27.
- Akamizu, T., K. Takaya, T. Irako, H. Hosoda, S. Teramukai, A. Matsuyama, H. Tada, K. Miura, A. Shimizu, M. Fukushima, M. Yokode, K. Tanaka y K. Kangawa. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. 2004. *Eur J Endocrinol.* 150 (4): 447-55.
- Akamizu, T., T. Shinomiya, T. Irako, M. Fukunaga, Y. Nakai, Y. Nakai y K. Kangawa. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. 2005. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (1): 6-9.
- Anderson, C. M. y R. A. Swanson. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. 2000. *Glia.* 32 (1): 1-14.
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling y C. J. Small. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. 2004. *J Biol Chem.* 279 (13): 12005-08.
- Anderwald, C., G. Brabant, E. Bernroider, R. Horn, A. Brehm, W. Waldhäusl y M. Roden. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. 2003. *Diabetes.* 52 (7): 1792-98.

- Andreis, P. G., L. K. Malendowicz, M. Trejter, G. Neri, R. Spinazzi, G. P. Rossi y G. G. Nussdorfer. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: Evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. 2003. *FEBS Lett.* 536 (1-3): 173-79.
- Araque, A., G. Carmignoto y P. G. Haydon. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. 2001. *Annu Rev Physiol.* 63 795-813.
- Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura y P. G. Haydon. Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. 1999. *Can J Physiol Pharmacol.* 77 (9): 699-706.
- Argente, J. [Obesity in childhood and adolescence: a heterogeneous disease with new pathophysiological bases.]. 2011. *An Pediatr (Barc).* 75 (1): 1-5.
- Argente, J., N. Caballo, V. Barrios, M. T. Muñoz, J. Pozo, J. A. Chowen y M. Hernández. Disturbances in the growth hormone-insulin-like growth factor axis in children and adolescents with different eating disorders. 1997b. *Horm Res.* 48 Suppl 4 16-18.
- Argente, J., V. Barrios, J. A. Chowen, M. K. Sinha y R. V. Considine. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. 1997a. *J Pediatr.* 131 (6): 833-38.
- Ariyasu, H., K. Takaya, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, Y. Arai, K. Kangawa y K. Nakao. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. 2005. *Endocrinology.* 146 (1): 355-64.
- Ariyasu, H., K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa y K. Nakao. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. 2001. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (10): 4753-58.
- Asakawa, A., A. Inui, M. Fujimiya, R. Sakamaki, N. Shinfuku, Y. Ueta, M. M. Meguid y M. Kasuga. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. 2005. *Gut.* 54 (1): 18-24.
- Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, G. Katsuura, M. Fujimiya, M. A. Fujino y M. Kasuga. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. 2003. *Gut.* 52 (7): 947-52.
- Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Nijima, M. A. Fujino y M. Kasuga. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. 2001. *Gastroenterology.* 120 (2): 337-45.
- Augustine, G. J., M. P. Charlton y S. J. Smith. Calcium entry into voltage-clamped presynaptic terminals of squid. 1985. *J Physiol.* 367 143-62.
- Avola, R., M. A. D. Tullio, A. Fisichella, S. K. Tayebati y D. Tomassoni. Glial fibrillary acidic protein and vimentin expression is regulated by glucocorticoids and neurotrophic factors in primary rat astroglial cultures. 2004. *Clin Exp Hypertens.* 26 (4): 323-33.
- Bak, L. K., A. Schousboe, U. Sonnewald y H. S. Waagepetersen. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. 2006. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26 (10): 1285-97.

- Baldanzi, G., N. Filigheddu, S. Cutrupi, F. Catapano, S. Bonisconi, A. Fubini, D. Malan, G. Baj, R. Granata, F. Broglio, M. Papotti, N. Surico, F. Bussolino, J. Isgaard, R. Deghenghi, F. Sinigaglia, M. Prat, G. Muccioli, E. Ghigo y A. Graziani. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. 2002. *J Cell Biol.* 159 (6): 1029-37.
- Bale, T. L., T. Z. Baram, A. S. Brown, J. M. Goldstein, T. R. Insel, M. M. McCarthy, C. B. Nemeroff, T. M. Reyes, R. B. Simerly, E. S. Susser y E. J. Nestler. Early life programming and neurodevelopmental disorders. 2010. *Biol Psychiatry.* 68 (4): 314-19.
- Balthasar, N., R. Coppari, J. McMinn, S. M. Liu, C. E. Lee, V. Tang, C. D. Kenny, R. A. McGovern, S. C. Chua, J. K. Elmquist y B. B. Lowell. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. 2004. *Neuron.* 42 (6): 983-91.
- Banks, W. A., C. R. DiPalma y C. L. Farrell. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. 1999. *Peptides.* 20 (11): 1341-45.
- Banks, W. A., M. Tschöp, S. M. Robinson y M. L. Heiman. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. 2002. *J Pharmacol Exp Ther.* 302 (2): 822-27.
- Banks, W. A. The many lives of leptin. 2004. *Peptides.* 25 (3): 331-38.
- Banks, W. A., A. B. Coon, S. M. Robinson, A. Moinuddin, J. M. Shultz, R. Nakaoke y J. E. Morley. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. 2004. *Diabetes.* 53 (5): 1253-60.
- Banks, W. A. The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. 2006. *Physiol Behav.* 89 (4): 472-76.
- Banks, W. A., S. A. Farr y J. E. Morley. The effects of high fat diets on the blood-brain barrier transport of leptin: failure or adaptation? 2006. *Physiol Behav.* 88 (3): 244-48.
- Barazzoni, R., A. Bosutti, M. Stebel, M. R. Cattin, E. Roder, L. Visintin, L. Cattin, G. Biolo, M. Zanetti y G. Guarnieri. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. 2005. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288 (1): E228-E35.
- Barkan, A. L., E. V. Dimaraki, S. K. Jessup, K. V. Symons, M. Ermolenko y C. A. Jaffe. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. 2003. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (5): 2180-84.
- Barker, D. J., C. Osmond, S. J. Simmonds y G. A. Wield. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. 1993. *BMJ.* 306 (6875): 422-26.
- Barker, D. J. In utero programming of chronic disease. 1998. *Clin Sci (Lond).* 95 (2): 115-28.
- Barr, V. A., K. Lane y S. I. Taylor. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. 1999. *J Biol Chem.* 274 (30): 21416-24.
- Baskin, D. G., J. F. Breininger y M. W. Schwartz. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. 1999. *Diabetes.* 48 (4): 828-33.

- Bayol, S. A., B. H. Simbi y N. C. Stickland. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. 2005. *J Physiol.* 567 (Pt 3): 951-61.
- Beall, M. H., M. E. Haddad, D. Gayle, M. Desai y M. G. Ross. Adult obesity as a consequence of in utero programming. 2004. *Clin Obstet Gynecol.* 47 (4): 957-66; discussion 80-1.
- Beck, B. Neuropeptides and obesity. 2000. *Nutrition.* 16 (10): 916-23.
- Bedendi, I., G. Alloatti, A. Marcantoni, D. Malan, F. Catapano, C. Ghé, R. Deghenghi, E. Ghigo y G. Muccioli. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. 2003. *Eur J Pharmacol.* 476 (1-2): 87-95.
- Bellone, S., A. Rapa, D. Vivenza, N. Castellino, A. Petri, J. Bellone, E. Me, F. Broglio, F. Prodam, E. Ghigo y G. Bona. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. 2002. *J Endocrinol Invest.* 25 (5): RC13-RC15.
- Benomar, Y., S. Wetzler, C. Larue-Achagiotis, J. Djiane, D. Tomé y M. Taouis. In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. 2005. *Mol Cell Endocrinol.* 242 (1-2): 59-66.
- Bereiter, D. A. y B. Jeanrenaud. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. 1979. *Brain Res.* 165 (2): 249-60.
- Berg, A. H. y P. E. Scherer. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. 2005. *Circ Res.* 96 (9): 939-49.
- Berger, J. y D. E. Moller. The mechanisms of action of PPARs. 2002. *Annu Rev Med.* 53 409-35.
- Bertagna, X. Proopiomelanocortin-derived peptides. 1994. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 23 (3): 467-85.
- Bewick, G. A., J. V. Gardiner, W. S. Dhillon, A. S. Kent, N. E. White, Z. Webster, M. A. Ghatei y S. R. Bloom. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. 2005. *FASEB J.* 19 (12): 1680-82.
- Bezzi, P. y A. Volterra. A neuron-glia signalling network in the active brain. 2001. *Curr Opin Neurobiol.* 11 (3): 387-94.
- Bingham, N. C., K. K. Anderson, A. L. Reuter, N. R. Stallings y K. L. Parker. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. 2008. *Endocrinology.* 149 (5): 2138-48.
- Bjørbaek, C., J. K. Elmquist, J. D. Frantz, S. E. Shoelson y J. S. Flier. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. 1998. *Mol Cell.* 1 (4): 619-25.
- Bjørbaek, C., K. El-Haschimi, J. D. Frantz y J. S. Flier. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. 1999. *J Biol Chem.* 274 (42): 30059-65.
- Bjørbaek, C. y B. B. Kahn. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. 2004. *Recent Prog Horm Res.* 59 305-31.
- Bouret, S. G. y R. B. Simerly. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. 2004. *Endocrinology.* 145 (6): 2621-26.

- Bouret, S. G., S. J. Draper y R. B. Simerly. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. 2004a. *J Neurosci.* 24 (11): 2797-805.
- Bouret, S. G., S. J. Draper y R. B. Simerly. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. 2004b. *Science.* 304 (5667): 108-10.
- Bouret, S. G. Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. 2008. *Endocrinology.* 149 (3): 875-76.
- Bouret, S. G., J. N. Gorski, C. M. Patterson, S. Chen, B. E. Levin y R. B. Simerly. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. 2008. *Cell Metab.* 7 (2): 179-85.
- Bouret, S. G. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. 2010. *Forum Nutr.* 63 84-93.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, E. Wilson, R. W. Mahley y J. M. Taylor. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. 1985. *J Clin Invest.* 76 (4): 1501-13.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Briggs, D. I., P. J. Enriori, M. B. Lemus, M. A. Cowley y Z. B. Andrews. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. 2010. *Endocrinology.* 151 (10): 4745-55.
- Briggs, D. I. y Z. B. Andrews. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. 2011. *Neuroendocrinology.* 93 (1): 48-57.
- Broberger, C., M. Landry, H. Wong, J. N. Walsh y T. Hökfelt. Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. 1997. *Neuroendocrinology.* 66 (6): 393-408.
- Broberger, C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. 2005. *J Intern Med.* 258 (4): 301-27.
- Buckley, A. J., B. Keserü, J. Briody, M. Thompson, S. E. Ozanne y C. H. Thompson. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. 2005. *Metabolism.* 54 (4): 500-07.
- Bulgarelli, I., L. Tamiazzo, E. Bresciani, D. Rapetti, S. Caporali, D. Lattuada, V. Locatelli y A. Torsello. Desacyl-ghrelin and synthetic GH-secretagogues modulate the production of inflammatory cytokines in mouse microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. 2009. *J Neurosci Res.* 87 (12): 2718-27.
- Burgos-Ramos, E., J. A. Chowen, E. Arilla-Ferreiro, S. Canelles, J. Argente y V. Barrios. Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. 2011. *J Neurochem.* 117 (1): 175-85.
- Bushong, E. A., M. E. Martone y M. H. Ellisman. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. 2004. *Int J Dev Neurosci.* 22 (2): 73-86.

- Cameron, N. y E. W. Demerath. Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. 2002. *Am J Phys Anthropol*. Suppl 35 159-84.
- Camiña, J. P. Cell biology of the ghrelin receptor. 2006. *J Neuroendocrinol*. 18 (1): 65-76.
- Cammisotto, P. G. y M. Bendayan. Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. 2007. *Histol Histopathol*. 22 (2): 199-210.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos y P. Burn. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. 1995. *Science*. 269 (5223): 546-49.
- Carling, D. AMP-activated protein kinase: balancing the scales. 2005. *Biochimie*. 87 (1): 87-91.
- Carlini, V. P., M. E. Monzón, M. M. Varas, A. B. Cragolini, H. B. Schiöth, T. N. Scimonelli y S. R. de Barioglio. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. 2002. *Biochem Biophys Res Commun*. 299 (5): 739-43.
- Carlini, V. P., M. M. Varas, A. B. Cragolini, H. B. Schiöth, T. N. Scimonelli y S. R. de Barioglio. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. 2004. *Biochem Biophys Res Commun*. 313, 16 (3): 635-41.
- Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha y R. V. Considine. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. 1996. *Lancet*. 348 (9021): 159-61.
- Caruso, C., D. Durand, H. B. Schiöth, R. Rey, A. Seilicovich y M. Lasaga. Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma in astrocytes. 2007. *Endocrinology*. 148 (10): 4918-26.
- Cassoni, P., M. Papotti, C. Ghè, F. Catapano, A. Sapino, A. Graziani, R. Deghenghi, T. Reissmann, E. Ghigo y G. Muccioli. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. 2001. *J Clin Endocrinol Metab*. 86 (4): 1738-45.
- Cassoni, P., G. Muccioli, T. Marrocco, M. Volante, E. Allia, E. Ghigo, R. Deghenghi y M. Papotti. Cortistatin-14 inhibits cell proliferation of human thyroid carcinoma cell lines of both follicular and parafollicular origin. 2002. *J Endocrinol Invest*. 25 (4): 362-68.
- Cassoni, P., C. Ghè, T. Marrocco, E. Tarabra, E. Allia, F. Catapano, R. Deghenghi, E. Ghigo, M. Papotti y G. Muccioli. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. 2004. *Eur J Endocrinol*. 150 (2): 173-84.
- Castañeda, T. R., J. Tong, R. Datta, M. Culler y M. H. Tschöp. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. 2010. *Front Neuroendocrinol*. 31 (1): 44-60.
- Catalano, P. M., E. D. Tyzbir, S. R. Allen, J. H. McBean y T. L. McAuliffe. Evaluation of fetal growth by estimation of neonatal body composition. 1992. *Obstet Gynecol*. 79 (1): 46-50.

- Catalano, P. M., J. P. Kirwan, S. H. de Mouzon y J. King. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. 2003a. *J Nutr.* 133 (5 Suppl 2): 1674S-83S.
- Catalano, P. M., A. Thomas, L. Huston-Presley y S. B. Amini. Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. 2003b. *Am J Obstet Gynecol.* 189 (6): 1698-704.
- Ceccarelli, B., W. P. Hurlbut y A. Mauro. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. 1973. *J Cell Biol.* 57 (2): 499-524.
- Ceddia, R. B., H. A. Koistinen, J. R. Zierath y G. Sweeney. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. 2002. *FASEB J.* 16 (10): 1163-76.
- Cesca, F., P. Baldelli, F. Valtorta y F. Benfenati. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. 2010. *Prog Neurobiol.* 91 (4): 313-48.
- Chaban, V. V., A. J. Lakhter y P. Micevych. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. 2004. *Endocrinology.* 145 (8): 3788-95.
- Chan, J. L., J. Bullen, J. H. Lee, N. Yiannakouris y C. S. Mantzoros. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. 2004. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (1): 335-43.
- Chan, J. M., E. B. Rimm, G. A. Colditz, M. J. Stampfer y W. C. Willett. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. 1994. *Diabetes Care.* 17 (9): 961-69.
- Chen, G., T. G. Gharib, C.-C. Huang, J. M. G. Taylor, D. E. Misek, S. L. R. Kardia, T. J. Giordano, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer, S. M. Hanash y D. G. Beer. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. 2002. *Mol Cell Proteomics.* 1 (4): 304-13.
- Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, J. Culpepper, K. J. Moore, R. E. Breitbart, G. M. Duyk, R. I. Tepper y J. P. Morgenstern. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. 1996. *Cell.* 84 (3): 491-95.
- Chen, H. Y., M. E. Trumbauer, A. S. Chen, D. T. Weingarth, J. R. Adams, E. G. Frazier, Z. Shen, D. J. Marsh, S. D. Feighner, X.-M. Guan, Z. Ye, R. P. Nargund, R. G. Smith, L. H. T. V. der Ploeg, A. D. Howard, D. J. MacNeil y S. Qian. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. 2004. *Endocrinology.* 145 (6): 2607-12.
- Chen, Y. A. y R. H. Scheller. SNARE-mediated membrane fusion. 2001. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 (2): 98-106.
- Cheung, C. C., D. K. Clifton y R. A. Steiner. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. 1997. *Endocrinology.* 138 (10): 4489-92.
- Cheunsuang, O. y R. Morris. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. 2005. *Glia.* 52 (3): 228-33.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 1987. *Anal Biochem.* 162 (1): 156-59.
- Chowen, J. A., J. Argente, S. Busiguina y L. M. Garcia-Segura. The role of glia in the neuroendocrine hypothalamus: possible implications in hormone secretion. 1996. *Horm Res.* 45 Suppl 1 15-18.

- Chua, S. C., W. K. Chung, X. S. Wu-Peng, Y. Zhang, S. M. Liu, L. Tartaglia y R. L. Leibel. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. 1996. *Science*. 271 (5251): 994-96.
- Chung, H., E. Kim, D. H. Lee, S. Seo, S. Ju, D. Lee, H. Kim y S. Park. Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. 2007. *Endocrinology*. 148 (1): 148-59.
- Clegg, D. J., K. Gotoh, C. Kemp, M. D. Wortman, S. C. Benoit, L. M. Brown, D. D'Alessio, P. Tso, R. J. Seeley y S. C. Woods. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. 2011. *Physiol Behav*. 103 (1): 10-16.
- Clément, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Goumelen, C. Dina, J. Chambaz, J. M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougnères, Y. Lebouc, P. Froguel y B. Guy-Grand. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. 1998. *Nature*. 392 (6674): 398-401.
- Clemmons, D. R. y L. E. Underwood. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. 1991. *Annu Rev Nutr*. 11: 393-412.
- Cohen, L. A. Re: Meta-analysis: dietary fat intake, serum estrogen levels, and the risk of breast cancer. 2000. *J Natl Cancer Inst*. 92 (1): 78.
- Cohen, P., C. Zhao, X. Cai, J. M. Montez, S. C. Rohani, P. Feinstein, P. Mombaerts y J. M. Friedman. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. 2001. *J Clin Invest*. 108 (8): 1113-21.
- Coll, A. P., I. S. Farooqi y S. O'Rahilly. The hormonal control of food intake. 2007. *Cell*. 129 (2): 251-62.
- Cone, R. D., M. A. Cowley, A. A. Butler, W. Fan, D. L. Marks y M. J. Low. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. 2001. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 25 Suppl 5 S63-S67.
- Cone, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. 2005. *Nat Neurosci*. 8 (5): 571-78.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee y T. L. Bauer. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. 1996. *N Engl J Med*. 334 (5): 292-95.
- Cota, D., G. Marsicano, M. Tschöp, Y. Grübler, C. Flachskamm, M. Schubert, D. Auer, A. Yassouridis, C. Thöne-Reineke, S. Ortmann, F. Tomassoni, C. Cervino, E. Nisoli, A. C. E. Linthorst, R. Pasquali, B. Lutz, G. K. Stalla y U. Pagotto. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. 2003. *J Clin Invest*. 112 (3): 423-31.
- Cottrell, E. C., R. L. Cripps, J. S. Duncan, P. Barrett, J. G. Mercer, A. Herwig y S. E. Ozanne. Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. 2009. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296 (3): R631-R39.

- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone y M. J. Low. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. 2001. *Nature*. 411 (6836): 480-84.
- Cowley, M. A. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. 2003. *Eur J Pharmacol*. 480 (1-3): 3-11.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschöp, N. Pronchuk, K. L. Grove, C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, M. L. Heiman, L. M. Garcia-Segura, E. A. Nillni, P. Mendez, M. J. Low, P. Sotonyi, J. M. Friedman, H. Liu, S. Pinto, W. F. Colmers, R. D. Cone y T. L. Horvath. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. 2003. *Neuron*. 37 (4): 649-61.
- Crespo, M. A., L. C. G. Matías, M. G. Lozano, S. F. Paz, M. R. Pérez, E. V. Gago y F. M. Ferrer. [Gastrointestinal hormones in food intake control]. 2009. *Endocrinol Nutr*. 56 (6): 317-30.
- Cripps, R. L., M. S. Martin-Gronert y S. E. Ozanne. Fetal and perinatal programming of appetite. 2005. *Clin Sci (Lond)*. 109 (1): 1-11.
- Crowley, V. E. F., G. S. H. Yeo y S. O'Rahilly. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. 2002. *Nat Rev Drug Discov*. 1 (4): 276-86.
- Crowley, V. E. F. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. 2008. *Ann Clin Biochem*. 45 (Pt 3): 245-55.
- Csiffáry, A., T. J. Görös y M. Palkovits. Neuropeptide Y innervation of ACTH-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabeling study. 1990. *Brain Res*. 506 (2): 215-22.
- Cummings, B. P., A. Bettaieb, J. L. Graham, K. L. Stanhope, R. Dill, G. J. Morton, F. G. Haj y P. J. Havel. Subcutaneous administration of leptin normalizes fasting plasma glucose in obese type 2 diabetic UCD-T2DM rats. 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (35): 14670-75.
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse y D. S. Weigle. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. 2001. *Diabetes*. 50 (8): 1714-19.
- Cusin, I., F. Rohner-Jeanrenaud, A. Stricker-Krongrad y B. Jeanrenaud. The weight-reducing effect of an intracerebroventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats. Reduced sensitivity compared with lean animals. 1996. *Diabetes*. 45 (10): 1446-50.
- Czernik, A. J., D. T. Pang y P. Greengard. Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I. 1987. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84 (21): 7518-22.
- Daneman, R., L. Zhou, A. A. Kebede y B. A. Barres. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. 2010. *Nature*. 468 (7323): 562-66.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa y M. Nakazato. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. 2000. *Endocrinology*. 141 (11): 4255-61.

- Date, Y., M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa y S. Matsukura. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. 2001. *Biochem Biophys Res Commun.* 280 (3): 904-07.
- Date, Y., M. Nakazato, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M. S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada y S. Matsukura. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. 2002. *Diabetes.* 51 (1): 124-29.
- de Souza, J. A., C. Vindis, B. Hansel, A. Nègre-Salvayre, P. Therond, C. V. Serrano, S. Chantepie, R. Salvayre, E. Bruckert, M. J. Chapman y A. Kontush. Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. 2008. *Atherosclerosis.* 197 (1): 84-94.
- Dembinski, A., Z. Warzecha, P. Ceranowicz, R. Tomaszewska, J. Stachura, S. J. Konturek y P. C. Konturek. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. 2003. *J Physiol Pharmacol.* 54 (4): 561-73.
- Devos, R., J. G. Richards, L. A. Campfield, L. A. Tartaglia, Y. Guisez, J. van der Heyden, J. Tavernier, G. Plaetinck y P. Burn. OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (11): 5668-73.
- Diano, S., F. Naftolin y T. L. Horvath. Kainate glutamate receptors (GluR5-7) in the rat arcuate nucleus: relationship to tanycytes, astrocytes, neurons and gonadal steroid receptors. 1998. *J Neuroendocrinol.* 10 (4): 239-47.
- Dieguez, C. y F.F. Casanueva. Ghrelin: a step forward in the understanding of somatotroph cell function and growth regulation. 2000. *Eur J Endocrinol.* 142: 413-417.
- Dixit, V. D., E. M. Schaffer, R. S. Pyle, G. D. Collins, S. K. Sakthivel, R. Palaniappan, J. W. Lillard y D. D. Taub. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. 2004. *J Clin Invest.* 114 (1): 57-66.
- Dixit, V. D., A. T. Weeraratna, H. Yang, D. Bertak, A. Cooper-Jenkins, G. J. Riggins, C. G. Eberhart y D. D. Taub. Ghrelin and the growth hormone secretagogue receptor constitute a novel autocrine pathway in astrocytoma motility. 2006. *J Biol Chem.* 281 (24): 16681-90.
- Donahue, J. E., E. G. Stopa, R. L. Chorsky, J. C. King, H. M. Schipper, S. A. Tobet, J. D. Blaustein y S. Reichlin. Cells containing immunoreactive estrogen receptor-alpha in the human basal forebrain. 2000. *Brain Res.* 856 (1-2): 142-51.
- Druce, M. R., N. M. Neary, C. J. Small, J. Milton, M. Monteiro, M. Patterson, M. A. Ghatei y S. R. Bloom. Subcutaneous administration of ghrelin stimulates energy intake in healthy lean human volunteers. 2006. *Int J Obes (Lond).* 30 (2): 293-96.
- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjørbaek y J. S. Flier. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. 2000. *J Clin Invest.* 105 (12): 1827-32.
- Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper y J. K. Elmquist. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. 1999. *Neuron.* 23 (4): 775-86.

- Elias, G. M. y R. A. Nicoll. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. 2007. *Trends Cell Biol.* 17 (7): 343-52.
- Elmqvist, J. K., R. S. Ahima, E. Maratos-Flier, J. S. Flier y C. B. Saper. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. 1997. *Endocrinology.* 138 (2): 839-42.
- Elmqvist, J. K. CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. 1998. *Lab Anim Sci.* 48 (6): 630-37.
- Elmqvist, J. K., C. Bjørbaek, R. S. Ahima, J. S. Flier y C. B. Saper. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. 1998a. *J Comp Neurol.* 395 (4): 535-47.
- Elmqvist, J. K., E. Maratos-Flier, C. B. Saper y J. S. Flier. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. 1998b. *Nat Neurosci.* 1 (6): 445-50.
- Elmqvist, J. K. y J. S. Flier. Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension. 2004. *Science.* 304 (5667): 63-64.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah y M. A. Cowley. Leptin resistance and obesity. 2006. *Obesity (Silver Spring).* 14 Suppl 5 254S-58S.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, P. Sinnayah, E. E. Jobst, L. Tonelli-Lemos, S. K. Billes, M. M. Glavas, B. E. Grayson, M. Perello, E. A. Nillni, K. L. Grove y M. A. Cowley. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. 2007. *Cell Metab.* 5 (3): 181-94.
- Erickson, J. C., K. E. Clegg y R. D. Palmiter. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. 1996. *Nature.* 381 (6581): 415-21.
- Erskine, M. S. y S. Miller. Ultrastructural effects of estradiol and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol on neurons within the ventromedial nucleus of the hypothalamus. 1995. *Neuroendocrinology.* 61 (6): 669-79.
- Escartin, C., J. Valette, V. Lebon y G. Bonvento. Neuron-astrocyte interactions in the regulation of brain energy metabolism: a focus on NMR spectroscopy. 2006. *J Neurochem.* 99 (2): 393-401.
- Fain, J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. 2006. *Vitam Horm.* 74 443-77.
- Fan, W., B. A. Boston, R. A. Kesterson, V. J. Hruby y R. D. Cone. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. 1997. *Nature.* 385 (6612): 165-68.
- Faouzi, M., R. Leshan, M. Björnholm, T. Hennessey, J. Jones y H. Münzberg. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. 2007. *Endocrinology.* 148 (11): 5414-23.
- Farooqi, I. S., S. A. Jebb, G. Langmack, E. Lawrence, C. H. Cheetham, A. M. Prentice, I. A. Hughes, M. A. McCamish y S. O'Rahilly. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. 1999. *N Engl J Med.* 341 (12): 879-84.
- Farooqi, I. S., G. S. Yeo, J. M. Keogh, S. Aminian, S. A. Jebb, G. Butler, T. Cheetham y S. O'Rahilly. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. 2000. *J Clin Invest.* 106 (2): 271-79.
- Fdez, E. y S. Hilfiker. Vesicle pools and synapsins: new insights into old enigmas. 2006. *Brain Cell Biol.* 35 (2-3): 107-15.

- Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell y J. M. Friedman. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (13): 7001-05.
- Fenton, J. I., S. D. Hursting, S. N. Perkins y N. G. Hord. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. 2006. *Carcinogenesis*. 27 (7): 1507-15.
- Férézou-Viala, J., A.-F. Roy, C. Sérougne, D. Gripois, M. Parquet, V. Bailleux, A. Gertler, B. Delplanque, J. Djiane, M. Riottot y M. Taouis. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. 2007. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293 (3): R1056-R62.
- Fields, R. D. y B. Stevens-Graham. New insights into neuron-glia communication. 2002. *Science*. 298 (5593): 556-62.
- Filigheddu, N., V. F. Gnocchi, M. Coscia, M. Cappelli, P. E. Porporato, R. Taulli, S. Traini, G. Baldanzi, F. Chianale, S. Cutrupi, E. Arnoletti, C. Ghè, A. Fubini, N. Surico, F. Sinigaglia, C. Ponzetto, G. Muccioli, T. Crepaldi y A. Graziani. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. 2007. *Mol Biol Cell*. 18 (3): 986-94.
- Filosa, J. A. y V. M. Blanco. Neurovascular coupling in the mammalian brain. 2007. *Exp Physiol*. 92 (4): 641-46.
- Fisler, J. S., H. Shimizu y G. A. Bray. Brain 3-hydroxybutyrate, glutamate, and GABA in a rat model of dietary obesity. 1989. *Physiol Behav*. 45 (3): 571-77.
- Fisler, J. S., M. Egawa y G. A. Bray. Peripheral 3-hydroxybutyrate and food intake in a model of dietary-fat induced obesity: effect of vagotomy. 1995. *Physiol Behav*. 58 (1): 1-7.
- Flegal, K. M. y B. I. Graubard. Estimates of excess deaths associated with body mass index and other anthropometric variables. 2009. *Am J Clin Nutr*. 89 (4): 1213-19.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, C. L. Ogden y L. R. Curtin. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. 2010. *JAMA*. 303 (3): 235-41.
- Freeman, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. 2010. *Science*. 330 (6005): 774-78.
- Freinkel, N. Gestational diabetes 1979: philosophical and practical aspects of a major public health problem. 1980. *Diabetes Care*. 3 (3): 399-401.
- Friedman, J. M. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. 1998. *Nutr Rev*. 56 (2 Pt 2): s38-46; discussion s54-75.
- Friedman, J. M. y J. L. Halaas. Leptin and the regulation of body weight in mammals. 1998. *Nature*. 395 (6704): 763-70.
- Frühbeck, G., S. A. Jebb y A. M. Prentice. Leptin: physiology and pathophysiology. 1998. *Clin Physiol*. 18 (5): 399-419.
- Frühbeck, G. y J. Gómez-Ambrosi. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. 2001. *Cell Signal*. 13 (11): 827-33.
- Frühbeck, G., J. Gómez-Ambrosi, F. J. Muruzábal y M. A. Burrell. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. 2001. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280 (6): E827-E47.

- Frühbeck, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. 2008. *Methods Mol Biol.* 456: 1-22.
- Furuhata, Y., R. Kagaya, K. Hirabayashi, A. Ikeda, K. T. Chang, M. Nishihara y M. Takahashi. Development of obesity in transgenic rats with low circulating growth hormone levels: involvement of leptin resistance. 2000. *Eur J Endocrinol.* 143 (4): 535-41.
- Gadea, A., S. Schinelli y V. Gallo. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. 2008. *J Neurosci.* 28 (10): 2394-408.
- Gallagher, D., M. Visser, D. Sepúlveda, R. N. Pierson, T. Harris y S. B. Heymsfield. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? 1996. *Am J Epidemiol.* 143 (3): 228-39.
- García-Cáceres, C., E. Fuente-Martín, E. Burgos-Ramos, M. Granado, L. M. Frago, V. Barrios, T. Horvath, J. Argente y J. A. Chowen. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. 2011. *Endocrinology.* 152 (5): 1809-18.
- García-Cáceres C., AM. Lechuga-Sancho, J. Argente, LM. Frago y JA. Chowen. Death of hypothalamic astrocytes in poorly controlled diabetic rats is associated with nuclear translocation of apoptosis inducing factor (AIF). 2008. *J Neuroendocrinol.* 20 (12): 1348-1360.
- García-Segura, L. M., J. A. Chowen y F. Naftolin. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. 1996. *Front Neuroendocrinol.* 17 (2): 180-211.
- García-Segura, L. M., F. Naftolin, J. B. Hutchison, I. Azcoitia y J. A. Chowen. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. 1999. *J Neurobiol.* 40 (4): 574-84.
- García-Segura, L. M. y M. M. McCarthy. Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. 2004. *Endocrinology.* 145 (3): 1082-86.
- Garris, D. R. Morphometric analysis of obesity (ob/ob)- and diabetes (db/db)-associated hypothalamic neuronal degeneration in C57BL/KsJ mice. 1989. *Brain Res.* 501 (1): 162-70.
- Gaskin, F. S., S. A. Farr, W. A. Banks, V. B. Kumar y J. E. Morley. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. 2003. *Peptides.* 24 (6): 913-18.
- Gaytan, F., M. L. Barreiro, L. K. Chopin, A. C. Herington, C. Morales, L. Pinilla, F. F. Casanueva, E. Aguilar, C. Diéguez y M. Tena-Sempere. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. 2003. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (2): 879-87.
- Genoud, C., C. Quairiaux, P. Steiner, H. Hirling, E. Welker y G. W. Knott. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. 2006. *PLoS Biol.* 4 (11): e343.
- Geppert, M., Y. Goda, R. E. Hammer, C. Li, T. W. Rosahl, C. F. Stevens y T. C. Südhof. Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. 1994. *Cell.* 79 (4): 717-27.
- Ghamari-Langroudi, M., D. Srisai y R. D. Cone. Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin. 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (1): 355-60.

- Ghè, C., P. Cassoni, F. Catapano, T. Marrocco, R. Deghenghi, E. Ghigo, G. Muccioli y M. Papotti. The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. 2002. *Endocrinology*. 143 (2): 484-91.
- Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim y R. C. Skoda. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (13): 6231-35.
- Giraudou, S. Q., C. J. Billington y A. S. Levine. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. 1998. *Brain Res*. 809 (2): 302-06.
- Glaum, S. R., M. Hara, V. P. Bindokas, C. C. Lee, K. S. Polonsky, G. I. Bell y R. J. Miller. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. 1996. *Mol Pharmacol*. 50 (2): 230-35.
- Glavas, M. M., M. A. Kirigiti, X. Q. Xiao, P. J. Enriori, S. K. Fisher, A. E. Evans, B. E. Grayson, M. A. Cowley, M. S. Smith y K. L. Grove. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. 2010. *Endocrinology*. 151 (4): 1598-610.
- Glowinski J. y Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. 1966. *J Neurochem*. 13 (8):655-682.
- Granado, M., C. García-Cáceres, L. M. Frago, J. Argente y J. A. Chowen. The positive effects of growth hormone-releasing peptide-6 on weight gain and fat mass accrual depend on the insulin/glucose status. 2010. *Endocrinology*. 151 (5): 2008-18.
- Granado, M., C. García-Cáceres, E. Fuente-Martín, F. Díaz, V. Mela, M.-P. Viveros, J. Argente y J. A. Chowen. Effects of Acute Changes in Neonatal Leptin Levels on Food Intake and Long-Term Metabolic Profiles in Rats. 2011. *Endocrinology*.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas y H. S. Sul. Understanding adipocyte differentiation. 1998. *Physiol Rev*. 78 (3): 783-809.
- Grove, K. L. y M. S. Smith. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. 2003. *Physiol Behav*. 79 (1): 47-63.
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantil. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantil. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2009. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM N° 2007/25.
- Gueorguiev, M., M. L. Góth y M. Korbonits. Leptin and puberty: a review. 2001. *Pituitary*. 4 (1-2): 79-86.
- Gutierrez, J. A., P. J. Solenberg, D. R. Perkins, J. A. Willency, M. D. Knierman, Z. Jin, D. R. Witcher, S. Luo, J. E. Onyia y J. E. Hale. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (17): 6320-25.
- Haddad, J. J., N. E. Saadé y B. Safieh-Garabedian. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. 2002. *J Neuroimmunol*. 133 (1-2): 1-19.

- Håkansson, M. L., A. L. Hulting y B. Meister. Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-relationship with NPY neurones. 1996. *Neuroreport*. 7 (18): 3087-92.
- Håkansson, M. L., H. Brown, N. Ghilardi, R. C. Skoda y B. Meister. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. 1998. *J Neurosci*. 18 (1): 559-72.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley y J. M. Friedman. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. 1995. *Science*. 269 (5223): 543-46.
- Halassa, M. M., T. Fellin y P. G. Haydon. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. 2007. *Trends Mol Med*. 13 (2): 54-63.
- Halassa, M. M. y P. G. Haydon. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. 2010. *Annu Rev Physiol*. 72 335-55.
- Halem, H. A., J. E. Taylor, J. Z. Dong, Y. Shen, R. Datta, A. Abizaid, S. Diano, T. L. Horvath y M. D. Culler. A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. 2005. *Neuroendocrinology*. 81 (5): 339-49.
- Hales, C. N. y D. J. Barker. The thrifty phenotype hypothesis. 2001. *Br Med Bull*. 60: 5-20.
- Hammami, M., J. C. Walters, E. M. Hockman y W. W. Koo. Disproportionate alterations in body composition of large for gestational age neonates. 2001. *J Pediatr*. 138 (6): 817-21.
- Han, J., J. Xu, P. N. Epstein y Y. Q. Liu. Long-term effect of maternal obesity on pancreatic beta cells of offspring: reduced beta cell adaptation to high glucose and high-fat diet challenges in adult female mouse offspring. 2005. *Diabetologia*. 48 (9): 1810-18.
- Han, J., J. Xu, Y. S. Long, P. N. Epstein y Y. Q. Liu. Rat maternal diabetes impairs pancreatic beta-cell function in the offspring. 2007. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293 (1): E228-E36.
- Han, W., J.-S. Rhee, A. Maximov, Y. Lao, T. Mashimo, C. Rosenmund y T. C. Südhof. N-glycosylation is essential for vesicular targeting of synaptotagmin 1. 2004. *Neuron*. 41 (1): 85-99.
- Hanada, R., H. Teranishi, J. T. Pearson, M. Kurokawa, H. Hosoda, N. Fukushima, Y. Fukue, R. Serino, H. Fujihara, Y. Ueta, M. Ikawa, M. Okabe, N. Murakami, M. Shirai, H. Yoshimatsu, K. Kangawa y M. Kojima. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. 2004. *Nat Med*. 10 (10): 1067-73.
- Hansen, T. K., R. Dall, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, J. S. Christiansen y J. O. L. Jørgensen. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. 2002. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 56 (2): 203-06.
- Hansson, C., D. Haage, M. Taube, E. Egecioglu, N. Salomé y S. L. Dickson. Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. 2011. *Neuroscience*. 180 201-11.
- Harvey, N. C., J. R. Poole, M. K. Javaid, E. M. Dennison, S. Robinson, H. M. Inskip, K. M. Godfrey, C. Cooper, A. A. Sayer y S. W. S. S. Group. Parental determinants of neonatal body composition. 2007. *J Clin Endocrinol Metab*. 92 (2): 523-26.
- Hastings, M., J. S. O'Neill y E. S. Maywood. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. 2007. *J Endocrinol*. 195 (2): 187-98.

- Haydon, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. 2001. *Nat Rev Neurosci.* 2 (3): 185-93.
- Haydon, P. G. y G. Carmignoto. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. 2006. *Physiol Rev.* 86 (3): 1009-31.
- Heaney, M. L. y D. W. Golde. Soluble hormone receptors. 1993. *Blood.* 82 (7): 1945-48.
- Hegyí, K., K. Fülöp, K. Kovács, S. Tóth y A. Falus. Leptin-induced signal transduction pathways. 2004. *Cell Biol Int.* 28 (3): 159-69.
- Heijmans, B. T., E. W. Tobi, A. D. Stein, H. Putter, G. J. Blauw, E. S. Susser, P. E. Slagboom y L. H. Lumey. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (44): 17046-49.
- Henneberger, C., T. Papouin, S. H. R. Oliet y D. A. Rusakov. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. 2010. *Nature.* 463 (7278): 232-36.
- Henneman, E., G. S. Somjen, G. y D. O. Carpenter. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. 1965. *J Neurophysiol.* 28 560-80.
- Henry, B. A., J. W. Goding, W. S. Alexander, A. J. Tilbrook, B. J. Canny, F. Dunshea, A. Rao, A. Mansell y I. J. Clarke. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. 1999. *Endocrinology.* 140 (3): 1175-82.
- Henry, B. A. y I. J. Clarke. Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. 2008. *J Neuroendocrinol.* 20 (6): 842-49.
- Herrmann, J. E., T. Imura, B. Song, J. Qi, Y. Ao, T. K. Nguyen, R. A. Korsak, K. Takeda, S. Akira y M. V. Sofroniew. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. 2008. *J Neurosci.* 28 (28): 7231-43.
- Heuser, J. E. y T. S. Reese. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. 1973. *J Cell Biol.* 57 (2): 315-44.
- Heymsfield, S. B., A. S. Greenberg, K. Fujioka, R. M. Dixon, R. Kushner, T. Hunt, J. A. Lubina, J. Patane, B. Self, P. Hunt y M. McCamish. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. 1999. *JAMA.* 282 (16): 1568-75.
- Hickey, M. S., J. A. Houmard, R. V. Considine, G. L. Tyndall, J. B. Midgette, K. E. Gavigan, M. L. Weidner, M. R. McCammon, R. G. Israel y J. F. Caro. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. 1997. *Am J Physiol.* 272 (4 Pt 1): E562-E66.
- Hidalgo, J., S. Florit, M. Giralt, B. Ferrer, C. Keller y H. Pilegaard. Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat. 2010. *Brain Behav Immun.* 24 (1): 119-26.
- Hileman, S. M., D. D. Pierroz, H. Masuzaki, C. Bjørbaek, K. El-Haschimi, W. A. Banks y J. S. Flier. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. 2002. *Endocrinology.* 143 (3): 775-83.
- Hill, J. W., C. F. Elias, M. Fukuda, K. W. Williams, E. D. Berglund, W. L. Holland, Y.-R. Cho, J.-C. Chuang, Y. Xu, M. Choi, D. Lauzon, C. E. Lee, R. Coppari, J. A. Richardson, J. M. Zigman, S. Chua, P. E. Scherer, B. B. Lowell, J. C. Brüning y J. K. Elmquist. Direct insulin and leptin

- action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. 2010. *Cell Metab.* 11 (4): 286-97.
- Hillebrand, J. J. G. y N. Geary. Do leptin and insulin signal adiposity? 2010. *Forum Nutr.* 63 111-22.
- Hirokawa, N., K. Sobue, K. Kanda, A. Harada y H. Yorifuji. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. 1989. *J Cell Biol.* 108 (1): 111-26.
- Hoffler, U., K. Hobbie, R. Wilson, R. Bai, A. Rahman, D. Malarkey, G. Travlos y B. I. Ghanayem. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. 2009a. *Endocrine.* 36 (2): 311-25.
- Holemans, K., L. Aerts y F. A. V. Assche. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. 2003. *J Soc Gynecol Investig.* 10 (7): 392-99.
- Holemans, K., S. Caluwaerts, L. Poston y F. A. V. Assche. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. 2004. *Am J Obstet Gynecol.* 190 (3): 858-65.
- Horvath, T. L., T. Castañeda, M. Tang-Christensen, U. Pagotto y M. H. Tschöp. Ghrelin as a potential anti-obesity target. 2003. *Curr Pharm Des.* 9 (17): 1383-95.
- Horvath, T. L. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. 2005. *Nat Neurosci.* 8 (5): 561-65.
- Horvath, T. L. y X.-B. Gao. Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. 2005. *Cell Metab.* 1 (4): 279-86.
- Horvath, T. L., B. Sarman, C. García-Cáceres, P.J. P. Enriori, Sotonyi, M. Shanabrough, E. Borok, J. Argente, JA. Chowen, D. Perez-Tilve, PT. Pfluger, HS. Brönneke, BE. Levin, S. Diano, MA. Cowley y MH. Tschöp. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. 2010. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (33): 14875-80.
- Hosaka, M. y T. C. Südhof. Synapsins I and II are ATP-binding proteins with differential Ca<sup>2+</sup> regulation. 1998. *J Biol Chem.* 273 (3): 1425-29.
- Höslí, L. y E. Höslí. Receptors for dopamine and serotonin on astrocytes of cultured rat central nervous system. 1987. *J Physiol (Paris).* 82 (4): 191-95.
- Hosoda, H., M. Kojima, H. Matsuo y K. Kangawa. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. 2000. *Biochem Biophys Res Commun.* 279 (3): 909-13.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill y B. M. Spiegelman. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. 1993. *Science.* 259 (5091): 87-91.
- Hotamisligil, G. S. y B. M. Spiegelman. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. 1994. *Diabetes.* 43 (11): 1271-78.
- Houseknecht, K. L., C. S. Mantzoros, R. Kuliawat, E. Hadro, J. S. Flier y B. B. Kahn. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. 1996. *Diabetes.* 45 (11): 1638-43.
- Houseknecht, K. L. y C. P. Portocarrero. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. 1998. *Domest Anim Endocrinol.* 15 (6): 457-75.
- Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri y M. E. Spurlock. The biology of leptin: a review. 1998. *J Anim Sci.* 76 (5): 1405-20.

- Howard, A. D., S. D. Feighner, D. F. Cully, J. P. Arena, P. A. Liberatore, C. I. Rosenblum, M. Hamelin, D. L. Hreniuk, O. C. Palyha, J. Anderson, P. S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K. K. Liu, K. K. McKee, S. S. Pong, L. Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D. J. Sirinathsinghji, D. C. Dean, D. G. Melillo, A. A. Patchett, R. Nargund, P. R. Griffin, J. A. DeMartino, S. K. Gupta, J. M. Schaeffer, R. G. Smith y L. H. V. der Ploeg. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. 1996. *Science*. 273 (5277): 974-77.
- Hsueh, H., Y. He, A. J. Kastin, H. Tu, E. N. Markadakis, R. C. Rogers, P. B. Fossier y W. Pan. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. 2009. *Brain*. 132 (Pt 4): 889-902.
- Hummel, K. P., M. M. Dickie y D. L. Coleman. Diabetes, a new mutation in the mouse. 1966. *Science*. 153 (740): 1127-28.
- Iannone, F. y G. Lapadula. Obesity and inflammation-targets for OA therapy. 2010. *Curr Drug Targets*. 11 (5): 586-98.
- Ibrahim, N., M. A. Bosch, J. L. Smart, J. Qiu, M. Rubinstein, O. K. Rønnekleiv, M. J. Low y M. J. Kelly. Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. 2003. *Endocrinology*. 144 (4): 1331-40.
- Ikemoto, S., M. Takahashi, N. Tsunoda, K. Maruyama, H. Itakura y O. Ezaki. High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. 1996. *Metabolism*. 45 (12): 1539-46.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie y G. D. Snell. Obese, a new mutation in the house mouse. 1950. *J Hered*. 41 (12): 317-18.
- Inhoff, T., B. Wiedenmann, B. F. Klapp, H. Mönnikes y P. Kobelt. Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? 2009. *Peptides*. 30 (5): 991-94.
- Inui, A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. 2001. *Nat Rev Neurosci*. 2 (8): 551-60.
- Ip, N. Y., J. McClain, N. X. Barrezueta, T. H. Aldrich, L. Pan, Y. Li, S. J. Wiegand, B. Friedman, S. Davis y G. D. Yancopoulos. The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. 1993. *Neuron*. 10 (1): 89-102.
- Iqbal, J., S. Pompolo, T. Murakami, E. Grouzmann, T. Sakurai, B. Meister y I. J. Clarke. Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. 2001. *Brain Res*. 920 (1-2): 55-64.
- Iwakura, H., T. Akamizu, H. Ariyasu, T. Irako, K. Hosoda, K. Nakao y K. Kangawa. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. 2007. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 293 (3): E819-E25.
- Jahn, R. y T. C. Südhof. Synaptic vesicles and exocytosis. 1994. *Annu Rev Neurosci*. 17: 219-46.
- Jaworski, J. N., A. Vicentic, R. G. Hunter, H. L. Kimmel y M. J. Kuhar. CART peptides are modulators of mesolimbic dopamine and psychostimulants. 2003. *Life Sci*. 73 (6): 741-47.
- Jovanovic, Z. y G. S. H. Yeo. Central leptin signalling: beyond the arcuate nucleus. 2010. *Auton Neurosci*. 156 (1-2): 8-14.

- Julien, C., C. Tremblay, A. Phivilay, L. Berthiaume, V. Emond, P. Julien y F. Calon. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. 2010. *Neurobiol Aging*. 31 (9): 1516-31.
- Jursky, F. y N. Nelson. Developmental expression of GABA transporters GAT1 and GAT4 suggests involvement in brain maturation. 1996. *J Neurochem*. 67 (2): 857-67.
- Kagotani, Y., T. Hashimoto, Y. Tsuruo, H. Kawano, S. Daikoku y K. Chihara. Development of the neuronal system containing neuropeptide Y in the rat hypothalamus. 1989. *Int J Dev Neurosci*. 7 (4): 359-74.
- Kalra, S. P. Disruption in the leptin-NPY link underlies the pandemic of diabetes and metabolic syndrome: new therapeutic approaches. 2008. *Nutrition*. 24 (9): 820-26.
- Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara y I. Wakabayashi. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. 2000. *Endocrinology*. 141 (12): 4797-800.
- Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara y I. Wakabayashi. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. 2001. *Diabetes*. 50 (11): 2438-43.
- Kao, H. T., B. Porton, A. J. Czernik, J. Feng, G. Yiu, M. Häring, F. Benfenati y P. Greengard. A third member of the synapsin gene family. 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (8): 4667-72.
- Kao, H. T., B. Porton, S. Hilfiker, G. Stefani, V. A. Pieribone, R. DeSalle y P. Greengard. Molecular evolution of the synapsin gene family. 1999. *J Exp Zool*. 285 (4): 360-77.
- Karalis, K. P., P. Giannogonas, E. Kodela, Y. Koutmani, M. Zoumakis y T. Teli. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. 2009. *FEBS J*. 276 (20): 5747-54.
- Karsenty, G. Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. 2001. *Recent Prog Horm Res*. 56 401-15.
- Kasimay, O., S. O. Iseri, A. a. Barlas, D. Bangir, C. Yegen, S. Arbak y B. C. Yegen. Ghrelin ameliorates pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats. 2006. *Hepato Res*. 36 (1): 11-19.
- Kaszubska, W., H. D. Falls, V. G. Schaefer, D. Haasch, L. Frost, P. Hessler, P. E. Kroeger, D. W. White, M. R. Jirousek y J. M. Trevillyan. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. 2002. *Mol Cell Endocrinol*. 195 (1-2): 109-18.
- Katsuki, A., Y. Sumida, E. C. Gabazza, S. Murashima, T. Tanaka, M. Furuta, R. Araki-Sasaki, Y. Hori, K. Nakatani, Y. Yano y Y. Adachi. Plasma levels of agouti-related protein are increased in obese men. 2001. *J Clin Endocrinol Metab*. 86 (5): 1921-24.
- Katz, R. I., J. S. Goodwin y I. J. Kopin. Disposition of neurotransmitters in experimental mouse glioma. 1969. *Life Sci*. 8 (11): 561-69.
- Kaung, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. 1994. *Dev Dyn*. 200 (2): 163-75.

- Kedzia, A., M. Obara-Moszyńska y M. Chmielnicka-Kopaczyk. Assessment of ghrelin, GHS-R, GH, and neurohormones in human fetal pituitary glands and central nervous system: an immunohistochemical study. 2009. *Folia Histochem Cytobiol.* 47 (3): 505-10.
- Keller, P., C. Keller, A. Steensberg, L. E. Robinson y B. K. Pedersen. Leptin gene expression and systemic levels in healthy men: effect of exercise, carbohydrate, interleukin-6, and epinephrine. 2005. *J Appl Physiol.* 98 (5): 1805-12.
- Kelly, A. S., R. J. Wetzsteon, D. R. Kaiser, J. Steinberger, A. J. Bank y D. R. Dengel. Inflammation, insulin, and endothelial function in overweight children and adolescents: the role of exercise. 2004. *J Pediatr.* 145 (6): 731-36.
- Kennedy, A., T. W. Gettys, P. Watson, P. Wallace, E. Ganaway, Q. Pan y W. T. Garvey. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. 1997. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (4): 1293-300.
- Kershaw, E. E. y J. S. Flier. Adipose tissue as an endocrine organ. 2004. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (6): 2548-56.
- Keung, W., A. Palaniyappan y G. D. Lopaschuk. Chronic Central Leptin Decreases Food Intake and Improves Glucose Tolerance in Diet-Induced Obese Mice Independent of Hypothalamic Malonyl CoA Levels and Skeletal Muscle Insulin Sensitivity. 2011. *Endocrinology.*
- Khachaturian, H., N. E. Alessi, M. E. Lewis, N. Munfakh, M. D. Fitzsimmons y S. J. Watson. Development of hypothalamic opioid neurons: a combined immunocytochemical and [3H]thymidine autoradiographic study. 1985. *Neuropeptides.* 5 (4-6): 477-80.
- Kieffer, T. J., R. S. Heller y J. F. Habener. Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. 1996. *Biochem Biophys Res Commun.* 224 (2): 522-27.
- Kim, F., M. Pham, E. Maloney, N. O. Rizzo, G. J. Morton, B. E. Wisse, E. A. Kirk, A. Chait y M. W. Schwartz. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. 2008. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28 (11): 1982-88.
- Kim, M. S., C. Y. Yoon, P. G. Jang, Y. J. Park, C. S. Shin, H. S. Park, J. W. Ryu, Y. K. Pak, J. Y. Park, K. U. Lee, S. Y. Kim, H. K. Lee, Y. B. Kim y K. S. Park. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. 2004. *Mol Endocrinol.* 18 (9): 2291-301.
- Kim, S. W., S. J. Her, S. J. Park, D. Kim, K. S. Park, H. K. Lee, B. H. Han, M. S. Kim, C. S. Shin y S. Y. Kim. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. 2005. *Bone.* 37 (3): 359-69.
- Kirk, S. L., A.-M. Samuelsson, M. Argenton, H. Dhonye, T. Kalamatianos, L. Poston, P. D. Taylor y C. W. Coen. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. 2009. *PLoS One.* 4 (6): e5870.
- Kishi, T., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, K. G. Mountjoy, C. B. Saper y J. K. Elmquist. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. 2003. *J Comp Neurol.* 457 (3): 213-35.

- Kline, A. D., G. W. Becker, L. M. Churgay, B. E. Landen, D. K. Martin, W. L. Muth, R. Rathnachalam, J. M. Richardson, B. Schoner, M. Ulmer y J. E. Hale. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. 1997. *FEBS Lett.* 407 (2): 239-42.
- Klok, M. D., S. Jakobsdottir y M. L. Drent. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. 2007. *Obes Rev.* 8 (1): 21-34.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo y K. Kangawa. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. 1999. *Nature.* 402 (6762): 656-60.
- Kojima, M. y K. Kangawa. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. 2002. *Curr Opin Pharmacol.* 2 (6): 665-68.
- Korbonits, M., S. A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E. F. Adams, D. G. Lowe, K. Kangawa y A. B. Grossman. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. 2001. *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2): 881-87.
- Korbonits, M., A. P. Goldstone, M. Gueorguiev y A. B. Grossman. Ghrelin a hormone with multiple functions. 2004. *Front Neuroendocrinol.* 25 (1): 27-68.
- Korner, J., E. Savontaus, S. C. Chua, R. L. Leibel y S. L. Wardlaw. Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. 2001. *J Neuroendocrinol.* 13 (11): 959-66.
- Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert, N. C. Ling, E. B. de Souza y M. J. Kuhar. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. 1997. *J Neuroendocrinol.* 9 (11): 823-33.
- Kozak, L. P., S. Newman, P.-M. Chao, T. Mendoza y R. A. Koza. The early nutritional environment of mice determines the capacity for adipose tissue expansion by modulating genes of caveolae structure. 2010. *PLoS One.* 5 (6): e11015.
- Kruijver, F. P. M., R. Balesar, A. M. Espila, U. A. Unmehopa y D. F. Swaab. Estrogen receptor-alpha distribution in the human hypothalamus in relation to sex and endocrine status. 2002. *J Comp Neurol.* 454 (2): 115-39.
- Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama, K. Eto, Y. Tsubamoto, A. Okuno, K. Murakami, H. Sekihara, G. Hasegawa, M. Naito, Y. Toyoshima, S. Tanaka, K. Shiota, T. Kitamura, T. Fujita, O. Ezaki, S. Aizawa y T. Kadowaki. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. 1999. *Mol Cell.* 4 (4): 597-609.
- Kumano, S., H. Matsumoto, Y. Takatsu, J. Noguchi, C. Kitada y T. Ohtaki. Changes in hypothalamic expression levels of galanin-like peptide in rat and mouse models support that it is a leptin-target peptide. 2003. *Endocrinology.* 144 (6): 2634-43.
- Ladyman, S. R., R. A. Augustine y D. R. Grattan. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. 2010. *J Neuroendocrinol.* 22 (7): 805-17.
- Laflamme, N. y S. Rivest. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. 2001. *FASEB J.* 15 (1): 155-63.

- Lafrance, V., W. Inoue, B. Kan y G. N. Luheshi. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. 2010. *Brain Behav Immun.* 24 (3): 358-65.
- Lall S, Tung LY, Ohlsson C, Jansson JO, Dickson SL. Growth hormone(GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. 2001. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:132-138.
- Lall, S., N. Balthasar, D. Carmignac, C. Magoulas, A. Sesay, P. Houston, K. Mathers y I. Robinson. Physiological studies of transgenic mice overexpressing growth hormone (GH) secretagogue receptor 1A in GH-releasing hormone neurons. 2004. *Endocrinology.* 145 (4): 1602-11.
- Lam, T. K. T., R. Gutierrez-Juarez, A. Pocai y L. Rossetti. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. 2005. *Science.* 309 (5736): 943-47.
- Lambert, K. G., K. M. Gerecke, P. S. Quadros, E. Doudera, A. M. Jasnow y C. H. Kinsley. Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. 2000. *Stress.* 3 (4): 275-84.
- Lampl, M. y P. Jeanty. Exposure to maternal diabetes is associated with altered fetal growth patterns: A hypothesis regarding metabolic allocation to growth under hyperglycemic-hypoxemic conditions. 2004. *Am J Hum Biol.* 16 (3): 237-63.
- Langhans, W., G. Egli y E. Scharrer. Regulation of food intake by hepatic oxidative metabolism. 1985. *Brain Res Bull.* 15 (4): 425-28.
- Langub, M. C. y R. E. Watson. Estrogen receptive neurons in the preoptic area of the rat are postsynaptic targets of a sexually dimorphic enkephalinergic fiber plexus. 1992. *Brain Res.* 573 (1): 61-69.
- Lau, C. G. y R. S. Zukin. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. 2007. *Nat Rev Neurosci.* 8 (6): 413-26.
- Lawrence, C. B., A. C. Snape, F. M. H. Baudoin y S. M. Luckman. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. 2002. *Endocrinology.* 143 (1): 155-62.
- Leabu, M. Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. 2006. *J Cell Mol Med.* 10 (2): 423-27.
- Lechuga-Sancho AM., AI. Arroba, LM. Frago, C. Paneda, C. García-Cáceres, A. Delgado Rubín de Celix, J. Argente y JA. Chowen. Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. 2006. *Endocrinology.* 147 (11): 5314-24.
- Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee y J. M. Friedman. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. 1996. *Nature.* 379 (6566): 632-35.
- Leininger, G. M., Y.-H. Jo, R. L. Leshan, G. W. Louis, H. Yang, J. G. Barrera, H. Wilson, D. M. Opland, M. A. Faouzi, Y. Gong, J. C. Jones, C. J. Rhodes, S. Chua, S. Diano, T. L. Horvath, R. J. Seeley, J. B. Becker, H. Münzberg y M. G. Myers. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. 2009. *Cell Metab.* 10 (2): 89-98.
- Leon, L. R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. 2002. *J Appl Physiol.* 92 (6): 2648-55.

- Levin, B. E. y E. Govek. Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. 1998. *Am J Physiol.* 275 (4 Pt 2): R1374-R79.
- Levin, B. E. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. 2006. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361 (1471): 1107-21.
- Li, Y., C. J. Hough, S. W. Suh, J. M. Sarvey y C. J. Frederickson. Rapid translocation of Zn(2+) from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. 2001. *J Neurophysiol.* 86 (5): 2597-604.
- Lillycrop, K. A., E. S. Phillips, C. Torrens, M. A. Hanson, A. A. Jackson y G. C. Burdge. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. 2008. *Br J Nutr.* 100 (2): 278-82.
- Linial, M. SNARE proteins why so many, why so few? 1997. *J Neurochem.* 69 (5): 1781-92.
- Livak K. J. y T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. 2001. *J Clin Invest.* 108: 1079-1085.
- Loffreda, S., S. Q. Yang, H. Z. Lin, C. L. Karp, M. L. Brengman, D. J. Wang, A. S. Klein, G. B. Bulkeley, C. Bao, P. W. Noble, M. D. Lane y A. M. Diehl. Leptin regulates proinflammatory immune responses. 1998. *FASEB J.* 12 (1): 57-65.
- Lopes-Cardozo, M., O. M. Larsson y A. Schousboe. Acetoacetate and glucose as lipid precursors and energy substrates in primary cultures of astrocytes and neurons from mouse cerebral cortex. 1986. *J Neurochem.* 46 (3): 773-78.
- Lorenz, B., L. M. Garcia-Segura y L. L. DonCarlos. Cellular phenotype of androgen receptor-immunoreactive nuclei in the developing and adult rat brain. 2005. *J Comp Neurol.* 492 (4): 456-68.
- Lucas, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. 1994. *Arch Dis Child.* 71 (4): 288-90.
- Lund, J. S. y R. D. Lund. The effects of varying periods of visual deprivation on synaptogenesis in the superior colliculus of the rat. 1972. *Brain Res.* 42 (1): 21-32.
- Luo, N., G. Marcelin, S. M. Liu, G. Schwartz y S. Chua. Neuropeptide Y and agouti-related peptide mediate complementary functions of hyperphagia and reduced energy expenditure in leptin receptor deficiency. 2011. *Endocrinology.* 152 (3): 883-89.
- Luquet, S., F. A. Perez, T. S. Hnasko y R. D. Palmiter. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. 2005. *Science.* 310 (5748): 683-85.
- Lushnikova, I., G. Skibo, D. Muller y I. Nikonenko. Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. 2009. *Hippocampus.* 19 (8): 753-62.
- Maccarinelli, G., V. Sibilia, A. Torsello, F. Raimondo, M. Pitto, A. Giustina, C. Netti y D. Cocchi. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. 2005. *J Endocrinol.* 184 (1): 249-56.
- Madej, T., M. S. Boguski y S. H. Bryant. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. 1995. *FEBS Lett.* 373 (1): 13-18.

- Madiehe, A. M., A. O. Schaffhauser, D. H. Braymer, G. A. Bray y D. A. York. Differential expression of leptin receptor in high- and low-fat-fed Osborne-Mendel and S5B/Pl rats. 2000. *Obes Res.* 8 (6): 467-74.
- Magistretti, P. J. y L. Pellerin. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. 1999. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354 (1387): 1155-63.
- Maimone, D., C. Cioni, S. Rosa, G. Macchia, F. Aloisi y P. Annunziata. Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. 1993. *J Neuroimmunol.* 47 (1): 73-81.
- Majdoubi, M. E., D. A. Poulain y D. T. Theodosis. Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. 1997. *Neuroscience.* 80 (4): 1137-47.
- Mangia, S., F. Giove, I. Tkác, N. K. Logothetis, P.-G. Henry, C. A. Olman, B. Maraviglia, F. D. Salle y K. Ugurbil. Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: current hypotheses, theoretical predictions and in vivo NMR experimental findings. 2009. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29 (3): 441-63.
- Mantzoros, C. S. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. 1999. *Ann Intern Med.* 130 (8): 671-80.
- Martos-Moreno, G. A., V. Barrios y J. Argente. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: relationship with sex steroids. 2006. *Eur J Endocrinol.* 155 (3): 429-34.
- Martos-Moreno, G. A., J. A. Chowen y J. Argente. Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. 2010. *Mol Cell Endocrinol.* 324 (1-2): 70-81.
- Martos-Moreno, G. A., V. Barrios, G. Martínez, F. Hawkins y J. Argente. Acylated ghrelin levels in pre-pubertal obese children at diagnosis and after weight reduction: effect of oral glucose ingestion. 2011. *J Endocrinol Invest.* 34 (2): 117-23.
- Matsumoto, M., H. Hosoda, Y. Kitajima, N. Morozumi, Y. Minamitake, S. Tanaka, H. Matsuo, M. Kojima, Y. Hayashi y K. Kangawa. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. 2001. *Biochem Biophys Res Commun.* 287 (1): 142-46.
- Mattioli, B., E. Straface, M. G. Quaranta, L. Giordani y M. Viora. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. 2005. *J Immunol.* 174 (11): 6820-28.
- Maurer, A. D. y R. A. Reimer. Maternal consumption of high-prebiotic fibre or -protein diets during pregnancy and lactation differentially influences satiety hormones and expression of genes involved in glucose and lipid metabolism in offspring in rats. 2011. *Br J Nutr.* 105 (3): 329-38.
- Mazzocchi, G., G. Neri, M. Rucinski, P. Rebuffat, R. Spinazzi, L. K. Malendowicz y G. G. Nussdorfer. Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. 2004. *Peptides.* 25 (8): 1269-77.
- McCall, M. A., R. G. Gregg, R. R. Behringer, M. Brenner, C. L. Delaney, E. J. Galbreath, C. L. Zhang, R. A. Pearce, S. Y. Chiu y A. Messing. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (13): 6361-66.

- McDermott, J. R., F. C. Leslie, M. D'Amato, D. G. Thompson, R. K. Grencis y J. T. McLaughlin. Immune control of food intake: enteroendocrine cells are regulated by CD4+ T lymphocytes during small intestinal inflammation. 2006. *Gut*. 55 (4): 492-97.
- McKee, K. K., O. C. Palyha, S. D. Feighner, D. L. Hreniuk, C. P. Tan, M. S. Phillips, R. G. Smith, L. H. V. der Ploeg y A. D. Howard. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. 1997. *Mol Endocrinol*. 11 (4): 415-23.
- McMillen, I. C. y J. S. Robinson. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. 2005. *Physiol Rev*. 85 (2): 571-633.
- Meister, B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. 2000. *Vitam Horm*. 59: 265-304.
- Mendieta-Zerón, H., M. López y C. Diéguez. Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. 2008. *Gen Comp Endocrinol*. 155 (3): 481-95.
- Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, L. T. Hannah y P. Trayhurn. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. 1996. *FEBS Lett*. 387 (2-3): 113-16.
- Miao, Y., Q. Xia, Z. Hou, Y. Zheng, H. Pan y S. Zhu. Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. 2007. *Biochem Biophys Res Commun*. 359 (3): 795-800.
- Milanski, M., G. Degasperi, A. Coope, J. Morari, R. Denis, D. E. Cintra, D. M. L. Tsukumo, G. Anhe, M. E. Amaral, H. K. Takahashi, R. Curi, H. C. Oliveira, J. B. C. Carvalheira, S. Bordin, M. J. Saad y L. A. Velloso. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. 2009. *J Neurosci*. 29 (2): 359-70.
- Mistry A. M., A. Swick y D. R. Romsos. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. 1999. *Am J Physiol*. 277: R742-R747.
- Mizuno, T. M. y C. V. Mobbs. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. 1999. *Endocrinology*. 140 (2): 814-17.
- Mong, J. A. y T. Blumstein. Estradiol modulation of astrocytic form and function: implications for hormonal control of synaptic communication. 2006. *Neuroscience*. 138 (3): 967-75.
- Moore, T. J., A. P. Lione, M. C. Sugden y D. M. Regen. Beta-hydroxybutyrate transport in rat brain: developmental and dietary modulations. 1976. *Am J Physiol*. 230 (3): 619-30.
- Mora, S. y J. E. Pessin. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. 2002. *Diabetes Metab Res Rev*. 18 (5): 345-56.
- Morán, J., M. Sabanero, I. Meza y H. Pasantes-Morales. Changes of actin cytoskeleton during swelling and regulatory volume decrease in cultured astrocytes. 1996. *Am J Physiol*. 271 (6 Pt 1): C1901-C07.
- Moreno, L. A., I. Pineda, G. Rodríguez, J. Fleta, A. Giner, M. G. Juste, A. Sarría y M. Bueno. Leptin and metabolic syndrome in obese and non-obese children. 2002. *Horm Metab Res*. 34 (7): 394-99.
- Morris, M. J. y H. Chen. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. 2009. *Int J Obes (Lond)*. 33 (1): 115-22.

- Morrison, R. S., J. D. Vellis, Y. L. Lee, R. A. Bradshaw y L. F. Eng. Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. 1985. *J Neurosci Res.* 14 (2): 167-76.
- Morton, G. J., P. Mystkowski, A. M. Matsumoto y M. W. Schwartz. Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. 2004. *Peptides.* 25 (4): 667-74.
- Mothet, J.-P., L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier y G. Baux. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (15): 5606-11.
- Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly y R. D. Cone. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. 1994. *Mol Endocrinol.* 8 (10): 1298-308.
- Mozid, A. M., G. Tringali, M. L. Forsling, M. S. Hendricks, S. Ajodha, R. Edwards, P. Navarra, A. B. Grossman y M. Korbonits. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. 2003. *Horm Metab Res.* 35 (8): 455-59.
- Muccioli, G., M. Tschöp, M. Papotti, R. Deghenghi, M. Heiman y E. Ghigo. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. 2002. *Eur J Pharmacol.* 440 (2-3): 235-54.
- Mühlhäusler, B. S., C. L. Adam, E. M. Marrocco, P. A. Findlay, C. T. Roberts, J. R. McFarlane, K. G. Kauter y I. C. McMillen. Impact of glucose infusion on the structural and functional characteristics of adipose tissue and on hypothalamic gene expression for appetite regulatory neuropeptides in the sheep fetus during late gestation. 2005. *J Physiol.* 565 (Pt 1): 185-95.
- Münzberg, H. y M. G. Myers. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. 2005. *Nat Neurosci.* 8 (5): 566-70.
- Mullier, A., S. G. Bouret, V. Prevot y B. Dehouck. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. 2010. *J Comp Neurol.* 518 (7): 943-62.
- Murata, M., Y. Okimura, K. Iida, M. Matsumoto, H. Sowa, H. Kaji, M. Kojima, K. Kangawa y K. Chihara. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. 2002. *J Biol Chem.* 277 (7): 5667-74.
- Myers, M. G., M. A. Cowley y H. Münzberg. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. 2008. *Annu Rev Physiol.* 70: 537-56.
- Nakagawa, E., N. Nagaya, H. Okumura, M. Enomoto, H. Oya, F. Ono, H. Hosoda, M. Kojima y K. Kangawa. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. 2002. *Clin Sci (Lond).* 103 (3): 325-28.
- Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa y S. Matsukura. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. 2001. *Nature.* 409 (6817): 194-98.

- Nanzer, A. M., S. Khalaf, A. M. Mozid, R. C. Fowkes, M. V. Patel, J. M. Burrin, A. B. Grossman y M. Korbonits. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. 2004. *Eur J Endocrinol.* 151 (2): 233-40.
- Neary, N. M., M. R. Druce, C. J. Small y S. R. Bloom. Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. 2006. *Gut.* 55 (1): 135.
- Nijijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and their role in food intake and blood glucose regulation. 1983. *J Auton Nerv Syst.* 9 (1): 207-20.
- Nilaver, G., E. A. Zimmerman, R. Defendini, A. S. Liotta, D. T. Krieger y M. J. Brownstein. Adrenocorticotropin and beta-lipotropin in the hypothalamus. Localization in the same arcuate neurons by sequential immunocytochemical procedures. 1979. *J Cell Biol.* 81 (1): 50-58.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff y F. Helmchen. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. 2005. *Science.* 308 (5726): 1314-18.
- Nimmerjahn, A., E. A. Mukamel y M. J. Schnitzer. Motor behavior activates Bergmann glial networks. 2009. *Neuron.* 62 (3): 400-12.
- Nishi, Y., H. Hiejima, H. Mifune, T. Sato, K. Kangawa y M. Kojima. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. 2005. *Endocrinology.* 146 (6): 2709-15.
- Niswender, K. D., G. J. Morton, W. H. Stearns, C. J. Rhodes, M. G. Myers y M. W. Schwartz. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. 2001. *Nature.* 413 (6858): 794-95.
- Nivoit, P., C. Morens, F. A. V. Assche, E. Jansen, L. Poston, C. Remacle y B. Reusens. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. 2009. *Diabetologia.* 52 (6): 1133-42.
- Nogueiras, R., P. Wiedmer, D. Perez-Tilve, C. Veyrat-Durebex, J. M. Keogh, G. M. Sutton, P. T. Pfluger, T. R. Castaneda, S. Neschen, S. M. Hofmann, P. N. Howles, D. A. Morgan, S. C. Benoit, I. Szanto, B. Schrott, A. Schürmann, H.-G. Joost, C. Hammond, D. Y. Hui, S. C. Woods, K. Rahmouni, A. A. Butler, I. S. Farooqi, S. O'Rahilly, F. Rohner-Jeanrenaud y M. H. Tschöp. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. 2007. *J Clin Invest.* 117 (11): 3475-88.
- Norris, J. G. y E. N. Benveniste. Interleukin-6 production by astrocytes: induction by the neurotransmitter norepinephrine. 1993. *J Neuroimmunol.* 45 (1-2): 137-45.
- Obici, S., Z. Feng, J. Tan, L. Liu, G. Karkaniyas y L. Rossetti. Central melanocortin receptors regulate insulin action. 2001. *J Clin Invest.* 108 (7): 1079-85.
- Oh-I, S., J. P. Thaler, K. Ogimoto, B. E. Wisse, G. J. Morton y M. W. Schwartz. Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. 2010. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299 (1): E47-E53.
- Okada, S., M. Nakamura, H. Katoh, T. Miyao, T. Shimazaki, K. Ishii, J. Yamane, A. Yoshimura, Y. Iwamoto, Y. Toyama y H. Okano. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. 2006. *Nat Med.* 12 (7): 829-34.
- Oken, E. y M. W. Gillman. Fetal origins of obesity. 2003. *Obes Res.* 11 (4): 496-506.

- Oliet, S. H., R. Piet y D. A. Poulain. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. 2001. *Science*. 292 (5518): 923-26.
- O'Malley, D., N. MacDonald, S. Mizielinska, C. N. Connolly, A. J. Irving y J. Harvey. Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. 2007. *Mol Cell Neurosci*. 35 (4): 559-72.
- Opp, M. R. Cytokines and sleep. 2005. *Sleep Med Rev*. 9 (5): 355-64.
- Osterstock, G., P. Escobar, V. Mitutsova, L.-A. Gouty-Colomer, P. Fontanaud, F. Molino, J.-A. Fehrentz, D. Carmignac, J. Martinez, N. C. Guerinéau, I. C. A. F. Robinson, P. Mollard y P.-F. Méry. Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. 2010. *PLoS One*. 5 (2): e9159.
- Ostlund, R. E., J. W. Yang, S. Klein y R. Gingerich. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. 1996. *J Clin Endocrinol Metab*. 81 (11): 3909-13.
- Otto, B., U. Cuntz, E. Fruehauf, R. Wawarta, C. Folwaczny, R. L. Riepl, M. L. Heiman, P. Lehnert, M. Fichter y M. Tschöp. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. 2001. *Eur J Endocrinol*. 145 (5): 669-73.
- Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa y K. Walsh. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. 2003. *Curr Opin Lipidol*. 14 (6): 561-66.
- Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus y K. Walsh. Adipokines in inflammation and metabolic disease. 2011. *Nat Rev Immunol*. 11 (2): 85-97.
- Pan, W., H. Hsueh, C. Xu, X. Wu, S. G. Bouret y A. J. Kastin. Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A vy mice. 2011. *J Mol Neurosci*. 43 (3): 478-84.
- Parker, S. L., M. S. Parker, J. K. Kane y M. M. Berglund. A pool of Y2 neuropeptide Y receptors activated by modifiers of membrane sulfhydryl or cholesterol balance. 2002. *Eur J Biochem*. 269 (9): 2315-22.
- Patel, M. S., M. Srinivasan y R. Aalinkel. Metabolic programming by nutrition during early development. 2000. *Indian J Exp Biol*. 38 (9): 849-55.
- Patel, N. V. y C. E. Finch. The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. 2002. *Neurobiol Aging*. 23 (5): 707-17.
- Patel, M. S. y M. Srinivasan. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. 2010. *J Nutr*. 140 (3): 658-61.
- Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Second Edition. 1986. New York: Academic Press.
- Pekny, M. y M. Nilsson. Astrocyte activation and reactive gliosis. 2005. *Glia*. 50 (4): 427-34.
- Pellerin, L. How astrocytes feed hungry neurons. 2005. *Mol Neurobiol*. 32 (1): 59-72.
- Pénicaud, L., C. Leloup, A. Lorsignol, T. Alquier y E. Guillod. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. 2002. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 5 (5): 539-43.
- Perea, G., M. Navarrete y A. Araque. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. 2009. *Trends Neurosci*. 32 (8): 421-31.

- Pérez, C., C. Fernández-Galaz, T. Fernández-Agulló, C. Arribas, A. Andrés, M. Ros y J. M. Carrascosa. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. 2004. *Diabetes*. 53 (2): 347-53.
- Peters, J. M., N. Hennuyer, B. Staels, J. C. Fruchart, C. Fievet, F. J. Gonzalez y J. Auwerx. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. 1997. *J Biol Chem*. 272 (43): 27307-12.
- Petersenn, S., A. C. Rasch, M. Penschorn, F. U. Beil y H. M. Schulte. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. 2001. *Endocrinology*. 142 (6): 2649-59.
- Pettersson, I., G. Muccioli, R. Granata, R. Deghenghi, E. Ghigo, C. Ohlsson y J. Isgaard. Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. 2002. *J Endocrinol*. 175 (1): 201-09.
- Petzold, G. C., D. F. Albeanu, T. F. Sato y V. N. Murthy. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. 2008. *Neuron*. 58 (6): 897-910.
- Pike, C. J., B. J. Cummings, R. Monzavi y C. W. Cotman. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. 1994. *Neuroscience*. 63 (2): 517-31.
- Pinto, S., A. G. Roseberry, H. Liu, S. Diano, M. Shanabrough, X. Cai, J. M. Friedman y T. L. Horvath. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. 2004. *Science*. 304 (5667): 110-15.
- Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, U. Janert, K. Melchior, W. Rohde y G. Dörner. Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. 1999. *Int J Dev Neurosci*. 17 (1): 37-44.
- Plagemann, A., T. Harder, A. Rake, K. Melchior, W. Rohde y G. Dörner. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. 2000. *J Nutr*. 130 (10): 2582-89.
- Plagemann, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. 2006. *Horm Res*. 65 Suppl 3: 83-89.
- Plotsky, P. M. y W. Vale. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. 1985. *Science*. 230 (4724): 461-63.
- Posey, K. A., D. J. Clegg, R. L. Printz, J. Byun, G. J. Morton, A. Vivekanandan-Giri, S. Pennathur, D. G. Baskin, J. W. Heinecke, S. C. Woods, M. W. Schwartz y K. D. Niswender. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. 2009. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296 (5): E1003-E12.
- Pöykkö, S. M., E. Kellokoski, S. Hörkkö, H. Kauma, Y. A. Kesäniemi y O. Ukkola. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. 2003. *Diabetes*. 52 (10): 2546-53.
- Pöykkö, S. M., O. Ukkola, H. Kauma, E. Kellokoski, S. Hörkkö y Y. A. Kesäniemi. The negative association between plasma ghrelin and IGF-I is modified by obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. 2005. *Diabetologia*. 48 (2): 309-16.
- Prebil, M., J. Jensen, R. Zorec y M. Kreft. Astrocytes and energy metabolism. 2011. *Arch Physiol Biochem*. 117 (2): 64-69.

- Prolo, P., M. L. Wong y J. Licinio. Leptin. 1998. *Int J Biochem Cell Biol.* 30 (12): 1285-90.
- Proulx, K., D. Richard y C.-D. Walker. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. 2002. *Endocrinology.* 143 (12): 4683-92.
- Qader, S. S., R. Håkanson, J. F. Rehfeld, I. Lundquist y A. Salehi. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. 2008. *Regul Pept.* 146 (1-3): 230-37.
- Qian, S., H. Chen, D. Weingarh, M. E. Trumbauer, D. E. Novi, X. Guan, H. Yu, Z. Shen, Y. Feng, E. Frazier, A. Chen, R. E. Camacho, L. P. Shearman, S. Gopal-Truter, D. J. MacNeil, L. H. T. V. der Ploeg y D. J. Marsh. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. 2002. *Mol Cell Biol.* 22 (14): 5027-35.
- Rasmussen JE., Torres-Aleman I., MacLusky NJ., Naftolin F. y Robbins RJ. The effects of estradiol on the growth patterns of estrogen receptor-positive hypothalamic cell lines. 1990. *Endocrinology.* 126 (1): 235-240.
- Ridet, J. L., S. K. Malhotra, A. Privat y F. H. Gage. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. 1997. *Trends Neurosci.* 20 (12): 570-77.
- Rigamonti, A. E., A. I. Pincelli, B. Corrà, R. Viarengo, S. M. Bonomo, D. Galimberti, M. Scacchi, E. Scarpini, F. Cavagnini y E. E. Müller. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. 2002. *J Endocrinol.* 175 (1): R1-R5.
- Robel, S., B. Berninger y M. Götz. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. 2011. *Nat Rev Neurosci.* 12 (2): 88-104.
- Rodríguez, E. M., J. L. Blázquez y M. Guerra. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. 2010. *Peptides.* 31 (4): 757-76.
- Rooney, K. y S. E. Ozanne. Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition: targets for preventative interventions. 2011. *Int J Obes (Lond).* 35 (7): 883-90.
- Ropelle, E. R., M. B. Flores, D. E. Cintra, G. Z. Rocha, J. R. Pauli, J. Morari, C. T. de Souza, J. C. Moraes, P. O. Prada, D. Guadagnini, R. M. Marin, A. G. Oliveira, T. M. Augusto, H. F. Carvalho, L. A. Velloso, M. J. A. Saad y J. B. C. Carvalheira. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. 2010. *PLoS Biol.* 8 (8).
- Roseberry, A. G., H. Liu, A. C. Jackson, X. Cai y J. M. Friedman. Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. 2004. *Neuron.* 41 (5): 711-22.
- Rothman, J. E. Intracellular membrane fusion. 1994. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 29 81-96.
- Rozovsky, I., N. J. Laping, K. Krohn, B. Teter, J. P. O'Callaghan y C. E. Finch. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein by corticosterone in rat astrocytes in vitro is influenced by the duration of time in culture and by astrocyte-neuron interactions. 1995. *Endocrinology.* 136 (5): 2066-73.

- Rudge, J. S., R. F. Alderson, E. Pasnikowski, J. McClain, N. Y. Ip y R. M. Lindsay. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. 1992. *Eur J Neurosci.* 4 (6): 459-71.
- Rudge, J. S., E. M. Pasnikowski, P. Holst y R. M. Lindsay. Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. 1995. *J Neurosci.* 15 (10): 6856-67.
- Saad, M. F., S. Damani, R. L. Gingerich, M. G. Riad-Gabriel, A. Khan, R. Boyadjian, S. D. Jinagouda, K. el Tawil, R. K. Rude y V. Kamdar. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. 1997. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (2): 579-84.
- Saenger, P., P. Czernichow, I. Hughes y E. O. Reiter. Small for gestational age: short stature and beyond. 2007. *Endocr Rev.* 28 (2): 219-51.
- Safavi-Abbasi, S., J. R. Wolff y M. Missler. Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins. 2001. *Glia.* 36 (1): 102-15.
- Sahu, A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. 1998. *Endocrinology.* 139 (2): 795-98.
- Sahu, A. Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin resistance in neuropeptide Y neurones. 2002. *J Neuroendocrinol.* 14 (10): 796-804.
- Sahu, A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. 2004. *Endocrinology.* 145 (6): 2613-20.
- Salehi, A., C. D. de la Cour, R. Håkanson y I. Lundquist. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. 2004. *Regul Pept.* 118 (3): 143-50.
- Samuelsson, A.-M., P. A. Matthews, M. Argenton, M. R. Christie, J. M. McConnell, E. H. J. M. Jansen, A. H. Piersma, S. E. Ozanne, D. F. Twinn, C. Rémacle, A. Rowlerson, L. Poston y P. D. Taylor. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. 2008. *Hypertension.* 51 (2): 383-92.
- Sanchez-Margalet, V. y C. Martín-Romero. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. 2001. *Cell Immunol.* 211 (1): 30-36.
- Sasaki, T. y T. Kitamura. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. 2010. *Endocr J.* 57 (11): 939-46.
- Sato, M., J. Takahara, Y. Fujioka, M. Niimi y S. Irino. Physiological role of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in the dynamics of GH secretion in adult male rat. 1988. *Endocrinology.* 123 (4): 1928-33.
- Sato, M., K. Nakahara, S. Goto, H. Kaiya, M. Miyazato, Y. Date, M. Nakazato, K. Kangawa y N. Murakami. Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. 2006. *Biochem Biophys Res Commun.* 350 (3): 598-603.

- Sato, T., Y. Fukue, H. Teranishi, Y. Yoshida y M. Kojima. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. 2005. *Endocrinology*. 146 (6): 2510-16.
- Scarlett, J. M., E. E. Jobst, P. J. Enriori, D. D. Bowe, A. K. Batra, W. F. Grant, M. A. Cowley y D. L. Marks. Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. 2007. *Endocrinology*. 148 (9): 4217-25.
- Schachtrup, C., J. K. Ryu, M. J. Helmrick, E. Vagena, D. K. Galanakis, J. L. Degen, R. U. Margolis y K. Akassoglou. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. 2010. *J Neurosci*. 30 (17): 5843-54.
- Schmid, D. A., K. Held, M. Ising, M. Uhr, J. C. Weikel y A. Steiger. Ghrelin stimulates appetite, imagination of food, GH, ACTH, and cortisol, but does not affect leptin in normal controls. 2005. *Neuropsychopharmacology*. 30 (6): 1187-92.
- Schöbitz, B., E. R. de Kloet, W. Sutanto y F. Holsboer. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. 1993. *Eur J Neurosci*. 5 (11): 1426-35.
- Schousboe, A. Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review. 2000. *Neurochem Res*. 25 (9-10): 1241-44.
- Schwartz, M. W., D. P. Figlewicz, D. G. Baskin, S. C. Woods y D. Porte. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. 1992. *Endocr Rev*. 13 (3): 387-414.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, M. Raskind, E. J. Boyko y D. Porte. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. 1996a. *Nat Med*. 2 (5): 589-93.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn y D. G. Baskin. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. 1996b. *J Clin Invest*. 98 (5): 1101-06.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield, P. Burn y D. G. Baskin. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. 1997. *Diabetes*. 46 (12): 2119-23.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley y D. G. Baskin. Central nervous system control of food intake. 2000. *Nature*. 404 (6778): 661-71.
- Schwartz, M. W. y D. Porte. Diabetes, obesity, and the brain. 2005. *Science*. 307 (5708): 375-79.
- Schweizer, F. E. y T. A. Ryan. The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. 2006. *Curr Opin Neurobiol*. 16 (3): 298-304.
- Seeley, R. J. y S. C. Woods. Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. 2003. *Nat Rev Neurosci*. 4 (11): 901-09.
- Segal, J. P., N. R. Stallings, C. E. Lee, L. Zhao, N. Socci, A. Viale, T. M. Harris, M. B. Soares, G. Childs, J. K. Elmquist, K. L. Parker y J. M. Friedman. Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. 2005. *J Neurosci*. 25 (16): 4181-88.
- Seidell, J. C. y I. Deerenberg. Obesity in Europe: prevalence and consequences for use of medical care. 1994. *Pharmacoeconomics*. 5 (Suppl 1): 38-44.
- Shafit-Zagardo, B., A. Kume-Iwaki y J. E. Goldman. Astrocytes regulate GFAP mRNA levels by cyclic AMP and protein kinase C-dependent mechanisms. 1988. *Glia*. 1 (5): 346-54.

- Shanley, L. J., A. J. Irving, M. G. Rae, M. L. J. Ashford y J. Harvey. Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels. 2002. *Nat Neurosci.* 5 (4): 299-300.
- Sharma, G. y S. Vijayaraghavan. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (7): 4148-53.
- Shen, L., P. Tso, D. Q.-H. Wang, S. C. Woods, W. S. Davidson, R. Sakai y M. Liu. Up-regulation of apolipoprotein E by leptin in the hypothalamus of mice and rats. 2009. *Physiol Behav.* 98 (1-2): 223-28.
- Shi, Z. Q., A. Nelson, L. Whitcomb, J. Wang y A. M. Cohen. Intracerebroventricular administration of leptin markedly enhances insulin sensitivity and systemic glucose utilization in conscious rats. 1998. *Metabolism.* 47 (10): 1274-80.
- Silver, J. y J. H. Miller. Regeneration beyond the glial scar. 2004. *Nat Rev Neurosci.* 5 (2): 146-56.
- Silverman, B. L., B. E. Metzger, N. H. Cho y C. A. Loeb. Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism. 1995. *Diabetes Care.* 18 (5): 611-17.
- Simar, D., H. Chen, K. Lambert, J. Mercier y M. J. Morris. Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. 2011. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*
- Sinha, M. K., I. Opentanova, J. P. Ohannesian, J. W. Kolaczynski, M. L. Heiman, J. Hale, G. W. Becker, R. R. Bowsher, T. W. Stephens y J. F. Caro. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. 1996. *J Clin Invest.* 98 (6): 1277-82.
- Smagin, G. N., L. A. Howell, D. H. Ryan, E. B. D. Souza y R. B. Harris. The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. 1998. *Neuroreport.* 9 (7): 1601-06.
- Smolinska, N., J. Przala, T. Kaminski, G. Siawrys, A. Gajewska, K. Kochman y S. Okrasa. Leptin gene expression in the hypothalamus and pituitary of pregnant pigs. 2004. *Neuro Endocrinol Lett.* 25 (3): 191-95.
- Sofroniew, M. V. y H. V. Vinters. Astrocytes: biology and pathology. 2010. *Acta Neuropathol.* 119 (1): 7-35.
- Souza, C. T. D., E. P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R. L. Zollner, A. C. Boschero, M. J. A. Saad y L. A. Velloso. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. 2005. *Endocrinology.* 146 (10): 4192-99.
- Spiegelman, B. M. y J. S. Flier. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. 1996. *Cell.* 87 (3): 377-89.
- Stein, Q. P., A. R. Mroch, K. L. D. Berg y J. D. Flanagan. The influential role of genes in obesity. 2011. *S D Med. Spec No* 12-5, 17.
- Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, S. G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H. M. Hsiung y A. Kriauciunas. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. 1995. *Nature.* 377 (6549): 530-32.

- Steppan, C. M. y A. G. Swick. A role for leptin in brain development. 1999. *Biochem Biophys Res Commun.* 256 (3): 600-02.
- Sternson, S. M., G. M. G. Shepherd y J. M. Friedman. Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. 2005. *Nat Neurosci.* 8 (10): 1356-63.
- Südhof, T. C., A. J. Czernik, H. T. Kao, K. Takei, P. A. Johnston, A. Horiuchi, S. D. Kanazir, M. A. Wagner, M. S. Perin y P. D. Camilli. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. 1989. *Science.* 245 (4925): 1474-80.
- Sullivan, E. L., M. S. Smith y K. L. Grove. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. 2011. *Neuroendocrinology.* 93 (1): 1-8.
- Sun, Y., P. Wang, H. Zheng y R. G. Smith. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (13): 4679-84.
- Sunny, N. E., S. Satapati, X. Fu, T. He, R. Mehdibeigi, C. Spring-Robinson, J. Duarte, M. J. Potthoff, J. D. Browning y S. C. Burgess. Progressive adaptation of hepatic ketogenesis in mice fed a high-fat diet. 2010. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298 (6): E1226-E35.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn y A. T. Brunger. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. 1998. *Nature.* 395 (6700): 347-53.
- Sweeney, G. Leptin signalling. 2002. *Cell Signal.* 14 (8): 655-63.
- Szanto, I. y C. R. Kahn. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (5): 2355-60.
- Tamashiro, K. L. K. y T. H. Moran. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. 2010. *Physiol Behav.* 100 (5): 560-66.
- Tang, C.-H., D.-Y. Lu, R.-S. Yang, H.-Y. Tsai, M.-C. Kao, W.-M. Fu y Y.-F. Chen. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 pathway in microglia. 2007. *J Immunol.* 179 (2): 1292-302.
- Tang-Christensen, M., P. J. Havel, R. R. Jacobs, P. J. Larsen y J. L. Cameron. Central administration of leptin inhibits food intake and activates the sympathetic nervous system in rhesus macaques. 1999. *J Clin Endocrinol Metab.* 84 (2): 711-17.
- Tanji, K., F. Mori, T. Imaizumi, H. Yoshida, K. Satoh y K. Wakabayashi. Interleukin-1 induces tau phosphorylation and morphological changes in cultured human astrocytes. 2003. *Neuroreport.* 14 (3): 413-17.
- Tannenbaum, B. M., D. N. Brindley, G. S. Tannenbaum, M. F. Dallman, M. D. McArthur y M. J. Meaney. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. 1997. *Am J Physiol.* 273 (6 Pt 1): E1168-E77.
- Tapia-González, S., L. M. García-Segura, M. Tena-Sempere, L. M. Frago, J. M. Castellano, E. Fuente-Martín, C. García-Cáceres, J. Argente y J. A. Chowen. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. 2011. *J Neuroendocrinol.* 23 (4): 365-70.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G.

- G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe y R. I. Tepper. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. 1995. *Cell*. 83 (7): 1263-71.
- Tassone, F., F. Broglio, S. Destefanis, S. Rovere, A. Benso, C. Gottero, F. Prodam, R. Rossetto, C. Gauna, A. J. van der Lely, E. Ghigo y M. Maccario. Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity. 2003. *J Clin Endocrinol Metab*. 88 (11): 5478-83.
- Taylor, P. D., J. McConnell, I. Y. Khan, K. Holemans, K. M. Lawrence, H. Asare-Anane, S. J. Persaud, P. M. Jones, L. Petrie, M. A. Hanson y L. Poston. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288 (1): R134-R39.
- Taylor, P. D. y L. Poston. Developmental programming of obesity in mammals. 2007. *Exp Physiol*. 92 (2): 287-98.
- Teixeira, C., ntia, M. Passos, C. Ramos, S. Dutra y E. Moura. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. 2002. *J Nutr Biochem*. 13 (8): 493.
- Thaler, J. P., S. J. Choi, M. W. Schwartz y B. E. Wisse. Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox. 2010. *Front Neuroendocrinol*. 31 (1): 79-84.
- Theodosis, D. T. y D. A. Poulain. Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. 1984. *Neuroscience*. 11 (1): 183-93.
- Theodosis, D. T., D. A. Poulain y S. H. R. Oliet. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. 2008. *Physiol Rev*. 88 (3): 983-1008.
- Thompson, N. M., D. A. S. Gill, R. Davies, N. Loveridge, P. A. Houston, I. C. A. F. Robinson y T. Wells. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. 2004. *Endocrinology*. 145 (1): 234-42.
- Thorens, B. Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. 2008. *Int J Obes (Lond)*. 32 Suppl 6 S62-S71.
- Tobi, E. W., L. H. Lumey, R. P. Talens, D. Kremer, H. Putter, A. D. Stein, P. E. Slagboom y B. T. Heijmans. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. 2009. *Hum Mol Genet*. 18 (21): 4046-53.
- Tolle, V., P. Zizzari, C. Tomasetto, M. C. Rio, J. Epelbaum y M. T. Bluet-Pajot. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. 2001. *Neuroendocrinology*. 73 (1): 54-61.
- Toran-Allerand, C. D., W. Bentham, R. C. Miranda y J. P. Anderson. Insulin influences astroglial morphology and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in organotypic cultures. 1991. *Brain Res*. 558 (2): 296-304.
- Tortorella, C., C. Macchi, R. Spinazzi, L. K. Malendowicz, M. Trejter y G. G. Nussdorfer. Ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone-secretagogue receptor, is expressed in the human adrenal cortex. 2003. *Int J Mol Med*. 12 (2): 213-17.

- Toshinai, K., Y. Date, N. Murakami, M. Shimada, M. S. Mondal, T. Shimbara, J.-L. Guan, Q.-P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, S. Shioda, S. Matsukura, K. Kangawa y M. Nakazato. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. 2003. *Endocrinology*. 144 (4): 1506-12.
- Toshinai, K., H. Yamaguchi, Y. Sun, R. G. Smith, A. Yamanaka, T. Sakurai, Y. Date, M. S. Mondal, T. Shimbara, T. Kawagoe, N. Murakami, M. Miyazato, K. Kangawa y M. Nakazato. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. 2006. *Endocrinology*. 147 (5): 2306-14.
- Tritos, N. A., A. Kokkinos, E. Lampadariou, E. Alexiou, N. Katsilambros y E. Maratos-Flier. Cerebrospinal fluid ghrelin is negatively associated with body mass index. 2003. *J Clin Endocrinol Metab*. 88 (6): 2943-46.
- Tschöp, M., D. L. Smiley y M. L. Heiman. Ghrelin induces adiposity in rodents. 2000. *Nature*. 407 (6806): 908-13.
- Tschöp, M., C. Weyer, P. A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin y M. L. Heiman. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. 2001. *Diabetes*. 50 (4): 707-09.
- Tu, H., A. J. Kastin, H. Hsueh y W. Pan. Soluble receptor inhibits leptin transport. 2008. *J Cell Physiol*. 214 (2): 301-05.
- Tung, Y.-C. L., M. Ma, S. Piper, A. Coll, S. O'Rahilly y G. S. H. Yeo. Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. 2008. *J Neurosci*. 28 (47): 12419-26.
- Turnbull, A. V. y C. L. Rivier. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. 1999. *Physiol Rev*. 79 (1): 1-71.
- Ullian, E. M., S. K. Saperstein, K. S. Christopherson y B. A. Barres. Control of synapse number by glia. 2001. *Science*. 291 (5504): 657-61.
- Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, M. Stoffel y J. M. Friedman. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. 1996. *Nat Genet*. 14 (1): 95-97.
- Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand y P. Froguel. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. 1998. *Nat Genet*. 20 (2): 113-14.
- Valassi, E., M. Scacchi y F. Cavagnini. Neuroendocrine control of food intake. 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 18 (2): 158-68.
- van de Wall, E., R. Leshan, A. W. Xu, N. Balthasar, R. Coppari, S. M. Liu, Y. H. Jo, R. G. MacKenzie, D. B. Allison, N. J. Dun, J. Elmquist, B. B. Lowell, G. S. Barsh, C. de Luca, M. G. Myers, G. J. Schwartz y S. C. Chua. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. 2008. *Endocrinology*. 149 (4): 1773-85.
- van Zundert, B., A. Yoshii y M. Constantine-Paton. Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. 2004. *Trends Neurosci*. 27 (7): 428-37.
- Veldhuis, J. D. y C. Y. Bowers. Integrating GHS into the Ghrelin System. 2010. *Int J Pept*. 2010
- Ventura, R. y K. M. Harris. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. 1999. *J Neurosci*. 19 (16): 6897-906.

- Verderio, C., D. Pozzi, E. Pravettoni, F. Inverardi, U. Schenk, S. Coco, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli, O. Rossetto, C. Frassoni y M. Matteoli. SNAP-25 modulation of calcium dynamics underlies differences in GABAergic and glutamatergic responsiveness to depolarization. 2004. *Neuron*. 41 (4): 599-610.
- Verkhratsky, A. y C. Steinhäuser. Ion channels in glial cells. 2000. *Brain Res Brain Res Rev*. 32 (2-3): 380-412.
- Verona, M., S. Zanotti, T. Schäfer, G. Racagni y M. Popoli. Changes of synaptotagmin interaction with t-SNARE proteins in vitro after calcium/calmodulin-dependent phosphorylation. 2000. *J Neurochem*. 74 (1): 209-21.
- Vicentic, A. y D. C. Jones. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. 2007. *J Pharmacol Exp Ther*. 320 (2): 499-506.
- Vickers, M. H., P. D. Gluckman, A. H. Coveny, P. L. Hofman, W. S. Cutfield, A. Gertler, B. H. Breier y M. Harris. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. 2005. *Endocrinology*. 146 (10): 4211-16.
- Vickers, M. H., Z. E. Clayton, C. Yap y D. M. Sloboda. Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. 2011. *Endocrinology*. 152 (4): 1378-87.
- Volante, M., E. Allia, E. Fulcheri, P. Cassoni, E. Ghigo, G. Muccioli y M. Papotti. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. 2003. *Am J Pathol*. 162 (2): 645-54.
- Volterra, A. y J. Meldolesi. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. 2005. *Nat Rev Neurosci*. 6 (8): 626-40.
- Vrang, N., P. J. Larsen, M. Tang-Christensen, L. K. Larsen y P. Kristensen. Hypothalamic cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids. 2003. *Brain Res*. 965 (1-2): 45-50.
- Vriese, C. D., F. Gregoire, R. Lema-Kisoka, M. Waelbroeck, P. Robberecht y C. Delporte. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. 2004. *Endocrinology*. 145 (11): 4997-5005.
- Wang, R., X. Liu, S. T. Hentges, A. A. Dunn-Meynell, B. E. Levin, W. Wang y V. H. Routh. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. 2004. *Diabetes*. 53 (8): 1959-65.
- Wang, X., N. Lou, Q. Xu, G.-F. Tian, W. G. Peng, X. Han, J. Kang, T. Takano y M. Nedergaard. Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by sensory stimulation in vivo. 2006. *Nat Neurosci*. 9 (6): 816-23.
- Warton, S. S. y R. McCart. Synaptogenesis in the stratum griseum superficiale of the rat superior colliculus. 1989. *Synapse*. 3 (2): 136-48.
- Watowich, S. S., H. Wu, M. Socolovsky, U. Klingmuller, S. N. Constantinescu y H. F. Lodish. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. 1996. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12: 91-128.

- Watson, S. J., C. W. Richard y J. D. Barchas. Adrenocorticotropin in rat brain: immunocytochemical localization in cells and axons. 1978. *Science*. 200 (4346): 1180-82.
- Wellhoener, P., B. Fruehwald-Schultes, W. Kern, D. Dantz, W. Kerner, J. Born, H. L. Fehm y A. Peters. Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. 2000. *J Clin Endocrinol Metab*. 85 (3): 1267-71.
- Wells, T. y P. A. Houston. Skeletal growth acceleration with growth hormone secretagogues in transgenic growth retarded rats: pattern-dependent effects and mechanisms of desensitization. 2001. *J Neuroendocrinol*. 13 (6): 496-504.
- Wenzel, J., G. Lammert, U. Meyer y M. Krug. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. 1991. *Brain Res*. 560 (1-2): 122-31.
- Whatmore, A. J., C. M. Hall, J. Jones, M. Westwood y P. E. Clayton. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. 2003. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 59 (5): 649-54.
- White, C. L., M. N. Purpera y C. D. Morrison. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. 2009. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 296 (5): R1464-R72.
- Willesen, M. G., P. Kristensen y J. Rømer. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. 1999. *Neuroendocrinology*. 70 (5): 306-16.
- Williams, D. L. y M. W. Schwartz. The melanocortin system as a central integrator of direct and indirect controls of food intake. 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289 (1): R2-R3.
- Williams, G., X. J. Cai, J. C. Elliott y J. A. Harrold. Anabolic neuropeptides. 2004. *Physiol Behav*. 81 (2): 211-22.
- Williams, K. W., L. O. Margatho, C. E. Lee, M. Choi, S. Lee, M. M. Scott, C. F. Elias y J. K. Elmquist. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. 2010. *J Neurosci*. 30 (7): 2472-79.
- Wisse, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. 2004. *J Am Soc Nephrol*. 15 (11): 2792-800.
- Wisse, B. E. y M. W. Schwartz. Does hypothalamic inflammation cause obesity? 2009. *Cell Metab*. 10 (4): 241-42.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, D. Porte y M. W. Schwartz. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. 1998. *Science*. 280 (5368): 1378-83.
- Wren, A. M., C. J. Small, C. R. Abbott, W. S. Dhillo, L. J. Seal, M. A. Cohen, R. L. Batterham, S. Taheri, S. A. Stanley, M. A. Ghatei y S. R. Bloom. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. 2001. *Diabetes*. 50 (11): 2540-47.
- Wu, L.-J. y M. Zhuo. Resting microglial motility is independent of synaptic plasticity in mammalian brain. 2008. *J Neurophysiol*. 99 (4): 2026-32.
- Wu, R., W. Dong, X. Cui, M. Zhou, H. H. Simms, T. S. Ravikumar y P. Wang. Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve. 2007. *Ann Surg*. 245 (3): 480-86.

- Xu, A. W., L. Ste-Marie, C. B. Kaelin y G. S. Barsh. Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. 2007. *Endocrinology*. 148 (1): 72-80.
- Xu, B., E. H. Goulding, K. Zang, D. Cepoi, R. D. Cone, K. R. Jones, L. H. Tecott y L. F. Reichardt. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. 2003a. *Nat Neurosci*. 6 (7): 736-42.
- Xu, G., Y. Li, W. An y W. Zhang. Ghrelin and cell differentiation. 2008. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 40 (10): 841-47.
- Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia y H. Chen. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. 2003b. *J Clin Invest*. 112 (12): 1821-30.
- Yang, J., T.-J. Zhao, J. L. Goldstein y M. S. Brown. Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. 2008. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (31): 10750-55.
- Yang, Y., O. Gozen, A. Watkins, I. Lorenzini, A. Lepore, Y. Gao, S. Vidensky, J. Brennan, D. Poulsen, J. W. Park, N. L. Jeon, M. B. Robinson y J. D. Rothstein. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. 2009. *Neuron*. 61 (6): 880-94.
- Yanik, T., G. Dominguez, M. J. Kuhar, E. M. D. Giudice y Y. P. Loh. The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans. 2006. *Endocrinology*. 147 (1): 39-43.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan y U. Hochgeschwender. Obesity in the mouse model of proopiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. 1999. *Nat Med*. 5 (9): 1066-70.
- Yeo, G. S., I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. G. Stanhope y S. O'Rahilly. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. 1998. *Nat Genet*. 20 (2): 111-12.
- Yi, C.-X., K. M. Habegger, J. A. Chowen, J. Stern y M. H. Tschöp. A role for astrocytes in the central control of metabolism. 2011. *Neuroendocrinology*. 93 (3): 143-49.
- Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y.-B. Kim, J. K. Elmquist, L. A. Tartaglia, B. B. Kahn y B. G. Neel. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. 2002. *Dev Cell*. 2 (4): 489-95.
- Zamoner, A., C. Funchal, M.C. Jacques-Silva, C. Gottfried, F.R. Barreto Silva, R. Pessoa-Pureur. Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and Rhoa-dependent mechanisms. 2007. *Cell Mol Neurobiol*. 27(7):845-65.
- Zamponi, G. W. Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. 2003. *J Pharmacol Sci*. 92 (2): 79-83.
- Zarkesh-Esfahani, H., G. Pockley, R. A. Metcalfe, M. Bidlingmaier, Z. Wu, A. Ajami, A. P. Weetman, C. J. Strasburger y R. J. Ross. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. 2001. *J Immunol*. 167 (8): 4593-99.
- Zhang, W., T. R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zhao, E. L. Stuenkel y M. W. Mulholland. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. 2004a. *J Physiol*. 559 (Pt 3): 729-37.

- Zhang, W., L. Zhao, T. R. Lin, B. Chai, Y. Fan, I. Gantz y M. W. Mulholland. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. 2004b. *Mol Biol Cell*. 15 (5): 2484-91.
- Zhang, W., Y. Hu, T. R. Lin, Y. Fan y M. W. Mulholland. Stimulation of neurogenesis in rat nucleus of the solitary tract by ghrelin. 2005. *Peptides*. 26 (11): 2280-88.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold y J. M. Friedman. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. 1994. *Nature*. 372 (6505): 425-32.

