



Papel de la carnitina palmitoiltransferasa 1A hipotalámica en el control de la ingesta

Paula Mera Nanín

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

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

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



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**PAPEL DE LA CARNITINA
PALMITOILTRANSFERASA 1A HIPOTALÁMICA
EN EL CONTROL DE LA INGESTA**

Paula Mera Nanín
2012



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Memoria presentada por Paula Mera Nanín, Licenciada en Biología, para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta Tesis se ha realizado bajo la dirección de los Doctores Fausto G. Hegardt y Guillermina Asins Muñoz, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Dr. Fausto G. Hegardt

Dra. Guillermina Asins Muñoz

Paula Mera Nanín

Barcelona, Enero de 2012
Programa de Doctorado: Biología Celular y Molecular
Bienio 2006-2008

GRACIAS, GRÀCIES, THANK YOU

Y finalmente llegó el día. El día en el que se termina una de las etapas de aprendizaje más intensas de mi vida.... Pensando en todos estos años, en el momento que comenzó mi aventura, me doy cuenta, más que nunca, de la ayuda inestimable de todas las personas a las que quiero dedicar unas palabras.

A mis directores de Tesis, Dr. Fausto G. Hegardt y Dra. Guillermina Asins, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciar mi carrera científica. A Fausto quiero agradecerle especialmente su optimismo y su capacidad de ver el lado bueno de las cosas cuando más lo he necesitado. A Guillermina su cariño y comprensión, por estar siempre dispuesta a tenderme una mano en los momentos difíciles.

A Dra. Dolors Serra por dirigir mis experimentos tanto como mis propios directores. Por su capacidad de escuchar y su interés incondicional por mi trabajo. A Dra. Laura Herrero por su alegría, vitalidad y amor por la ciencia. Su llegada al laboratorio y sus ánimos constantes me enseñaron a creer más en mi trabajo y apasionarme por la investigación.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, porque sin vosotros esto hubiera sido imposible. A los que ya estaban cuando llegué: Assia, David, Irene y Yolanda, por cogerme de la mano en mis primeros pasos por el *lab*. Por enseñarme todos los misterios sobre la CPT1 y por la cantidad de risas compartidas dentro y fuera del trabajo. A mi amigo Chandru, por ser una parte tan importante de estos años. Por nuestras conversaciones “profundas” y sus curiosos consejos, que siempre me han hecho sentir reconfortada. Al artista Pep, *a.k.a.* Dr. Orellana-Gavaldà, por ser mi compañero de travesía. Porque hemos hecho este viaje casi a la par y hemos compartido los mejores y peores momentos de nuestras Tesis. A Mida, mi compañera de poyata, porque su llegada al *lab* se transformó en una bonita amistad. Por ser tan cercana, detallista y buena e intentar hacernos a todos un poquito más “dulce” el trabajo. A Macarena, por su alegría y jovialidad. Por arrancarme siempre una sonrisa y llenar de “buen rollo” el laboratorio. A Kamil, por ser la otra mitad de muchos de mis experimentos. Por estar siempre dispuesto a enseñarme todo lo que no se del misterioso mundo de la química y por sus ganas de aprender todo lo que yo he podido

enseñarle. A las últimas incorporaciones: Joan y Mar, por su interés en nuestro trabajo, su alegría y sus ganas de aprender. Y, en general, a todos los estudiantes que han pasado por “nuestras manos”: Elena, las Marías, Maria Lucia, Valentina, Iván....

A los compañeros de la Universidad Internacional de Cataluña: Patricia, Sara, Esther, Jordi y Dra. Nuria Casals. Por sus conocimientos sobre el cerebro y sus consejos en todos y cada uno de los *lab meetings*.

A todos los compañer@s del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, los que estaban y los que están. Los Tauler, *City*, Colis, *ST*, Plantas y Peces. Por ayudarme siempre que lo he necesitado, por las sonrisas en los pasillos y alguna que otra noche de karaoke. A los técnicos, Silvia, Andrés y Quim, y a las secretarias, Mari Carmen, Montse y Brugués, por su gran ayuda con esos temas técnicos y burocráticos que tantos dolores de cabeza nos dan.

A todos y cada unos de los chic@s del Estabulario de la Facultad de Farmacia, que para mi ha sido como un segundo hogar durante estos años. Aina, Anna, Cristina, David, Luisa, Marta, Paula, Tere.... No querría dejarme a ninguno pues han sido una pieza crucial para mi trabajo, ayudándome siempre con los mil problemas que les he planteado.

A toda la gente de los Servicios científico-técnicos de la UB, especialmente Dra. Olga Jáuregui y Dr. David Bellido, por su imprescindible asistencia técnica en los análisis de HPLC-MS/MS.

A Dr. Jesús Pérez-Clausell, de la Facultad de Biología, por iniciarme en el mundo de la estereotaxis. Sin su ayuda los inicios de este trabajo hubieran sido muchísimo más complicados. Gracias por tu gran paciencia y capacidad de enseñar.

A todos los miembros de los grupos de Dr. Felipe Casanueva y Dr. Carlos Diéguez, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela. En especial a Omar, Sisi y M^a Jesús por hacerme un hueco en sus agendas y estar dispuestos a enseñarme los secretos de la canulación i.c.v.

También quiero dar las gracias a Dra. Lora Heisler y todos los miembros de su grupo, en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Cambridge. Por

darme la oportunidad de aprender y trabajar mano a mano con ellos. Especialmente a Dan, Al y Ollie, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del *lab*.

Por supuesto, no quiero olvidarme de todas las personas ajenas a este mundo de la investigación, pero imprescindibles en el resto de facetas de mi vida. Ellos tienen un apartado especial en mis agradecimientos...

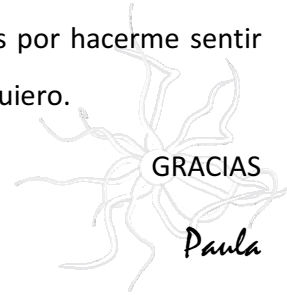
A mis fantásticas amigas: Moni y Mariona, "las biólogas" Laura y Noe y mi *labmate* Mida. Por estar siempre dispuestas a escucharme e interesarse por mis experimentos y mis ratitas. Gracias por todas las cenas, fiestas, viajes, festivales... porque no se qué sería de mi sin tantas risas y momentos de desconexión. En extensión quiero mostrar mi agradecimiento a sus "apéndices", Javi, Álvaro y Vitto. Por formar siempre parte de los buenos momentos.

A toda mi familia política. En especial, Àngels, Manel, Jose y Charo, por su inmenso cariño, sus ánimos, su interés y su disposición a ayudarme en todo lo que he necesitado. A mis cuñad@s, Laura, Marta, Rul y Charly, que después de tantos años son, además de mi familia, los mejores amigos que se puede tener. Gracias por las cenas, los "findes" y veranos en Sant Pol, las fiestas locas y todo lo que hemos vivido.

A cada uno de los miembros de mi increíble familia. A mis padres, Manuela y Antonio, porque gracias a ellos soy lo que soy. Por darlo todo por sus hijos y ser una inspiración para mí. A mis hermanos y sus "apéndices". Noe, Ori y las dos estrellas de la casa Diana y Gina. Gracias chicos por haber traído al mundo dos alegrías que me ayudan a olvidarme de cualquier agobio. También por todos los momentos de *coaching*, risas y *buitonis*. Toni y Laia, gracias por todos los momentos de juega y desconexión. Por convertirme en *Pau Fulas* y ser capaces de arrancarme siempre una sonrisa. A mi Rosita, la nueva bióloga de la casa, que siempre está dispuesta a escuchar mis historias con la máxima atención. Por ser tan dulce y fuerte a la vez y por hacerme sentir orgullosa de sus progresos en la ciencia. Y por último a todos mis ti@s, prim@s y abuel@s, porque aunque les queda un poco lejos esto que estoy haciendo siempre están ahí cuando los he necesitado.

Y para terminar, mi mayor agradecimiento es para el hombre de mi vida: Sergi. Por compartirlo todo conmigo, las alegrías y las penas. Por ver la vida con optimismo y

hacerme reír incluso en los momentos más grises. No sabes lo importante que ha sido para mi tu amor y compañía durante estos últimos años. Gracias por hacerme sentir valorada y transmitirme el orgullo que sientes por mis logros. Te quiero.



***“Lo que sabemos es una gota de agua;
Lo que ignoramos es el océano”***

Isaac Newton

*A mi marido, Sergi
A mis padres, Manuela y Antonio*

ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

4-AA: 4-aminoantipirina

Aa: aminoácido

AAV: virus adenoasociado

Ab: anticuerpo

Abs: absorbancia

AC: autoclavado

ACC1: acetil-CoA carboxilasa, isoforma 1

ACC2: acetil-CoA carboxilasa, isoforma 2

ACL: ATP-citrato liasa

ACS: acil-CoA sintasa

AgRP: péptido relacionado con agouti

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

AMT: *Amsterdam Molecular Therapeutics*

AP: área postrema

ARC: núcleo arcuato del hipotálamo

BBB: barrera hematoencefálica

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

BSA: albumina sérica bovina

BST: núcleo Del lecho de La estría terminal

C75: ácido 4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico

CACT: carnitina acilcarnitina transferasa

CART: transcrito relacionado con cocaína-anfetamina

CCK: colecistoquinina

CoA-SH: coenzima A

COT: carnitina octanoiltransferasa

CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa 1, isoforma hepática

CPT1AM: carnitina palmitoiltransferasa 1, isoforma mutada insensible a malonil-CoA

CPT1B: carnitina palmitoiltransferasa 1, isoforma muscular

CPT1C: carnitina palmitoiltransferasa 1, isoforma cerebral

CPT2: carnitina palmitoiltransferasa 2

CrAT: carnitina acetiltransferasa

CSF: líquido cefalorraquídeo

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DMH: hipotálamo dorsomedial

DMSO: dimetil sulfóxido

DMV: núcleo dorsal motor

DVC: complejo dorsal vagal

EC: endocannabinoide

ECS: sistema de endocannabinoides

FAS: ácido graso sintasa

FFA: ácido graso libre

G-3-P: glicerol-3-fosfato

G-6-Pasa: glucosa-6-fosfatasa

GFP: proteína verde fluorescente

GHS-R: receptor de secretagogos de La hormona del crecimiento (receptor de ghrelina)

GK: gliceroquinasa

GLC: glucosa

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1

GPO: glicerol fosfato oxidasa

GSH: glutatión

GTT: test de tolerancia a la glucosa

HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas

HSPB: proteína de choque térmico, tipo B

i.c.v.: intracerebroventricular

IL-6: interleuquina 6

i.p.: intraperitoneal

IR: receptor de insulina

IRS2: sustrato del receptor de insulina, tipo 2

KB: cuerpo cetónico

K_{ATP} SUR1: subunidad SUR1 del canal de potasio dependiente de ATP

K_{ATP} Kir6.2: subunidad Kir6.2 del canal de potasio dependiente de ATP

LCFA-CoA: aciles-CoA de cadena larga

LHA: hipotálamo lateral

LPL: lipoproteína lipasa

MBH: hipotálamo mediobasal

MC3R: receptor 3 de melanocortinas

MC4R: receptor 4 de melanocortinas

MCD: malonil-CoA decarboxilasa

MCH: hormona concentradora de melanina

MD: malonato decarboxilasa

MLC: *methylene-lacking-C75*, derivados de C75 sin grupo metileno

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

α-MSH: hormona estimuladora de melanocitos

NPY: neuropéptido Y

NPY1R: receptor 1 del neuropéptido Y

NPY5R: receptor 5 del neuropéptido Y

NTS: núcleo Del tracto solitario

OAA: oxalacetato

ObRb: receptor de la hormona leptina

OXM: oxintomodulina

PDH: piruvato deshidrogenasa

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PKC-δ: proteína quinasa C, isoforma δ

POD: peroxidasa

POMC: pro-opiomelanocortina

PP: polipéptido pancreático

PPAR-α: receptor activado por el proliferador de peroxisomas, isoforma α

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

PVH: núcleo paraventricular del hipotálamo

PYY: péptido YY

RCA: área retroquiasmática
RE: retículo endoplasmático
SDS: sodio dodecil sulfato
SNC: sistema nervioso central
Snd: sobrenadante
snoRNA: RNA nucleolar pequeño
SREBP: proteína de unión a elementos regulados por esterol
T3: tri-iodotironina
TAB: tejido adiposo blanco
TAG: triacilglicerol
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamina
TGI: tracto gastrointestinal
TH: tampón de homogenización
TNF- α : factor de necrosis tumora α
UA: unidades arbitrarias
UCP: proteína desacoplante
VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo

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

PRESENTACIÓN

La elevada incidencia de la obesidad y las enfermedades relacionadas han convertido en una prioridad el estudio de los mecanismos destinados a controlar la ingesta y el gasto calórico. Ambos procesos están regulados por las interacciones bidireccionales entre el sistema nervioso central y los órganos periféricos, las cuales permiten crear un mapa del estado energético del organismo y responder en consecuencia ajustando tanto el consumo de alimentos como el gasto de energía.

El hipotálamo es una parte del sistema nervioso central con un papel protagonista en el control de la homeostasis energética. Es una estructura integradora de señales centrales y periféricas implicada en la regulación de varios procesos, entre otros, el apetito.

Durante los últimos años, múltiples estudios han tratado de profundizar en los mecanismos moleculares que, en el hipotálamo, controlan la expresión de los neuropéptidos y neuromoduladores encargados de regular la ingesta. Como resultado se ha demostrado el papel clave que juega el metabolismo de los ácidos grasos en estos procesos. Concretamente, se ha propuesto que moléculas como el malonil-CoA derivado de la glucosa, o los aciles-CoA de cadena larga (LCFA-CoA, *long chain fatty acyl-CoA*) actúan como señales intracelulares de saciedad regulando el apetito. El enzima carnitina palmitoiltransferasa (CPT) 1, cataliza la entrada de LCFA-CoA al interior de la mitocondria, y es el principal regulador de la oxidación de ácidos grasos. A su vez, su actividad se encuentra inhibida por el primer intermediario de la lipogénesis, el malonil-CoA, lo que permite mantener un equilibrio entre la síntesis y la oxidación de las grasas.

En esta Tesis se ha estudiado el efecto que la modulación de CPT1 en el hipotálamo tiene sobre la ingesta de alimentos. Para ello se han utilizado dos aproximaciones experimentales diferentes. En primer lugar se ha sobre-expresado una isoforma permanentemente activa del enzima (CPT1AM) en el núcleo ventromedial del hipotálamo. En segundo lugar se ha estudiado el efecto de la administración central del compuesto anorexigénico C75 que, una vez activado a C75-CoA, actúa como potente inhibidor de CPT1.

Los resultados obtenidos demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en el hipotálamo causa inicialmente hiperfagia y, en un estado posterior, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia. Por otro lado, la inhibición de CPT1 en el hipotálamo tras el tratamiento con C75 produce una disminución de la ingesta y una pérdida de peso aportando nuevas pistas sobre el mecanismo de acción central de C75.

Tomados en conjunto, estos resultados confirman el importante papel que el enzima CPT1 juega en la regulación del apetito. Asimismo, aportan nuevos datos sobre los mecanismos centrales que modulan el metabolismo glucídico. Por otro lado demuestran que la inhibición de CPT1 a nivel central se deriva en una disminución de la ingesta resaltando la importancia de este enzima como diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad.

ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1. Regulación de la homeostasis energética	3
1.1. Ingesta y gasto energético	3
2. Regulación central de la ingesta y el balance energético	12
2.1. Hipotálamo	12
2.2. Tronco del encéfalo	18
3. Metabolismo lipídico en el hipotálamo	20
3.1. Síntesis <i>de novo</i> y oxidación de ácidos grasos	20
3.2. Hipótesis Malonil-CoA	22
3.3. Hipótesis LCFA-CoA	24
3.4. Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)	28
4. Sistema carnitina palmitoiltransferasa	31
4.1. Regulación de CPT1	34
4.2. CPT1 en el hipotálamo y regulación de la ingesta	36
5. C75 disminuye el peso y la ingesta	39
Capítulo 2. OBJETIVOS	47
<hr/>	
Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
<hr/>	
MATERIALES	53
1. C75 y derivados	53
2. Vectores víricos	53
3. Cepas de levadura y vectores plasmídicos	54

4. Oligonucleótidos y sondas	55
MÉTODOS	56
1. Animales y procedimientos	56
1.1. Determinación del peso y la ingesta	56
1.2. Estereotaxis	56
1.2.1. Micro-inyección en el hipotálamo	57
1.2.2. Canulación del ventrículo lateral	58
1.2.3. Canulación bilateral del VMH	58
1.3. Medida de la glucemia y obtención de suero	60
1.4. Test de tolerancia a la glucosa	60
1.5. Diseños experimentales	61
2. Determinación de hormonas en suero	62
3. Determinación de metabolitos	63
3.1. Triacilgliceroles (TAG)	63
3.2. Malonil-CoA	64
4. Cuantificación de aciles-CoA por espectrofotometría de masas	68
4.1. Extracción de aciles-CoA y C75-CoA de hipotálamo	69
4.2. Cuantificación de C75-CoA en hipotálamo	70
4.3. Cuantificación de aciles-CoA de cadena larga en hipotálamo	71
5. Métodos de trabajo con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
5.1. Crecimiento, transformación y selección de los transformantes	72
5.2. Obtención de proteínas recombinantes	75
6. Métodos de trabajo con proteínas	76
6.1. Extracción de proteínas	76
6.2. Cuantificación de proteínas	78
6.3. Ensayo de la actividad enzimática carnitina palmitoiltransferasa	79

6.3.1. Ensayo de la actividad CPT1 en presencia de inhibidores	82
6.3.2. Ensayo de la estabilidad de la unión enzima-inhibidor	82
6.4. <i>Western blot</i>	83
7. Métodos de trabajo con RNA	88
7.1. Extracción de RNA de tejidos	88
7.2. Valoración de la concentración de RNA	89
7.3. RT (<i>reverse transcriptase</i>)-PCR	89
7.3.1. Síntesis de cDNA por transcriptasa inversa	89
7.3.2. Amplificación por PCR	90
7.4. PCR cuantitativa en tiempo real (<i>qRT</i> -PCR)	91
7.4.1. Análisis de los datos	95
7.5. Chip de DNA (<i>DNA microarray</i>)	95
8. Análisis histológicos	96
8.1. Estudio histológico de cerebro	96
8.2. Estudio histológico de tejido adiposo (TAB) e hígado	97
9. Métodos bioinformáticos	98
10. Métodos estadísticos	99
Capítulo 4. RESULTADOS	101
<hr/>	
SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM MEDIANTE VIRUS ADENO-ASOCIADOS	103
1. Sobre-expresión de CPT1AM en cerebro	103
1.1. Efecto sobre la concentración de proteína y actividad CPT1	103
2. Sobre-expresión de CPT1AM en el VMH	104
2.1. Análisis de la infección y los niveles de expresión de CPT1A	105
2.2. Efecto sobre la ingesta, el peso y la adiposidad	106
2.3. Análisis de los niveles de metabolitos y hormonas	108
2.4. Análisis de la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa	109

2.5. Análisis de la expresión génica en hipotálamo	110
2.6. Análisis de la expresión génica en hígado	114
2.7. Análisis de los niveles hepáticos de malonil-CoA y triglicéridos	115
 INHIBICIÓN DE CPT1A POR C75 Y SUS DERIVADOS	 117
1. C75 y C75-CoA	117
1.1. Estructura de C75 y C75-CoA	117
1.2. Efecto sobre la actividad CPT1A <i>in vitro</i>	118
1.3. Estudio de la formación de C75-CoA en hipotálamo	119
1.4. Efecto sobre el peso y la ingesta	121
1.5. Efecto sobre la actividad CPT1 hipotalámica	122
2. Derivados de C75 sin grupo metileno: <i>methylene-lacking-C75</i> (MLCs)	123
2.1. Estructura de los MLCs	123
2.2. Efecto sobre la actividad CPT1A <i>in vitro</i>	123
2.3. Efecto sobre el peso y la ingesta	124
2.4. Efecto sobre la actividad CPT1 hipotalámica	124
2.5. Efecto sobre la concentración hipotalámica de malonil-CoA	124
3. Isómeros de C75	127
3.1. Estructura de los isómeros de C75	127
3.2. Efecto sobre la actividad CPT1A <i>in vitro</i>	127
3.3. Efecto sobre el peso y la ingesta	128
3.4. Efecto sobre la actividad CPT1 hipotalámica	128
3.5. Estudio de la formación de C75- <i>cis</i> -CoA en hipotálamo de rata	129
4. Enantiómeros de C75	131
4.1. Estructura de los enantiómeros de C75	131
4.2. Efecto sobre la actividad CPT1A <i>in vitro</i>	132
4.3. Efecto sobre el peso y la ingesta	133
4.4. Efecto sobre la actividad CPT1 hipotalámica	134

5. Otros derivados de C75	136
5.1. Introducción de un ácido malónico en la posición C-3 de C75: UB-001	136
5.2. Introducción de un grupo carnitina en la posición C-3 de C75: KM079	138

Capítulo 5. DISCUSIÓN	141
------------------------------	------------

1. La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH produce hiperfagia	144
2. La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa	149
3. La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH altera la expresión de snoRNAs y HSPBs en el hipotálamo	150
4. La inhibición de CPT1 en el hipotálamo reduce el peso y la ingesta	155
5. Investigaciones futuras	164

Capítulo 6. CONCLUSIONES	167
---------------------------------	------------

Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA	171
---------------------------------	------------

APÉNDICES	191
------------------	------------

Apéndice 1	193
Apéndice 2	194

PUBLICACIÓN	197
--------------------	------------

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1. Regulación de la homeostasis energética
 2. Regulación central de la ingesta y el balance energético
 3. Metabolismo lipídico en el hipotálamo
 4. Sistema carnitina palmitoiltransferasa
 5. C75 disminuye el peso y la ingesta
-

1. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

A pesar de la elevada incidencia de sobrepeso en las poblaciones actuales, la regulación de la homeostasis energética en mamíferos es un proceso sorprendentemente preciso. Existen complejos sistemas destinados al mantenimiento de un equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. Sin embargo, cuando se instaura un balance calórico positivo crónico, los mecanismos homeostáticos no siempre son capaces de compensar el desequilibrio, lo que conlleva la aparición de obesidad.

Esta patología multifactorial se define como una acumulación de grasa excesiva asociada a problemas de salud. Es, además, un factor de riesgo que incrementa las probabilidades de sufrir otras enfermedades, como diabetes, dolencias cardiovasculares e incluso algunos tipos de cáncer (Friedman, 2000; Flier, 2004). Por todo ello el estudio de los mecanismos que regulan el balance energético es esencial para el entendimiento, la prevención y el tratamiento de la obesidad.

El mantenimiento de este balance depende de la regulación de tres procesos: la ingesta, el gasto de energía y el almacenamiento de un depósito de grasa, que funciona como reserva calórica y permite la adaptación a variaciones ambientales y nutricionales. Estos procesos están minuciosamente regulados por un versátil sistema neuroendocrino capaz de monitorizar el estado metabólico, integrar la información obtenida y responder en consecuencia (Korner, Woods *et al.*, 2009).

1.1. INGESTA Y GASTO ENERGÉTICO

Como ya se ha comentado, las interacciones bidireccionales entre órganos periféricos y sistema nervioso central (SNC) permiten regular la ingesta de alimentos y gasto energético. Las diferentes señales hormonales y nutricionales ejercen su acción sobre el hipotálamo y el tronco del encéfalo. Estos núcleos reciben también información sensorial, horaria, relativa a la situación social y referente al sabor de los alimentos (**Figura 1**).

El papel integrador del cerebro será examinado en profundidad en el siguiente apartado (Introducción, 2). A continuación se analiza la contribución de las señales gastrointestinales, hormonales y metabólicas a la regulación de la ingesta y el gasto energético.

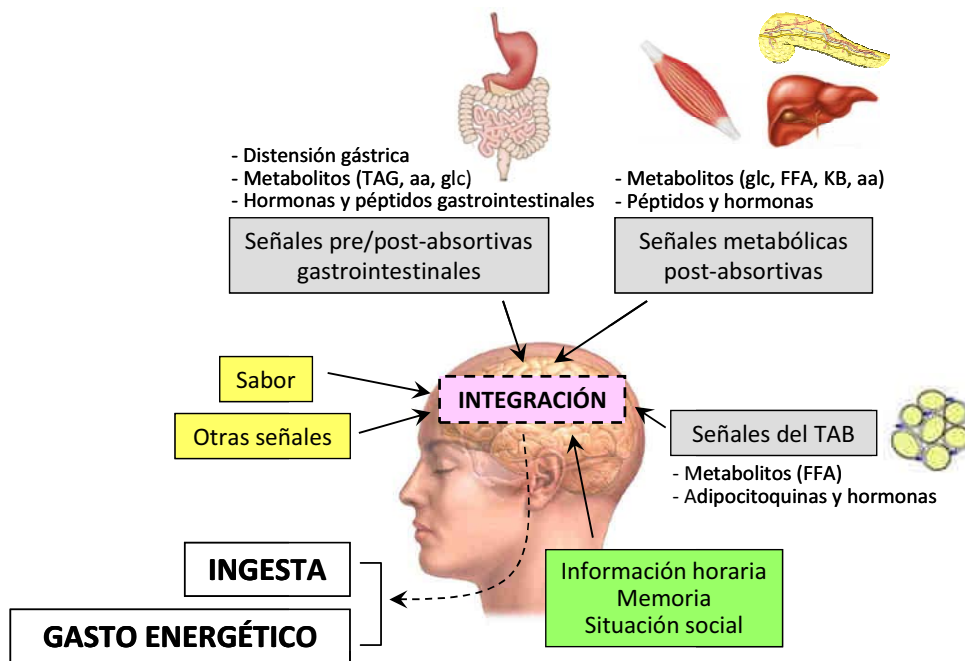


Figura 1. Señales que regulan la ingesta y la homeostasis energética. Las señales hormonales y metabólicas procedentes de órganos periféricos, las señales sensoriales referentes al sabor de los alimentos y la información horaria y sobre la situación social, se integran a nivel del sistema nervioso central (SNC) con el fin de modular la ingesta y el gasto energético. **TAG:** triacilglicérols; **aa:** aminoácidos; **glc:** glucosa; **FFA:** free fatty acids (ácidos grasos libres); **KB:** ketone bodies (cuerpos cetónicos) (Adaptado de Williams y Frühbeck, 2009).

Señales gastrointestinales

El tracto gastrointestinal (TGI) desempeña un papel fundamental en el control de la homeostasis energética, pues además de ser la fuente de diferentes péptidos y hormonas reguladoras del apetito, modula el consumo de alimentos a corto plazo, detectando la cantidad y composición de los nutrientes ingeridos e informando de la misma al SNC. Durante las fases pre- y post-absortiva de la ingesta, el SNC recibe señales procedentes del TGI que actúan limitando la ingesta y contribuyendo a la finalización del acto de comer.

Las primeras evidencias de la existencia de un eje intestino-cerebro fueron aportadas en los años 70, cuando se identificó la colecistoquinina (CCK) como la primera hormona intestinal capaz de afectar al apetito (Gibbs, Young *et al.*, 1973). Desde entonces se han identificado otras hormonas y péptidos gastrointestinales con un papel en la regulación de la ingesta (**Tabla 1**).

Grelina

La grelina es una hormona peptídica producida, principalmente, por el estómago descubierta en el año 1999 como un ligando endógeno del receptor de secretagogos de la GH (*growth hormone*, hormona del crecimiento) (GHS-R) (Kojima, Hosoda *et al.*, 1999). Es la única hormona periférica con efecto orexigénico (incrementa la ingesta) descubierta hasta el día de hoy.

Se trata de un péptido de 28 aa que requiere de la octanoilación post-traducciona para ejercer su actividad biológica. Disminuye la utilización de grasas (Ueno, Yamaguchi *et al.*, 2005) y tiene la capacidad de estimular el apetito (Wren, Small *et al.*, 2000; Nakazato, Murakami *et al.*, 2001), siendo una importante señal para iniciar la ingesta de alimentos (Cummings, Purnell *et al.*, 2001). La expresión y secreción de esta hormona se incrementan durante el ayuno o cuando hay una pérdida de peso.

Señales hormonales

Además de los péptidos gastrointestinales, varias hormonas secretadas por el tejido adiposo y otros órganos endocrinos actúan en el SNC modulando la ingesta y el gasto energético.

Tejido adiposo blanco (TAB)

La masa adiposa se encuentra regulada por cambios compensatorios en la ingesta y el gasto calórico, en respuesta a variaciones en el estado energético global. Esta habilidad es esencial para la supervivencia, pues permite la adaptación a situaciones ambientales diversas evitando grandes fluctuaciones en el peso corporal.

Las señales procedentes del TAB, o relacionadas directamente con él, actúan en el sistema nervioso central (SNC) para regular tanto la ingesta como la movilización o el acúmulo de grasa (Kaiyala, Woods *et al.*, 1995; Baskin, Figlewicz Lattemann *et al.*, 1999; Sandoval, Cota *et al.*, 2008). Desde el descubrimiento de la hormona anorexigénica leptina se generó un cambio en la visión de este tejido, que pasó a considerarse un órgano endocrino con capacidad de integrar señales metabólicas y

responder en consecuencia modulando la secreción de diferentes hormonas y adipocitoquinas con capacidad de regular la ingesta (**Tabla 1**).

Leptina

Antes del descubrimiento de esta hormona en los años 90 (Zhang, Proenca *et al.*, 1994), los estudios con modelos de animales obesos y diabéticos ya señalaron la existencia de un factor circulante, proporcional a la cantidad de grasa, con capacidad de regular la ingesta. Estos estudios se basaron en la utilización de parejas de animales parabióticos, forzadas a compartir un mismo flujo sanguíneo a través de una conexión vascular. Los primeros experimentos se realizaron en los años 60 con ratas hiperfágicas y obesas debido a una lesión en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) (Hervey, 1959). En la década siguiente se realizaron estudios similares con ratones genéticamente obesos (*ob/ob*) y diabéticos (*db/db*) (Coleman, 1973). Todos los resultados obtenidos sugerían la existencia de un factor de saciedad (ausente en los animales *ob/ob*) capaz de unirse a un receptor (ausente en los animales *db/db*), causando la disminución de la ingesta y el aumento del gasto energético. Se especuló que este factor ejercía su acción en el hipotálamo, pues las ratas con lesiones en el VMH resultaron insensibles al mismo. 20 años después, se descubrió que los animales obesos sufrían un déficit de leptina, mientras los animales *db/db* presentaban una mutación en el receptor de esta hormona (ObRb).

A pesar de su efecto sobre el peso y la ingesta, los niveles de leptina son muy altos en individuos obesos y, de hecho, la administración exógena de la misma no tiene un efecto significativo en estos pacientes. Únicamente los individuos con una deficiencia congénita responden, perdiendo peso, a la administración de leptina (Farooqi, Matarese *et al.*, 2002). De igual manera, esta hormona es incapaz de regular el apetito y la masa corporal de ratones con obesidad inducida por la dieta. Esto se debe a la aparición de resistencia a la leptina, un estado metabólico definido por la incapacidad de esta hormona en ejercer su efecto fisiológico.

Páncreas endocrino

La parte endocrina del páncreas se encarga de sintetizar y liberar diferentes péptidos y hormonas a la circulación. Algunas, como la insulina, tienen un importante

papel en la regulación del apetito y el mantenimiento de la homeostasis energética (Tabla 1).

Insulina

Se trata de una hormona polipeptídica de 51 aa producida y secretada por las células- β del páncreas. Ejerce diferentes acciones sobre sus órganos diana, todas encaminadas a mantener la glucemia constante. Estimula la captación de glucosa y la glucogénesis e inhibe la gluconeogénesis y la glucogenolisis.

En el cerebro el receptor de insulina se expresa ampliamente, sin embargo se encuentran concentraciones especialmente altas en zonas específicas como el bulbo olfativo, el hipocampo, la corteza cerebral y el hipotálamo. Especialmente en el hipotálamo, esta hormona tiene un importante efecto en la regulación del peso y la ingesta. La administración central de insulina produce una pérdida de apetito mientras que la disminución selectiva de su receptor en el hipotálamo causa hiperfagia y resistencia sistémica a la insulina (Brüning, Gautam *et al.*, 2000; Obici, Feng *et al.*, 2002 (a)).

Asimismo, los niveles circulantes de esta hormona están estrechamente relacionados con la masa adiposa y, junto a la leptina, sirven como señal informativa de la adiposidad periférica para el SNC.

Otras glándulas endocrinas

Los glucocorticoides derivados de la glándula adrenal tienen un importante efecto sobre la modulación del apetito (Dallman, la Fleur *et al.*, 2004). La deficiencia de cortisol produce anorexia mientras que un exceso causa hiperfagia. Los efectos sobre la ingesta de los glucocorticoides se deben a su acción sobre neuronas hipotalámicas (Makimura, Mizuno *et al.*, 2000; Drazen, Wortman *et al.*, 2003).

Las hormonas esteroideas derivadas de las gónadas también están implicadas en la regulación del apetito. Se ha observado que el estradiol causa una reducción en el peso y la ingesta a través de su acción en el hipotálamo (Gao, Mezei *et al.*, 2007).

Igualmente, las hormonas tiroideas son capaces de modular el balance energético. La acción de la tri-iodotironina (T3) en el SNC produce un aumento de la ingesta independientemente del gasto de energía (Kong, Martin *et al.*, 2004).

En la **Tabla 1** se resumen las principales señales endocrinas con un papel en la regulación del balance energético.

Señales metabólicas

La ingesta de alimentos es necesaria para la obtención de sustratos energéticos, como la glucosa o los ácidos grasos. Por este motivo, resulta lógico que los niveles circulantes de estos metabolitos sean capaces de regular el apetito.

Múltiples evidencias demuestran que variaciones en la disponibilidad y utilización de los diferentes nutrientes controlan la ingesta (Mayer y Thomas, 1967; Langhans, 1996; Leonhardt y Langhans, 2004). Por ejemplo, la administración parenteral de glucosa o ácidos grasos inhibe el consumo de alimentos mientras el bloqueo farmacológico de la utilización de estos nutrientes estimula el apetito (Langhans, Wiesenreiter *et al.*, 1983; Langhans, 1996). Los cambios en su disponibilidad pueden ser monitorizados por el SNC y órganos periféricos, contribuyendo a la regulación de la homeostasis energética.

De hecho, en el hipotálamo existen poblaciones de neuronas glucosensoras capaces de utilizar glucosa y otros metabolitos como moléculas señalizadoras, respondiendo a los cambios en la concentración extracelular de las mismas. Estas neuronas se dividen en dos grupos, GE (*glucose-excited*) y GI (*glucose-inhibited*). Las primeras incrementan y las segundas disminuyen su actividad cuando los niveles de glucosa extracelular aumentan (Song, Levin *et al.*, 2001). La actividad de estas neuronas controla la función de tejidos periféricos, incluyendo la parte endocrina del páncreas. De hecho, se ha propuesto que el efecto central de la insulina sobre la homeostasis energética está mediado, al menos en parte, por estas neuronas glucosensoras (Cotero y Routh, 2009).

El metabolismo de los ácidos grasos en el SNC también resulta crucial en el mantenimiento del balance energético. Se ha demostrado que la concentración de

ácidos grasos puede ser monitorizada por el hipotálamo, afectando la ingesta, el gasto de energía y la producción de glucosa hepática (Obici, Feng *et al.*, 2002 (b); Hu, Cha *et al.*, 2003; Obici, Feng *et al.*, 2003).

Los estudios más recientes sugieren que la disponibilidad y utilización de los diferentes nutrientes, así como la relación entre unos y otros, permite elaborar un mapa sobre el estado metabólico de manera que la ingesta y la termogénesis se ajusten en consecuencia, con el objetivo de mantener el balance energético. Esta idea sugiere la existencia de un sensor celular capaz de monitorizar las señales relativas al estado metabólico. Recientemente se le ha atribuido este papel a dos proteínas quinasa, AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que poseen un papel clave en la integración de la información periférica en el hipotálamo (Minokoshi, Alquier *et al.*, 2004; Cota, Proulx *et al.*, 2006).

Péptidos y hormonas reguladoras del apetito

Hormona/Péptido	Secreción	Efecto
Grelina	Estómago	↑ Ingesta ↓ Gasto energético
Obestatina	Estómago	↓ Ingesta ↓ Peso
Colecistoquinina (CCK)	Intestino	↓ Ingesta (saciedad)
Péptido YY	Intestino	↓ Ingesta (saciedad)
Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)	Intestino	↓ Ingesta (saciedad) ↓ Almacenamiento de grasa
Oxintomodulina (OXM)	Mucosa gástrica	↓ Ingesta (saciedad)
Leptina	TAB	↓ Ingesta ↑ Gasto energético
Adiponectina	TAB	↓ Resistencia a la insulina ? Ingesta ? Gasto energético
Resistina	Adipocitos (roedores) Macrófagos (humanos)	↑ Resistencia a la insulina ? Ingesta ? Gasto energético
TNF- α	TAB	↓ Ingesta ↑ Gasto energético
IL-6	TAB	? Ingesta ↑ Gasto energético
Insulina	Célula- β páncreas	↓ Ingesta
Polipéptido pancreático	Celula PP páncreas	↓ Ingesta (saciedad)
Glucocorticoides	Glándula adrenal	↑ Ingesta
Estradiol	Ovarios	↓ Ingesta
Hormonas tiroideas	Glándula tiroides	↑ Ingesta

Tabla 1. Principales péptidos y hormonas reguladoras de la ingesta y el gasto energético (Coll, Farooqi et al., 2007).

Sistema de endocannabinoides

Las señales destinadas a regular la homeostasis energética están moduladas por el sistema de endocannabinoides (ECS, *endocannabinoid system*). Su descubrimiento se remonta a los años 90, cuando se identificaron los receptores CB1 (Matsuda, Lolait *et al.*, 1990) y CB2 (Munro, Thomas *et al.*, 1993), a los que se une el principio activo del cannabis. Poco tiempo después, se hallaron nuevos ligandos endógenos de estos receptores que pasaron a denominarse endocannabinoides (EC).

Los EC son lípidos bioactivos derivados de los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*), siendo el N-araquidonoiletanolamida (AEA o anandamida) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) los EC más estudiados (Di Marzo y Fontana, 1995; Sugiura, Kondo *et al.*, 1995).

El ECS controla la ingesta y el balance energético a través de su acción central y periférica (**Tabla 2**) jugando un papel principal en la comunicación entre el SNC y otros órganos. Su activación se traduce, básicamente, en un aumento del apetito y el peso (Kim, Li *et al.*, 2011). La desregulación en este sistema se ha asociado con trastornos alimenticios, patologías cardiovasculares y obesidad por lo que se ha convertido en una buena diana terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades (Di Marzo y Matias, 2005; Maccarrone, Gasperi *et al.*, 2010).

Activación del ECS	
<i>Lugar de acción</i>	<i>Efecto</i>
Cerebro	↑ Ingesta
TGI	↓ Saciedad, ↑ Asimilación de alimentos
TAB	↓ Adiponectina y leptina, ↑ Lipogénesis
Hígado	↑ Lipogénesis
Páncreas	↑ Insulina
Músculo	↓ Captación de glucosa y oxidación de ácidos grasos

Tabla 2. Respuesta a la activación del sistema de endocannabinoides.

2. REGULACIÓN CENTRAL DE LA INGESTA Y EL BALANCE ENERGÉTICO

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, el papel integrador del SNC es crucial en el mantenimiento de la homeostasis energética. El hipotálamo y el tronco del encéfalo son las partes encargadas del control de estos procesos. Ambos núcleos se encuentran íntimamente ligados a través de conexiones neuronales, lo que permite integrar todas las señales recibidas. Éstas son tanto de tipo neural como humoral. Las primeras consisten en fibras del nervio vago aferentes que proceden, principalmente, del hígado y el TGI, y desembocan en el tronco del encéfalo. Las segundas incluyen péptidos, hormonas y metabolitos circulantes, que ejercen su acción principalmente en el hipotálamo.

A lo largo de este apartado se detallan las principales características del hipotálamo y el tronco del encéfalo y se analiza su papel en el control de la ingesta y el balance energético.

2.1. HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una pequeña parte del SNC localizada justo debajo del tálamo, a ambos lados del tercer ventrículo, en la parte inferior del encéfalo (**Figura 2 A**). Se trata de una estructura integradora de señales centrales y periféricas implicada en el control diario de un gran número de procesos como la temperatura corporal, la presión sanguínea o la sed y el apetito. Está estructurado, anatómicamente y funcionalmente, en núcleos neuronales bien definidos que conectan entre sí a través de proyecciones axonales, estableciendo una compleja red neuronal (**Figura 2 B**).

Los primeros estudios que demostraron el papel del hipotálamo en la regulación de la ingesta se remontan a los años 40. Se observó la aparición de hiperfagia y obesidad en ratas con lesiones en el núcleo ventromedial (VMH) por lo que este núcleo pasó a considerarse un “centro de saciedad” (Hetherington y Ranson, 1942). Posteriormente se demostró que lesiones en el hipotálamo lateral (LHA) provocan hipofagia mientras que en los núcleos arcuato (ARC) y paraventricular (PVH) causan aumento de la ingesta y el peso (Olney, 1969).

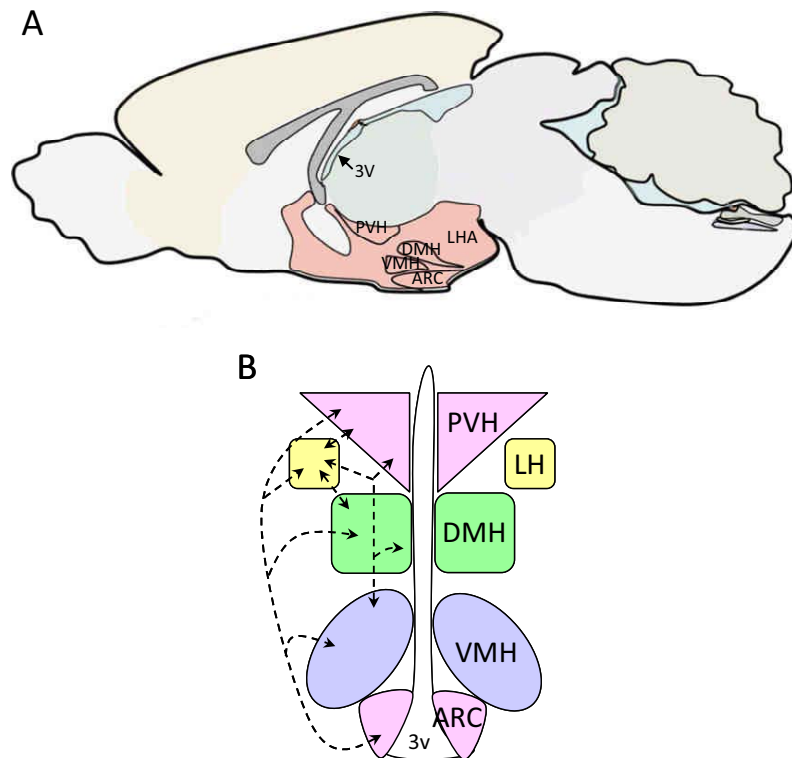


Figura 2. Localización y estructura anatómica del hipotálamo. (A) Esquema de un corte sagital del encéfalo de rata en el que se muestra la localización del hipotálamo y la disposición de los diferentes núcleos (Adaptado de Smith y Ferguson, 2008). (B) Esquema de un corte coronal del cerebro en el que se muestra la disposición relativa de los núcleos hipotalámicos y las conexiones neuronales que establecen entre sí (líneas punteadas). **3v**: tercer ventrículo; **ARC**: núcleo arcuato; **VMH**: núcleo ventromedial; **DMH**: núcleo dorsomedial; **LH**: hipotálamo lateral; **PVH**: núcleo paraventricular.

Núcleo arcuato (ARC)

El ARC está considerado como el núcleo clave en la regulación del apetito. Se localiza próximo a la eminencia media y los capilares fenestrados de la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*), por lo que es capaz de integrar gran cantidad de señales humorales. En el ARC existen dos poblaciones neuronales claramente diferenciadas. La primera co-expresa los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP, y su estimulación conlleva un aumento de la ingesta (Hahn, Breininger *et al.*, 1998). La segunda co-expresa los neuropéptidos anorexigénicos POMC y CART y su activación produce una disminución de la ingesta (Broberger, De Lecea *et al.*, 1998). Estas poblaciones neuronales están consideradas de primer orden ya que responden directamente a los niveles circulantes de metabolitos y hormonas. Sus proyecciones

axonales alcanzan áreas hipotalámicas de segundo orden, como el PVH o el DMH (Bouret, Draper *et al.*, 2004).

Neuronas POMC / CART

El procesamiento proteolítico del neuropéptido POMC (pro-opiomelanocortina) produce melanocortinas, que ejercen su acción biológica al unirse a los receptores MC3R y MC4R presentes en el hipotálamo (Mountjoy, Mortrud *et al.*, 1994; Kishi, Aschkenasi *et al.*, 2003). Estos receptores se expresan en los núcleos ARC, VMH y, especialmente, en el PVH. Las melanocortinas derivadas de las neuronas POMC se unen a sus receptores lo que produce una inhibición de la ingesta (Balthasar, Dalgaard *et al.*, 2005). De hecho la pérdida de señalización a través de MC4R o la deficiencia en POMC causa hiperfagia, disminución del gasto energético y obesidad (Huszar, Lynch *et al.*, 1997; Yaswen, Diehl *et al.*, 1999). El neuropéptido AgRP es un antagonista endógeno de los receptores MC3R y MC4R y su efecto orexigénico se debe a su acción inhibitoria sobre las neuronas POMC. Esto sugiere que la inhibición de la ingesta y el aumento del gasto energético mediado por las melanocortinas se mantienen hasta que los requerimientos energéticos activan las neuronas AgRP, que se encargan de frenar la acción anorexigénica de esta vía (Bagnol, Lu *et al.*, 1999).

Estudios recientes han demostrado la importancia del sistema de las melanocortinas en la regulación de la homeostasis energética en humanos. Se han identificado más de 90 mutaciones en el gen de MC4R, causantes de, aproximadamente, el 6% de la obesidad temprana en humanos (Farooqi, Keogh *et al.*, 2003; Simpson, Martin *et al.*, 2009).

La mayoría de las neuronas POMC co-expresan el neuropéptido CART. Éste se expresa en el ARC, pero también en el DMH, LHA y PVH (Couceyro, Koylu *et al.*, 1997). La administración central de este péptido produce hipofagia, mientras que la administración de un antisuero anti-CART produce hiperfagia (Kristensen, Judge *et al.*, 1998). Curiosamente, impidiendo el flujo de líquido cefalorraquídeo (CSF, *cerebrospinal fluid*) entre el tercer y cuarto ventrículo cerebral se inhibe el efecto anorexigénico de la administración de CART, sugiriendo que sus efectos tienen lugar en el tronco del encéfalo más que en el hipotálamo (Aja, Sahandy *et al.*, 2001). El papel de

CART como regulador de la ingesta es controvertido, pues otros estudios han demostrado que la administración aguda de este péptido en el VMH o el ARC produce un aumento en la ingesta (Abbott, Rossi *et al.*, 2001) y la sobre-expresión del mismo produce un aumento del peso e hiperfagia (Kong, Stanley *et al.*, 2003). Por otro lado, el ratón transgénico CART-/- no muestra alteraciones ni en el peso ni en la ingesta cuando se alimenta con dieta normal (Asnicar, Smith *et al.*, 2001). Todos estos resultados sugieren que CART puede tener acciones orexigénicas o anorexigénicas dependiendo del circuito hipotalámico sobre el que actúa.

Neuronas NPY / AgRP

El neuropéptido NPY es uno de los principales reguladores del peso corporal por su acción sobre la ingesta. Actúa sobre 5 receptores diferentes (Y1 – Y5) sin embargo parece que ejerce su efecto orexigénico a través de su unión a los receptores NPY1R y NPY5R. Los niveles de este neuropéptido dependen del estado nutricional. Su expresión y secreción se incrementan durante el ayuno y disminuyen tras la alimentación (Sanacora, Kershaw *et al.*, 1990; Swart, Overton *et al.*, 2001). La mayoría de las neuronas NPY co-expresan el neuropéptido AgRP. Éste es un antagonista de los receptores MC3R y MC4R, por lo que bloquea la señal anorexigénica de las melanocortinas. La administración central de NPY en ratas estimula la ingesta (Clark, Kalra *et al.*, 1984) mientras que la ablación de las neuronas NPY /AgRP en ratones causa hipofagia y disminución del peso (Bewick, Gardiner *et al.*, 2005).

Las neuronas NPY /AgRP proyectan sus axones hacia otros núcleos hipotalámicos, como el PVH, DMH y LHA (Broberger, De Lecea *et al.*, 1998; Bagnol, Lu *et al.*, 1999). La estimulación de la vía NPY/AgRP produce un aumento de la ingesta debido a la acción directa del NPY sobre los receptores NPY1R y NPY5R y a la acción antagónica del AgRP sobre los receptores MC3R y MC4R.

Núcleo ventromedial (VMH)

Entre los años 1940–80 se publicaron muchos estudios sobre el efecto de lesiones y estimulaciones del núcleo VMH y su implicación en la ingesta (King, 2006).

Los experimentos demostraron que lesiones en este núcleo producen hiperfagia y obesidad, por lo que pasó a considerarse un “centro de saciedad” (Kennedy, 1950).

Actualmente, el VMH está considerado como un núcleo integrador de señales centrales y periféricas, con un papel clave en la regulación de la ingesta y la homeostasis energética. Las neuronas del VMH contienen un gran número de receptores de neuropéptidos, neurotransmisores (dopamina, serotonina) y hormonas (leptina, grelina, hormonas tiroideas, estrógenos) con un papel relevante en la regulación del apetito (King, 2006). Asimismo el VMH contiene un gran número de neuronas glucosensoras que responden a la concentración extracelular de glucosa (Anand, Chhina *et al.*, 1964; Kang, Routh *et al.*, 2004). Además, este núcleo envía señales periféricas eferentes, vía sistema nervioso simpático, implicadas en regular procesos catabólicos como la gluconeogénesis, la lipólisis y el aumento del apetito (Uyama, Geerts *et al.*, 2004). De manera que el VMH está implicado, no solo en la modulación de la ingesta, sino también en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, *brain derived neurotrophic factor*) se expresa abundantemente en las neuronas del VMH. Esta proteína, de la familia de las neurotrofinas, tiene un papel en la regulación del apetito y su administración central causa hipofagia y disminución del peso (Pelleymounter, Cullen *et al.*, 1995). Su expresión está regulada por el estado nutricional y por el sistema de las melanocortinas. Se cree que las neuronas POMC del ARC activan las neuronas BDNF del VMH para producir una disminución de la ingesta (Xu, Goulding *et al.*, 2003).

Las neuronas del VMH envían proyecciones axonales a diferentes núcleos cerebrales, tanto dentro como fuera del hipotálamo. Dentro del hipotálamo conectan con los núcleos PVH, DMH, ARC, LHA y con el área retroquiasmática (RCA) que rodea el núcleo supraquiasmático. Fuera del hipotálamo, conectan principalmente con el tronco del encéfalo, la amígdala, el BST (*bed nucleus of the stria terminalis*) y la sustancia gris periacueductal (McClellan, Parker *et al.*, 2006; López, Lelliott *et al.*, 2007).

Núcleo paraventricular (PVH)

El PVH tiene un importante papel en el control de la ingesta, ya que es lugar de convergencia de señales neuronales implicadas en regular este proceso. La inyección de prácticamente todos los péptidos orexigénicos conocidos en este núcleo causa un aumento de la ingesta, mientras que las lesiones en el mismo producen hiperfagia y aumento de peso.

Las neuronas NPY / AgRP del núcleo ARC conectan con neuronas de segundo orden de este núcleo para generar una respuesta orexigénica. Se ha descrito que las neuronas del PVH que contienen hormona liberadora de tirotropina (TRH, *thyrotrophin releasing hormone*) están implicadas en la regulación de estos procesos (Martin, Smith *et al.*, 2006).

Hipotálamo lateral (LHA)

El LHA fue considerado, durante mucho tiempo, como el centro del hambre. Al contrario que con el VMH, las lesiones en este núcleo producen hipofagia y pueden llevar a la muerte del animal por inanición.

Las neuronas del LHA contienen el neuropéptido orexigénico MCH (*melanin concentrating hormone*) y otras orexinas y reciben proyecciones axonales desde otros núcleos hipotalámicos, principalmente el ARC. Las fibras MCH proyectan, a su vez, a diferentes áreas cerebrales, como los núcleos ARC y VMH, la corteza y el tronco del encéfalo (Bittencourt, Presse *et al.*, 1992; Simpson, Martin *et al.*, 2009).

Hipotálamo dorsomedial (DMH)

El papel del DMH en el control de la ingesta es similar al del VMH y PVH. Está considerado como un centro integrador de señales y las lesiones en este núcleo causan hiperfagia y obesidad (Bernardis y Bellinger, 1987).

El DMH recibe proyecciones desde el ARC y contiene fibras α -MSH que proyectan a otros núcleos, como el PVH. También se ha descrito la existencia de una pequeña población de neuronas NPY en el DMH y, de hecho, la expresión de este neuropéptido se ha encontrado aumentada en animales obesos (Kesterson, Huszar *et*

al., 1997; Guan, Yu *et al.*, 1998). El papel de las neuronas NPY del DMH en el control de la ingesta y la homeostasis energética ha cobrado importancia a raíz de estudios recientes en los que se ha demostrado que la sobre-expresión de este neuropéptido en el DMH causa hiperfagia y aumento de peso mientras que la inhibición del mismo mejora el fenotipo de las ratas obesas OLETF (Kinzeler y Edwards, 2009; Yang, Scott *et al.*, 2009).

2.2. TRONCO DEL ENCÉFALO

El tronco del encéfalo es la parte posterior del cerebro donde se une el mesencéfalo, el puente troncoencefálico y el bulbo raquídeo. Esta parte del SNC recibe gran cantidad de información periférica en forma de fibras aferentes que desembocan en el complejo vagal dorsal (DVC, *dorsal vagal complex*). El DVC está formado por el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus of the solitary tract*), el núcleo motor dorsal del vago (DMV, *dorsal motor nucleus*) y el área postrema (AP) (Rinaman, 2003) (**Figura 3**). De manera similar a lo que ocurre en la parte basal del hipotálamo, en la zona del NTS y el AP se encuentran capilares fenestrados que permiten el paso de factores circulantes, como metabolitos y hormonas (Cunningham, Miselis *et al.*, 1994). Por todo ello, el tronco del encéfalo es una pieza clave en la integración de señales metabólicas para la regulación de la ingesta y el mantenimiento del balance energético.

Las fibras vagales aferentes procedentes del TGI que llegan al tronco del encéfalo son sensibles a cambios en la distensión gástrica, la cantidad y composición de los nutrientes ingeridos y los péptidos gastrointestinales como la CCK (Mathis, Moran *et al.*, 1998; Schwartz, 2000) y, en respuesta a estos estímulos, producen la activación de las neuronas del NTS y la disminución de la ingesta (Monnikes, Lauer *et al.*, 1997; Rinaman, Baker *et al.*, 1998).

Junto a las señales gastrointestinales generadas durante el consumo de alimentos, el NTS integra también señales adiposas. De hecho, la administración exógena de leptina disminuye la cantidad de alimento ingerido, sin afectar a la frecuencia, sugiriendo que esta hormona podría regular el *feedback* negativo generado en el TGI durante el proceso de ingesta (Eckel, Langhans *et al.*, 1998; Kahler, Geary *et al.*, 1998). Esta hipótesis se ha visto apoyada por estudios posteriores en los que se

comprobó que la administración de leptina, en presencia de CCK u otros estímulos gastrointestinales, produce una mayor activación de las neuronas del NTS (Emond, Schwartz *et al.*, 1999; Emond, Ladenheim *et al.* 2001).

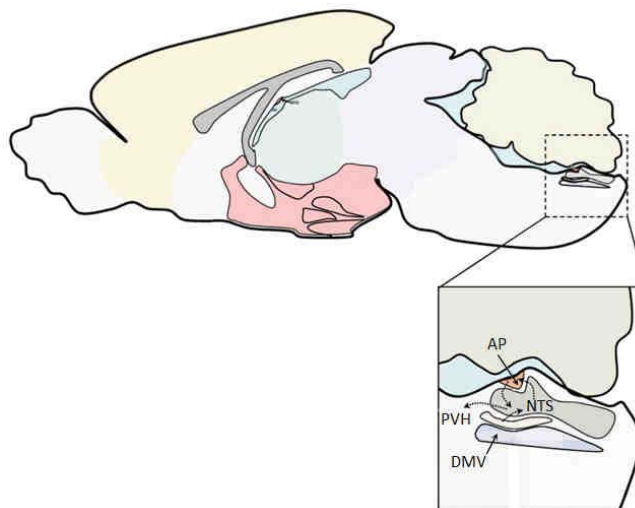


Figura 3. Localización y estructura anatómica del tronco del encéfalo. Esquema de un corte sagital del encéfalo de rata en el que se muestra la localización del tronco del encéfalo y un detalle con los núcleos que lo forman. (Adaptado de Smith y Ferguson, 2008).

Las neuronas del NTS también conectan bilateralmente con diferentes núcleos hipotalámicos, generando un complejo circuito neuronal. El NTS contiene un sistema de melanocortinas, similar al que se encuentra en el ARC. De hecho, la sobre-expresión de POMC en las neuronas del NTS disminuye la ingesta y la administración del agonista de los receptores MC3R y MC4R, melanotan II, causa el mismo fenotipo hipofágico (Azzara, Sokolnicki *et al.*, 2002; Schwartz, 2006). Asimismo, las neuronas POMC del NTS se activan tras la administración de CCK y otras señales de saciedad, siendo necesaria la activación del receptor MC4R para la inhibición de la ingesta producida por el péptido CCK (Fan, Ellacott *et al.*, 2004).

3. METABOLISMO LIPÍDICO EN EL HIPOTÁLAMO

Las neuronas hipotalámicas alteran la síntesis de neuropéptidos y neuromoduladores con el propósito de ajustar la ingesta. Los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estos factores no están del todo claros, sin embargo varios estudios han resaltado la importancia del metabolismo lipídico en este proceso.

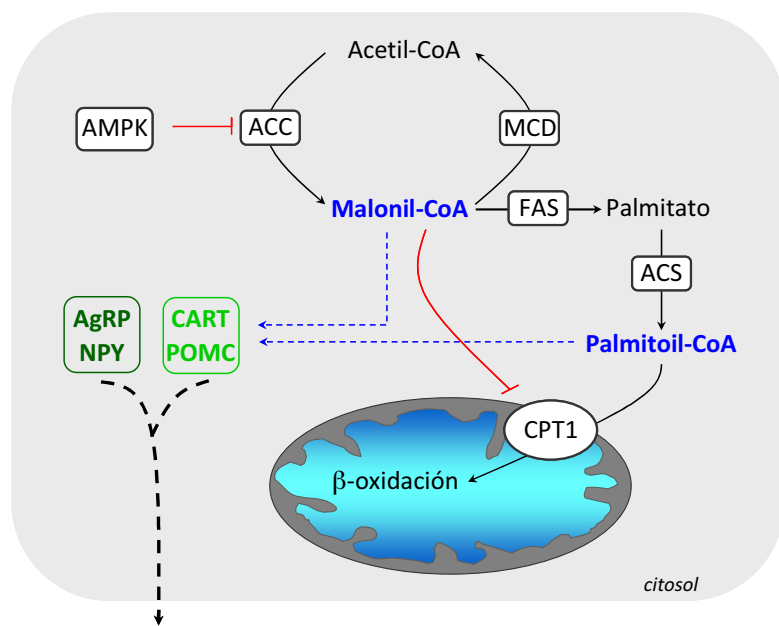
Existen dos hipótesis al respecto. La primera sugiere que la molécula de malonil-CoA es la señal que desencadena la síntesis de neuropéptidos y neuromoduladores encargados de regular la ingesta (hipótesis malonil-CoA). La segunda apunta que esta molécula señalizadora son los ácidos grasos de cadena larga unidos a coenzima A (LCFA-CoA, *long chain fatty acyl-CoA*) (hipótesis LCFA-CoA), que actuarían como señal de saciedad en el hipotálamo. A pesar de que se han descrito como hipótesis diferentes, cabe destacar que se trata de ideas estrechamente relacionadas debido al paralelismo que existe entre las concentraciones de malonil-CoA y LCFA-CoAs (ver **Figura 4** e Introducción 3.2 y 3.3).

3.1. SÍNTESIS *DE NOVO* Y OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son moléculas esenciales debido a la gran cantidad de funciones que realizan. Son una reserva energética, forman parte de las membranas celulares, son necesarios para algunas modificaciones de proteínas y tienen una importante función reguladora como precursores de moléculas señalizadoras. Los ácidos grasos provienen de la dieta o de la síntesis *de novo*, catalizada por el enzima ácido graso sintasa (FAS, *fatty acid synthase*).

El enzima FAS utiliza como sustratos acetil-CoA y malonil-CoA para generar el producto palmitato (C16:0) (Semenkovich, 1997), precursor de los demás ácidos grasos. El acetil-CoA se produce por la decarboxilación del piruvato derivado de la glucólisis, reacción catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH). Este acetil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico y es exportado al exterior de la mitocondria en forma de citrato que se reconvierte a acetil-CoA y oxalacetato (OAA), por acción del enzima ATP-citrato liasa (ACL). El malonil-CoA es generado a partir de acetil-CoA y CO₂ por acción del enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). Existen dos isoformas de este enzima, ACC1 se localiza en el citoplasma y es la forma mayoritaria en tejidos

lipogénicos (TAB). ACC2 se asocia a la mitocondria y se expresa principalmente en tejidos oxidativos (músculo) donde tiene funciones más reguladoras que biosintéticas (Thampy, 1989; Bianchi, Evans *et al.*, 1990). La reacción catalizada por ACC es reversible y el enzima malonil-CoA decarboxilasa (MCD) cataliza la formación de acetyl-CoA a partir de malonil-CoA (Dyck, Barr *et al.*, 1998). Esto permite modular los niveles de este metabolito, que tiene un importante papel regulador manteniendo un balance entre la síntesis y la oxidación de ácidos grasos.



REGULACIÓN de la INGESTA

Figura 4. Metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo y regulación de la ingesta. Los niveles de malonil-CoA dependen de la actividad de tres enzimas, ACC, MCD y FAS. La primera cataliza la síntesis de malonil-CoA, la segunda su degradación y la tercera utiliza esta molécula como sustrato para la síntesis de ácidos grasos (palmitato). Una vez el palmitato es esterificado a palmitoil-CoA, por acción de la acil-CoA sintasa (ACS), puede ser internalizado en la mitocondria, donde es β-oxidado. Este paso está catalizado por CPT1. Este enzima es inhibido por malonil-CoA, lo que permite mantener un equilibrio entre la síntesis y oxidación de grasas. Los metabolitos malonil-CoA y LCFA-CoA (palmitoil-CoA) se han propuesto como señalizadores en la regulación de la síntesis de los neuropéptidos implicados en el control de la ingesta.

En el cerebro los enzimas de la vía de síntesis de ácidos grasos se expresan de manera constitutiva, pues tanto neuronas como células gliales necesitan los lípidos para mantener sus funciones básicas. Sin embargo, es de destacar la elevada expresión de los mismos en núcleos hipotalámicos como el VMH o el ARC. Además, los enzimas

de esta ruta se regulan en función del estado nutricional, sugiriendo que tienen una función en la regulación del apetito (Dowell, Hu *et al.*, 2005) (**Figura 4**). Los estudios basados en la manipulación genética y farmacológica de dichas enzimas confirmaron este papel en la modulación de la homeostasis energética (ver Introducción 3.2 y 3.3).

Uno de los principales reguladores de la síntesis de ácidos grasos es la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). Su actividad está modulada por diferentes estímulos y una vez activada fosforila e inhibe ACC, deteniendo la síntesis de malonil-CoA (Kudo, Barr *et al.*, 1995). El papel de AMPK en la regulación de la ingesta será examinado en profundidad más adelante (Introducción, 3.4).

El malonil-CoA es un inhibidor fisiológico de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), enzima que cataliza el paso de los ácidos grasos desde el citoplasma al interior de la mitocondria y principal regulador de la β -oxidación (McGarry y Brown, 1997). Existen tres isoformas del enzima, aunque solo CPT1A y CPT1C se expresan en cerebro. Además, la segunda se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y no participa en la β -oxidación (Sierra, Gratacós *et al.*, 2008). En el apartado 4 de la Introducción se profundiza en el papel de este enzima en la regulación del apetito.

3.2. HIPÓTESIS MALONIL-CoA

Esta hipótesis sostiene que un aumento en la concentración de malonil-CoA en el hipotálamo es una señal intracelular de saciedad que se traduce en una reducción de la ingesta, mientras que la disminución de malonil-CoA se traduce en un aumento del consumo de alimentos.

Se apoya en diferentes estudios y coloca al malonil-CoA en el centro de la regulación del apetito (Hu, Dai *et al.*, 2005; Wolfgang y Lane, 2006). En primer lugar, los niveles de malonil-CoA varían en el hipotálamo entre las situaciones de ayuno (\downarrow malonil-CoA) y alimentación (\uparrow malonil-CoA), sugiriendo que cambios en este metabolito se traducen en cambios en la ingesta (Hu, Cha *et al.*, 2003) (**Figura 5**). Estudios farmacológicos realizados con inhibidores de FAS, que provocan acumulación de su sustrato malonil-CoA, han demostrado que éstos son supresores de la ingesta (Loftus, Jaworsky *et al.*, 2000; Mobbs y Makimura, 2002; López, Lelliott *et al.*, 2006)

(Figura 5 A). En otros estudios *in vivo* se observó que la sobre-expresión de MCD en el hipotálamo produce hiperfagia en ratones (Hu, Cha *et al.*, 2003), y Gao y colaboradores demostraron que el efecto anoréxico de la leptina se basa en su acción activadora sobre ACC y el consiguiente aumento en los niveles de malonil-CoA (Gao, Kinzig *et al.*, 2007) (Figura 5 B).

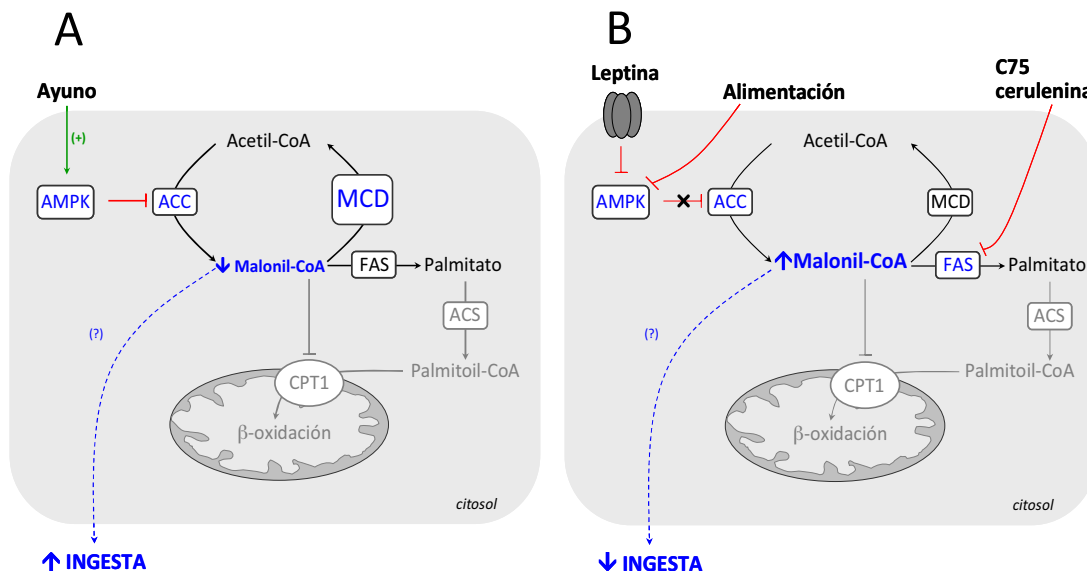


Figura 5. Malonil-CoA y regulación de la ingesta. (A) En ayuno, la disminución de los niveles de malonil-CoA se traduce en un aumento del apetito. De igual manera, la sobre-expresión de MCD tiene el mismo efecto sobre la ingesta. (B) Tras la alimentación, o por la acción de los inhibidores de FAS, los niveles de malonil-CoA aumentan y se genera en una señal de saciedad. La leptina ejerce su acción inhibitoria de la ingesta a través de la inactivación de AMPK, la consiguiente activación de ACC y el aumento en los niveles de malonil-CoA.

Cuáles son los efectores de esta molécula en la modulación de la ingesta es una cuestión aún por resolver. Sin duda CPT1 juega un papel en estos procesos, pues su actividad está intrínsecamente ligada a los niveles de malonil-CoA. En el hipotálamo, se expresan dos isoformas de CPT1, con localización subcelular y funciones diferentes si bien ambas son capaces de unir malonil-CoA y mediar los efectos derivados de un aumento en su concentración

Recientemente Gao y colaboradores han sugerido que en el núcleo ARC es CPT1C, y no CPT1A, la isoforma que media los efectos anoréxicos de la leptina por ser diana del malonil-CoA. CPT1C no regula la β-oxidación y su función celular es aún desconocida. Por ello, la consecuencia molecular de su inhibición y su papel exacto en

la regulación de la ingesta requiere más investigaciones al respecto (Introducción, 4.2) (Gao, Keung *et al.*, 2011; Gao, Zhu *et al.*, 2011).

Muchos otros estudios señalan a los LCFA-CoA como molécula señalizadora implicada en la regulación del apetito y demuestran que la inhibición de CPT1A por malonil-CoA y el consiguiente aumento de LCFA-CoAs en el hipotálamo produce cambios en la ingesta y la gluconeogénesis hepática (ver hipótesis LCFA-CoA, Introducción, 3.3).

3.3. HIPÓTESIS LCFA-CoA

La idea de que los niveles de macronutrientes, como los ácidos grasos o la glucosa, pueden regular el apetito y el balance energético se implantó en la comunidad científica tiempo atrás. En los años 80 ya se demostró el efecto anorexigénico de la administración periférica de lípidos (Woods, Stein *et al.*, 1984), reafirmando un papel para los ácidos grasos en la regulación del consumo de alimentos. Los LCFA plasmáticos son capaces de atravesar la BBB (Pardridge, Mietus *et al.*, 1980; Clément, Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2002) y una vez en las células gliales o las neuronas son esterificados a LCFA-CoAs y utilizados en diferentes procesos celulares. Además, en el hipotálamo también tiene lugar la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Recientemente, los elegantes estudios realizados por Rossetti y colaboradores pusieron nuevamente de manifiesto la importancia de los LCFA-CoAs en la regulación del apetito (**Figura 6**). Demostraron que los niveles elevados de estos metabolitos en el hipotálamo son una señal molecular que se traduce en una disminución de la ingesta y la producción de glucosa hepática. Por un lado, realizaron inyecciones centrales de ácido oleico en ratas. En los animales tratados se observó una rápida disminución en los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, así como una significativa disminución de la ingesta acompañada de una bajada en los niveles de expresión del neuropéptido orexigénico NPY. Los autores demostraron que este efecto se debe a la formación de oloeil-CoA en el hipotálamo, pues la administración de Triacsina C, inhibidor de acil-CoA sintasa (ACS), anula la acción anoréxica del ácido oleico (Obici, Feng *et al.*, 2002 (b)). Por otro lado, demostraron que la inhibición genética y farmacológica de CPT1A en el hipotálamo causa un aumento en los niveles de LCFA-CoA y una disminución de la

ingesta y la expresión de los neuropéptidos NPY y AGRP, así como de la producción hepática de glucosa (Obici, Feng *et al.*, 2003). En el año 2005 publicaron un trabajo muy similar al publicado por Hu y colaboradores ese mismo año (Hu, Dai *et al.*, 2005), en el que sobre-expresaron el enzima MCD en el hipotálamo de ratas adultas. Los animales tratados presentaron hiperfagia y aumento de peso y de la producción hepática de glucosa, además de una reducción en los niveles de LCFA-CoA en el hipotálamo similar a la observada en animales ayunados (He, Lam *et al.*, 2006). Estos estudios demostraron que la disminución de malonil-CoA en el hipotálamo causa una reducción paralela de los LCFA-CoA sugiriendo que el efecto anoréxico del primero se basa en su acción inhibitoria sobre CPT1 (**Figura 6 A**).

Curiosamente, la capacidad de los LCFA-CoAs para reducir la ingesta se ve afectada cuando las ratas se alimentan de una dieta sabrosa e hipercalórica que les induce sobrepeso rápidamente (Pocai, Lam *et al.*, 2006). En esta situación de sobre-alimentación, aparece una “resistencia a los LCFA-CoAs” que dejan de actuar como señal de saciedad. En estas condiciones, la inhibición de CPT1A en el hipotálamo permite recuperar la “sensibilidad” a los ácidos grasos y normaliza el metabolismo glucídico en estos animales. Estos resultados indican que no solo la concentración de LCFA-CoA en el hipotálamo, sino la capacidad de monitorizar los cambios en la misma, es esencial para el mantenimiento de la homeostasis energética. Por otro lado, presentan a CPT1A como una buena diana terapéutica en los casos de obesidad inducida por la dieta.

Estos resultados demostraron que la modulación del metabolismo lipídico en el hipotálamo, además de afectar la ingesta, tiene efectos sistémicos regulando la producción de glucosa hepática. La conexión entre hígado e hipotálamo la forman fibras del nervio vago que convergen en el tronco del encéfalo y permiten la transferencia de información entre ambos órganos (Pocai, Obici *et al.*, 2005). La transmisión de la señal desde el hipotálamo, que lleva a la disminución de la producción hepática de glucosa, requiere la activación/apertura de los canales de potasio dependientes de ATP (subunidades SUR1 y Kir6.2) presentes en las neuronas (Obici, Feng *et al.*, 2002 (b); Pocai, Lam *et al.*, 2005; Pocai, Obici *et al.*, 2005). La apertura de estos canales depende de su fosforilación por la proteína quinasa C (PKC-

δ), cuya activación en el hipotálamo, como en otros tejidos, parece depender de un aumento en los niveles de LCFA-CoA resultando clave en la regulación del metabolismo de la glucosa (Ross, Wang *et al.*, 2008).

Los trabajos publicados por Rossetti y colaboradores, en los que demuestran que la inhibición de CPT1 en el hipotálamo causa un aumento en los niveles de LCFA-CoAs, contrastan con estudios previos en los que se evidencia que la inhibición de esta enzima en el cerebro no altera el contenido de LCFA-CoAs, sino que incrementa la incorporación de ácidos grasos a otras especies lipídicas, como fosfolípidos y TAG (Chang, Wakabayashi *et al.*, 1994; Chang, Grange *et al.*, 1997). Por este motivo, el efecto que la inhibición de CPT1 en el hipotálamo tiene sobre el contenido de LCFA-CoAs y la regulación de la ingesta resulta controvertido y debe ser examinado en profundidad.

En un trabajo reciente publicado por López y colaboradores (López, Lage *et al.*, 2008) se demuestra que el efecto orexigénico de la hormona grelina está mediado por su acción sobre el metabolismo lipídico en el hipotálamo. Estos autores evidencian que la administración central de grelina activa AMPK que a su vez inactiva ACC en el hipotálamo lo que produce una disminución en los niveles de malonil-CoA y una mayor actividad CPT1. Los autores sugieren que el eje grelina-AMPK-malonil-CoA-CPT1 en el hipotálamo podría actuar como una señal que desencadena el inicio de la ingesta tras un período de ayuno (**Figura 6 B**). Estos mismos autores demuestran que el efecto orexigénico de grelina se debe a un incremento en el hipotálamo de los neuropéptidos NPY/AgRP y el factor de transcripción BSX (*brain specific homeobox*) (Lage, Vázquez *et al.*, 2010). BSX es un factor de transcripción hipotalámico, muy conservado evolutivamente, con un papel crucial en la regulación de la ingesta y la actividad locomotora que se expresa en las neuronas NPY/AgRP e interacciona con las zonas reguladoras de la transcripción de estos genes.

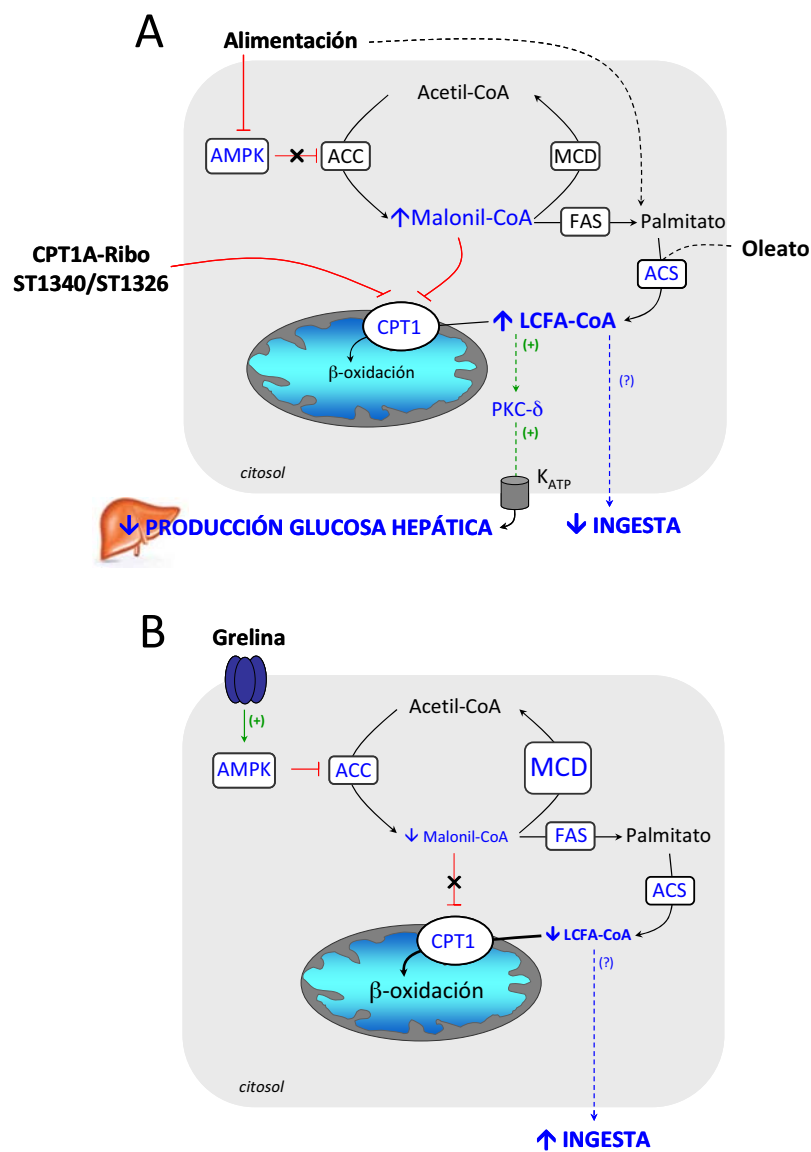


Figura 6. LCFA-CoA y regulación de la ingesta y la producción hepática de glucosa. (A) Un aumento en los LCFA-CoA en el hipotálamo, ya sea por la administración de ácido oleico o por la inhibición, genética (CPT1A-Ribo) o farmacológica (ST1340/ST1326), de CPT1, se traduce en una disminución de la ingesta y la producción de glucosa hepática. La activación de PKC-δ y los canales K_{ATP} en el hipotálamo, probablemente mediada por los LCFA-CoAs, es imprescindible para la transmisión de señal al hígado y la consiguiente modulación del metabolismo de la glucosa. (B) Una disminución en los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo, por la acción de grelina sobre el metabolismo lipídico o por la sobre-expresión del enzima MCD, se traduce en un incremento de la actividad CPT1 y la β-oxidación y la consiguiente reducción de los LCFA-CoA citoplasmáticos. Esto se traduce en un aumento del apetito y la producción hepática de glucosa.

3.4. PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)

AMPK (*AMP Kinase*) es una serina-treonina quinasa que en los últimos años se ha perfilado como un importante sensor intracelular del estado metabólico, con un papel clave en la regulación del apetito y el balance energético. Esta proteína responde a cambios hormonales o en la concentración de nutrientes, tanto en el SNC como en tejidos periféricos, modulando el metabolismo y la ingesta con el fin de mantener un equilibrio en el estado energético del organismo (**Figura 7**) (Carling, 2004; Hardie y Sakamoto, 2006; Lage, Diéguez *et al.*, 2008).

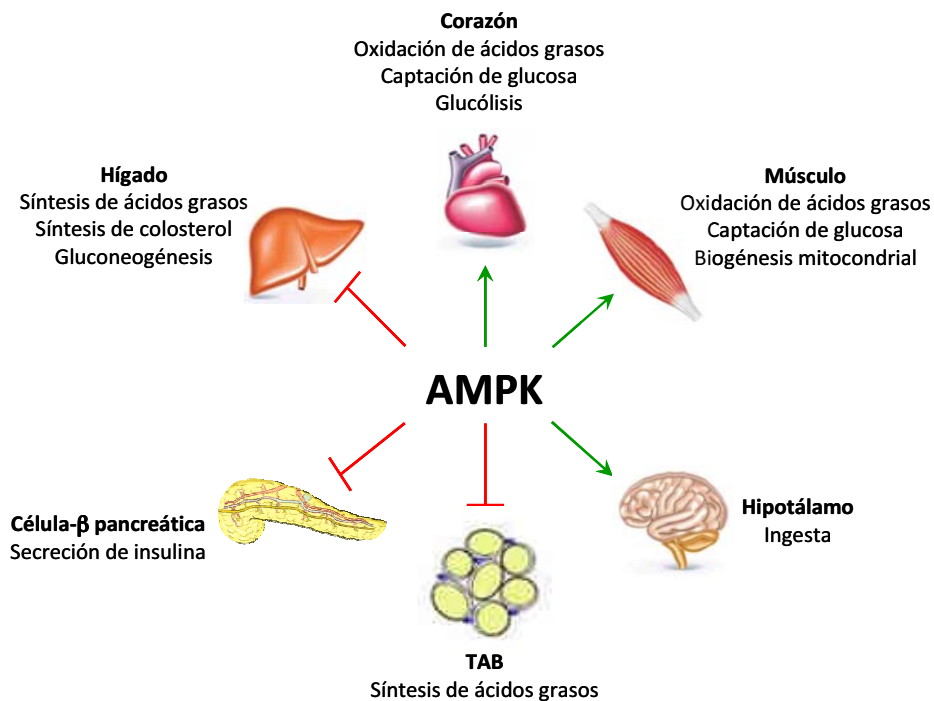


Figura 7. Principales rutas del metabolismo energético reguladas por AMPK. Las flechas verdes indican activación y las líneas rojas inhibición.

AMPK se regula por fosforilación, resultando activa la forma fosforilada en el residuo Thr172 de la subunidad catalítica (Woods, Johnstone *et al.*, 2003; Woods, Dickerson *et al.*, 2005). Además, es activada alostéricamente por AMP, respondiendo a un estado energético celular en que la relación AMP/ATP aumenta. A nivel celular, AMPK inhibe los procesos que consumen ATP y activa aquellos que lo producen y, a nivel general, media en la disminución del gasto energético y el aumento de la ingesta y la producción de energía (Kahn, Alquier *et al.*, 2005; Lage, Diéguez *et al.*, 2008). Entre

los estímulos que activan AMPK en el hipotálamo se encuentran el ayuno y la hipoglucemia, hormonas y péptidos como la grelina, la adiponectina o los glucocorticoides y el neuropéptido AgRP. Por otro lado, la alimentación y la hiperglucemia, las hormonas insulina y leptina, el GLP-1 o los agonistas de los receptores de melanocortinas tienen el efecto contrario, inhibiendo AMPK (Lage, Diéguez *et al.*, 2008). En este tejido, AMPK actúa como un nexo entre las señales metabólicas y hormonales y los sistemas de síntesis de neuropéptidos que llevan a una modulación de la ingesta, resultando clave su acción sobre el metabolismo lipídico (Figura 8).

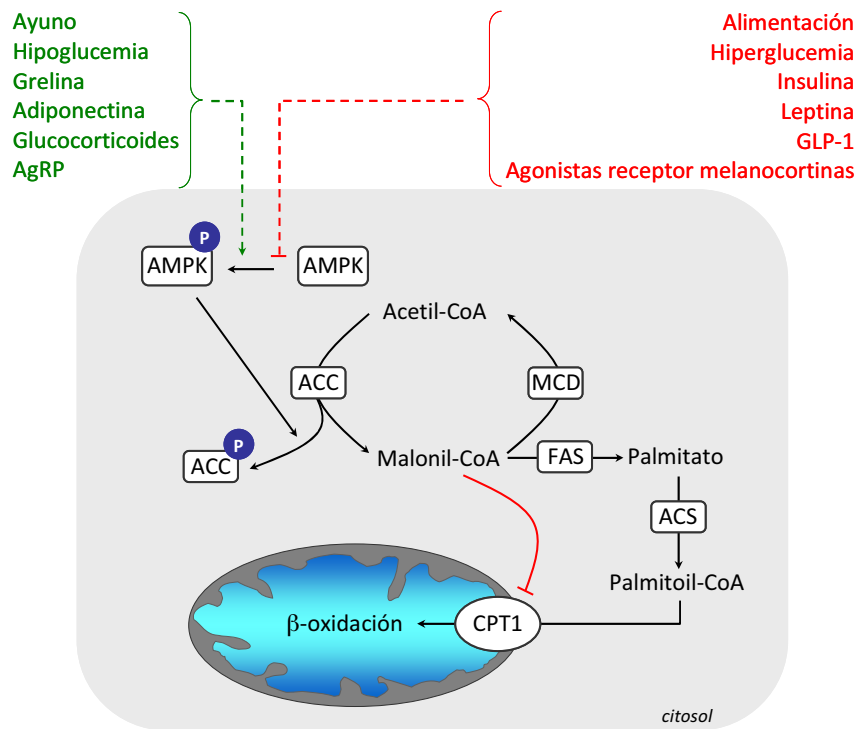


Figura 8. Regulación de la síntesis y oxidación de ácidos grasos por AMPK en el hipotálamo. Diferentes estímulos hormonales y metabólicos regulan la actividad AMPK (las flechas verdes indican activación y las líneas rojas inhibición). Una vez fosforilada, AMPK fosforila ACC, inhibiéndola. Esto causa una reducción en los niveles de malonil-CoA que se traduce en una disminución de la síntesis de ácidos grasos y un aumento de la oxidación.

De hecho, AMPK es uno de los principales puntos de control del metabolismo de los ácidos grasos. Una vez activada fosforila, e inhibe, ACC (Yeh, Lee *et al.*, 1980) reduciendo el flujo del sustrato malonil-CoA para la síntesis *de novo* de ácidos grasos y

favoreciendo la β -oxidación, que se ve incrementada por la mayor actividad CPT1 que se deriva de una disminución en los niveles de su inhibidor.

A pesar de la idea imperante que le adjudica a AMPK un rol general como integrador de las señales hormonales y metabólicas en el hipotálamo, un estudio publicado en el año 2007 demostró que el efecto fisiológico de AMPK sobre la homeostasis energética así como su papel en la respuesta molecular a hormonas (insulina y leptina) y metabolitos (glucosa), es diferente en las poblaciones neuronales POMC y AgRP. Estos resultados resultaron novedosos sugiriendo que AMPK podría tener una función diferente en la regulación del balance energético en los distintos tipos neuronales del hipotálamo (Claret, Smith *et al.*, 2007).

4. SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA

Las carnitina palmitoiltransferasas (CPTs) (EC. 2.3.1.21) 1 y 2 son proteínas de la familia de las carnitina aciltransferasa, con afinidad por los ácidos grasos de cadena larga, que se localizan en la membrana mitocondrial externa (MME) e interna (MMI) respectivamente facilitando la entrada de los LCFA-CoA a la matriz mitocondrial, donde son utilizados para la β -oxidación (McGarry y Brown, 1997).

El sistema CPT está formado por tres proteínas diferentes, CPT1, carnitina-acilcarnitinatranslocasa (CACT) y CPT2. Estas tres proteínas se encargan de las diferentes etapas en la translocación de los LCFA-CoA al interior de la mitocondria (Ramsay, Gandour *et al.*, 2001).

En primer lugar, los LCFA-CoA, formados por acción de ACS, son utilizados por CPT1, que cataliza la formación de LCFA-carnitina. Los productos de la reacción son translocados al interior de la mitocondria por una reacción de intercambio facilitada por el enzima CACT, una proteína integral de la MMI. Por último, una vez en la matriz mitocondrial, CPT2 cataliza la formación de LCFA-CoA, a partir de los LCFA-carnitina importados desde el citosol (Murthy y Pande, 1987). La carnitina liberada en este paso puede ser utilizada de nuevo por CPT1 para el transporte de LCFA-CoA (**Figura 9**).

CPT1 está fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico, malonil-CoA, y representa el principal punto de control de la β -oxidación. El malonil-CoA, derivado de la glucosa, es el primer intermediario de la lipogénesis y su efecto sobre CPT1 permite mantener un equilibrio entre los procesos de síntesis y oxidación de ácidos grasos y señalar la disponibilidad relativa de nutrientes en la célula.

En mamíferos se expresan tres isoformas de CPT1, codificadas por diferentes genes y con propiedades bioquímicas y distribución tisular diferentes:

La isoforma CPT1A o CPT1L (del inglés *liver*, hígado). En rata se expresa en hígado, pulmón, páncreas, intestino, riñón, cerebro y ovarios. También presenta una expresión más débil en corazón y tejido adiposo blanco y está ausente en músculo esquelético y tejido adiposo marrón (McGarry y Brown, 1997). El gen de CPT1A humana se ha localizado en el cromosoma 11q13.1-q13.5 (Britton, Mackey *et al.*, 1997). El cDNA de CPT1A de rata codifica para una proteína de 773 aa con una masa

molecular aparente de 88 kDa (Esser, Britton *et al.*, 1993). La actividad de este enzima se inhibe por malonil-CoA con una sensibilidad que puede variar en función de las condiciones fisiopatológicas ($IC_{50} \sim 3 - 30 \mu M$). CPT1A presenta una elevada afinidad por los sustratos carnitina ($K_m \sim 30 \mu M$) y LCFA-CoA (para palmitoil-CoA, $K_m \sim 40 - 150 \mu M$).

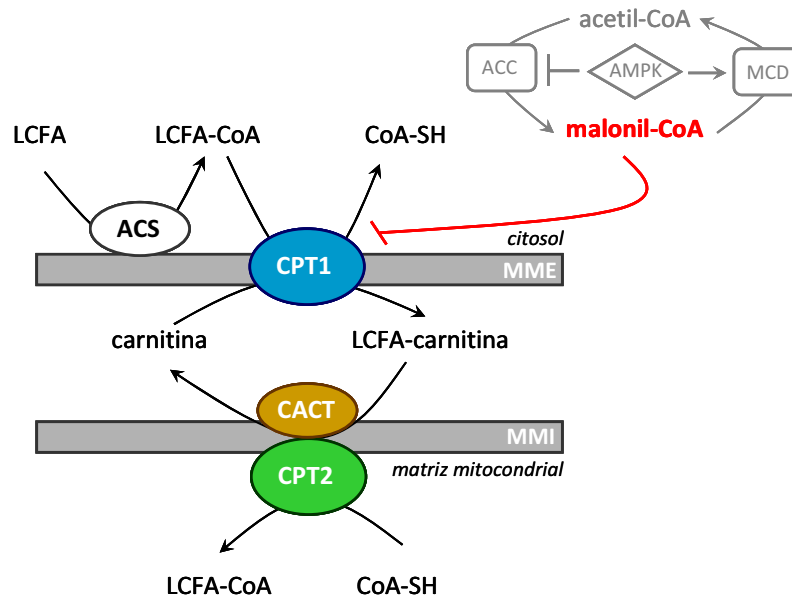


Figura 9. Transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria mediante el sistema CPT. Los LCFA se activan a LCFA-CoA por acción del enzima ACS. El transporte al interior de la mitocondria se lleva a cabo por la acción de CPT1, que cataliza la formación de LCFA-carnitina, CACT, que transporta las LCFA-carnitinas a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) y CPT2, que reconvierte las LCAF-carnitinas en LCFA-CoA en el interior de la matriz mitocondrial. CPT1 está regulada por su inhibidor fisiológico, malonil-CoA. Los niveles del mismo dependen de la acción de los enzimas ACC y MCD que a su vez están regulados por la acción de AMPK. **MME:** membrana mitocondrial externa.

La isoforma CPT1B o CPT1M (del inglés *muscle*, músculo). En rata se expresa en músculo esquelético, corazón, tejido adiposo blanco y marrón, testículos y cerebelo (Lavrentyev, Matta *et al.*, 2004). El gen de CPT1B humana se localiza en el cromosoma 22q13.31-q13.32 (Britton, Mackey *et al.*, 1997). El cDNA de CPT1B de rata codifica para una proteína de 772 aa y una masa molecular aparente de 82 kDa (Esser, Brown *et al.*, 1996). Presenta una afinidad más débil por el sustrato carnitina que la isoforma hepática ($K_m \sim 500 \mu M$), sin embargo la afinidad por el sustrato LCFA-CoA es similar entre ambas proteínas. La sensibilidad a malonil-CoA es entre 30 y 100 veces más elevada que la de CPT1A ($IC_{50} \sim 0,03 \mu M$) (McGarry, Mills *et al.*, 1983; Mills, Foster *et*

al., 1983). De esta manera la regulación de la β -oxidación en los tejidos que expresan la isoforma CPT1B depende de variaciones muy pequeñas en los niveles de malonil-CoA.

Por último, la isoforma CPT1C se expresa principalmente en cerebro y testículos. El cDNA de esta proteína fue clonado pocos años atrás (Price, van der Leij *et al.*, 2002) y el gen humano se ha localizado en el cromosoma 19q13.33. Los alineamientos de secuencias han mostrado una identidad del 83,5% entre las secuencias de humano y ratón (Price, van der Leij *et al.*, 2002). La similitud de esta proteína con las otras isoformas es del 70% para CPT1A y del 66% para CPT1B. Contiene todos los residuos importantes para la actividad carnitina aciltransferasa y para la unión de malonil-CoA, sin embargo inicialmente se describió como una proteína sin actividad catalítica (Price, van der Leij *et al.*, 2002; Wolfgang, Kurama *et al.*, 2006). Lane y colaboradores definieron CPT1C como una proteína integral de membrana, localizada en la MME, capaz de unirse a malonil-CoA, con una constante de afinidad $K_D = 0,3 \mu\text{M}$, dentro del rango de la concentración hipotalámica de este inhibidor ($0,1 - 1,4 \mu\text{M}$) (Wolfgang y Lane 2006). Por este motivo, a CPT1C se le atribuyó un papel en el control de la ingesta y el balance energético. Este papel se analizará en detalle en el apartado 4.2 de la Introducción. Estudios recientes realizados en nuestro grupo demostraron que la proteína CPT1C se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (RE), siendo la región N-terminal la responsable de la localización sub-celular de la misma. En este estudio también se demostró que CPT1C tiene afinidad por el sustrato palmitoil-CoA y presenta una baja actividad carnitina aciltransferasa (Sierra, Gratacós *et al.*, 2008). La localización de CPT1C en RE sugiere nuevas funciones para esta proteína como la de participar en rutas biosintéticas regulando los niveles de CoA-SH y LCFA-CoA entre el citosol y el lumen del retículo.

4.1. REGULACIÓN DE CPT1

Además de por su inhibidor fisiológico, CPT1 es regulada por diferentes mecanismos independientes de malonil-CoA.

Regulación independiente de malonil-CoA

En el hígado, se ha descrito que variaciones en la relación insulina/glucagón producen cambios en los niveles de mRNA de CPT1. Estos cambios están asociados a una baja disponibilidad de glucosa y unas concentraciones elevadas de ácidos grasos (Park, Mynatt *et al.*, 1995; Chatelain, Kohl *et al.*, 1996). En roedores se ha descrito un aumento en el mRNA de CPT1 durante la fase de lactancia y al ser alimentados con una dieta rica en grasa. Asimismo, ratas diabéticas o en ayuno también tienen una mayor expresión y actividad CPT1A en hígado (Park, Mynatt *et al.*, 1995). En el hipotálamo se ha descrito que la administración de grelina incrementa los niveles de expresión de CPT1A (Andrews, Liu *et al.*, 2008). A pesar de esto, la regulación transcripcional de este enzima es modesta en relación a la regulación derivada de las concentraciones de sus sustratos o inhibidor.

Igualmente, existen modificaciones post-traduccionales que pueden modificar la actividad catalítica de CPT1. Se han descrito diferentes sitios de fosforilación en la isoforma CPT1A y la modificación de, al menos, dos de ellos altera las características cinéticas del enzima, en especial su sensibilidad a malonil-CoA (Brandt, Djouadi *et al.*, 1998; Zammit, 2008). A pesar de todo, no se ha descrito que estas modificaciones se deban a variaciones en el estado fisiológico, por lo que podría tratarse de cambios constitutivos (Zammit, 2008).

Por otro lado, se ha observado que al exponer hepatocitos en cultivo a inhibidores de fosfatasa 1A o activadores de AMPK se produce una activación del enzima sin cambios en su sensibilidad a malonil-CoA. Este efecto no se debe a la fosforilación directa de la proteína y desaparece cuando se tratan únicamente las mitocondrias aisladas, sugiriendo que existe algún tipo de relación entre la mitocondria y una estructura extra-mitocondrial que media este efecto (Guzmán, Kolodziej *et al.*, 1994; Leterrier, Rusakov *et al.*, 1994). En este sentido, se ha demostrado que CPT1A responde a la fosforilación, por AMPK, de componentes del

citoesqueleto. Este hecho también podría explicar la relación existente entre el volumen celular y la actividad CPT1 (Guzmán, Velasco *et al.*, 1994; Zammit, 2008).

Regulación por malonil-CoA

CPT1 está fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico, malonil-CoA. Por este motivo, los mecanismos que modulan la concentración citoplasmática de este metabolito son cruciales en la regulación de su actividad. En el apartado 3.1 de la Introducción se profundiza en los mecanismos moleculares que regulan la concentración de malonil-CoA en la célula.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo se identificó el residuo aminoacídico de CPT1 responsable de la inhibición por malonil-CoA. Se observó que todos los miembros de la familia de las carnitina aciltransferasas regulables por malonil-CoA (CPT1A, CPT1B y COT) tienen una metionina en la posición 593 (M593), mientras que los miembros de la familia insensibles al inhibidor (CPT2 y CrAT) tienen una serina en la misma posición (Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2003) (**Figura 10**). Utilizando la técnica de mutagénesis dirigida se sustituyó la M593 de la proteína CPT1A de rata por una serina. Esta mutación generó una CPT1A activa pero insensible a su inhibidor fisiológico, capaz de mantener un 80% de su actividad enzimática independientemente de los niveles de malonil-CoA (Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2003). Esta forma mutada de la proteína recibió el nombre de CPT1AM.

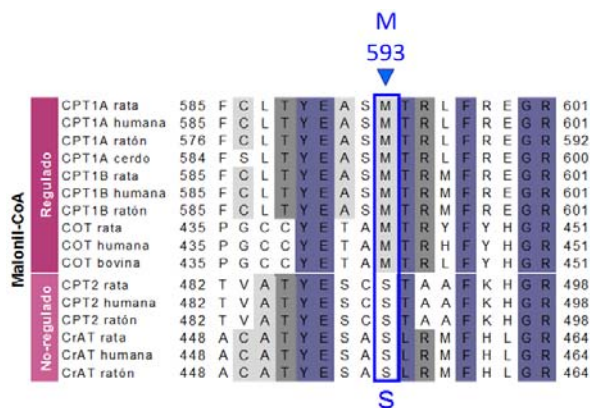


Figura 10. Alineación de secuencias de las carnitina aciltransferasas según su sensibilidad a malonil-CoA. Los miembros de la familia regulados por malonil-CoA conservan una metionina (M) en la posición 593, mientras los miembros de la familia insensibles al inhibidor conservan un residuo de serina (S).

La pérdida de sensibilidad de CPT1AM a su inhibidor ha sido estudiada en diferentes modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*. En levaduras (Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2003), cultivos de células- β pancreáticas (Herrero, Rubí *et al.*, 2005), cultivos de células musculares de rata (Sebastián, Herrero *et al.*, 2007), hepatocitos primarios de rata (Akkaoui, Cohen *et al.*, 2009) e hígado de ratón (Orellana-Gavaldà, Herrero *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se ha sobre-expresado la isoforma CPT1AM en el VMH de ratas para analizar el papel de esta proteína, y los LCFA-CoA, en el control del apetito, el metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética. La insensibilidad del enzima a su inhibidor fisiológico permite desacoplar el sistema malonil-CoA-CPT1A aportando una importante novedad respecto a los estudios publicados hasta el momento.

4.2. CPT1 EN EL HIPOTÁLAMO Y REGULACIÓN DE LA INGESTA

Se ha descrito cómo diferentes enzimas de las rutas de síntesis y oxidación de ácidos grasos median los efectos de determinadas situaciones metabólicas y hormonales en el proceso de modulación del apetito (Introducción, 3). CPT1 tiene un papel destacado en estos procesos pues, por un lado, regula la β -oxidación y los niveles de LCFA-CoA y, por otro, su actividad es regulada por malonil-CoA.

En el hipotálamo se expresan las isoformas CPT1A y CPT1C, pero la segunda se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (RE) y no participa en la β -oxidación de los ácidos grasos. No obstante, estudios realizados con un ratón *knockout* (KO) para esta proteína demuestran que tiene una función en el mantenimiento de la homeostasis energética y el control de la ingesta. Lane y colaboradores observaron que los animales KO para CPT1C presentan un menor peso corporal y una pérdida de apetito cuando son alimentados con dieta normal. Sorprendentemente, estos animales son más susceptibles a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina cuando son alimentados con dieta grasa (Wolfgang, Kurama *et al.*, 2006).

La función concreta de CPT1C en la regulación del apetito sigue siendo una cuestión controvertida. Se ha demostrado que, a pesar de presentar una baja actividad CPT, esta proteína es capaz de unir malonil-CoA y presenta una constante de afinidad

dentro del rango de las concentraciones hipotalámicas de este metabolito. Esto la convierte en una buena candidata para mediar el efecto anorexigénico de un aumento en los niveles de malonil-CoA. De hecho, estudios recientes apoyan esta hipótesis demostrando que, concretamente en el núcleo ARC, CPT1C media los efectos anorexigénicos de la leptina. Estos mismos estudios sugieren que el papel de CPT1C en el control de la ingesta se basa en la modulación de la síntesis *de novo* de ceramidas, que tiene lugar en el RE de las neuronas hipotalámicas (Gao, Zhu *et al.*, 2011).

En el hipotálamo, CPT1A se localiza en las mitocondrias y regula la entrada de LCFA-CoA a la matriz mitocondrial, modulando la concentración citoplasmática de LCFA-CoA. Este enzima está fuertemente regulado por malonil-CoA y por todo ello se coloca en el centro de los procesos de monitorización del estado nutricional en el hipotálamo. Se han publicado una gran cantidad de resultados que demuestran la importancia del metabolismo lipídico y los LCFA-CoA en la regulación de la ingesta y el metabolismo de la glucosa, todos ellos se detallan en la sección 3.3 de la Introducción.

En el año 2008 se publicó un novedoso trabajo en el que se demostró la importancia de la proteína mitocondrial UCP2 (*uncoupling protein 2*, proteína desacoplante 2) en los eventos moleculares derivados de la acción de la grelina en el hipotálamo. Los autores sugieren que la cascada de eventos derivada de la unión de esta hormona a su receptor en las neuronas NPY/AgRP es la siguiente: aumento de actividad AMPK, seguido de inhibición de ACC y la consiguiente reducción de los niveles de malonil-CoA. Esto se traduce en una mayor actividad CPT1 y una elevada β -oxidación. El aumento de ROS (*reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno), generado por una mayor oxidación de ácidos grasos, y los propios LCFA-CoA promueven un aumento en la transcripción y actividad de la proteína UCP2, que neutraliza los ROS y permite mantener una oxidación de ácidos grasos constante que aporta la energía necesaria a las neuronas NPY para mantener su actividad, lo que produce un aumento en la ingesta (Andrews, Liu *et al.*, 2008). Este estudio resultó novedoso al sugerir un nuevo mecanismo molecular por el que CPT1 y los LCFA-CoA regulan la ingesta. En este caso, los LCFA-CoA no tendrían una función señalizadora, sino una función energética, permitiendo mantener una alta actividad y tasa de

descarga en las neuronas encargadas de provocar una respuesta a un estado metabólico concreto (Figura 11).

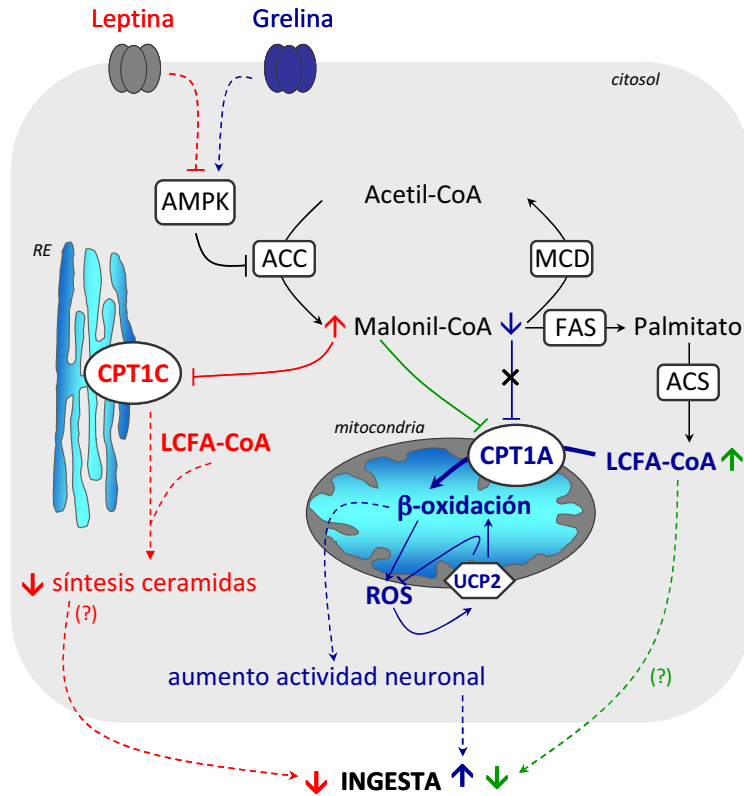


Figura 11. CPT1 y regulación de la ingesta. En el hipotálamo, la hormona leptina inhibe AMPK, lo que se traduce en un aumento de malonil-CoA y una disminución de la ingesta. Se ha propuesto que uno de los efectores del malonil-CoA sería CPT1C, que regularía la síntesis de ceramidas en el RE causando una disminución del apetito (líneas rojas). Se ha demostrado que la hormona ghrelina actúa sobre el metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo causando la activación de AMPK, la disminución de actividad ACC y la reducción en los niveles de malonil-CoA. Esto se traduce en un aumento de la actividad CPT1A y la β-oxidación, lo que en las neuronas NPY/AgRP se traduce en una mayor actividad neuronal y un aumento de la ingesta (líneas azules). Diferentes estudios sugieren que los LCFA-CoA presentes en el hipotálamo actúan como señal intracelular de saciedad causa una disminución del apetito (líneas verdes).

Estos estudios resultaron controvertidos y se han puesto en duda, por entrar en conflicto con diferentes resultados publicados anteriormente. Igualmente por sugerir que las neuronas oxidan ácidos grasos con fines energéticos cuando, clásicamente, se que ha considerado que no es así. Sin embargo y a pesar de la controversia, proponen un nuevo mecanismo de control del apetito en el que los LCFA-CoA y CPT1 tienen un papel protagonista.

5. C75 DISMINUYE EL PESO Y LA INGESTA

C75 (ácido 4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico) (**Figura 12**) es un compuesto sintético, derivado de cerulenina, diseñado como un inhibidor más estable y específico del enzima FAS, con un potencial uso como fármaco antitumoral (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000). Algunas células cancerosas presentan un nivel muy alto de expresión de FAS, lo que convierte a este enzima en una buena diana en el diseño de nuevos fármacos y a sus inhibidores en buenos candidatos para el tratamiento de esta patología (Pizer, Jackisch *et al.*, 1996; Pizer, Chrest *et al.*, 1998). Cerulenina inhibe FAS irreversiblemente, uniéndose a su centro catalítico (Moche, Schneider *et al.*, 1999; Price, Choi *et al.*, 2001), sin embargo su actividad *in vivo* es limitada, probablemente debido a su inestabilidad química. C75, por el contrario, es una molécula químicamente más estable capaz de inhibir irreversiblemente la actividad FAS uniéndose de manera lenta y covalente al enzima (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000). Esta inhibición resulta citotóxica para algunas células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*.

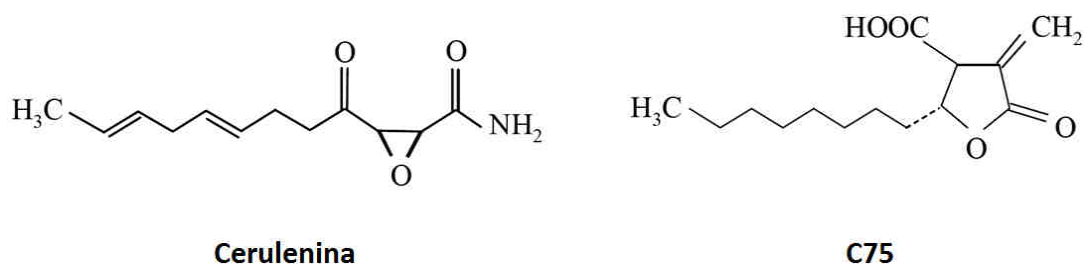


Figura 12. Estructura química de cerulenina y C75.

En el año 2000 se describió una nueva propiedad de C75 Esta molécula tiene un potente efecto reductor de la ingesta y el peso cuando es administrada a roedores, siendo capaz de revertir el fenotipo obeso de un ratón *ob/ob* (Loftus, Jaworsky *et al.*, 2000). Este nuevo descubrimiento abrió las fronteras de C75 convirtiéndolo en un buen candidato para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados.

La disminución del peso y la ingesta se ha observado en roedores tanto tras la administración periférica (intraperitoneal, i.p.) como central (intracerebroventricular, i.c.v.) de C75, resultando más acentuada en animales obesos que en delgados. De hecho, los segundos se muestran tolerantes tras un corto período de tiempo y presentan hiperfagia tras el cese del tratamiento. De igual manera, los animales

obesos muestran cierta resistencia a los efectos de C75 a medida que pierden adiposidad (Kumar, Shimokawa *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que la reducción de la ingesta causada por C75 se debe a su acción en el SNC. Miller y colaboradores demostraron que la administración i.p. de este compuesto produce la activación neuronal, a corto plazo, en diferentes núcleos del hipotálamo y el tronco del encéfalo (Miller, Ronnett *et al.*, 2004). De hecho, C75 previene la regulación al alza de los neuropéptidos orexigénicos y la regulación a la baja de los anorexigénicos en el hipotálamo, causando así una disminución del apetito (Cha, Hu *et al.*, 2004; Aja, Bi *et al.*, 2006).

Además de su efecto central, C75 produce cambios en el perfil de expresión génica de otros órganos. En músculo de ratones obesos sometidos a un tratamiento i.p., se observó un aumento en la expresión de UCP3, sugiriendo que C75 tiene un efecto activador del gasto energético (Cha, Hu *et al.*, 2004). Esta acción sobre la expresión génica fue observada también por otros autores, demostrando que la administración i.p. de este compuesto altera la expresión en hígado, tejido adiposo blanco, músculo y, como ya se ha comentado, hipotálamo (Tu, Thupari *et al.*, 2005). En hígado disminuye la expresión de ACC y FAS pero aumenta la de CPT1A, explicando un incremento en el gasto energético y la consiguiente pérdida de peso.

Todos los cambios mencionados se observaron tras la administración i.p. de C75. Por otro lado, la administración i.c.v. también causa alteraciones sistémicas. Hu y colaboradores demostraron que la inyección central de este compuesto, produce un aumento en la biogénesis mitocondrial y la expresión de los genes oxidativos UCP3 y CPT1B en músculo esquelético (Cha, Hu *et al.*, 2005; Cha, Rodgers *et al.*, 2006). Estos hechos sugieren que los cambios a nivel del SNC mediarían, no solo la disminución de la ingesta, sino también la pérdida de peso debida a una menor ingesta de alimentos y la activación del gasto energético en tejidos periféricos. Igualmente, se ha demostrado que su administración central regula la secreción de grelina en el estómago (Hu, Cha *et al.*, 2005), disminuyendo la concentración de esta hormona en sangre. Asimismo, C75 bloquea también la secreción de esta hormona *ex vivo*, en el hipotálamo.

Todos estos resultados demuestran que C75, a través de su acción central y periférica, causa una reducción de la ingesta y el peso en los animales tratados (**Figura**

13). El mecanismo molecular subyacente no es del todo conocido, sin embargo el efecto de este compuesto sobre el metabolismo lipídico en el hipotálamo es una pieza clave en estos procesos.

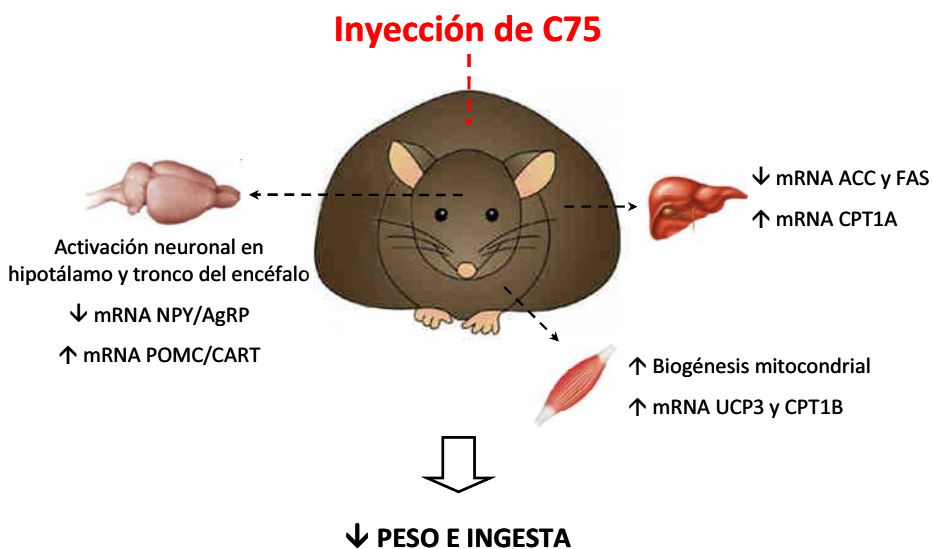


Figura 13. C75 reduce el peso y la ingesta. La administración i.p. de C75, especialmente en animales obesos, causa cambios en el SNC y órganos periféricos que llevan a la disminución de la ingesta y la pérdida de peso. En el hipotálamo y el tronco del encéfalo se produce una activación neuronal y se modula la expresión de los neuropéptidos que controlan la ingesta. En hígado disminuye la expresión de ACC y FAS, pero aumenta la de CPT1A. En músculo estimula la biogénesis mitocondrial e incrementa la expresión de UCP3 y CPT1B sugiriendo un aumento en el gasto energético.

La inhibición de FAS por C75 produce un aumento en los niveles de malonil-CoA en las células tratadas, lo que podría explicar el efecto anorexigénico de este compuesto. Como se ha discutido en el apartado 3.2 de la Introducción, la hipótesis de malonil-CoA sugiere que los niveles de este metabolito en las neuronas hipotalámicas son una señal molecular que comporta una modulación de la ingesta (**Figura 14**). Sus efectores en el proceso de regulación del apetito no son del todo conocidos, sin embargo una de sus dianas es CPT1, que al encontrarse inhibida frena la β -oxidación y favorece la acumulación de LCFA-CoA y la disminución de la ingesta.

En el año 2002, Thupari y colaboradores demostraron que C75 tiene un efecto periférico cuando es administrado i.p. a ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO, *diet-induced obesity*) (Thupari, Landree *et al.*, 2002). En este trabajo se evidenció que los animales DIO tratados con C75 presentan una oxidación de ácidos grasos en

tejidos periféricos mayor que los controles y, en general, un gasto energético más elevado. Los autores apuntaron que este efecto se debe a la acción activadora que este compuesto tiene sobre CPT1, pues la administración de etomoxir -potente inhibidor del enzima- revirtió el efecto observado. Con este trabajo se aportaron nuevos datos sobre el mecanismo de acción de C75 y se describió, por primera vez, un activador de CPT1 (**Figura 15**).

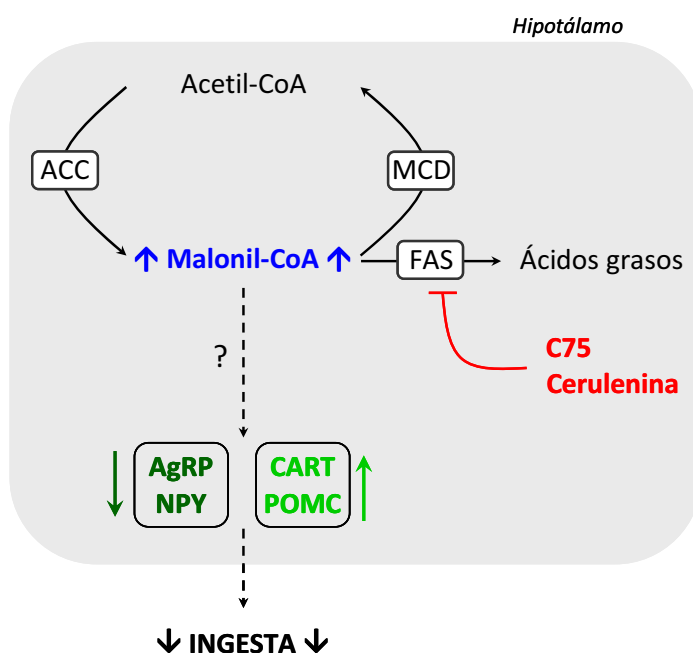


Figura 14. Inhibidores de FAS y regulación de la ingesta. La inhibición farmacológica de FAS, por C75 o cerulenina, comporta una acumulación de su sustrato, malonil-CoA. Un acúmulo de malonil-CoA en el hipotálamo se traduciría en una modulación de la síntesis de los neuropéptidos orexigénicos (NPY y AgRP) y anorexigénicos (CART y POMC) y una disminución de la ingesta.

Posteriormente se publicaron varios trabajos es los que se analizó el efecto de C75 sobre el sistema CPT, aportando nuevos datos sobre la activación de este enzima (Nicot, Napal *et al.*, 2004; Yang, Kays *et al.*, 2005). Todos ellos resultan paradójicos pues demuestran que una misma molécula tiene acciones potencialmente opuestas. Por un lado C75 activa CPT1 y por otro inhibe FAS, causando un aumento en los niveles de malonil-CoA y la consiguiente inhibición de CPT1. Estos resultados sugieren que la inhibición de CPT1 causada por un acúmulo de malonil-CoA se vería superada por la activación directa producida por C75. Sin embargo generaron controversia y estimularon la aparición de más estudios destinados a resolver la paradoja existente.

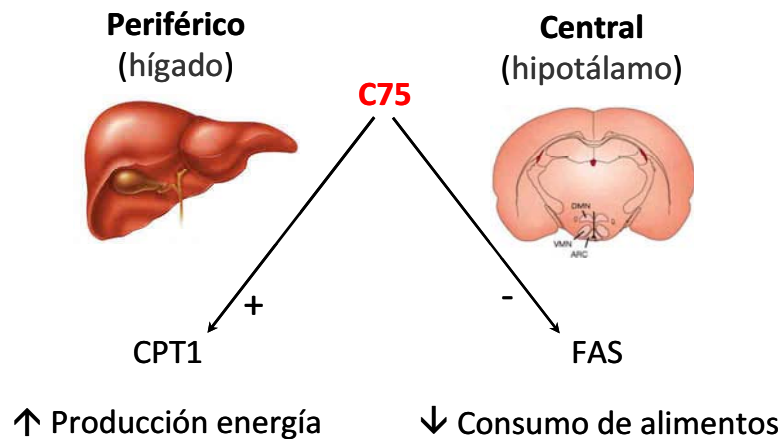


Figura 15. Modelo propuesto del mecanismo de acción central y periférico de C75. En el hipotálamo C75 inhibiría FAS, generando un aumento en los niveles de malonil-CoA y una disminución de la ingesta. En tejidos periféricos, como el hígado, C75 activaría CPT1 produciendo un aumento en la oxidación de ácidos grasos y la producción de energía. Figura modificada de (Thupari, Landree et al., 2002).

Durante 2004, se publicaron dos estudios diferentes en los que se demostró que el efecto anorexigénico de C75 está mediado por AMPK (Kim, Miller *et al.*, 2004; Landree, Hanlon *et al.*, 2004). Como ya se ha comentado (Introducción, 3.4), AMPK es un sensor del estado energético de la célula y un importante regulador del metabolismo de los ácidos grasos, cuya activación se traduce en una disminución de los niveles de malonil-CoA. En estos trabajos se demuestra que tras la administración de C75 se produce una menor fosforilación/activación de AMPK que los autores achacan a la disminución en el ratio AMP/ATP generado tras la inhibición de FAS y la activación de CPT1. Estos resultados incrementaron la controversia sobre C75, pues la menor activación de AMPK causada por este compuesto se debería traducir, en último término en la disminución de la actividad CPT1, por un aumento en los niveles de su inhibidor, malonil-CoA.

En el año 2005 su publicó un sorprendente trabajo que añadía nuevas incógnitas al mecanismo molecular por el que el C75 causa una inhibición del apetito. Rohrbach y colaboradores aportaron evidencias sobre la desconexión que existe entre la inhibición de la ingesta y la inhibición de FAS en el hipotálamo. Los autores demostraron que tras la administración i.p. de C75 los animales disminuyen la ingesta sin ver inhibida la actividad FAS en el hipotálamo (Rohrbach, Han *et al.*, 2005).

En el año 2006, nuestro grupo publicó un trabajo en el que demostró que C75-CoA es un potente inhibidor de CPT1, identificando una nueva acción para este compuesto (**Figura 16**) (Bentebibel, Sebastian *et al.*, 2006). Muchos fármacos requieren una activación previa antes de ejercer su efecto biológico. Es el caso de etomoxir y 2-TDGA, que deben ser activados a sus correspondientes aductos -CoA para actuar como inhibidores de CPT1. En el citado trabajo se demuestra que la inhibición de CPT1 causada por C75-CoA es incluso mayor que la causada por otros inhibidores (IC_{50} C75-CoA \sim 0,24 μ M vs. IC_{50} etomoxir-CoA \sim 4 μ M). El efecto del C75 sobre este enzima fue analizado en diferentes líneas celulares y en tejidos de ratón, aportando evidencias de la acción inhibidora que este compuesto tiene sobre la oxidación de ácidos grasos.

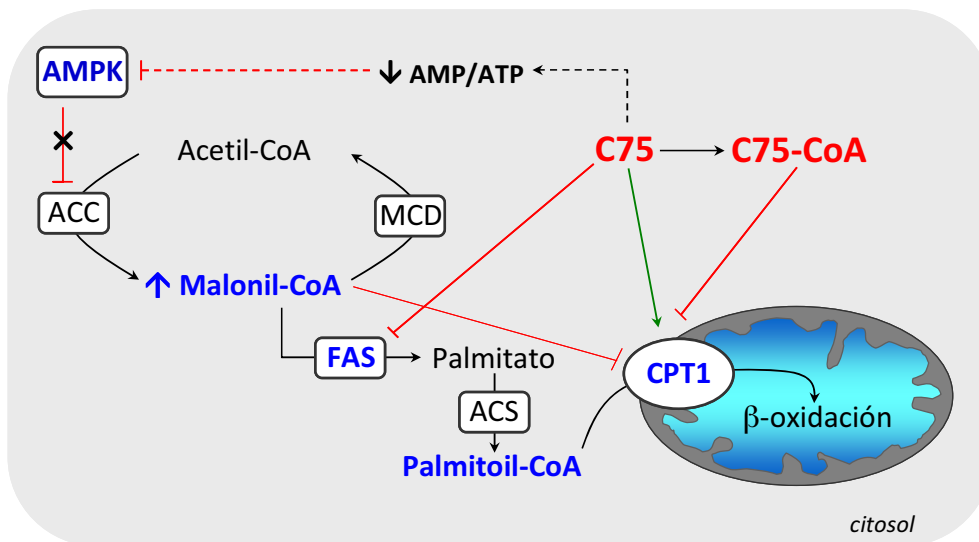


Figura 16. Efecto de C75 y C75-CoA sobre FAS y CPT1. C75 es un inhibidor de FAS. La inhibición de este enzima causa un acúmulo de malonil-CoA, inhibidor fisiológico de CPT1. Se ha propuesto que C75 tiene un efecto activador sobre CPT1, sugiriendo una acción dual y paradójica para este compuesto. El derivado C75-CoA, formado a partir de C75 y CoA-SH, tiene un potente efecto inhibidor de CPT1 *in vitro* e *in vivo*. Las líneas rojas indican inhibición y las flechas verdes activación.

Todos estos resultados nos instaron a profundizar en el estudio del mecanismo de acción de C75 y durante el presente trabajo analizamos el efecto que tiene sobre CPT1 en el hipotálamo, planteándonos que la inhibición de este enzima podría ser crucial mediando el efecto anorexigénico de C75. Al mismo tiempo, tratamos de avanzar en la síntesis de nuevos derivados de esta molécula con un mayor efecto

supresor del apetito, como primer paso en el diseño de nuevos fármacos anti-obesidad.

1

Capítulo 2. OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto que la modulación de la actividad CPT1A hipotalámica tiene en la regulación de la ingesta, el peso y el metabolismo glucídico. Para ello hemos realizado dos aproximaciones diferentes:

1. Sobre-expresión de CPT1AM en el hipotálamo

Expresión a largo plazo de la isoforma permanentemente activa CPT1AM, específicamente en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), y análisis de su papel en la regulación de la ingesta, el peso y la homeostasis glucídica.

2. Inhibición de CPT1 en el hipotálamo

2.1. Estudio del mecanismo de acción del compuesto anoréxico C75, basándonos en su acción sobre CPT1.

2.2. Estudio de los requerimientos estructurales que hacen de C75 un compuesto supresor del peso y la ingesta como primer paso en el diseño de nuevas moléculas con una acción más potente y/o específica que el propio C75.

Capítulo 3. MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES

1. C75 y derivados
2. Vectores víricos
3. Cepas de levadura y vectores plasmídicos
4. Oligonucleótidos y sondas

MÉTODOS

1. Animales y procedimientos
 2. Determinación de hormonas en suero
 3. Determinación de metabolitos
 4. Cuantificación de aciles-CoA por espectrometría de masas
 5. Métodos de trabajo con *Saccharomyces cerevisiae*
 6. Métodos de trabajo con proteínas
 7. Métodos de trabajo con RNA
 8. Análisis histológico
 9. Métodos bioinformáticos
 10. Métodos estadísticos
-

MATERIALES

Los reactivos utilizados se especifican en cada apartado de la sección Métodos. A continuación se detallan otros materiales utilizados:

3

1. C75 Y DERIVADOS

Los compuestos utilizados fueron sintetizados en el *Grupo de Investigación en Metodología Sintética Aplicada a Productos Bioactivos* del departamento de Química Orgánica (Facultad de Química) de la Universidad de Barcelona bajo la dirección del Dr. Jordi García. Esta síntesis nace de la colaboración entre los dos grupos, como un proyecto del IBUB (*Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona*). En algunos casos también utilizamos (±)-C75 (*trans*-4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofurano-3-ácido carboxílico) comercial, de la marca Sigma (ref. C5490).

La utilización de los enantiómeros de (±)-C75, por separado, para la fabricación de un medicamento ha sido presentada ante la Oficina Española de Patentes y Marcas.

En el **Apéndice 1** se muestra el nombre y estructura química de cada uno de los compuestos.

2. VECTORES VÍRICOS

Durante la realización de este trabajo se han utilizado virus adenoasociados (AAV) para la sobre-expresión de proteínas en rata. Éstos fueron producidos en colaboración con la empresa holandesa *Amsterdam Molecular Therapeutics* (AMT). AMT es una compañía ubicada en el sector de la biotecnología, que se dedica a la síntesis de vectores víricos para la utilización en terapia génica.

El método utilizado para la fabricación de los AAV fue el descrito por Urabe y colaboradores (Urabe, Ding *et al.*, 2002) que se basa en la formación de tres baculovirus y la posterior producción de los AAVs en células de insecto Sf9. Uno de los baculovirus contiene las proteínas *rep* para la replicación, el segundo contiene las proteínas de la cápside, *cap* o *vp*, y por último el tercer baculovirus contiene el gen de interés.

El primer paso para la obtención del baculovirus que contiene el gen de interés es el clonaje de dicho gen en el vector plasmídico correspondiente. En nuestro caso, dicho vector está integrado por el promotor del citomegalovirus (CMV), la secuencia de cDNA de los genes que se quieren expresar (GFP o CPT1AM), una región reguladora post-transcripcional para mejorar la transcripción (WPRE, *woodchuck post-transcriptional regulatory element* [GenBank acc AY468 486]) y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH, bases 2326 – 2533 [GenBank acc M57764]). La construcción va encajada entre dos zonas invertidas (ITR, *inverse terminal repeats*) que provienen del virus adenoasociado de serotipo 2. Los plásmidos con los que se obtuvieron los baculovirus de las proteínas *rep* y *vp* fueron suministrados por la empresa AMT. Los virus adenoasociados utilizados presentan una cápside correspondiente al serotipo 1, que permite la infección de células del SNC, especialmente neuronas (**Figura 1**).



Figura 1. Esquema de la estructura de los virus adenoasociados utilizados para la sobre-expresión de las proteínas GFP y CPT1AM en rata.

3. CEPAS DE LEVADURA Y VECTORES PLASMÍDICOS

Para la expresión de las proteínas recombinantes CPT1Awt y CPT1AM se empleó la cepa de levadura YPH499 de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Invitrogen, ref. K500053). El genotipo/fenotipo de esta cepa es el siguiente: *MAT a ura3-52 leu2-D1 ade2-101 lys2-801 his3-D200 trp1-D63*.

El vector utilizado para expresar las citadas proteínas en *S. cerevisiae* fue el pYES 2.0 (Invitrogen, ref. V825-20). Se trata de un plásmido episomal de alto número de copias. En levaduras el marcador de selección de este plásmido es el gen URA3, que codifica para el enzima orotidina-5'-fosfatodecarboxilasa y permite una selección por auxotrofia, lo que significa que en ausencia de uracilo solamente son capaces de crecer aquellas células que han incorporado el plásmido. La expresión del gen de interés está

bajo el control del promotor GAL1, inducible por galactosa y que se encuentra reprimido cuando la fuente de carbono es glucosa.

4. OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys y TibMolbiol y purificados por desalado. Se recibieron liofilizados y se resuspendieron en H₂O milliQ estéril hasta una concentración de 100 µM. Esta solución *stock* se almacenó a -20°C.

En el **Apéndice 2** se muestra la secuencia y temperatura de fusión (*T_m*) de los oligonucleótidos utilizados.

En algunos casos, se emplearon sondas de hibridación o de hidrólisis para una mayor especificidad y sensibilidad en la amplificación por *real time*-PCR.

Para la amplificación de CPT1Awt y CPT1AM se utilizaron sondas de hibridación. El sistema se basa en la presencia de dos sondas, marcadas cada una con un fluoróforo diferente, que hibridan en zonas muy próximas del gen a amplificar. De esta manera, cuando ambas sondas están hibridadas se encuentran lo bastante cerca para que la energía emitida por el fluoróforo de una, o donador, excite el fluoróforo de la segunda sonda, o aceptor, el cual emite la fluorescencia que es detectada por el aparato de *real time*-PCR. En el **Apéndice 2** se muestra la secuencia de las sondas de hibridación utilizadas.

Para la amplificación del gen *ObRb* se utilizó una sonda de hidrólisis (UPL, *Universal Probe Library*. Roche® nº 118). La detección con este tipo de sondas se basa en el marcaje de la misma con un fluoróforo y un “apagador” o *quencher* de manera próxima entre ellos. La sustancia denominada *quencher*, absorbe la energía de excitación del fluoróforo de manera que cuando la sonda se hidroliza en el proceso de amplificación ambos compuestos son separados permitiendo la liberación de fluorescencia, detectada entonces por el aparato de *real time*-PCR.

MÉTODOS

1. ANIMALES Y PROCEDIMIENTOS

Se emplearon ratas de la cepa Sprague-Dawley de, aproximadamente, 10-12 semanas de edad con un peso de 260-290 gramos los machos y 210-230 gramos las hembras, y ratones de la cepa C57/BL6 de 10 semanas de edad. Todos fueron adquiridos en Harlan Co. o en el Estabulario de la facultad de Farmacia. En todos los casos los animales se mantuvieron a 20°C en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con libre acceso a la comida (Harlan Ibérica, ref. 2014) y el agua. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

1.1. DETERMINACIÓN DEL PESO Y LA INGESTA

El peso corporal de ratas y ratones se determinó mediante pesadas de los animales en una balanza de precisión, en los períodos de tiempo indicados en cada caso. El cambio en el peso se calculó como la diferencia entre dos pesadas consecutivas en un intervalo de tiempo determinado.

Para calcular la ingesta de las ratas se pesó la cantidad de comida inicial en una balanza de precisión y se realizaron pesadas consecutivas de dicha comida en los intervalos de tiempo indicados en cada caso. Los animales sometidos a un control de la ingesta se estabularon en jaulas individuales.

1.2. ESTEREOTAXIS

La estereotaxis consiste en alcanzar una región profunda del cerebro, previamente definida por sus coordenadas en los tres planos del espacio, con una aguja o una cánula, que penetra en el cráneo por un orificio de trepanación y que es guiada por un aparato especial según los datos de la localización previa.

Durante esta Tesis Doctoral se han realizado tres procedimientos esterotáxicos diferentes:

- Micro-inyección en el hipotálamo
- Canulación del ventrículo lateral
- Canulación del núcleo ventromedial (VMH) del hipotálamo

1.2.1. Micro-inyección en el hipotálamo

Las ratas se anestesiaron utilizando una mezcla de ketamina (90 mg/kg) (Imalgene 1000, Merial) y xilazina (11 mg/kg) (Rompun 2%, Bayer). Una vez anestesiadas, se colocaron en un aparato de estereotaxis (*Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument*, Kopf Instruments). A continuación se practicó una incisión longitudinal en la cabeza utilizando un bisturí hasta dejar al descubierto el cráneo del animal. En el cráneo se localizó el punto bregma, correspondiente a la unión de los huesos frontales y occipitales (**Figura 2**), que se utilizó como punto de referencia para la realización de la craneotomía que permite la inyección en el cerebro.

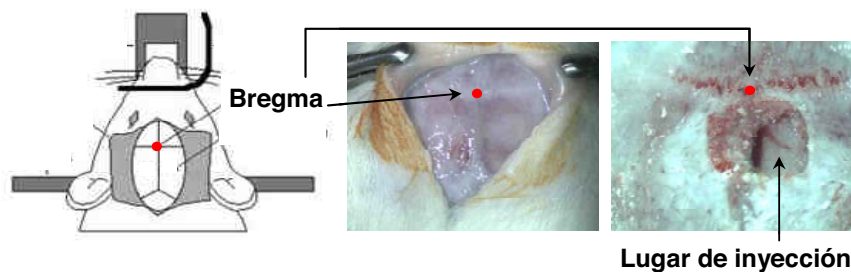


Figura 2. Esquema e imágenes del cráneo de una rata macho de la cepa Sprague-Dawley de 290 g de peso, antes y después de una craneotomía. El punto de referencia bregma se muestra en color rojo.

Utilizando un atlas del cerebro de rata adulta (Paxinos y Watson, 1998) se establecieron las coordenadas, respecto el punto bregma, para alcanzar el núcleo hipotalámico deseado y en ese punto se realizó un orificio en el cráneo suficientemente grande como para introducir la aguja y realizar la inyección. Para la trepanación se utilizó un micro-taladro con una broca fina y afilada.

Para realizar la inyección se utilizó una jeringuilla de precisión de 1 μL (Hamilton, ref. 7001 SN 1 μL). Una vez introducida a la profundidad deseada se esperaron entre 5 y 10 minutos para permitir la acomodación de dicha aguja en el tejido cerebral. Pasado ese tiempo se procedió a la inyección a una velocidad aproximada de 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$. El volumen máximo inyectado fue de 1 μL por cada sitio de inyección. Se esperaron entre 5 y 10 minutos antes de retirar la aguja, para evitar el reflujo del compuesto inyectado.

1.2.2. Canulación del ventrículo lateral

El animal se anestesió tal y como se indica en el apartado anterior y se colocó en un aparato de estereotaxis. A continuación se practicó una incisión transversal en la piel de la cabeza hasta dejar al descubierto el cráneo del animal. Una vez localizado el punto bregma (**Figura 2**) se realizó un pequeño orificio de, 1,1 mm aproximadamente, en las siguientes coordenadas (respecto bregma): 1,2 mm lateral y 1,00 mm posterior (Paxinos y Watson, 1998). En ese orificio se introdujo una cánula de polietileno (Clay-Adams, Becton Dickinson, ref. PE-20) a una profundidad aproximada de 3,5 mm. Para la correcta fijación de la cánula se utilizó gel de cianoacrilato (Plastics 1, ref. 300CAG) que asegura la permanencia de la misma y no afecta a la recuperación del animal.

Administración intracerebroventricular (i.c.v.)

Tras un período de recuperación de una semana desde la implantación de la cánula en el ventrículo lateral, los animales fueron anestesiados con isoflurano (IsoFlo®, Veterinaria Esteve) para la inyección i.c.v. de cualquier compuesto. Dicha inyección se realizó utilizando una jeringuilla de 50 μL (Hamilton, ref. 705RN, P/N 7637-01/00) siendo el volumen máximo inyectado de 10 μL .

La correcta colocación de la cánula se comprobó analizando la respuesta de los animales a angiotensina II, grelina o C75.

1.2.3. Canulación bilateral del VMH

La rata se anestesió tal y como se indica en el apartado 1.2.1 y se colocó en un aparato de estereotaxis. A continuación se realizó una incisión longitudinal en la cabeza dejando al descubierto el cráneo del animal. Es muy importante eliminar todo

el tejido conjuntivo que recubre el cráneo y mantener seca la zona para asegurar la correcta adhesión del cemento que fija la cánula, por lo que se utilizó un cauterizador para detener todas las hemorragias producidas durante el proceso quirúrgico. Una vez limpia la zona del cráneo se localizó el punto bregma y se realizó una abertura, suficientemente grande para acomodar la cánula, en las siguientes coordenadas (respecto bregma): 2,8 mm posterior, 0,7 mm lateral (**Figura 3**). Esta abertura se hizo utilizando un micro-taladro y una broca fina y afilada. A continuación se realizaron 4 orificios pequeños (aproximadamente 1 mm de diámetro) próximos a cada esquina de la abertura, donde se acomodaron 4 tornillos de acero inoxidable (Plastics 1, ref. *screw* 0-80x1-16 1212 080x062) que permiten el anclaje del cemento que fija la cánula. A continuación se introdujo la cánula bilateral (Plastics 1, ref. C235G-1,5-SPC *Guide* DBL 26GA 1,5 mm C-C/9 mm *Below Pedestal*) a una profundidad de 9 mm y se fijó utilizando gel de cianoacrilato (Plastics 1, ref. 300CAG) y cemento adhesivo de secado rápido (Plastics 1, ref. cere-AD Cerebond/cere-Tub Cerebond *Mixing Tube*). Una vez seco el cemento se introdujo un obturador en la cánula, para evitar obstrucciones (Plastics 1, ref. C235DC-SPC/*fit* 9mm C235G-1,5 *W-O Proj.*). La cánula y el obturador se protegieron utilizando un tapón de plástico (Plastics 1, ref. 303DCFT *Dust Cap*).

Inyección de virus adenoasociados en el VMH

Tras un período post-operatorio de 1 semana los animales fueron anestesiados, tal y como se describe en el apartado 1.2.1, y colocados en un aparato de estereotaxis. Utilizando una jeringuilla de 5 μ L (Hamilton, 7633-01) se realizó la inyección de los virus adenoasociados en el VMH, a través de la cánula bilateral, a una profundidad de 10 mm desde la superficie del cráneo. El volumen inyectado fue de 1 μ L. Una vez introducida la jeringuilla a través de la cánula se esperaron 10-15 minutos, para permitir la acomodación de la aguja en el tejido cerebral. La inyección se realizó a una velocidad de 0,2 μ L/min tras lo que se esperaron 10-15 minutos antes de retirar la aguja, para evitar el reflujo del compuesto inyectado.

Una vez finalizado cualquier proceso estereotáxico, los animales se colocaron individualmente en una caja limpia con libre acceso a la comida. Durante una semana se les suministró agua suplementada con antibióticos (enrofluoxacina, 10%) y

analgésicos (bruprenorfina, 0,3 mg/400 mL agua) y se realizó un control diario del estado general y la correcta recuperación post-quirúrgica.

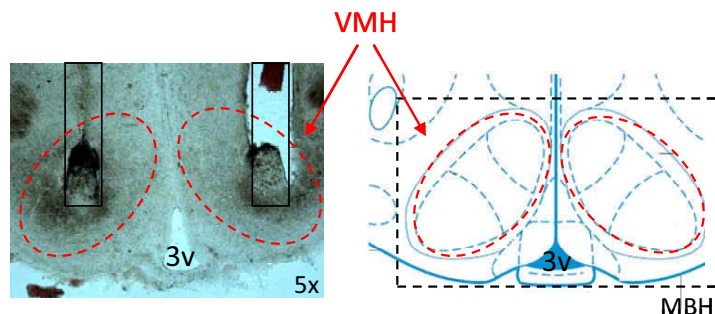


Figura 3. Canulación del núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH). Imagen parcial de una sección coronal del cerebro de rata a la que se le implantó quirúrgicamente una cánula bilateral en el VMH. El recorrido de la cánula se presenta enmarcado en rectángulos negros. Se muestra un dibujo esquemático de la sección del cerebro correspondiente donde se señala el VMH y el tercer ventrículo (3v) (Paxinos y Watson, 1998). **VMH:** núcleo ventromedial del hipotálamo; **3v:** tercer ventrículo; **MBH:** hipotálamo mediobasal; **5x:** imagen tomada con un objetivo de 5 aumentos.

1.3. MEDIDA DE LA GLUCEMIA Y OBTENCIÓN DE SUERO

Las medidas de los niveles de glucosa en sangre se realizaron utilizando un glucómetro (Elite, Bayer) con una gota de sangre obtenida tras un pequeño corte en la cola de la rata. Las medidas de glucemia se realizaron tras un ayuno de 6 o 12 horas, según cada diseño experimental. Para la obtención de suero se utilizaron tubos para la extracción de sangre capilar (Microvette® CB300, Sarstedt). Una vez obtenida la sangre los tubos se mantuvieron un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 10.000 $\times g$ a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C para posteriores determinaciones de metabolitos y hormonas.

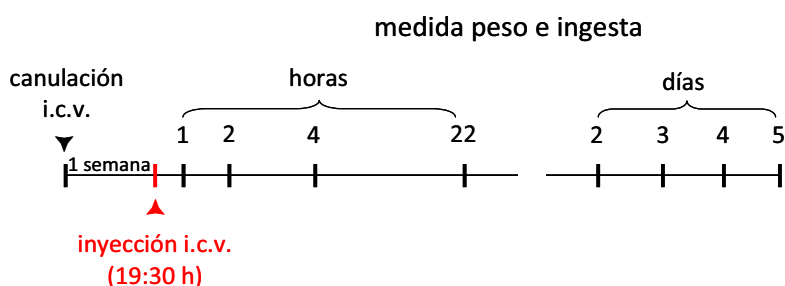
1.4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT)

El test de tolerancia a la glucosa se realizó en ratas tras un ayuno de 12 horas. Se practicó una inyección intraperitoneal (i.p.) de glucosa 20% a una concentración de 2 g/Kg de peso a cada rata y se midió la glucemia 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Las medidas de glucemia se realizaron utilizando un glucómetro tal y como se detalla en el apartado anterior.

1.5. DISEÑOS EXPERIMENTALES

Tratamiento intracerebroventricular (i.c.v.) con C75 y sus derivados

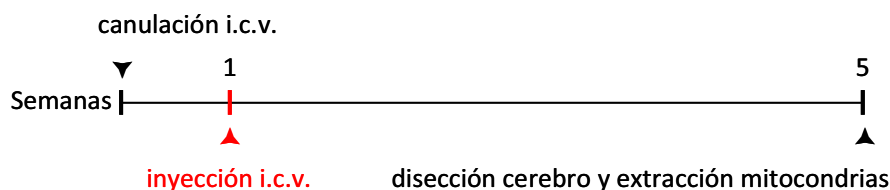
Para el estudio del efecto que la administración central de C75 y otros compuestos derivados (ver **Apéndice 1**) tienen sobre el peso y la ingesta de las ratas, se realizaron inyecciones i.c.v. 1 semana después de la colocación de las correspondientes cánulas. Los diferentes compuestos fueron inyectados tal y como se detalla en Métodos, 1.2.2., media hora antes del inicio de la fase oscura (19:30 h). Las ratas son animales nocturnos y se alimentan principalmente durante el ciclo oscuro, por ello los efectos de un determinado tratamiento sobre la ingesta se ensayaron siempre durante ese periodo.



En algunos casos los animales fueron sacrificados 1 hora después de la inyección i.c.v. y el hipotálamo fue diseccionado y procesado para análisis posteriores.

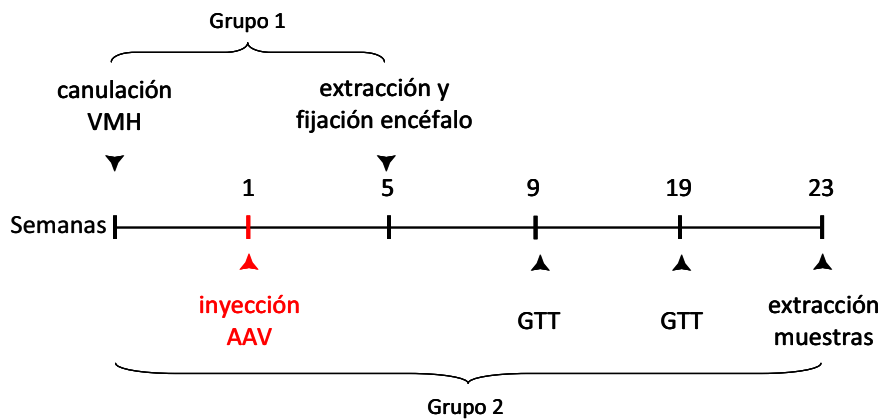
Tratamiento i.c.v. con virus adenoasociados (AAVs)

Para estudiar la capacidad infectiva y la efectividad de los virus adenoasociados (AAV) para sobre-expresan las proteínas GFP/CPT1AM en cerebro se siguió el siguiente diseño experimental:



Inyección de AAVs en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH)

Para estudiar el efecto que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH tiene sobre el peso, la ingesta y el metabolismo de la glucosa se realizaron experimentos a largo plazo, durante 24 semanas (grupo 2). Alternativamente, en algunos casos los animales se sacrificaron 4 semanas después de la inyección de los virus y el encéfalo se fijó en una solución de formalina 10% para posteriores estudios histológicos (Métodos, 8) (grupo 1).



2. DETERMINACIÓN DE HORMONAS EN SUERO

Todos los niveles de hormonas fueron determinados utilizando *kits* de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) comerciales. Estos ensayos, también denominados *sandwich* ELISA, se basan en la utilización de placas de 96-pocillos cubiertas con un anticuerpo específico para detectar y capturar un antígeno de interés en una muestra. El antígeno inmovilizado es detectado con otro anticuerpo específico que a su vez es detectado por un tercer anticuerpo enlazado a un enzima capaz de generar un producto detectable, generalmente por un cambio en el color y la absorbancia, que se puede medir espectrofotométricamente. En todos los casos se siguieron las instrucciones provistas por cada casa comercial:

Insulina

Se utilizó el *kit Rat/Mouse Insulin ELISA* (Millipore, EZRMI-13K)

Leptina

Se utilizó el *kit Mouse/Rat Leptin ELISA Kit* (B-Bridge International, K1006-1)

Grelina

Se utilizó el *kit Rat Acylated Ghrelin ELISA* (BioVendor, RD394062400R)

3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

3.1. TRIACILGLICEROLES (TAG)

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

Extracción de las grasas

Este protocolo se basa en la extracción de todas las grasas utilizando cloroformo. Se siguieron los pasos detallados a continuación:

1. Colocar aprox. 100 mg de tejido congelado en un tubo *ependorf* de 2 mL.
2. Añadir 500 μ L de PBS 1x y romper mecánicamente el tejido utilizando el sistema *Polytron* (PT 2100).
3. Guardar 100 μ L de homogenado para la valoración de la concentración de proteínas.
4. Transferir el resto del homogenado a tubos de vidrio y añadir 1,5 mL de cloroformo. Mezclar vigorosamente y dejar toda la noche en agitación a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5 minutos a 10.000 *xg*. Transferir el sobrenadante y la fase inferior (descartando la interfase) a un nuevo tubo de vidrio.
6. Añadir 500 μ L de NaCl 0,9%. Mezclar durante 1 minuto. Centrifugar 5 minutos a 10.000 *xg*.
7. Recuperar la fase inferior y evaporar el solvente bajo una atmósfera de nitrógeno.

8. Reconstituir el producto con 250 μL de isopropanol.

Contenido de TAG

Se realizó utilizando un *kit* Cromatest comercial basado en un método enzimático colorimétrico (LINEAR Chemicals S.L., ref. 1155010) (**Figura 4**). La base de la técnica es la hidrólisis de los TAG, presentes en el tejido, a glicerol y ácidos grasos libres (FFA, *free fatty acids*) por acción del enzima lipoproteína lipasa (LPL). A continuación el glicerol es fosforilado por el enzima gliceroquinasa (GK), en presencia de ATP, formando glicerol-3-fosfato (G-3-P) y ADP. El G-3-P es oxidado por el enzima glicerol fosfato oxidasa (GPO) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y H_2O_2 .

En presencia del enzima peroxidasa (POD), el fenol y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por acción del H_2O_2 , formándose un producto de color rojo que es proporcional a la concentración de TAG en la muestra. La determinación se llevó a cabo siguiendo el protocolo provisto con el *kit*.

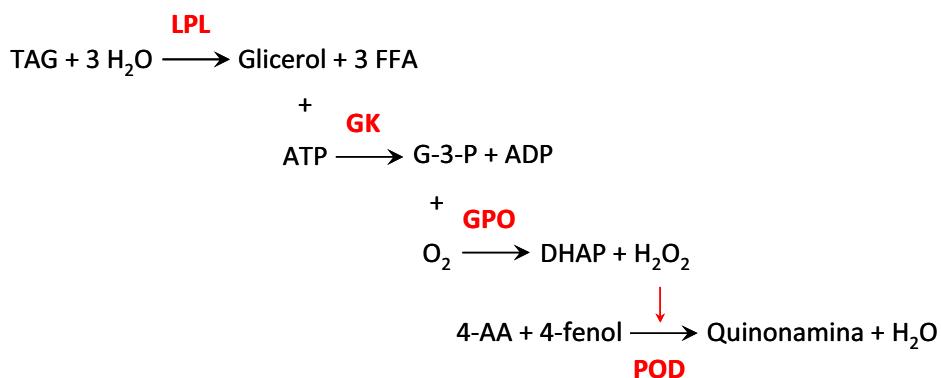


Figura 4. Método enzimático colorimétrico utilizado para la determinación de TAG.

3.2. MALONIL-CoA

Para la determinación de malonil-CoA en tejido se utilizó un método enzimático basado en la acción del complejo multienzimático malonato decarboxilasa (MD) de la bacteria *Pseudomonas putida* (Takamura, Kitayama *et al.*, 1985) (**Figura 5**). Este complejo tiene diferentes actividades enzimáticas y cataliza la siguiente reacción cíclica: en primer lugar decarboxila el malonil-CoA para producir acetil-CoA. Posteriormente transfiere el coenzima A del acetil-CoA a la molécula de malonato,

regenerando el malonil-CoA y produciendo acetato. La repetición cíclica de estos eventos por parte del complejo MD amplifica la acumulación del producto final, el acetato, que es transformado en ácido acetil-hidroxiácido. La concentración de este compuesto, que puede ser detectado midiendo su absorbancia a 540 nm, es proporcional a la concentración inicial de malonil-CoA en la muestra. Este método para determinar malonil-CoA es especialmente útil en tejidos con una concentración de este metabolito muy baja, ya que aporta gran sensibilidad debido a la reacción cíclica de la MD.

La determinación de malonil-CoA constó de diferentes pasos. En primer lugar la extracción de malonil-CoA de la muestra. En segundo lugar la eliminación del acetil-CoA presente. En tercer lugar la reacción cíclica de la MD y por último la transformación del acetato a ácido acetil-hidroxiácido y la medida de la absorbancia a 540 nm (A_{540}).

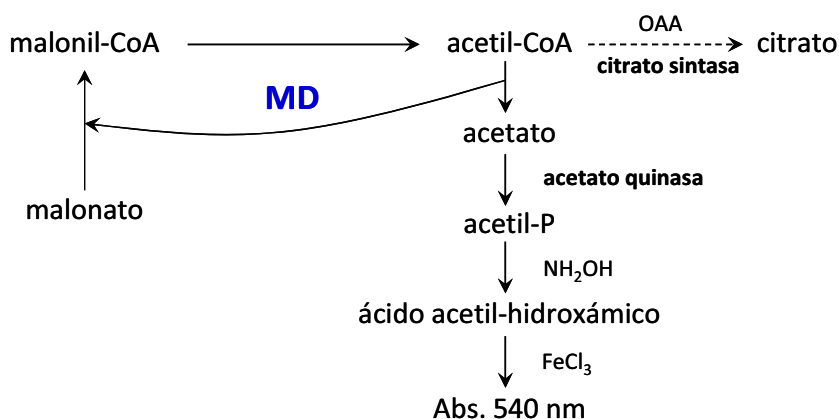


Figura 5. Conjunto de reacciones llevadas a cabo para la determinación de malonil-CoA en tejido. El acetil-CoA presente en la muestra es transformado en citrato por acción del enzima citrato sintasa. El complejo MD cataliza, en primer lugar, la decarboxilación del malonil-CoA a acetil-CoA. En segundo lugar forma malonil-CoA y acetato a partir de acetil-CoA y malonato. El acetato formado se va acumulando, debido a la reacción cíclica del complejo MD. Finalmente el acetato acumulado es transformado en ácido acetil-hidroxiácido, que se cuantifica midiendo su absorbancia a 540 nm.

Extracción de malonil-CoA

Todo el protocolo se realizó a 4°C.

1. Colocar ~ 50 mg de tejido congelado en un tubo eppendorf de 2 mL.
2. Añadir 600 µL de H₂SO₄ 0,3 M, previamente enfriado en hielo.

3. Sonicar el tejido en hielo (amplitud = 80, ciclos de 0,8).
4. Incubar el homogenado a 4°C durante durante un mínimo de 30 minutos (es posible dejarlo toda la noche).
5. Centrifugar las muestras a 10.000 *xg* durante 10 minutos a 4°C.
6. Ajustar cuidadosamente el pH del sobrenadante (snd) a 6,5-7,5 con Tris 1 M. Este proceso debe realizarse en hielo. Es muy importante que el pH no sea nunca mayor de 8 (Para 600 µL de H₂SO₄ se requieren aproximadamente 240 µL de Tris 1 M).
7. Centrifugar nuevamente a 10.000 *xg* durante 10 minutos a 4°C.
8. Guardar el snd.

Se apuntó el volumen de los snd obtenidos en las dos centrifugaciones, para realizar los cálculos posteriores.

Opcional: En este momento se pueden congelar los snd obtenidos durante 10 días a -80°C o 3 días a 4°C antes de su utilización.

Eliminación del acetyl-CoA presente en la muestra

1. Preparar la mezcla de reacción (en hielo):

Mezcla de reacción	
Muestra	250 µL
Oxalacetato 80 mM	7 µL
Tampón B	22 µL
Citrato Sintasa (1U/µL)	1 µL

2. Incubar durante 20 minutos a 30°C.

Tampón B

Tris-HCl 500 mM pH 7,2, MgSO₄·7 H₂O 100 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM. Preparar de manera extemporánea.

Citrato sintasa

Sigma, ref. C3260. Preparar de manera extemporánea a 1 U/µL.

Opcional: En este momento se puede detener el ensayo y las muestras pueden ser almacenadas a 4°C.

Reacción cíclica del complejo MD

1. Preparar diluciones del estándar malonil-CoA (6 nmol/μL) para hacer una recta patrón. Normalmente las concentraciones del patrón se encuentran en un rango desde 0,09 pmol/μL hasta 6 pmol/μL.
2. Preparar la mezcla de reacción:

Mezcla de reacción		
Muestra	Muestra	265 μL
	Patrón	20 μL
Malonato 500 mM		50 μL
ATP 50 mM		85 μL
MD		3,4 μL
H ₂ O c.s.p.		400 μL

3. Incubar 40 minutos a 30°C.

Estándar malonil-CoA (6 nmol/μL)

Disolver 5 mg (6 μmol) de malonil-CoA en 1 mL de tampón A. Ajustar pH a 6. Almacenar a -80°C.

Tampón A

Dilución 1:10 con H₂O del tampón B.

MD (Malonato Decarboxilasa)

El complejo enzimático MD de la bacteria *Pseudomonas putida* fue gentilmente suministrado por el Dr. Shigeru Chohnan, de la Universidad de Ibaraki (Japón).

Síntesis del ácido acetil-hidroxiámico

1. Colocar las muestras en hielo y añadir 1 U del enzima acetato quinasa.
2. Incubar 20 minutos a 30°C.
3. Colocar las muestras en hielo y añadir 200 μL de hidrocloreuro de hidroxilamina (HAH) 2,5 M.

4. Incubar 20 minutos a 30°C.
5. Colocar las muestras en hielo y añadir 600 µL de reactivo férrico.
6. Centrifugar a 4.000 xg durante 5 minutos.
7. Medir absorbancia a 540 nm.

Acetato quinasa

Sigma, ref. A7437. Preparar de manera extemporánea a 1 U/µL.

Reactivo férrico

Mezcla 1:1:1 de FeCl₃ 5%, ácido TCA 12% y HCl 3 M. Preparar de manera extemporánea.

4. CUANTIFICACIÓN DE ACILES-CoA POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS

Durante esta Tesis Doctoral se realizaron experimentos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) para el análisis en los niveles de C75-CoA y aciles-CoA de cadena larga en tejidos de rata.

La HPLC-MS/MS es una técnica de química analítica que combina la capacidad de separar diferentes moléculas mediante cromatografía líquida con la capacidad de identificación de las mismas por espectrometría de masas. Esta técnica es muy sensible y altamente selectiva y suele utilizarse para la identificación y cuantificación de diferentes moléculas que se encuentran en una mezcla compleja con otros productos.

Un equipo de cromatografía para HPLC está formado por diferentes componentes. En primer lugar contiene un sistema de bombeo para impulsar la fase móvil, una válvula de inyección que permite introducir las muestras en el sistema cromatográfico con un flujo continuo y a altas presiones, también contiene una columna cromatográfica que contiene la fase estacionaria y a través de la cual se separan las diferentes moléculas, un detector que permite determinar las sustancias separadas y por último un sistema registrador, que permite obtener los cromatogramas. Para el análisis de una muestra ésta se inyecta en el cromatógrafo de líquidos y sus componentes se separan en la columna cromatográfica. Los

componentes separados pasan, por orden de elución, al espectrómetro de masas, donde son analizados y cuantificados.

El primer paso para los estudios de HPL-MS/MS fue la obtención de los aciles-CoA de cadena larga y del C75-CoA de hipotálamo de rata.

4.1. EXTRACCIÓN DE ACILES-CoA Y C75-CoA DE HIPOTÁLAMO

Para la extracción de aciles-CoA y C75-CoA de hipotálamo se utilizó una modificación del protocolo descrito por Golovko y colaboradores (Golovko y Murphy, 2004). El C75-CoA, al tener una estructura y características químicas similares a un acil-CoA de cadena larga, se obtiene en la misma fracción que éstas moléculas. A continuación se detalla el procedimiento seguido:

1. Pesar el tejido y congelar en nitrógeno líquido.
2. Homogenizar el tejido congelado con 1 mL de tampón fosfatos 100 mM pH 7,4 y 10 μ L de n-heptadecanoil-CoA (C₁₇-CoA) (Sigma, ref. H1385) 1 mM (estándar interno) utilizando un homogenizador de vidrio (Wheaton, 7 mL *Dounce Tissue Grinder*, ref. 357542).
3. Añadir 1 mL de n-propanol y volver a homogenizar.
4. Añadir 125 μ L de (NH₄)₂SO₄ saturado y 2 mL de acetonitrilo 100%. Vortear durante 5 min de la siguiente manera: 1 minuto vórtex y 1 minuto en hielo.
5. Centrifugar a 2.100 *xg* durante 5 minutos a 4°C.
6. Filtrar La fase superior con un filtro estéril de 0,22 μ m (Millipore, ref. Millex-GS, catálogo: SLGL0250S).
7. Opcional: liofilizar La muestra filtrada con un concentrador (Eppendorf, *Concentrator Plus*).

Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

El último paso de liofilización se realizó en función de los niveles del producto a analizar en la muestra. Para los análisis de C75-CoA sí se liofilizó, sin embargo para los análisis de aciles-CoA la fase filtrada sin liofilizar fue directamente analizada.

Este protocolo se siguió para la extracción de aciles-CoA/C75-CoA de un hipotálamo con un peso de ~ 50-60 mg. Para un tejido de partida más pequeño todos los volúmenes se ajustaron de manera proporcional.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE C75-CoA EN HIPOTÁLAMO

Para los estudios de la formación de C75-CoA en hipotálamo de rata se utilizó el sistema cromatográfico Agilent Serie 1100 equipado con una bomba cuaternaria y un inyector de muestras termoestabilizado. La columna utilizada fue una XBridge (Waters, ref. 186003037) C₁₈ (2,1 x 50 mm, 3,5 µm) a temperatura ambiente y el volumen de inyección de las muestras fue de 15 µL. Las fases móviles utilizadas fueron tres: **Fase móvil A:** 50% de acetonitrilo en acetato de amonio 10 mM pH 5,3; **Fase móvil B:** 10% de acetonitrilo en acetato de amonio 10 mM pH 5,3; **Fase móvil C:** 100% acetona.

La columna fue equilibrada de la siguiente manera: 15% A durante 10 minutos; de 15% a 90% de A en 5,5 minutos; de 90% de A a 50% de A y de 5% de C a 45% de C en 15,5 minutos; 50% de A y 45% de C durante 15 minutos.

Los análisis de masas (barrido completo *-full scan*, MS- y tándem *-MS/MS-*) se realizaron en un espectrómetro de masas API 3000 triple cuadrupolo equipado con una fuente de *turbo ionspray*. Todos los análisis fueron realizados en modo positivo y con las siguientes condiciones: voltaje capilar, +3000 V; gas nebulizador (N₂), 10 unidades arbitrarias (UA); gas cortina (N₂), 12 UA; gas de colisión (N₂), 4 UA; potencial *declustering*, +30 V; potencial de focalización, +200 V; potencial de entrada, +10 V; energía de colisión, +40 V; potencial de salida de la celda de colisión, +15 V. El gas auxiliar (N₂) se calentó a 300°C y fue introducido en la fuente de ionización chocando a 90° respecto al spray, a un flujo de 6000 cm³/min.

La adquisición de datos en el modo *full scan*, o barrido completo, se realizó desde 500 hasta 1200 m/z, en modo continuo, utilizando un ciclo de 2 segundos con un paso de 0,1 u y una pausa entre cada ciclo de 2 ms. Con el objetivo de alcanzar la máxima sensibilidad, las muestras fueron inyectadas en modo MRM (*multiple monitoring mode*) y se monitorizaron las transiciones 1022,5/515,6 y 1020,7/513,5, obtenidas tras los experimentos de *product ion scan* (PIS), para los estándares C75-CoA y C₁₇-CoA respectivamente.

Para cuantificar la concentración del analito C75-CoA en la muestra, se inyectaron 15 μ L de concentraciones crecientes de los estándares C75-CoA y C₁₇-CoA. Las áreas de los picos cromatográficos resultantes fueron calculadas y se utilizaron para crear las curvas estándares, que permitieron calcular la concentración del C75-CoA en la muestra problema a partir del área del pico obtenido. El C₁₇-CoA, acil-CoA sintético que no se encuentra en las muestras biológicas, se utilizó como estándar interno y permitió calcular el porcentaje de recuperación de los aciles-CoA/C75-CoA durante el proceso de extracción.

4.3. CUANTIFICACIÓN DE ACILES-CoA DE CADENA LARGA EN HIPOTÁLAMO

Para la cuantificación de los aciles-CoA de cadena larga en hipotálamo se utilizaron las mismas condiciones de HPLC-MS/MS que para los estudios de C75-CoA (ver apartado Métodos 4.2), con algunas modificaciones.

Los aciles-CoA utilizados como estándar fueron los siguientes: **Palmitoil-CoA** (C₁₆-CoA) (Sigma, ref. P9716); **Oleoil-CoA** (C_{18:1}-CoA) (Sigma, ref. O1012); **Estearoil-CoA** (C₁₈-CoA) (Sigma, ref. S0802); **Linoleoil-CoA** (C_{18:2}-CoA) (Sigma, ref. L-4260); **n-Heptadecanoil-CoA** (C₁₇-CoA), estándar interno (Sigma, ref. H1385).

Para la cuantificación de estos analitos en la muestra problema se crearon curvas estándar para cada uno de ellos. Para ello se inyectaron 15 μ L de concentraciones crecientes conocidas de cada estándar y se calculó el área de los picos cromatográficos obtenidos en cada caso. Las diluciones de las diferentes concentraciones se prepararon en una matriz blanca. Una matriz blanca es una solución idéntica a la solución problema pero que carece de los metabolitos problema. Para conseguir una matriz blanca se incubó un hipotálamo control durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo todos los aciles-CoA presentes en la muestra han sido degradados. El hipotálamo, libre de aciles-CoA, fue sometido al mismo protocolo de extracción que las muestras problema. El producto, fue utilizado para hacer las diluciones de los diferentes estándares.

Tras la inyección de los diferentes puntos de la curva estándar se monitorizaron las siguientes transiciones: **Palmitoil-CoA**: 1006,4/499,4; **Oleoil-CoA**: 1032,6/525,4;

Estearoil-CoA: 1034,7/527,5; **Linoleoil-CoA:** 1030,9/523,6; **n-Heptadecanoil-CoA:** 1020,7/513,5.

El estándar interno, C₁₇-CoA, se añadió a una concentración fija en cada uno de los puntos de la recta patrón (10 ppm). Esta concentración fue la misma que se añadió a las muestras problema antes de iniciar el proceso de extracción de aciles-CoA. Esto permite establecer un *ratio* entre la concentración del estándar interno y la del metabolito problema. La cuantificación de cualquier compuesto utilizando este sistema es más precisa, pues permite valorar y tener en cuenta la posible variación de la señal de una misma muestra durante todo el proceso (variaciones debidas básicamente a un efecto de retención en la columna).

Todos los experimentos de HPLC-MS/MS se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, localizado en el Parque Científico de Barcelona (PCB).

5. MÉTODOS DE TRABAJO CON *Saccharomyces cerevisiae*

5.1. CRECIMIENTO, TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

Crecimiento

La cepa de levadura YPH499 (Materiales 3) se creció en medio completo YPD estéril. El medio YPD líquido se compone de 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa (pH 6,6 antes de la esterilización por autoclave). Al medio sólido se le añade, además, agar al 2% (pH 7,2 antes de la esterilización por autoclave). Todos los medios de cultivo se almacenaron a 4°C.

El crecimiento en medio líquido se realizó a 30°C con agitación continua. La densidad de las células en cultivo se determinó espectrofotométricamente, utilizando la siguiente regla para titular: $0,1 \text{ DO}_{660} \approx 3 \times 10^6 \text{ células/mL}$, siendo DO_{660} la densidad óptica del cultivo a 660 nm.

Transformación

El plásmido de expresión pYES-CPT1Awt se transformó en la cepa de *S. cerevisiae* utilizando una modificación del método descrito por Schiestl (Schiestl y Gietz, 1989). Este método utiliza acetato de litio y se basa en que los cationes alcalinos hacen a la levadura competente para aceptar DNA. El acetato de litio permite la disrupción parcial de la pared sin romperla completamente, lo que mantiene a la célula más o menos estable. En este método, la adición de polietilenglicol (PEG) y un choque térmico desencadenan la captación de DNA transformante por las células competentes. Una vez transformadas las levaduras son plaqueadas en un medio selectivo.

El procedimiento que se siguió se describe a continuación:

1. Inocular 15 μ L de un cultivo líquido de la cepa de interés en 15 mL de medio YPD líquido. Crecimiento a 30°C con agitación durante 16-18 horas ($2 < DO_{660} < 9$).
2. Inocular x mL del preinóculo (paso 1) en 50 mL de medio YPD líquido, para obtener una DO_{660} de 0,2-0,3. Para calcular x aplicar la siguiente fórmula: $V_{inicial} \times DO_{inicial} = V_{final} \times DO_{final}$, donde V es el volumen en mL. Crecimiento durante 3 h a 30°C en agitación.
3. Centrifugar las células a 100 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar las células con 25-50 mL de H₂O milliQ ac, resuspendiendo las células por inversión. Centrifugar a 100 xg durante 5 minutos.
5. Resuspender las células en 200 μ L de solución acetato de litio tamponada (TE 1x/acetato de litio 1x).
6. Transformar en tubos eppendorf en los que se añade: 1 μ L TE 1x/acetato de litio 1x, 100 μ g DNA transportador, 100 ng DNA plasmídico a transformar (entre 1 y 5 μ L) y 100 μ L de levaduras competentes. Mezclar sin vortear.
7. Añadir 600 μ L de solución de polietilenglicol (TE 1x/acetato de litio 1x/PEG 4000 40%). Mezclar.

8. Incubar a 30°C durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, añadir 70 µL de DMSO, filtrado inmediatamente antes. Mezclar por inversión.
9. Someter la mezcla anterior a un choque térmico: incubar a 42°C durante 15 minutos. Seguidamente enfriar en hielo durante 1-3 minutos.
10. Centrifugar las células unos segundos a velocidad máxima. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 100 µL de tampón TE 1x.
11. Plaquear los 100 µL en una placa selectiva para el marcador del plásmido, en nuestro caso en una placa de medio sin uracilo (CMUra⁻). Incubar a 30°C hasta la aparición de colonias transformantes.

Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y los diferentes reactivos se prepararon de manera extemporánea. Las soluciones *stock* a partir de las cuales se prepararon son las siguientes:

Acetato de litio 10x

Acetato de litio 1 M (Sigma, ref. L6883) en H₂O milliQ ac. pH 7,5. Solución esterilizada por filtración.

Tampón TE 10x pH 7,5

Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA pH 8,0 10 mM. Esterilizado por filtración.

PEG 4000 50% (p/v)

Esterilizado por filtración.

DNA transportador

DNA (sal sódica de esperma de salmón. Sigma, ref. D1626), disuelto en TE 1x pH 8,0 a una concentración de 100 mg/mL. Almacenado a -20°C.

CMUra⁻

Medio líquido: 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 0,17% de YNB (*yeast nitrogen base*), 0,077% de CSM-URA (suplemento que contiene todos los aminoácidos necesarios excepto uracilo), 2% de una fuente de carbono (glucosa o ácido láctico). pH 5,0 antes de autoclavar.

Medio sólido: se añade un 2% agar y se ajusta el pH a 6,0 antes de autoclavar. Almacenados a 4°C.

Selección de los transformantes

La selección de los transformantes se realiza porque en placas sin uracilo únicamente crecen las levaduras que han incorporado el plásmido. Tras la transformación se picó una de las colonias de *S. cerevisiae* positiva y se inoculó en 30 mL de medio CMUra⁻ líquido con un 2% de glucosa como fuente de carbono. El cultivo se creció a 30°C hasta obtener una DO₆₆₀ no superior a 1. Es este punto el cultivo líquido puede ser almacenado a 4°C hasta un mes.

Puesto que el enzima CPT1A de rata se localiza en mitocondrias, las levaduras transformadas con el plásmido pYES-CPT1Awt que contiene el cDNA de este enzima se crecieron en un medio con ácido láctico como fuente de carbono, para favorecer la síntesis de dichos orgánulos. Se inoculó la cantidad adecuada del cultivo de glucosa en medio CMUra⁻ con un 2% de ácido láctico para que quedara a una DO₆₆₀ de 0,1. Este crecimiento se mantuvo a 30°C en agitación hasta que se llegó a una DO₆₆₀ de ~ 1. En ese punto se indujo la expresión de la proteína de interés añadiendo un 2% de galactosa al medio líquido, continuando con la agitación a 30°C durante 20 horas más.

5.2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la obtención de las proteínas recombinantes expresadas en levadura se utilizó el método de las bolas de vidrio, que se basa en la rotura mecánica de las levaduras al vortear vigorosamente en presencia de las citadas bolas (Sigma, ref. G8772). El protocolo que se siguió se describe a continuación:

1. Centrifugar las levaduras inducidas con 2% de galactosa a 4.000 *xg* durante 5 minutos a 4°C.
2. Hacer dos lavados con H₂O destilada fría. Centrifugar nuevamente.
3. Resuspender las levaduras sedimentadas en 700 µL de tampón con inhibidores de proteasas por cada 250 mL de cultivo. Es importante no superar el volumen máximo de 1 mL por tubo.

4. Añadir en cada tubo el mismo volumen de bolas de vidrio previamente enfriadas.
5. Romper las levaduras vorteadando durante 5-10 minutos, intercalando 30 segundos de vórtex con 30 segundos en hielo.
6. Tras la rotura, centrifugar los tubos a 4.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C, para bajar las bolas de vidrio y los restos de la pared de las levaduras.
7. Centrifugar el sobrenadante obtenido a 17.000 *xg* durante 30 minutos a 4°C. El precipitado de esta centrifugación se corresponde a la fracción mitocondrial
8. Resuspender la fracción mitocondrial con tampón con inhibidores de proteasas hasta una concentración de ~3 µg/µL. Almacenar en alícuotas a -80°C para posteriores ensayos de actividad.

Tampón

Hepes 10 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, glicerol 10% en agua destilada. Los inhibidores de proteasas se añaden de manera extemporánea, justo antes de su utilización (Roche *Complete*, ref. 11836145001).

6. MÉTODOS DE TRABAJO CON PROTEÍNAS

6.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

El método de extracción de proteínas varió en función de la fuente de extracción. La obtención de proteínas sobre-expresadas en levaduras se realizó como se detalla en el apartado Métodos 5.2. En todos los casos se obtuvieron extractos enriquecidos en mitocondrias para los análisis de *western blot* y actividad enzimática. A continuación se detalla la extracción a partir de células en cultivo o tejido cerebral.

Células en cultivo y hepatocitos primarios

Los cultivos primarios de hepatocitos de rata fueron obtenidos por otros miembros de nuestro grupo siguiendo el protocolo detallado en (Orellana-Gavaldà, Herrero, *et al.*, 2011). Para la obtención de extractos mitocondriales de células

inmortalizadas en cultivo y hepatocitos primarios de rata se utilizó el mismo protocolo. Todo el proceso se realizó a 4°C. El protocolo detallado en este apartado corresponde a la obtención de proteínas a partir de una placa de cultivo celular de 10 cm de diámetro.

1. Lavar las células con PBS (*phosphate buffer saline*) 1x.
2. Recoger las células con la ayuda de un rascador en 2 mL de PBS 1x.
3. Centrifugar a 1.200 *xg* durante 5 minutos.
4. Resuspender las células precipitadas en 1 mL de tampón de homogenización con inhibidores de proteasas previamente enfriado.
5. Romper las células mecánicamente utilizando un homogenizador de vidrio (Wheaton, 7 mL *Dounce Tissue Grinder*, ref. 357542).
6. Centrifugar el homogenizado durante 3 minutos a 2.000 *xg* y una temperatura de 4°C.
7. Centrifugar el sobrenadante obtenido a una velocidad de 16.000 *xg* durante 30 minutos.
8. El precipitado obtenido se corresponde a la fracción enriquecida en mitocondrias. Resuspenderlo en 75-100 µL de tampón de homogenización.
9. Almacenar a -20°C.

Tampón de homogenización (TH)

KCl 150 mM, Tris-HCl 2,5 mM pH 7,2. Los inhibidores de proteasas se añaden de manera extemporánea, justo antes de la utilización del tampón (Roche *Complete*, ref. 11836145001).

PBS 1x

8 g de NaCl, 1,44 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 0,2 g de KCl y 0,2 g de KH₂PO₄ disueltos en H₂O destilada hasta un volumen final de 1 litro.

Tejido cerebral de rata

La obtención de extractos mitocondriales de tejido cerebral se realizó diseccionando la parte del cerebro correspondiente y depositándola inmediatamente en tampón de homogenización con inhibidores de proteasas previamente enfriado. Todo el proceso se realizó a 4°C. El protocolo detallado se corresponde con la obtención de extractos mitocondriales de ~ 60 mg de tejido.

1. Disgregar el tejido mecánicamente en 2 mL de tampón de homogenización (TH) utilizando un homogenizador de vidrio (Wheaton, 7 mL *Dounce Tissue Grinder*, ref. 357542).
2. Centrifugar el homogenizado a 1.000 *xg* durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.
3. Centrifugar el sobrenadante a 10.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 1 mL de TH con inhibidores de proteasas. Centrifugar nuevamente a 10.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C.
5. Repetir el paso 4.
6. El precipitado obtenido se corresponde con la fracción enriquecida en mitocondrias y se resuspende en 100 µL de TH con inhibidores de proteasas.
7. Utilizar inmediatamente para los ensayos de actividad enzimática o almacenar a -20°C.

Tampón de homogenización (TH)

Sacarosa 70 mM, manitol 220 mM, BSA 0,5 mg/mL, HEPES 2 mM pH 7,4. Los inhibidores de proteasas se añaden de manera extemporánea, justo antes de la utilización del tampón (Roche *Complete*, ref. 11836145001).

6.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

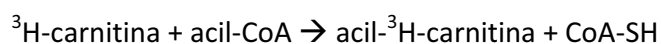
Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método introducido por Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el cambio producido en el espectro de absorción de

algunos colorantes como consecuencia de su unión a moléculas proteicas. En el caso del reactivo de Bradford, el colorante azul de Coomassie se une de manera específica a las proteínas virando de color cuando esto ocurre en una solución ácida. El reactivo contiene el colorante en un medio de metanol y ácido fosfórico y al unirse de manera covalente al enlace peptídico de las proteínas su máximo de absorción cambia de 465 a 595 nm.

Para valorar la concentración de proteínas en nuestras muestras se siguió el protocolo detallado por la casa comercial proveedora de la solución de Bradford (*Bio-Rad protein assay*, ref. 500-0006). Como patrón se empleó albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 1-20 µg/mL. En la mayoría de casos la curva estándar se realizó con 2, 5, 10, 15 y 20 µg de BSA. La solución de BSA utilizada como patrón se preparó a una concentración de 1 µg/µL con H₂O destilada y se almacenó a -20°C durante tiempos largos o a 4°C a corto plazo. La absorbancia de la curva patrón y las muestras se midió en un volumen total de 1 mL a 595 nm utilizando cubetas de plástico de 1cm de paso de luz. A cada muestra o patrón se le añadió la proteína, 200 µL de reactivo de Bradford 5x y la cantidad de H₂O destilada suficiente para completar 1 mL. Uno de los patrones no lleva proteína y se utiliza como blanco. Una vez hecha la mezcla los tubos se agitan y se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia en el espectrofotómetro. Los datos obtenidos permiten cuantificar ya que son proporcionales a la concentración de proteína.

6.3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA 1

Para la determinación de la actividad CPT1 se utilizó un método radiométrico, descrito previamente por Morillas y colaboradores (Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2001), que se basa en la siguiente reacción:



Los sustratos utilizados fueron L-[*metil*-³H]carnitina hidrocloreuro (*Amersham Biosciences*, ref. TRK762) y palmitoil-CoA (Sigma, ref. P9716). La principal ventaja de este método es que el sustrato producido es lipofílico y soluble en un medio orgánico, lo que permite separar la fase acuosa, que contiene del sustrato hidrofílico ³H-carnitina

que no se ha incorporado a la reacción, de la fase orgánica, que contiene el producto acil-³H-carnitina.

La concentración final de los componentes de la reacción, en un volumen final de 200 µL, fue la siguiente:

Mezcla de Reacción	
Tris-HCl pH 7,2	105 mM
KCl	15 mM
MgCl ₂	4 mM
ATP	4 mM
Glutatión reducido (GSH)	250 µM
Palmitoil-CoA	50 µM
BSA deslipidizada	0,1%
L-[<i>metil</i> - ³ H]carnitina (30 µCi)	400 µM

El ATP presente en La reacción permite la regeneración del palmitoil-CoA por las acil-CoA sintetasas a partir del palmitoil y el CoA generado por la acción de las desacilasas, evitando así la disminución en la concentración de sustrato. El glutatión se utilizó como agente reductor. La albúmina deslipidizada protege las mitocondrias del efecto deletéreo de los ácidos grasos, sin embargo es importante que su concentración no exceda el 0,1% con el fin de evitar un efecto de sigmoicidad en la cinética del enzima respecto al sustrato palmitoil-CoA (Prip-Buus, Cohen *et al.*, 1998). El KCl se añadió porque aumenta la actividad del enzima (Saggerson, 1982). El pH al que se realizó el ensayo es 7,2, debido a la dependencia de la actividad CPT1 y su sensibilidad al malonil-CoA al pH (Mills, Foster *et al.*, 1984; Bieber y Wagner, 1996).

El protocolo que se siguió para los ensayos de actividad CPT1A se detalla a continuación:

1. Preparar la mezcla de reacción en un tubo de 15 mL y mantener en hielo. El GSH se prepara de manera extemporánea, inmediatamente antes de utilizarlo.
2. Preparar la mezcla de proteína. En todos los casos la fracción ensayada se corresponde con la fracción mitocondrial. La muestra se prepara por duplicado en tubos eppendorf de 1,5 mL como se detalla a continuación. El blanco solo contiene agua y tampón CPT1 4x.

Muestra proteína		
Proteína	Levaduras	10-15 µg
	Cultivo celular	10-15 µg
	Cerebro	100 µg
	Tampón de reacción CPT1 4x	10 µL
	H ₂ O milliQ (c.s.p.)	40 µL

- Añadir a cada tubo con la muestra proteica 160 µL de la mezcla de reacción. Vortear. Incubar durante 5 minutos a 30°C.
- Parar la reacción con 200 µL de HCl 1,2 N.
- Extraer el producto, palmitoil-³H-carnitina, con la adición de 600 µL de n-butanol saturado de agua. Vortear y centrifugar a 16.000 *xg* durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 400 µL de la fase butanólica con 200 µL de H₂O milliQ. Vortear las muestras y centrifugar a 16.000 *xg* durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Recuperar 250 mL de la fase superior para el contaje de la radioactividad. El contaje se realiza en viales de plástico con 5 mL de líquido de centelleo. El contador utilizado es un *liquid scintillation analyzer* (Packard, TRI-CARB 2100TR) ubicado en el servicio de radioisótopos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

³H-carnitina 16 Mm

Disolver 6,6 mg de L-carnitina en 1964,6 µL de etanol 95%:H₂O destilada (1:1). Añadir 125 µL de L-[*metil*-³H]carnitina hidrocloreuro (~80 Ci/mmol). Almacenar a -80°C. Evitar ciclos de congelación/descongelación.

Tampón CPT1 4x

Tris-HCl 420 mM pH 7,2, KCl 60 mM, MgCl₂ 16 mM. Almacenado a 4°C.

Para calcular la actividad específica (A.E.) del enzima se aplicó la siguiente fórmula:

$$A.E. (nmol \times min^{-1} \times mg \text{ proteína}^{-1}) = \frac{c.p.m.}{R.E.} \times \frac{1}{t} \times \frac{1000}{\mu g} \times f$$

Donde:

c.p.m.: cuentas por minuto.

R.E.: radioactividad específica de la carnitina (~ 3000 c.p.m./nmol).

t: tiempo de incubación en el ensayo, expresado en minutos.

μ g: μ g de muestra proteica ensayada.

f: factor de dilución. Generalmente es 2,4 (600 μ L/250 μ L).

6.3.1. Ensayo de actividad CPT1 en presencia de inhibidores

El enzima CPT1A es inhibido de manera fisiológica por la molécula de malonil-CoA. Existen, además, moléculas sintéticas que pueden actuar como inhibidores de este enzima. Durante la realización de esta Tesis se analizó el efecto que diferentes compuestos sintéticos (Apéndice 1) tienen sobre la actividad CPT1A.

En todos los ensayos de inhibición realizados se añadieron diferentes concentraciones (0,01-100 μ M) de cada compuesto a la muestra proteica, ajustando siempre el volumen final a 40 μ L. Las muestras se vortearon y se pre-incubaron durante 1-10 minutos a 30°C antes de añadir la mezcla de reacción.

Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la IC₅₀ de cada compuesto, que se define como la concentración máxima a la que se produce un 50% de inhibición de la actividad. El cálculo se realizó utilizando el programa Excel de Microsoft por linealización de los datos, utilizando la consiguiente ecuación y la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = f(\log[\text{inhibidor}]) \quad \text{IC}_{50} (\mu\text{M}) = 10^{([50-b]/a)}$$

Donde:

a: pendiente de la recta resultante de la representación indicada.

b: valor de la intersección de la recta con el eje de ordenadas.

6.3.2. Ensayo de la estabilidad de la unión enzima-inhibidor

Para evaluar el tipo de unión de los inhibidores (\pm)-C75-CoA, (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA y (\pm)-C75-cis-CoA con el enzima CPT1A se realizaron experimentos de diálisis.

Estos experimentos permitieron determinar la reversibilidad de la unión de dichos inhibidores con el enzima.

El protocolo que se siguió se detalla a continuación:

1. Pre-incubar 160 μg de fracciones mitocondriales, obtenidas de células de levadura que sobre-expresan la CPT1A, a 30°C durante 5 minutos en ausencia del inhibidor o con una concentración final del mismo de 50 μM .
2. Dializar las muestras en sacos de diálisis (Sigma, ref. D-6191) en tampón de diálisis a 4°C.
3. Tomar muestras de la diálisis a diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas).
4. Ensayar la actividad CPT1 de todas las muestras.

Tampón de diálisis

HEPES 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, glicerol 10%. Almacenado a 4°C.

6.4. WESTERN BLOT

La técnica de inmunodetección de proteínas con anticuerpos fue descrita por Burnette (Burnette, 1981). Esta técnica permite detectar una proteína concreta de entre una muestra de proteínas que han sido separadas por electroforesis y posteriormente transferidas a una membrana sintética mediante la aplicación de un campo eléctrico. La detección se basa en la obtención de un anticuerpo que se una de la manera más específica posible a la proteína de interés. La técnica de inmunodetección, conocida como *western blot*, incluye las siguientes etapas:

Separación electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica permite separar las proteínas según su masa molecular a medida que éstas migran a través de una matriz de poliacrilamida.

En la separación electroforética de proteínas se utilizaron dos tipos de geles simultáneamente. El gel superior, o apilador, contiene una menor proporción de acrilamida y un pH menor que el inferior. Esto permite a las proteínas avanzar más rápidamente que en el gel inferior, o separador, acumulándose así en la frontera entre

ambos geles y favoreciendo la migración de las proteínas en bandas finas que incrementan la resolución de la técnica.

La composición de los geles apilador y separador se muestra en La siguiente tabla:

	Gel separador	Gel apilador
Acrilamida/bisacrilamida 40%	1,32 mL	312,5 μ L
H ₂ O destilada	4,53 mL	1,89 mL
Tris-HCl 1,87 M pH 8,8	1,5 mL	---
Tris-HCl 1,25 M pH 6,8	---	250 μ L
SDS 10%	75 μ L	25 μ L
Persulfato amónico 10%	75 μ L	15 μ L
TEMED	7,5 μ L	3,5 μ L
	V _f = 7,5 mL	V _f = 2,5 mL

En ambos casos se mezclaron primero todos los componentes excepto el persulfato amónico y el TEMED (Bio-Rad, ref. 161-0800), que son los agentes polimerizantes y se añadieron justo antes de preparar el gel. Se utilizó acrilamida/bisacrilamida 40% (Bio-Rad, ref. 161-0146). El persulfato amónico se preparó al 10% con H₂O destilada de manera extemporánea. Para la preparación de los geles se utilizaron los sistemas Mini-PROTEAN® II y CRITERION®, ambos de Bio-Rad.

Las muestras proteicas se prepararon para la electroforesis añadiéndoles tampón de carga para proteínas 4x, hasta una concentración de 1x. Este tampón contiene SDS y β -mercaptoetanol. El primero es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, enmascarando su carga y consiguiendo que migren de manera proporcional a su masa molecular. El β -mercaptoetanol actúa como agente reductor de los puentes disulfuro, permitiendo que las proteínas que forman dímeros monomericen. La mezcla de proteínas y tampón de carga se calentó a 95°C durante 5 minutos. Tras este paso las muestras están listas para someterse a una electroforesis aunque también pueden almacenarse a -80°C.

Para iniciar la electroforesis el gel se montó en la cámara correspondiente, que se llenó con tampón de electroforesis hasta cubrir los pocillos del gel. Las muestras y el marcador de electroforesis se cargaron en el gel y a continuación se aplicó una corriente continua de 25 miliamperios (mA) durante el tiempo necesario para la separación de las proteínas. El marcador de peso molecular, al estar pre-teñido,

permite visualizar la correcta separación de las proteínas y terminar con la electroforesis en el momento adecuado para cada experimento.

Tampón de carga para proteínas 4x

Tris-HCl pH 6,8 200 mM, SDS 8%, β -mercaptoetanol 20%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,4% en H₂O destilada. Almacenado en alícuotas a -20°C.

Tampón de electroforesis

Tris-HCl pH 8,8 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%. Almacenado a temperatura ambiente.

Electrotransferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas del gel separador fueron transferidas a una membrana de PVDF (*HyBond-P*, GE Healthcare, ref. RPN303F), previamente activada en metanol y equilibrada en tampón de transferencia. Se siguió el protocolo de los aparatos *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, ref. 162-0174) o *Criterion® Blotter With Wire Electrodes* (Bio-Rad, ref. 170-4071), en función del sistema utilizado para la electroforesis.

En el montaje de la transferencia se siguió el siguiente orden (desde el polo negativo al positivo): una esponja, 2 papeles Whatman, el gel separador, la membrana activada y equilibrada, 2 papeles Whatman y otra esponja. Todos estos componentes, montados en el correspondiente *sandwich*, se sumergieron en la cubeta llena de tampón de transferencia. Para evitar un sobrecalentamiento del sistema durante el proceso de electrotransferencia, se colocó en la cubeta un *cassette* con H₂O destilada helada. Durante el montaje se evitó la formación de burbujas.

La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora a 250 mA. Una vez terminada, la membrana se lavó con PBS 1x durante 5 minutos en agitación.

Tampón de transferencia

Tris 20 mM pH 8,5, glicina 150 mM, metanol 20%. El metanol se añade inmediatamente antes de usar. Almacenado a temperatura ambiente.

Bloqueo de la membrana

Los sitios de unión inespecífica en la membrana fueron bloqueados por inmersión de la misma en una solución con un 5% de agente de bloqueo (*ECL Prime Blocking Reagent*. GE Healthcare, ref. RPN2135) y un 0,1% de Tween 20 en PBS 1x. La membrana se dejó sumergida en la solución de bloqueo durante 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente. En algunos casos la membrana se dejó bloqueando toda la noche a 4°C.

Tras el bloqueo la membrana se lavó secuencialmente con PBS-Tween (0,1% Tween 20 en PBS 1x) de la siguiente manera: un primer lavado corto de 10 segundos, un lavado de 15 minutos y dos lavados de 5 minutos. Todos se hicieron manteniendo la membrana en agitación.

Unión al anticuerpo primario

El anticuerpo primario utilizado para la detección de la proteína CPT1A es un anticuerpo policlonal que fue producido en nuestro grupo por inyección en conejos de un péptido sintético y es específico contra los aminoácidos 317-430 de la CPT1 de hígado de rata. El anticuerpo utilizado para la detección de la proteína β -actina es comercial (Sigma, ref. 11459).

La membrana se incubó en agitación toda la noche a 4°C, o 1 hora a temperatura ambiente, con la solución de bloqueo con el anticuerpo primario a una dilución de 1:6.000.

Tras la incubación con el anticuerpo primario la membrana se lavó de la misma manera que tras el bloqueo.

Unión al anticuerpo secundario

El complejo antígeno-anticuerpo generado tras la incubación con el anticuerpo primario se visualizó por inmunoensayo enzimático indirecto utilizando un anticuerpo secundario. Este anticuerpo es una inmunoglobulina anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*). Esta inmunoglobulina reconoce al anticuerpo primario, obtenido en conejo, y se une a él. Cuando a la membrana unida al

anticuerpo secundario se le añade el sustrato ECL, el enzima peroxidasa actúa sobre él produciendo luz, que puede ser captada con una película fotográfica.

La membrana se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora en una solución con un 2% de agente de bloqueo en PBS-Tween con el anticuerpo secundario (*Goat anti-rabbit IgG-HRP*, GE Healthcare, ref. RPN4301) en una dilución 1:150.000. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los lavados de la misma manera que en casos anteriores.

Detección

La membrana se incubó durante 1 minuto con una mezcla de los sustratos A y B del kit *Amersham™ ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare, ref. RPN2135). Transcurrido ese tiempo se eliminó el exceso de sustrato ECL y la membrana se puso en contacto con un film de fotografía (Curix RP2 Plus, Agfa, ref. ENKMOV) dentro de un *cassette* autoradiográfico. El tiempo de exposición dependió del anticuerpo utilizado y la señal obtenida, pero al tratarse de un sustrato ECL muy potente nunca fue mayor de un minuto. Para revelar el *film* se utilizó el aparato *Kodak Medical X-ray Processor*. Todo el proceso se realizó en una cámara oscura para evitar el velado de la película fotográfica.

Eliminación de los reactivos: *stripping*

La membrana unida a las proteínas puede utilizarse para más de una inmunodetección. Para ello, el primer paso es la eliminación de los reactivos unidos a la membrana, para proceder a la incubación con otros anticuerpos sin que haya una interferencia entre ellos.

Para la eliminación de los reactivos y anticuerpos unidos a la membrana ésta se lavó 3 veces con H₂O destilada a 100°C durante 5 minutos en agitación. Tras este procedimiento la membrana queda lista para volver a ser utilizada en otro *western blot* o para ser almacenada a 4°C en PBS 1x.

7. MÉTODOS DE TRABAJO CON RNA

7.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDOS

Para la obtención de RNA de tejidos de rata se utilizaron *kits* comerciales de la casa QIAGEN. En todos los casos se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante.

Para la obtención de RNA de cerebro se utilizó el *RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit* (QIAGEN, ref. 74804). Para la obtención de RNA de hígado se utilizó el *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN, ref. 74104).

Ambos *kits* se basan en la utilización de un tampón de lisis formado por una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidinio (*QIAzol Lysis Reagent*) diseñada para facilitar la lisis de los tejidos y la inhibición de las RNAsas. Esta lisis se complementa con una purificación del RNA mediante la utilización de columnas con una membrana de sílice (*RNeasy Spin Column*).

Para la obtención de RNA de cerebro se partió de ~ 20-40 mg de tejido, previamente congelado, que se homogenizó con 1 ml de tampón de lisis utilizando el sistema *Polytron* (PT 2100). Para la obtención de RNA a partir de hígado, el tejido congelado fue pulverizado en nitrógeno líquido y ~ 30 mg del producto fueron homogenizados en 1 mL de tampón de lisis utilizando el mismo sistema que para las muestras de cerebro. Una vez homogenizado el tejido, se siguieron las instrucciones provistas por el *kit*.

La utilización de estos *kits* para la extracción de RNA asegura una eliminación eficiente del DNA contaminante en la muestra. Sin embargo, para evitar amplificaciones de DNA contaminante en experimentos posteriores, se realizó un tratamiento con DNasa I libre de RNAsas (QIAGEN, ref. 79254) al RNA que queda adherido a la columna de sílice durante la extracción. El enzima DNasa es una endonucleasa inespecífica que degrada DNA de cadena simple y doble, asegurando una muestra de RNA libre de DNA contaminante. El tratamiento con DNasa I se hizo siguiendo las instrucciones facilitadas por el proveedor.

7.2. VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA

El RNA se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un *NanoDrop*[®] (ND-1000). Este aparato permite la cuantificación del RNA utilizando únicamente 1-2 μ L de muestra. La absorbancia a 260 nm permite calcular la concentración de RNA de la muestra. Una DO de 1 corresponde a \sim 40 mg/mL de RNA. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) nos sirvió para estimar la pureza del RNA en nuestra muestra, considerando óptimo un valor 260/280 de aproximadamente 2.

7.3. RT(REVERSE TRANSCRIPTASE)-PCR

La RT-PCR es un tipo de PCR que utiliza como molde una mezcla de DNAs complementarios a los RNAs que se expresan en las células. Este tipo de DNAs reciben el nombre de cDNAs y su obtención a partir de RNAs es la base de la técnica de RT-PCR.

Esta técnica consta de dos etapas. En la primera el enzima transcriptasa inversa sintetiza cDNA a partir de RNA de cadena simple. En la segunda etapa, el cDNA obtenido es amplificado por PCR.

7.3.1. Síntesis de cDNA por transcriptasa inversa

Para la síntesis de cDNA se utilizó el *kit* comercial *TRANSCRIPTOR*[®] *First Strand cDNA Synthesis* de Roche (ref. 04379012001). Todos los reactivos necesarios para la síntesis de cDNA se suministran junto a la transcriptasa inversa (*transcriptor*[®]) en el mismo *kit*. La principal ventaja de este *kit* es la gran sensibilidad y termoestabilidad del enzima así como su capacidad de general cDNAs más largos (de hasta 14 kb).

La transcriptasa inversa es una DNA polimerasa dependiente de RNA que requiere un oligonucleótido para iniciar la síntesis de DNA. En nuestro caso se utilizaron *random primers*, que son una colección de hexadeoxinucleótidos de secuencia aleatoria que permiten sintetizar cDNAs a partir de todos los RNAs de la muestra, estén o no completos. Durante la reacción también se utilizó un inhibidor de RNAsas (*Protector RNase Inhibitor*) para prevenir la degradación de los RNAs.

Para la síntesis de cDNA utilizando el *kit* de *Transcriptor*[®] se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante.

7.3.2. Amplificación por PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), se utiliza para obtener un gran número de copias un fragmento de DNA concreto a partir de una cantidad mínima de DNA que actúa como molde. Para ello, se utilizan dos oligonucleótidos como cebadores para una serie de reacciones catalizadas por el enzima DNA polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados son moléculas con secuencias diferentes complementarios, cada uno, a secuencias de hebras opuestas del DNA molde que flanquean el fragmento de DNA que se quiere amplificar.

La técnica de la PCR consta de varios pasos. En primer lugar el DNA molde es desnaturalizado por calentamiento, de manera que las dos hebras se separan. A continuación la mezcla se enfría hasta una temperatura que permita la hibridación de los cebadores a su secuencia complementaria. Por último se pasa a la temperatura óptima a la que el enzima DNA polimerasa inicia la síntesis de nuevas hebras de DNA. Estos tres ciclos -desnaturalización, hibridación y síntesis- se repiten varias veces (normalmente 20-30) produciendo un aumento exponencial en el número de moléculas nuevas, ya que en cada ciclo se dobla la cantidad de producto de DNA deseado.

Esta técnica, descrita por Saiki y colaboradores (Saiki, Gelfand *et al.*, 1988), se basa en la utilización de una DNA polimerasa termoestable, capaz de sobrevivir tras largas incubaciones a 95°C y que por tanto no se inactiva por el paso de desnaturalización de la PCR. Esta polimerasa fue aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y recibe el nombre de *Taq* DNA polimerasa.

Las condiciones de trabajo a las que se realizaron las PCRs se muestran a continuación:

Mezcla de reacción	
DNA molde	1 ng
Tampón de amplificación 10x	1x
MgCl ₂ 50 mM	1-2 mM
Mezcla de dNTPs 2 mM	0,20 mM
Oligonucleótido <i>forward</i> 10 μM	1 μM
Oligonucleótido <i>reverse</i> 10 μM	1 μM
DNA polimerasa	1-2 U
H ₂ O milliQ ac c.s.p.	20 μL

Condiciones de amplificación	
Pre-incubación	94°C 2-3 min
Desnaturalización	94°C 45 seg
Hibridación	50-65°C 30 seg
Extensión	72°C 1 min/Kb
Repetir 20-30 veces desde el paso 2	
Extensión final	72°C 10 min

La Taq DNA polimerasa utilizada fue la *BiothermTM DNA polymerase* (GeneCraft, ref. GC-002-0500). Se utilizó un termociclador Minicycler PTC-100TM (MJ Research, Inc.) con refrigeración *Peltier*. La temperatura de hibridación dependió de los cebadores utilizados. Normalmente fue 2°C menor que la temperatura de fusión (*T_m*) del oligonucleótido con la temperatura más baja. La *T_m* se define como la temperatura a la que el 50% de las moléculas del oligonucleótido se encuentran hibridadas, por lo que la temperatura de hibridación marca la eficiencia y especificidad de la reacción de PCR.

7.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (*qRT*-PCR)

La *qRT*-PCR es una variante de la PCR que permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación. Esta técnica fue descrita por Higuchi y colaboradores (Higuchi, Fockler *et al.*, 1993) que inicialmente la denominaron *Kinetic PCR*. La reacción de *qRT*-PCR es básicamente igual a una PCR convencional, sin embargo a la mezcla de reacción se le añade un fluoróforo y se utiliza un termociclador especial, capaz de excitar dicho fluoróforo y detectar la fluorescencia emitida por él.

Esto permite medir la tasa de generación del producto de DNA después de cada ciclo de amplificación, motivo por el que recibe el nombre de PCR en tiempo real.

La *qRT-PCR* se puede clasificar según el tipo de fluoróforo empleado; en la mayoría de casos, se puede utilizar un fluoróforo inespecífico que se une a la doble cadena de DNA permitiendo detectar la generación de nuevas hebras. En este tipo de experimentos el fluoróforo habitual es *SYBRGreen* (**Figura 6**), un agente intercalante que emite luz verde al ser excitado con luz azul. La utilización de *SYBRGreen* abarata el coste de la *qRT-PCR*, sin embargo en algunos casos no es aconsejable su utilización debido a la naturaleza inespecífica de su unión. En otro tipo de *qRT-PCR* se utilizan, además de los cebadores, sondas específicas con una secuencia complementaria al fragmento del DNA a amplificar, lo que aporta una gran especificidad a la reacción. En las reacciones de *qRT-PCR* realizadas en esta Tesis se utilizaron dos tipos de sondas: sondas de hibridación y sondas de hidrólisis. Las sondas de hibridación son aquellas con secuencias complementarias a dos zonas del DNA molde que están muy próximas entre si (**Figura 7**). Una de las sondas está marcada con un fluoróforo en su extremo 5' y la otra lo está en su extremo 3'. Cuando estas dos sondas hibridan, los fluoróforos se encuentran lo suficientemente cerca el uno del otro como para que la energía emitida por el primero excite al segundo, que emite fluorescencia captada por el termociclador. Por otro lado, el sistema que utiliza sondas de hidrólisis se basa en la existencia de una única sonda, marcada con dos compuestos, un apagador o *quencher* y un fluoróforo (**Figura 8**). Cuando la sonda es hidrolizada, durante el proceso de elongación, el fluoróforo y el *quencher* se separan lo que provoca la liberación de fluorescencia captada por el termociclador.

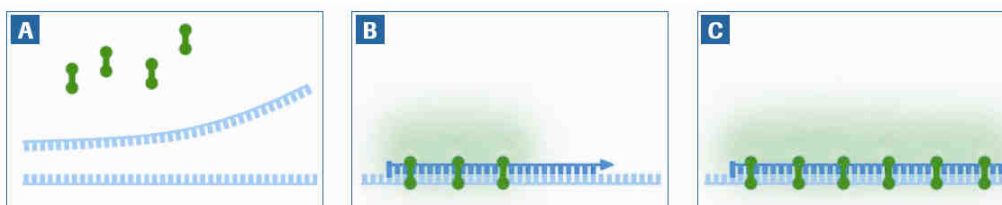


Figura 6. *qRT-PCR* en presencia de *SYBRGreen*. El colorante *SYBRGreen* solo emite fluorescencia cuando está unido a la doble cadena de DNA y es excitado por luz azul (**B**). Durante el paso de elongación, la cantidad de fluorescencia es cada vez mayor hasta llegar a un máximo al final de cada ciclo (**C**).

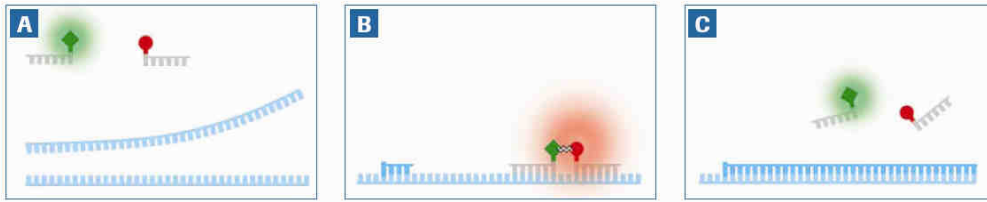


Figura 7. *qRT-PCR* con sondas de hibridación. El fluoróforo donador (3'-fluoresceína) y el aceptor (5'-LightCycler® Red640) se encuentran próximos cuando las dos sondas hibridan en la zona complementaria del DNA molde lo que permite que se produzca el fenómeno *FRET* (*fluorescent resonance energy transfer*) y por tanto la liberación de fluorescencia detectada por el termociclador (B). Durante el paso de desnaturalización y al final del paso de elongación las dos sondas des-hibridan, alejándose la una de la otra e impidiendo el fenómeno de *FRET* (A y C).

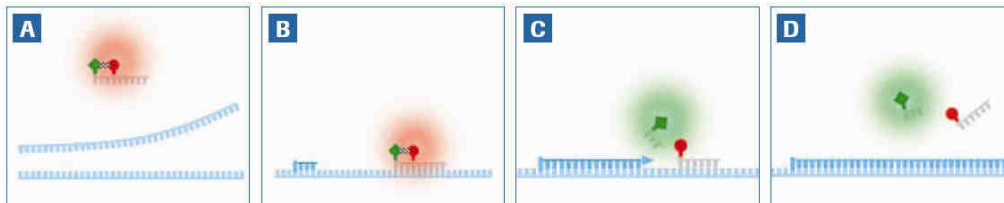


Figura 8. *qRT-PCR* con sondas de hidrólisis. La sonda está marcada con un apagador o *quencher*, que impide la emisión de fluorescencia del fluoróforo reportero. Durante el paso de elongación (C), la sonda se hidroliza permitiendo la liberación de fluorescencia (D).

Las condiciones a las que se realizaron las *qRT-PCR* con **SYBRGreen** se muestran en las siguientes tablas:

Mezcla de reacción	
cDNA	12,5-25 ng
Mezcla de reacción <i>SYBRGreen</i> 2x	1x
Oligonucleótido forward 10 μM	0,5 μM
Oligonucleótido reverse 10 μM	0,5 μM
H ₂ O milliQ ac c.s.p.	20 μL

Condiciones de la reacción		
Pre-incubación		95°C 5 min
Amplificación (45 ciclos)	Desnaturalización	95°C 10 seg
	Hibridación	50-65°C 20 seg
	Elongación	72°C 20 seg
Curva de <i>melting</i> (1 ciclo)		95°C 5 seg
		65°C 1 min
		98°C ---
Enfriado		40°C 10 seg

Se llama curva de desnaturalización (o curva de *melting*) al análisis de las características de disociación de una molécula de DNA de doble cadena cuando se calienta. En los análisis en los que se utiliza *SYBRGreen*, la curva de *melting* permite discriminar entre las moléculas de doble cadena correspondientes al producto específico analizado y los dímeros de oligonucleótidos u otros productos inespecíficos.

Se utilizó la mezcla de reacción de Roche (*LightCycler® 480 DNA SYBRGreen I Master*, ref. 04 707 516 001). Los oligonucleótidos utilizados para las diferentes amplificaciones se detallan en el apartado 5 de la sección Materiales. Las *qRT-PCR* se realizaron en un termociclador *LightCycler® 480* de Roche. Los análisis de los resultados se llevaron a cabo utilizando el *software* incluido en el *LightCycler® 480*.

Las condiciones a las que se realizaron las *qRT-PCR* con **sondas de hidrólisis/hibridación** se muestran en las siguientes tablas:

Mezcla de reacción	
cDNA	12,5-25 ng
Mezcla de reacción <i>Probes Master 2x</i>	1x
Oligonucleótido forward 10 µM	1 µM
Oligonucleótido reverse 10 µM	1 µM
Sonda 2 µM	0,2 µM
H ₂ O milliQ ac c.s.p.	20 µL

Condiciones de la reacción		
Pre-incubación		95°C 10 min
Amplificación (45 ciclos)	Desnaturalización	95°C 10 seg
	Hibridación	50-65°C 30 seg
	Elongación	72°C 20 seg
Enfriado		40°C 10 seg

Se utilizó la mezcla de reacción de Roche (*LightCycler® 480 Probes Master*, ref. 04707494001). Los oligonucleótidos y sondas utilizados se detallan en el apartado 5 y 6 de la sección Materiales. Las *qRT-PCR* se realizaron en un termociclador *LightCycler® 480* de Roche. Los análisis de los resultados se llevaron a cabo utilizando el *software* incluido en el *LightCycler® 480*.

7.4.1. Análisis de los datos

La cuantificación de la expresión génica utilizando *qRT-PCR* puede hacerse de dos maneras, en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la cuantificación se expresa en valor absoluto y se basa en la obtención de una curva de calibrado con diferentes concentraciones de DNA conocidas. Durante esta Tesis se ha realizado únicamente el segundo tipo de análisis, cuantificación relativa, que se basa en la comparación entre el nivel de expresión de un gen problema y un gen normalizador o de referencia, que mantiene una expresión estable en todas las muestras. El gen de referencia elegido en todos los experimentos fue el gen de la β -actina, que mantiene una expresión ubicua y constitutiva en nuestro modelo de estudio.

Para la realización de los análisis de cuantificación relativa se utilizó el *software E-Method*, incluido en el termociclador *LightCycler® 480* (Roche). Este método se basa en la comparación de los valores de Ct (*cycle threshold* o ciclo umbral) y utiliza la eficiencia de la reacción de PCR como factor de corrección.

El Ct se define como el ciclo de PCR en el que la fluorescencia en la reacción supera un nivel umbral, significativamente diferente al ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la expresión inicial del gen de interés en una muestra problema.

La eficiencia de la reacción (E) se define como la capacidad de duplicar un número de copias de cDNA en cada ciclo y se calcula a partir de las pendientes de las rectas estándares obtenidas a partir de *qRT-PCR* con cantidades decrecientes de cDNA inicial, utilizando la fórmula $E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$ -1. Una buena eficiencia presenta un valor aproximado de 2.

7.5. CHIP DE DNA (DNA *microarray*)

Para el análisis del perfil de expresión génica en rata se utilizó un chip de DNA de la casa Affymetrix®. Estos chips, también denominados *microarrays*, consisten en una superficie sólida a la que se adhieren diferentes fragmentos de DNA o sondas que son capaces de hibridar con una muestra problema. Estas sondas se corresponden con fragmentos del genoma de manera que estos chips permiten medir la expresión

diferencial de miles de genes de manera simultánea, monitorizando la hibridación entre la sonda y la muestra a estudiar.

El chip utilizado ha sido el *Rat Gene 1.0 ST array* de Affymetrix. Los estudios se realizaron en el departamento de genómica del IDIBAPS (Hospital Clínic), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. El análisis bioestadístico de los resultados obtenidos se realizó en el departamento de Bioinformática del mismo instituto, bajo la dirección de la Dra. Susana Kalko.

El *Rat Gene 1.0 ST* es un chip que cubre todo el genoma (27.342 genes) utilizando diferentes sondas para cada gen que hibridan en diferentes exones. De esta manera permite obtener un resultado más fino del perfil de expresión génica que otros chips de DNA.

8. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

8.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO

El objetivo de los análisis histológicos en cerebro fue caracterizar el patrón de infección de las células hipotalámicas tras la inyección del virus adenoasociado que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH). La técnica utilizada consistió básicamente en la disección del cerebro seguida de la fijación y corte del mismo utilizando un micrótopo de deslizamiento-congelación. Los cortes obtenidos fueron montados sobre porta-objetos y analizados con el microscopio Leica CTR4000, acoplado a una fuente de fluorescencia.

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Diseccionar el cerebro.
2. Sumergir todo el tejido en una solución de formalina 10% (Sigma, HT5014). Mantener a 4°C durante 16-18 h.
3. Sumergir el tejido en una solución de sacarosa 20% en PBS 1x. Mantener a 4°C durante 16-18 h.

4. Hacer cortes coronales de 60 μm de grosor utilizando un micrótopo de deslizamiento (Leica SM 200R) con un sistema de congelación acoplado (Physiterm BFS-30MP *Controller*) que permite bajar la temperatura de la plataforma de corte del micrótopo hasta -30°C .
5. Montar los cortes siguiendo un orden anatómico (de la parte rostral a la parte caudal del cerebro) en porta-objetos de 76x26 mm (Menzel-Gläser, ref. AA00000102E). Dejar secar.
6. Una vez seca la muestra cubrir con medio de montaje Immu-Mount™ (Thermo, ref. P/N 238747), que previene la pérdida de fluorescencia, y un cubre-objetos.

8.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO (TAB) E HÍGADO

El objetivo del estudio histológico fue analizar la morfología y anatomía microscópica del TAB. Para ello se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina. Esta tinción se basa en la utilización del colorante hematoxilina, que al ser básico tiñe estructuras ácidas en tonos azules, y el colorante eosina, que tiñe componentes básicos del tejido en color rosa. Esta es una de las técnicas más utilizadas en histología y permite visualizar diferencias morfológicas y anatómicas en la mayoría de tejidos.

El procesamiento del tejido y la tinción de los cortes con hematoxilina-eosina (H-E) se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica (SAP) del Hospital Clínico de Barcelona. Las imágenes de las muestras procesadas se tomaron con el microscopio Leica CTR4000 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia (UB).

El primer paso consistió en la disección de pequeños fragmentos de tejido que fueron sumergidos en una solución de formalina 10% (Sigma, HT5014). Estos fragmentos fueron procesados por el personal del SAP utilizando un procedimiento que incluyó los pasos de deshidratación de las muestras y tinción H-E.

9. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas disponibles *online*. A continuación se detallan las más utilizadas:

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*. Portal estadounidense que agrupa bases de datos de proteínas y nucleótidos y herramientas bioinformáticas para el alineamiento de secuencias. Es de acceso público. www.ncbi.nlm.nih.gov.

EBI: Portal del *European Bioinformatics Institute* que agrupa un conjunto de bases de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas así como herramientas bioinformáticas. www.ebi.ac.uk.

Swiss Prot: Base de datos que se utilizó para la obtención de secuencias proteicas. Permite conocer la función proteica, sus modificaciones post-traduccionales, sus dominios y sitios catalíticos, estructura secundaria, similitud con otras proteínas, etc. www.expasy.org/sprot.

GenBank: Base de datos para la obtención de secuencias de DNA. Pertenece al NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi.

ENSEMBL: Base de datos utilizada para la obtención de secuencias de DNA. Pertenece al EBI. www.ensembl.org/index.html.

BLAST: Programa de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) (Altschul, Madden *et al.*, 1997) utilizado para la búsqueda de homologías entre secuencias. Este programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias presentes en la base de datos y calcula las equivalencias estadísticamente significativas. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

ClustalW2: Programa utilizado para el alineamiento de diferentes secuencias de ácidos nucleicos (Thompson, Higgins *et al.*, 1994). Este programa se encuentra en el portal EBI. www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html.

10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos se expresan como la media \pm SEM. La comparación de los resultados se realizó utilizando el test estadístico de la *t-Student*. Para todos los análisis estadísticos y representación de las gráficas se utilizaron los programas Excel de Microsoft y SigmaPlot v. 9.0.

Capítulo 4. RESULTADOS

SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM MEDIANTE VIRUS ADENOASOCIADOS

1. Sobre-expresión de CPT1AM en cerebro
2. Sobre-expresión de CPT1AM en el VMH

INHIBICIÓN DE CPT1A POR C75 Y SUS DERIVADOS

1. C75 y C75-CoA
 2. Derivados de C75 sin grupo metileno:
methylene-lacking-C75 (MLCs)
 3. Isómeros de C75
 4. Enantiómeros de C75
 5. Otros derivados de C75
-

1. SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM EN CEREBRO

Estudios previos realizados en nuestro grupo identificaron el residuo aminoacídico de la proteína CPT1A implicado en la sensibilidad a su inhibidor fisiológico, malonil-CoA (Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2003). Se trata de una metionina en la posición 593, que se encuentra altamente conservada en todos los miembros de la familia de las carnitina aciltransferasas reguladas por malonil-CoA. Utilizando la técnica de mutagénesis dirigida se generó una proteína CPT1A con una serina en lugar de una metionina en la posición 593, que se denominó CPT1AM. El enzima muestra una actividad CPT permanente, independientemente de los niveles de malonil-CoA. Utilizando el cDNA de esta nueva proteína generamos virus adenoasociados (AAVs) para la sobre-expresión de la misma en cerebro de rata (AAV-CPT1AM). Utilizamos como control animales infectados con un AAV que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) (AAV-GFP). Tal y como se detalla en la sección Materiales y Métodos, fabricamos estos virus en la empresa holandesa AMT, siguiendo el protocolo de obtención de AAVs a gran escala descrito por Urabe y colaboradores (Urabe, Ding *et al.*, 2002). Las preparaciones utilizadas para realizar nuestros estudios tenían una titulación de $2,5 \times 10^{12}$ copias genómicas/mL en el caso de los AAV-CPT1AM y 5×10^{12} copias genómicas/mL en el caso de los AAV-GFP.

1.1. EFECTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD CPT1

Para analizar la capacidad infectiva de nuestros AAVs en cerebro, se realizaron inyecciones i.c.v. de los virus (20 μ L) en ratas adultas. Cuatro semanas después se diseccionó la parte del cerebro que rodea los ventrículos laterales y se procedió a analizar los niveles de proteína y actividad CPT1 en los animales infectados con el AAV-CPT1AM (a partir de ahora grupo CPT1AM) y en los animales control, infectados con AAV-GFP (a partir de ahora grupo GFP).

Los niveles de proteína CPT1A se analizaron utilizando la técnica de *western blot* con 150 μ g de extractos mitocondriales de cerebro. Para la cuantificación de

CPT1A se utilizó el nivel de proteína β -actina como normalizador. El resultado obtenido mostró que en los animales CPT1AM se produce un aumento de dos veces en los niveles de proteína CPT1A respecto al control (GFP) (**Figura 1 A y B**).

A continuación se analizó la actividad CPT1 en los mismos extractos. Para los ensayos de actividad CPT1A se utilizaron 100 μ g de mitocondrias de cerebro y el método radiométrico descrito en la sección Métodos, 6.3. Los animales CPT1AM presentaron un aumento de $2,8 \pm 0,9$ en la actividad CPT1 respecto a los animales control (GFP) (**Figura 1 C**).

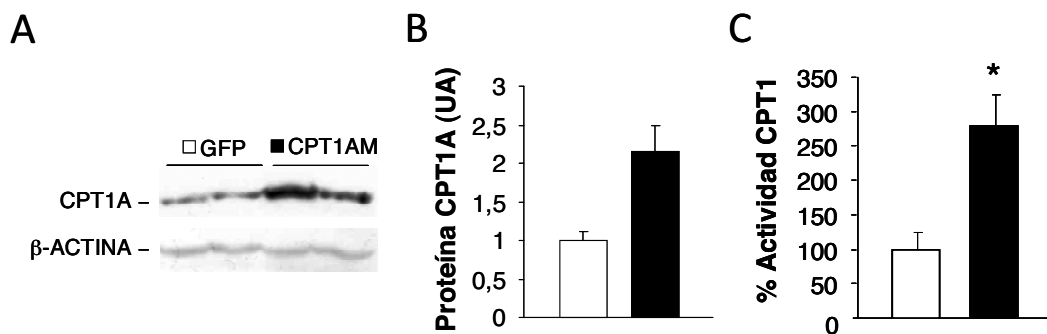


Figura 1. Sobre-expresión de CPT1A en cerebro de rata. (A) *Western blot* representativo de fracciones mitocondriales (150 μ g) de cerebro de ratas infectadas con los AAVs. (B) Los niveles de la proteína β -actina se utilizaron como valor normalizador para la cuantificación de CPT1A (UA, unidades arbitrarias). (C) La actividad CPT1 fue analizada en extractos mitocondriales de cerebro (100 μ g) de ratas infectadas con los AAVs. Los resultados se muestran como % de actividad CPT1 remanente respecto al control 100% (GFP) (promedio \pm SEM). Todos los análisis se realizaron 4 semanas después de la inyección i.c.v. de los virus. GFP, $n = 2-3$; CPT1AM $n = 2-4$. *: $p < 0,05$.

Los resultados confirmaron que el AAV producido para sobre-expresar CPT1AM presenta capacidad infectiva y causa un aumento en los niveles de proteína y actividad enzimática en el cerebro de los animales infectados.

2. SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM EN EL VMH

Una vez comprobada la funcionalidad de nuestra herramienta en cerebro de ratas adultas, quisimos analizar el efecto de la sobre-expresión de CPT1AM en un núcleo hipotalámico concreto. El elegido fue el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), debido a su papel en el control del apetito y el metabolismo de la glucosa (Uyama, Geerts *et al.*, 2004; King, 2006). Este núcleo se localiza en la zona mediobasal

del hipotálamo (MBH), adyacente al ARC y alrededor del tercer ventrículo. Para alcanzarlo utilizamos cirugía estereotáxica, (Métodos, 1.2.3).

2.1. ANÁLISIS DE LA INFECCIÓN Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CPT1A

En primer lugar analizamos la correcta infección de las células del VMH en los animales infectados con el virus AAV-GFP (grupo GFP). El hecho que la proteína sobre-expresada en estos animales sea fluorescente, nos permitió localizar las células infectadas 4 semanas después de la inyección de los virus en el hipotálamo y, de esta manera, comprobar el correcto posicionamiento y funcionalidad de las cánulas bilaterales. Los resultados obtenidos demostraron que la infección, en los animales GFP, se delimita mayoritariamente al VMH (**Figura 2 A**).

En segundo lugar, analizamos el nivel de mRNA de CPT1AM en el hipotálamo mediobasal (MBH) de los animales GFP y los infectados con AAV-CPT1AM (grupo CPT1AM). La disección específica del núcleo VMH plantea complicaciones técnicas, por ese motivo realizamos los análisis en el MBH, parte que incluye principalmente los núcleos VMH y arcuato (ARC) (**Figura 2 B**).

De manera endógena, en el hipotálamo, los animales expresan la proteína CPT1A. Para diferenciarla de la proteína sobre-expresada, CPT1AM, la denominamos CPT1Awt (*wt: wild type*). Quisimos analizar, no solo la expresión de la isoforma sobre-expresada CPT1AM, sino también los niveles de CPT1Awt en los animales infectados con los virus. Para ello, 23 semanas después de la inyección de los AAVs, los animales fueron sacrificados y el MBH fue diseccionado y congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente se procesó para obtener mRNA y el producto fue utilizado para la cuantificación relativa, por *qRT-PCR*, de la expresión de CPT1Awt y CPT1AM. El cDNA de estas dos proteínas difiere únicamente en dos nucleótidos, por lo que se diseñó un experimento utilizando oligonucleótidos específicos y sondas de hibridación (**Apéndice 2**). Los resultados obtenidos mostraron que la infección con el virus AAV-CPT1AM no produce cambios significativos en los niveles de mRNA de CPT1Awt. Sin embargo, como era de esperar, el nivel de mRNA de la isoforma CPT1AM fue $113 \pm 59,8$ veces mayor en los animales CPT1AM (**Figura 2 B**).

Los resultados obtenidos demostraron que la implantación estereotáxica de cánulas bilaterales en el VMH permite una infección delimitada, mayoritariamente, a este núcleo tras la inyección de los AAVs. Al mismo tiempo, la cuantificación por separado de las isoformas CPT1Awt y CPT1AM en el MBH permitió confirmar que la inyección del AAV-CPT1AM produce un incremento en el mRNA de CPT1AM respecto a la expresión endógena de CPT1Awt. Todo ello confirma la efectividad y funcionalidad de los AAVs como herramienta para la sobre-expresión de las proteínas GFP y CPT1AM en el VMH.

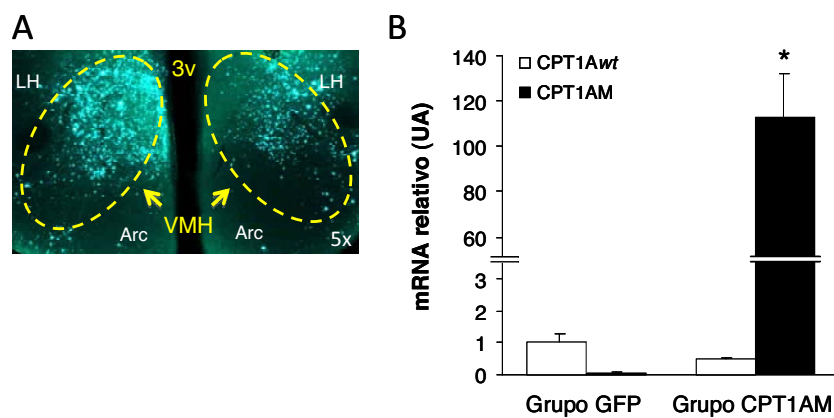


Figura 2. Sobre-expresión de GFP y CPT1AM en VMH. (A) Imagen parcial de una sección coronal del cerebro tres semanas después de la infección con AAV-GFP en el VMH (delimitado con líneas punteadas amarillas). La imagen se tomó utilizando un objetivo de 5 aumentos (5x). (B) Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de CPT1Awt y CPT1AM en el MBH, 23 semanas después de la administración de los virus. La cuantificación se realizó utilizando la técnica *qRT-PCR* con el gen de la β -actina como *housekeeping* o normalizador. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Grupo GFP, $n = 5$; Grupo CPT1AM, $n = 6$. * $p < 0,01$. Arc: núcleo arcuato; LH: hipotálamo lateral; 3v: tercer ventrículo.

2.2. EFECTO SOBRE LA INGESTA, EL PESO Y LA ADIPOSIDAD

El metabolismo lipídico en el VMH juega un papel muy importante en los procesos de control del apetito y el balance energético (He, Lam *et al.*, 2006; López, Lelliott *et al.*, 2007; López, Lage *et al.*, 2008). Por ello quisimos analizar el efecto que la sobre-expresión de CPT1AM en este núcleo tiene sobre la ingesta, el peso y la adiposidad de los animales tratados.

Los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa hiperfagia y una tendencia al aumento de peso en los animales CPT1AM respecto al control. La ingesta acumulada fue significativamente mayor en los animales

CPT1AM a partir del día 32 después de la inyección de los virus ($912 \pm 102,3$ vs. $798 \pm 43,5$, $n = 5-6$, $p < 0.05$) (**Figura 3 A**) y la hiperfagia se mantuvo hasta la finalización del experimento (**Figura 3 B**). El peso mostró una tendencia hacia el aumento en los animales CPT1AM, sin embargo esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($103,2 \pm 19,8$ vs. $75,1 \pm 26,1$ ($n = 5-6$, $p = 0,07$)) (**Figura 3 C**).

También analizamos el efecto que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH tiene sobre la adiposidad. Para ello, 23 semanas después de la inyección de los virus, se diseccionó y pesó el tejido adiposo blanco epididimal, que se sometió a un análisis histológico. En una situación de sobrepeso el tejido adiposo tiende a expandirse y agrandar sus adipocitos. En un estado posterior, este hecho se acompaña de una mayor infiltración de células inmunológicas que rodean los adipocitos creando una estructura en forma de coronas (Weisberg, McCann *et al.*, 2003). Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el peso del TAB entre los grupos GFP y CPT1AM (**Figura 3 D**). Sin embargo revelaron que los animales CPT1AM presentan unos adipocitos más grandes, respecto al grupo control (**Figura 3 E, F y G**). No se observaron diferencias en el número de células infiltradas entre ambos grupos. Estos resultados demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa hiperfagia, y una tendencia al aumento de peso que se acompaña de un agrandamiento de los adipocitos que forman el TAB.

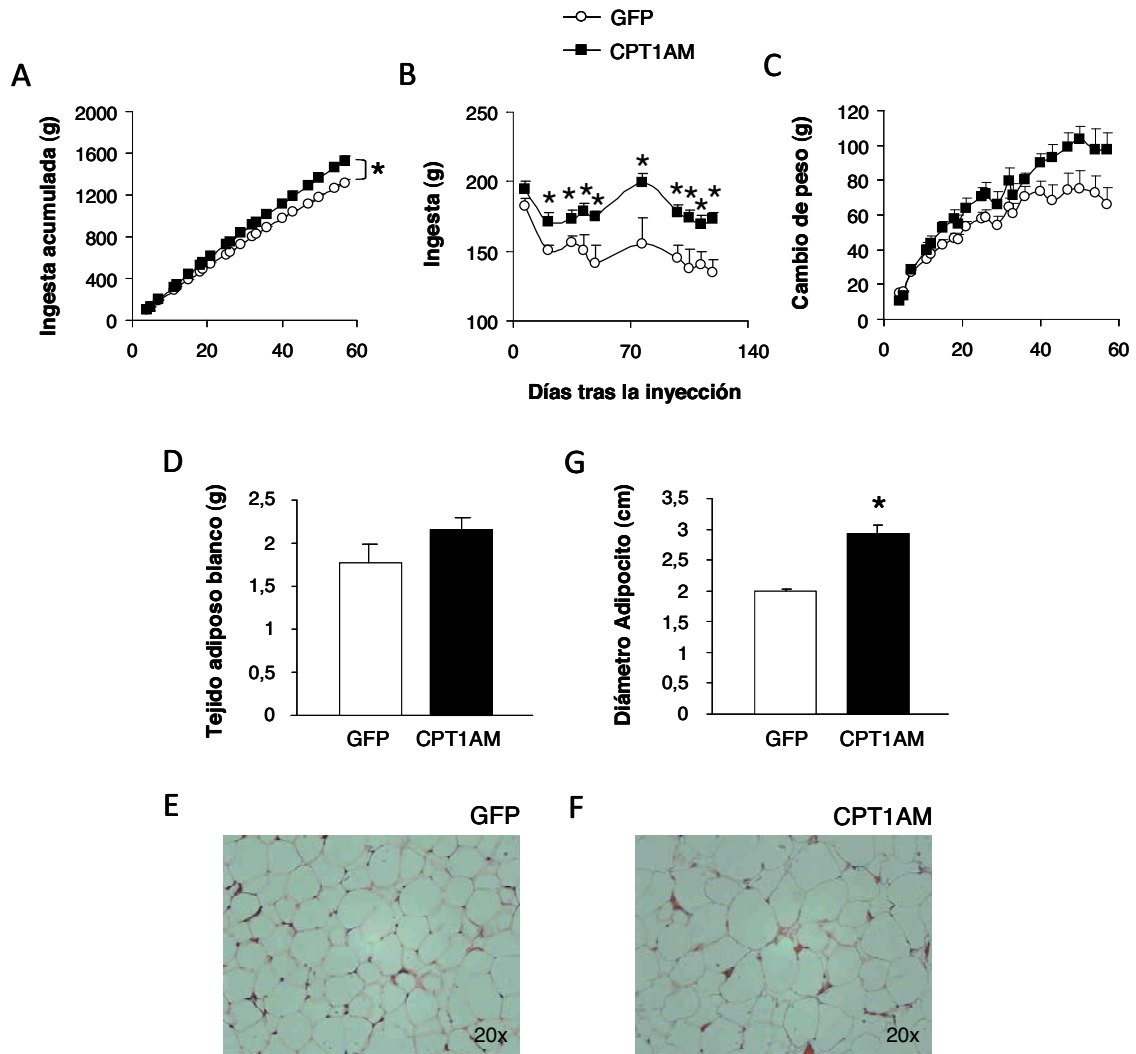


Figura 3. Efecto de la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH sobre la ingesta, el peso y la adiposidad. (A) Ingesta acumulada, (B) Ingesta semanal, (C) cambio en el peso, (D) peso en gramos del tejido adiposo blanco epididimal e Imagen representativa del TAB (tinción H & E) de los animales (E) GFP y (F) CPT1AM, 23 semanas después de la inyección de los AAVs. En el panel G se muestra la medida del diámetro de los adipocitos de ambos grupos. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

2.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE METABOLITOS Y HORMONAS

Pasadas 23 semanas desde la inyección de los AAVs, los animales fueron sacrificados tras un ayuno de 6 horas y se extrajo sangre que fue utilizada para la determinación de la concentración de glucosa y la obtención de suero.

Los resultados obtenidos mostraron que los animales CPT1AM son hiperglucémicos (GFP, $105,6 \pm 8,5$ mg/dL vs. CPT1AM, $122,8 \pm 8,7$ mg/dL, $p = 0,009$), hiperinsulinémicos (GFP, $0,69 \pm 0,2$ ng/mL vs. CPT1AM, $1,32 \pm 0,7$ ng/mL, $p = 0,05$) e

hiperghrelinéimicos (GFP, $3,98 \pm 1,6$ pg/mL vs. CPT1AM, $6,40 \pm 1,6$ pg/mL, $p = 0,02$). No se observaron diferencias en los niveles de leptina entre ambos grupos (**Figura 4**).

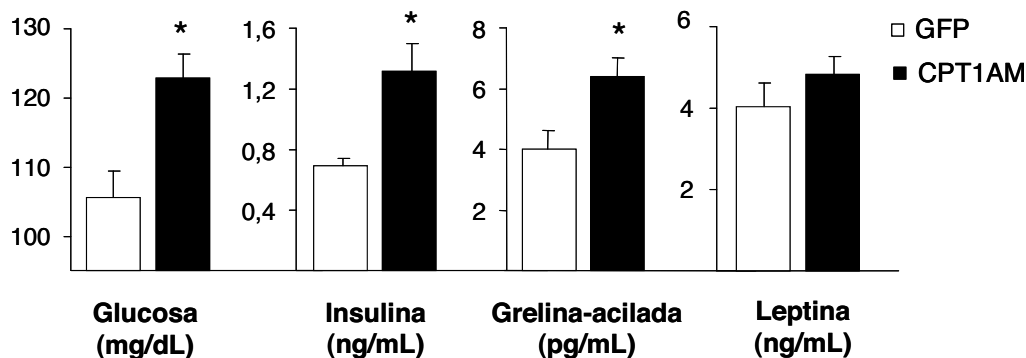


Figura 4. Efecto de la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH sobre los niveles de glucosa, insulina, grelina y leptina. 23 semanas después de la inyección de los AAVs en el VMH los animales se sacrificaron y se obtuvieron muestras de sangre y suero. La cuantificación de glucosa se hizo en una muestra de sangre, mientras que las cuantificaciones de insulina, grelina y leptina se hicieron con muestras de suero utilizando kits de ELISA comerciales. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

2.4. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA Y LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH provoca la aparición de hiperglucemia e hiperinsulinemia 23 semanas después de la administración del virus. Nos planteamos estudiar la evolución de este fenotipo durante todo el tiempo que duró el experimento. Para ello, realizamos medidas antes de la infección con los virus y 9 y 19 semanas después. Los animales se sometieron a un ayuno de 12 h antes de cada medida.

Los resultados obtenidos mostraron la aparición de resistencia a la insulina en los animales CPT1AM 9 semanas después de la administración de los virus ($0,33 \pm 0,05$ vs. $0,45 \pm 0,07$ ng/mL de insulina, $p = 0,008$). Esta hiperinsulinemia se observó nuevamente en la semanas 19 ($0,43 \pm 0,1$ ng/mL vs. $0,56 \pm 0,1$ ng/mL, $p = 0,05$) (**Figura 5 A y B**) y en la semana 23 (**Figura 4**) ($0,69 \pm 0,2$ ng/mL vs. $1,32 \pm 0,7$ ng/mL, $p = 0,05$) del experimento.

También estudiamos la tolerancia a la glucosa en los animales GFP y CPT1AM. El GTT realizado 9 semanas después de la administración de los virus demostró que en ese momento no existían cambios en la tolerancia a la glucosa entre los grupos GFP y

CPT1AM (Figura 5 C). Sin embargo, 19 semanas después de la inyección de los AAVs los resultados del GTT mostraron intolerancia a la glucosa en los animales CPT1AM (área bajo la curva (ABC): $13,9 \pm 1,4$ vs. $17,5 \pm 2,9$, $p = 0,02$) (Figura 5 D).

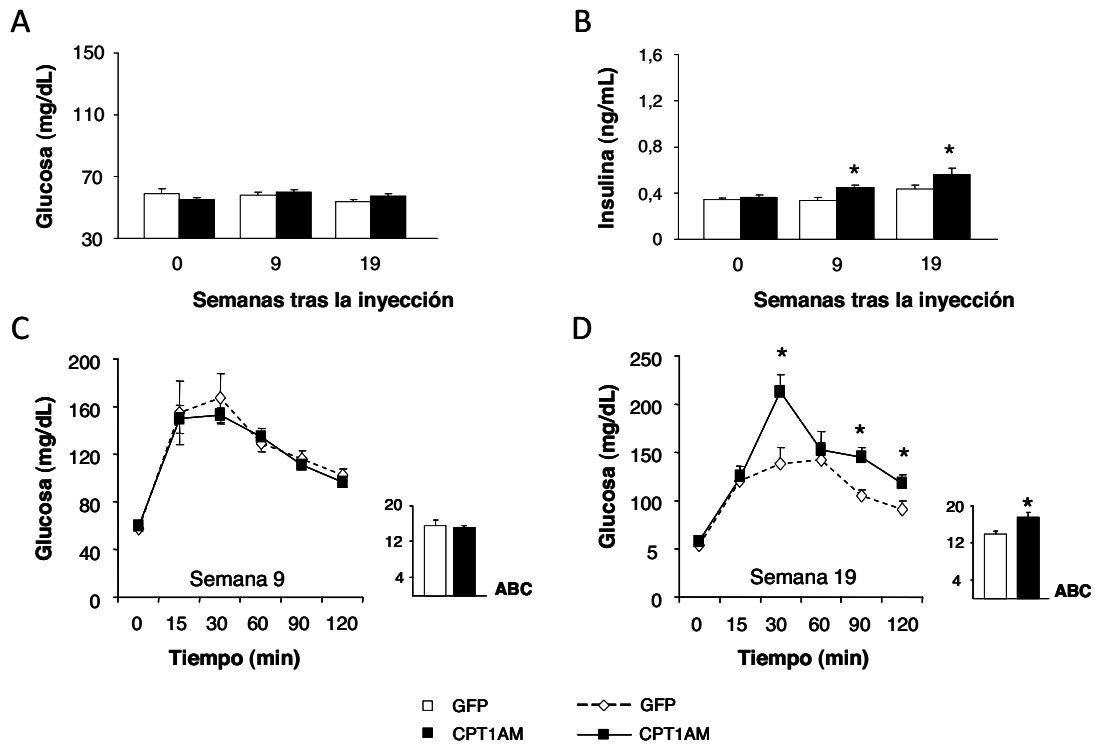


Figura 5. Metabolismo glucídico de los animales que sobre-expresan CPT1AM en el VMH. Se midieron las concentraciones de glucosa (A) e insulina (B) 0, 9 y 19 semanas después de la administración de los AAVs. Todas las medidas se hicieron en animales ayunados durante 12 horas. En las semanas (C) 9 y (D) 19 se llevaron a cabo tests de tolerancia a la glucosa (GTT), tras someter a los animales a una ayuno de 12 horas. Para ello se realizaron inyecciones i.p. de glucosa 20% (2 g/Kg) y 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después se midió la glucemia. En los dos paneles se muestra el área bajo la curva (ABC) calculada. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

2.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN HIPOTÁLAMO

A continuación estudiamos el perfil génico en el MBH tras la sobre-expresión de CPT1AM. Nuevamente seleccionamos el MBH (parte del hipotálamo que comprende principalmente los núcleos VMH y ARC) por las dificultades técnicas que supone aislar únicamente el VMH. Los animales fueron sacrificados 23 semanas después de la administración de los AAVs y el MBH fue diseccionado y congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente se procesó el tejido para extraer el mRNA a partir del cual

realizamos los análisis de los niveles de mensajeros, utilizando la técnica de *qRT-PCR*. Los oligonucleótidos y sondas utilizadas se detallan en el **Apéndice 2**.

En primer lugar analizamos la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de $2,1 \pm 0,3$ veces en el mRNA de FAS en los animales CPT1AM, sin embargo los niveles de mRNA de ACC1, ACC2, CPT1C, UCP2, PPAR α y SREBP1 no variaron entre los dos grupos de animales (**Figura 6 B**).

A continuación analizamos la expresión de genes relacionados con el control de la ingesta, como neuropéptidos y receptores de neuropéptidos y hormonas. Los resultados obtenidos no mostraron cambios en los niveles de mensajeros de los neuropéptidos orexigénicos NPY y AGRP, ni de los anorexigénicos, POMC y CART. Sin embargo, los niveles de mRNA del receptor Y1 de NPY (NPY1R) y del receptor de la hormona orexigénica grelina (GHS-R) se encontraron más elevados en los animales CPT1AM respecto al control ($1,6 \pm 0,4$ y $2,4 \pm 1,3$ veces respectivamente). No se observaron cambios en la expresión del receptor de la hormona leptina (ObRb), de los receptores de melanocortinas (MC3R y MC4R) y del receptor NPY5R (**Figura 6 A**).

Estudios previos sugieren que los niveles de LCFA-CoAs en las neuronas hipotalámicas regulan la gluconeogénesis hepática a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC- δ) y la regulación de la apertura y cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (canales K_{ATP}) Kir6.2 y SUR1 (Pocai, Lam *et al.*, 2005; Lam, Chari *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha demostrado que la disminución selectiva de los receptores de insulina en el hipotálamo produce hiperfagia y resistencia a la insulina en ratas (Obici, Feng *et al.*, 2002 (a)). Por todo ello, estudiamos los niveles de expresión de los genes IR (*insulin receptor*, receptor de insulina), IRS2 (*insulin receptor substrate 2*, sustrato del receptor de insulina 2), PKC- δ y las subunidades del canal de K_{ATP} Kir6.2 y SUR1. Los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH no altera los niveles de mRNA entre las ratas control (GFP) y las CPT1AM (**Figura 6 C**).

En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH produce cambios significativos en la expresión de los genes FAS, NPY1R y GHS-R, todos ellos implicados en la regulación de la ingesta en el hipotálamo.

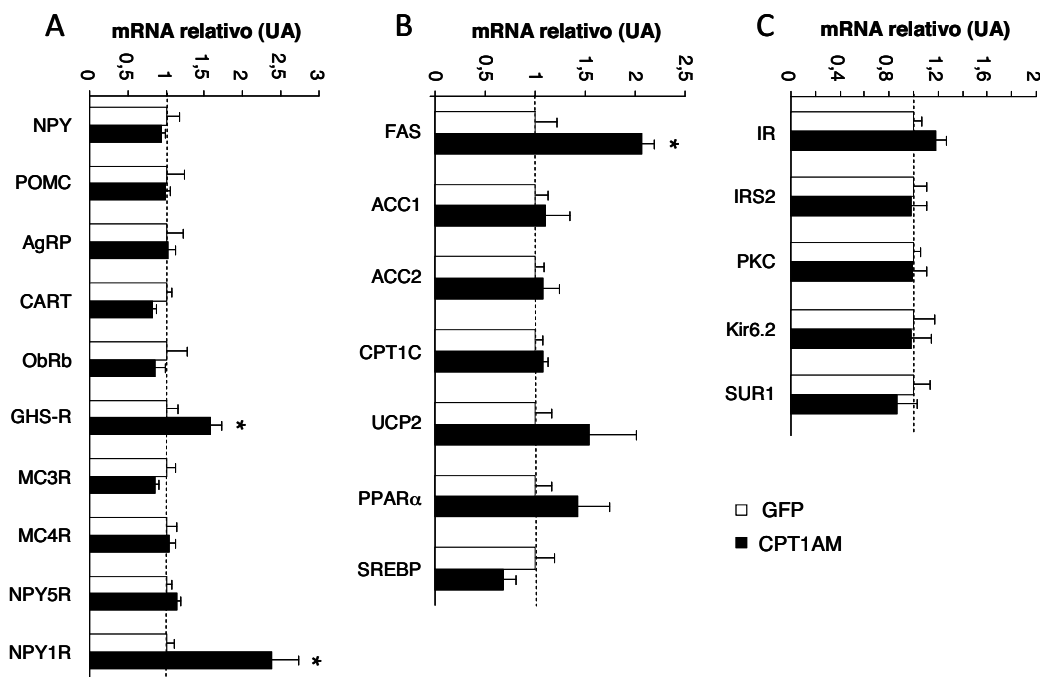


Figura 6. Análisis por *qRT*-PCR de los niveles de mRNA en el MBH. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA en el MBH 23 semanas después de la administración de los virus. **(A)** Genes relacionados con el control de la ingesta, **(B)** el metabolismo lipídico y **(C)** la homeostasis del metabolismo glucídico. Los resultados se expresan como la variación respecto al control (GFP) como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

Seguidamente realizamos un estudio más amplio del perfil génico en el MBH. Para ello utilizamos un chip de DNA (DNA *microarray*) de Affymetrix diseñado para analizar la expresión de todos los transcritos descritos del genoma de rata (Métodos, 6.5). Los resultados obtenidos fueron analizados en el servicio de Bioinformática del IDIBAPS, bajo la supervisión de la Dra. Susana Kalko. Se detectaron 117 transcritos con una expresión mayor y 30 con una expresión menor en los animales CPT1AM respecto al control (GFP). Entre los transcritos *up*-regulados encontramos principalmente snoRNA (*small nucleolar RNA*), pequeñas moléculas de RNA con funciones reguladoras. Principalmente modulan la modificación de otros RNAs, los procesos de *splicing* y, en algunos casos, actúan como miRNA. Entre los snoRNA *up*-regulados en los animales CPT1AM encontramos el SNORD115, SNORD116 y SNORD113 (Tabla 1).

Entre los transcritos *down*-regulados encontramos la hormona vasopresina (AVP), el neuropéptido anorexigénico neurotensina (NTS) y dos proteínas de choque térmico (HSP (*heat shock protein*) B1 y HSPB8) (Tabla 1).

Nombre del transcrito	Cambio relativo (<i>log</i>)	<i>p</i> valor
SNORD116 (<i>small nucleolar RNA</i>)	1,467	0
SNORD115	1,358	0
SNOR113	1,056	0
VIP (<i>vasoactive intestinal peptide</i>)	0,63	0,000038
HDC (<i>histamine decarboxylase</i>)	0,59	0,000091
TTR (<i>transthyretin</i>)	0,94	0,000031
CGA (<i>chorionic gonadotropina a</i>)	0,5	0,000024
TSHB (<i>thyroid stimulating hormone β</i>)	0,75	0,000028
AVP (<i>arginine vasopressin</i>)	-0,8	0,0000041
HSPB1 (<i>heat shock protein B1</i>)	-0,98	0,0000034
HSPB8 (<i>heat shock protein B8</i>)	-0,54	0,00005
NTS (<i>neurotensin</i>)	-0,71	0,000024
USP18 (<i>ubiquitin specific peptidase 18</i>)	-0,78	0,0000031
CA3 (<i>carbonic anhydrase 3</i>)	-0,72	0,0000068
A2M (<i>α-2-macroglobulin</i>)	-0,75	0,0000048
MT2A (<i>metallothionein-2A</i>)	-0,66	0,0000068
CXCL10 (<i>C-X-C motif chemokine 10</i>)	-0,69	0,00002
FCRL5 (<i>Fc receptor-like 5, scavenger receptor</i>)	-1	0,0000034
LGALS3 (<i>galectin-3</i>)	-1,3	0
CLEC7A (<i>C-type lectin domain family 7 member A</i>)	-0,76	0,000014

Tabla 1. Perfil de expresión génica en el MBH. Análisis de la expresión génica en el MBH 23 semanas después de la administración de los AAVs. Resultados obtenidos utilizando un chip de DNA y expresados como el cambio relativo en los niveles de mRNA en los animales CPT1AM respecto al control (GFP). En verde se muestran los transcritos con una expresión mayor y en rojo los transcritos con una expresión menor en los animales CPT1AM. GFP y CPT1AM, *n* = 3.

De entre los genes con una expresión génica significativamente diferente, seleccionamos los siguientes para continuar con su estudio: SNORD116, SNORD115, SNORD113, VIP, HDC, TTR, CGA, TSHB, AVP, HSPB1 y HSPB8, NTS. Para todos ellos se ha descrito un papel en el control de la ingesta o el mantenimiento de los ritmos circadianos. Utilizando la técnica de *qRT*-PCR procedimos a confirmar los resultados obtenidos con el *micro-array*. Los datos obtenidos constataron que únicamente los genes de HSPB1 y B8 y SNORD113, 115 y 116 presentan una expresión significativamente diferente en los animales CPT1AM. En el caso de las HSPB1 y B8 la disminución es del $35,8 \pm 18,5$ % y $22,3 \pm 11,7$ % respectivamente. En el caso de los RNAs SNORD116, 115 y 113 el aumento en los animales CPT1AM es del $25,3 \pm 7,2$ %, $55,6 \pm 13,4$ % y $42,7 \pm 14,9$ % respectivamente (**Figura 7**).

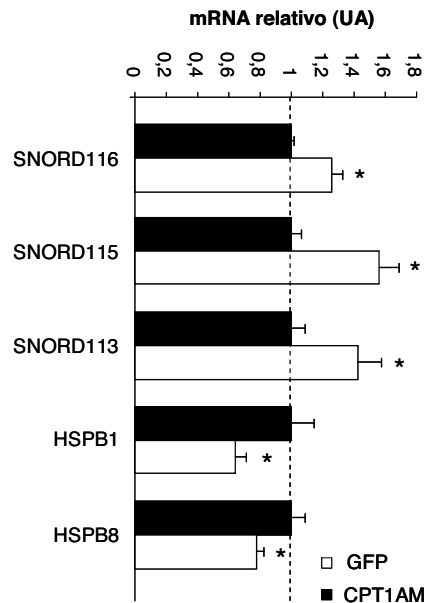


Figura 7. Análisis por *qRT*-PCR de los niveles de mRNA de SNORD116, SNORD115, SNORD113, HSPB1 y HSPB8 en el MBH. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA en el MBH 23 semanas después de la inyección de los AAVs. Los resultados se expresan como la variación respecto al control (GFP) como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

2.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO

Seguidamente analizamos el perfil de expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo lipídico y la gluconeogénesis en el hígado.

En primer lugar analizamos los niveles de mRNA de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos. Los resultados obtenidos confirmaron la ausencia de expresión de CPT1AM en el hígado. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los mRNA de CPT1Awt, isoforma endógena, FAS, ACC2 y UCP2. Sí se observó un aumento de $1,9 \pm 0,2$ veces en la expresión del gen ACC1 en los animales CPT1AM respecto al control (**Figura 8**).

Diferentes estudios han demostrado que la gluconeogénesis hepática está regulada por el sistema nervioso central, especialmente por neuronas del núcleo VMH hipotalámico (Uyama, Geerts *et al.*, 2004). Quisimos analizar si la sobre-expresión de CPT1AM en dicho núcleo afecta a la expresión de genes hepáticos implicados en la vía de la gluconeogénesis. Para ello cuantificamos los niveles de mRNA de G-6-fosfatasa (G6Pasa) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el hígado de los animales GFP

y CPT1AM. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de $1,5 \pm 0,1$ veces en el mRNA de PEPCCK en los animales CPT1AM respecto al control (**Figura 8**).

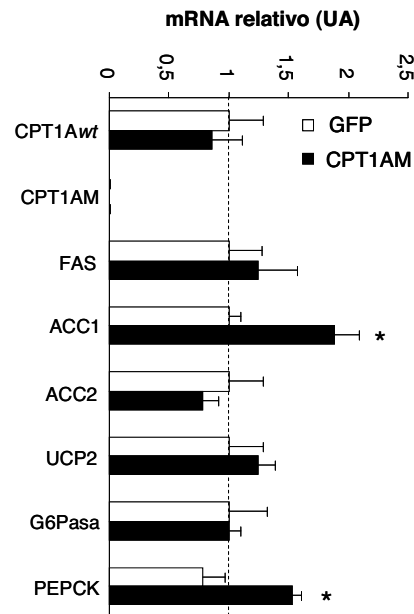


Figura 8. Análisis por *qRT*-PCR de los niveles de mRNA en el hígado. Cuantificación relativa de los mRNA de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la gluconeogénesis. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. *: $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados presentados demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH produce cambios significativos en los niveles de mRNA de ACC1 y PEPCCK en el hígado.

2.7. ANÁLISIS DE LOS NIVELES HEPÁTICOS DE MALONIL-CoA Y TRIGLICÉRIDOS

Los estudios de expresión génica en el hígado mostraron un aumento en el mRNA de ACC1 en los animales CPT1AM. Para profundizar en las consecuencias de este aumento, analizamos las concentraciones hepáticas tanto de malonil-CoA, sustrato del enzima ACC1, como de triglicéridos (TAG) y realizamos un estudio histológico del mismo tejido.

Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de diferencias significativas en la concentración de malonil-CoA entre los animales GFP y CPT1AM (**Figura 9 A**). Igualmente, tampoco se observaron cambios en el contenido de TAG (**Figura 9 B**) ni en la anatomía histológica del hígado (**Figura 9 C y D**) entre los dos grupos de animales.

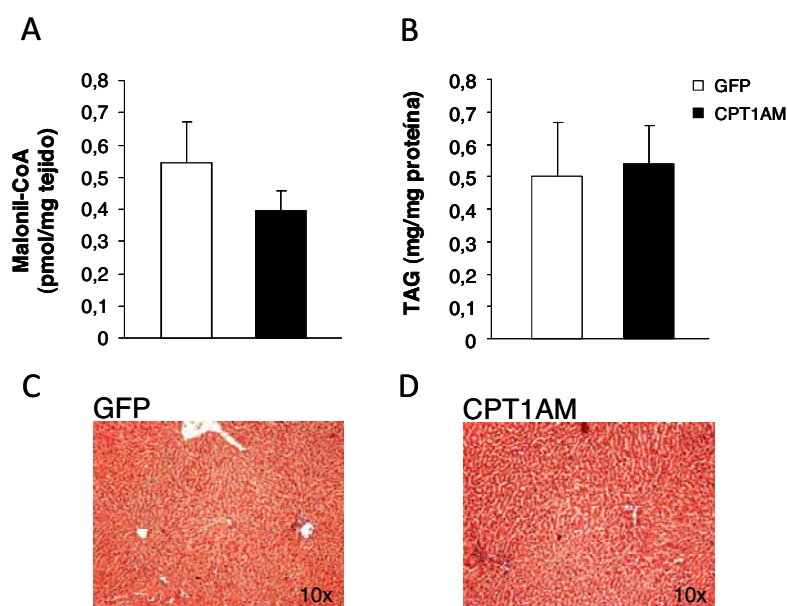


Figura 9. Análisis histológico y de la concentración de malonil-CoA y TAG en hígado. Los niveles de (A) malonil-CoA y (B) TAG fueron determinados en muestras de hígado de animales infectados con los AAVs en el VMH. Para la determinación de malonil-CoA se utilizó un ensayo basado en la reacción enzimática del enzima malonato decarboxilasa, tal y como se detalla en Métodos, 3.2. La concentración de TAG se determinó utilizando un *kit* comercial. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. GFP, $n = 5$; CPT1AM, $n = 6$. (A, B) Imagen representativa de un corte de hígado (tinción H & E) en los animales GFP (A) y CPT1AM (B). Todas las determinaciones se realizaron 23 semanas después de la inyección de los virus en el VMH.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH tiene un efecto sistémico causando hiperfagia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia en ratas. Este fenotipo va acompañado de cambios en el perfil de expresión génica en hipotálamo e hígado. En investigaciones futuras se deberán analizar en profundidad los mecanismos moleculares que en nuestro modelo llevan al desarrollo de un fenotipo hiperfágico e insulino-resistente.

1. C75 Y C75-CoA

1.1. ESTRUCTURA DE C75 Y C75-CoA

C75 (ácido 4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico) es una molécula sintética derivada de un compuesto natural, la cerulenina, conocido inhibidor de la actividad FAS. Se ha descrito que C75 tiene un efecto a nivel del sistema nervioso central produciendo una disminución del apetito y una pérdida de peso en roedores (Loftus, Jaworsky *et al.*, 2000), sin embargo el mecanismo de acción que subyace a este efecto farmacológico no está del todo claro.

Estudios previos, realizados en nuestro grupo, demostraron que el derivado con coenzima A de C75 es un potente inhibidor de la actividad CPT1A. Sin embargo, este compuesto, en su forma no conjugada, no tiene efecto alguno sobre dicho enzima (Bentebibel, Sebastián *et al.*, 2006). De igual manera sucede con otros fármacos, como etomoxir, que debe ser activado a etomoxir-CoA para actuar como inhibidor de CPT1 (Weis, Cowan *et al.*, 1994).

Como parte de una colaboración entre nuestro grupo y el *Grupo de Investigación en Metodología Sintética Aplicada a Productos Bioactivos* del departamento de Química Orgánica (Facultad de Química) de la Universidad de Barcelona, se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) para determinar la estructura química de la molécula de C75-CoA. De estos estudios se dedujo que éste se forma a partir de C75 y coenzima A por la reacción del grupo nucleofílico –SH del coenzima A con el grupo metileno, electrofílico, de la molécula de C75. Esta reacción química se produce, a un pH básico y en presencia de agua deuterada, sin la mediación de ningún enzima (**Figura 10**).

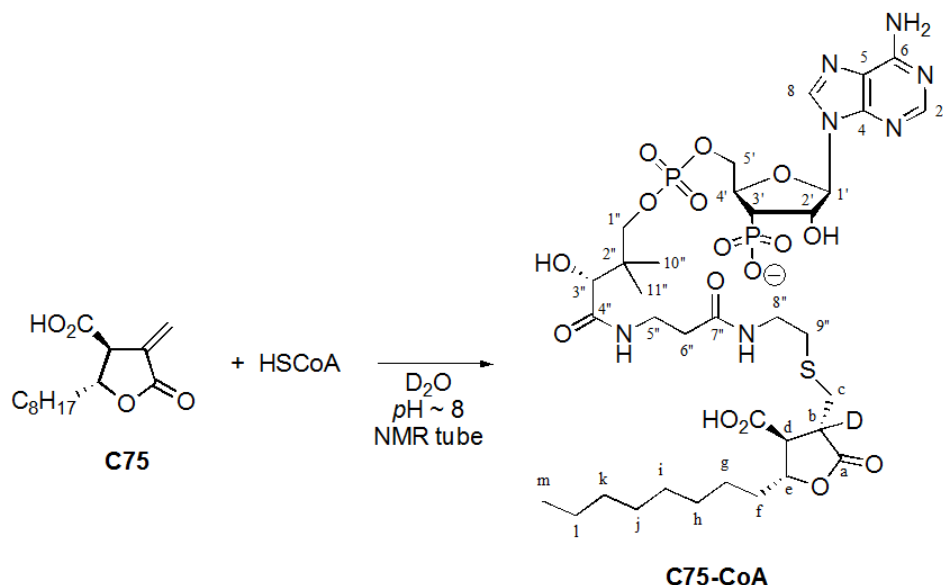


Figura 10. Estructura de C75-CoA. Estudios de RMN permitieron determinar la estructura y estereoquímica de la molécula de C75-CoA. La reacción de los grupos $-SH$ del coenzima A y $=CH_2$ de la molécula de C75 es la base de la formación del aducto C75-CoA.

1.2. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1A *in vitro*

Como ya hemos demostrado (**Figura 10**), C75-CoA se forma a partir de C75 y coenzima A por una reacción química, que en medio básico no requiere la mediación de un enzima. Sin embargo en las células se encuentra el enzima ACS, que cataliza la síntesis de aciles-CoA a partir de ácidos grasos y coenzima A. No se puede descartar que C75 sea un sustrato para este enzima y que *in vivo* su activación a C75-CoA esté mediada por el mismo. Realizamos ensayos de actividad enzimática con extractos mitocondriales de levadura que sobre-expresa el enzima CPT1A de rata, y analizamos el efecto que C75 y C75-CoA tienen sobre la actividad enzimática (**Figura 11 A**). Utilizamos C75-CoA sintetizado químicamente e *in vitro*, en presencia del enzima ACS, para comprobar si existen diferencias entre el tipo de inhibición causado en ambos casos (**Figura 11 B**). Los resultados obtenidos confirmaron que C75-CoA es un potente inhibidor de CPT1A, y que la inhibición es independiente de si esta molécula se ha formado químicamente o *in vitro*. Además demostraron que C75, en su forma libre, no tiene ningún efecto sobre la actividad del enzima CPT1A (**Figura 14 A**).

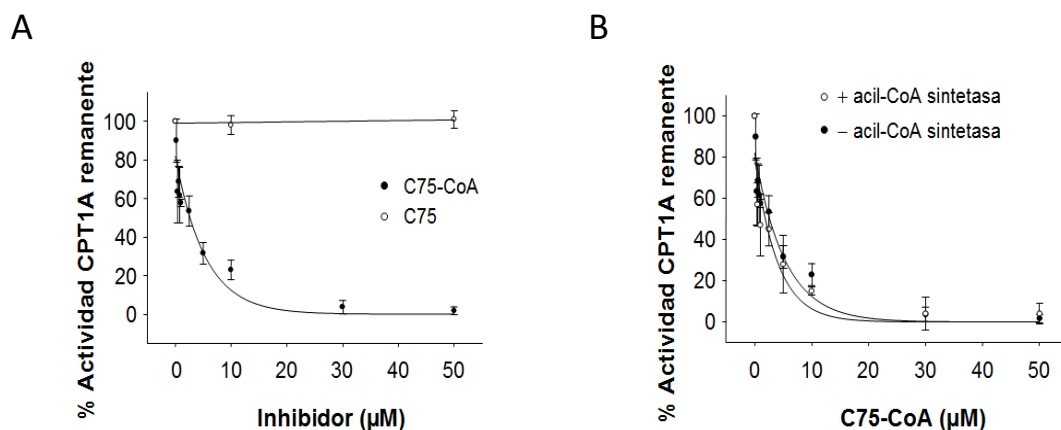


Figura 11. Actividad CPT1 en extractos mitocondriales de levaduras que sobre-expresan CPT1A de rata incubados con concentraciones crecientes de C75 y C75-CoA. 10-15 µg de extractos mitocondriales de levadura se pre-incubaron durante 1 minuto con concentraciones crecientes de C75-CoA o C75 a 30°C. A continuación se ensayó la actividad CPT1A (A). Alternativamente se realizaron los mismos experimentos con C75-CoA sintetizado en presencia y ausencia del enzima ACS (B). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM.

1.3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE C75-CoA EN EL HIPOTÁLAMO

Una vez demostrado que C75-CoA es la forma activa, capaz de inhibir CPT1A *in vitro*, el siguiente paso fue analizar si esta molécula se forma, a partir de C75, en uno de los tejidos en los que tiene una acción biológica, el hipotálamo. Para ello se realizaron micro-inyecciones de 1 µL de C75 en el ARC. Una hora después se procedió a la disección del hipotálamo y la extracción de los aciles-CoA del tejido. De haberse formado C75-CoA, este compuesto debería obtenerse en la misma fracción que los aciles-CoA a causa de sus características fisico-químicas. El producto de dicha extracción fue analizado por HPLC-MS/MS.

El primer paso del examen por HPLC-MS/MS fue caracterizar el tiempo de retención en la columna cromatográfica y el espectro de masas de cada uno de las moléculas problema. Para ello se analizaron concentraciones crecientes conocidas del estándar C75-CoA y de C₁₇-CoA, que fue utilizado como patrón interno. Utilizando las áreas de los picos cromatográficos obtenidos se crearon las curvas de calibración a partir de las cuales cuantificar la concentración de C75-CoA en la muestra problema (Figura 12 A y B).

Una vez caracterizados los estándares se analizaron las muestras problema. Los resultados demostraron que tras la inyección de C75 en el hipotálamo se forma C75-CoA en una cantidad proporcional a la dosis de C75 inyectada (**Figura 12 C, D y E**).

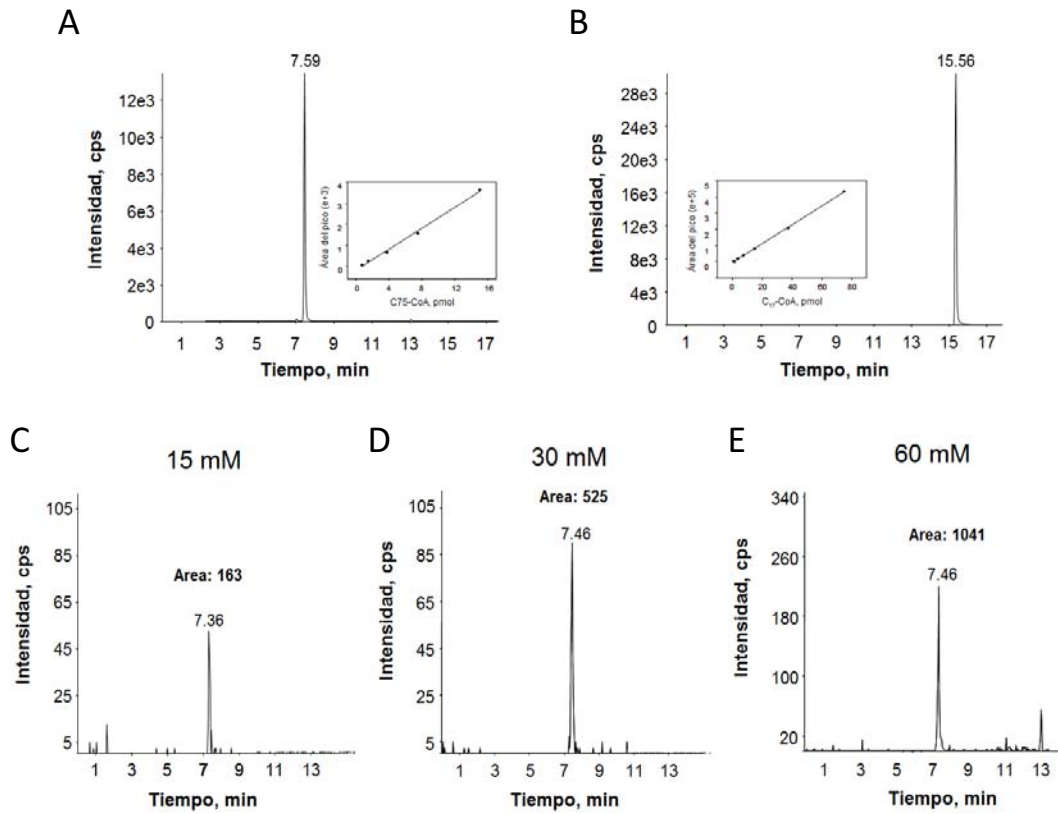


Figura 12. Análisis por HPLC-MS/MS de la formación de C75-CoA en hipotálamo. Cromatogramas representativos en los que se muestra el tiempo de retención y la curva de calibración de los estándares (**A**) C75-CoA y (**B**) C₁₇-CoA (patrón interno). Los tiempos de retención fueron diferentes para cada estándar, lo que permitió separarlos cromatográficamente. El análisis de la formación de C75-CoA se realizó en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley. Los animales recibieron inyecciones en el hipotálamo de una solución de C75 a diferentes concentraciones: (**C**) 15 mM, (**D**) 30 mM y (**E**) 60 mM. Una hora después de la inyección se diseccionó el hipotálamo y se procesó para el análisis por HPLC-MS/MS. En la figura se muestran los cromatogramas representativos correspondientes al producto C75-CoA. En el análisis de espectrometría de masas se siguieron las transiciones 1022,5/515,6 y 1020,7/513,5 para C75-CoA y C₁₇-CoA respectivamente.

Los resultados obtenidos demostraron que C75-CoA se forma, a partir de C75 y CoA-SH, tanto químicamente como *in vivo*, en el hipotálamo, con la estructura y estereoquímica que se muestra en la **Figura 10**.

1.4. EFECTO SOBRE EL PESO Y LA INGESTA

Tras la observación de la formación de C75-CoA *in vivo* y del efecto que este derivado tiene sobre la actividad CPT1 *in vitro*, nos planteamos que el mecanismo de acción de C75 en el hipotálamo podría estar mediado, al menos en parte, por su acción sobre CPT1.

Para abordar esta cuestión quisimos analizar, en primer lugar, el efecto que la administración central de C75 tiene sobre el peso y la ingesta de los animales tratados. Para ello, realizamos inyecciones intracerebroventriculares (i.c.v.) de C75 en ratas Sprague-Dawley macho adultas media hora antes del inicio de la fase oscura y medimos la ingesta 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección. Igualmente, 22 horas después de la inyección se realizó una medida del peso de los animales tratados. Utilizamos como control otro conocido inhibidor de CPT1, etomoxir (Lopaschuk, Wall *et al.*, 1988), que fue administrado a los animales de la misma manera que C75. Los resultados mostraron una potente disminución en la ingesta y el peso causada por el tratamiento con C75 y etomoxir. La diferencia en la ingesta fue significativa 1 hora después de la inyección central de C75 y 22 horas después en el caso de la administración de etomoxir (**Figura 13**). Cabe resaltar que estudios previos realizados en nuestro grupo demostraron que etomoxir, igual que C75, también es activado a etomoxir-CoA *in vivo*.

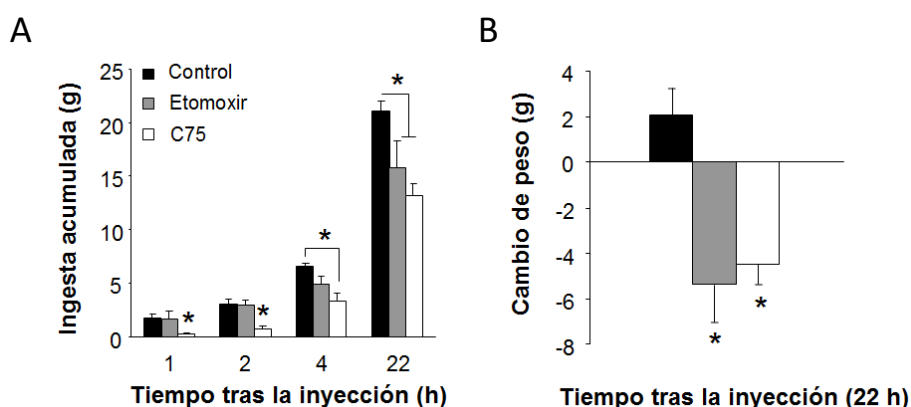


Figura 13. Cambio en la ingesta y el peso en los animales tratados con C75 y etomoxir. Los animales recibieron inyecciones i.c.v. de 10 μ L de C75 y etomoxir (33 mM) 30 minutos antes del inicio de la fase oscura. 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección se realizaron medidas de la ingesta. 22 horas después de la inyección se realizó una medida del peso. A los animales control se les administró el vehículo en el que se disolvieron los fármacos (DMSO:RPMI, 1:3). Los resultados se presentan como (A) ingesta acumulada y (B) cambio de peso respecto al peso inicial. Todos los datos se expresan como el promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$.

1.5. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1 HIPOTALÁMICA

A continuación analizamos la actividad CPT1 en el hipotálamo de animales tratados con C75. Para ello, un primer grupo recibió inyecciones de C75 (1 μ L de una solución 33 mM) o vehículo (DMSO:RPMI, 1:3) en el núcleo ARC del hipotálamo. En un segundo grupo se realizaron inyecciones i.c.v. (10 μ L de la misma solución). Una hora después de la administración del compuesto el hipotálamo fue diseccionado y se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias en las que se ensayó la actividad CPT1. Los resultados mostraron una disminución de la actividad del $44,9 \pm 3,4\%$ (**Figura 14 A**) y $32,5 \pm 4,1\%$ (**Figura 14 B**) en el primer y segundo grupo de animales tratados con C75 respectivamente.

En conjunto, estos resultados demuestran que, tras su administración central, C75 se convierte en C75-CoA en el hipotálamo, donde inhibe la actividad CPT1, el peso y la ingesta. El hecho de que otros inhibidores de CPT1, como etomoxir-CoA (**Figura 16**) o ST1326 (Obici, Feng *et al.*, 2003), también causen el mismo efecto anoréxico sugieren que la inhibición de CPT1 juega un papel en el mecanismo de acción central de C75.

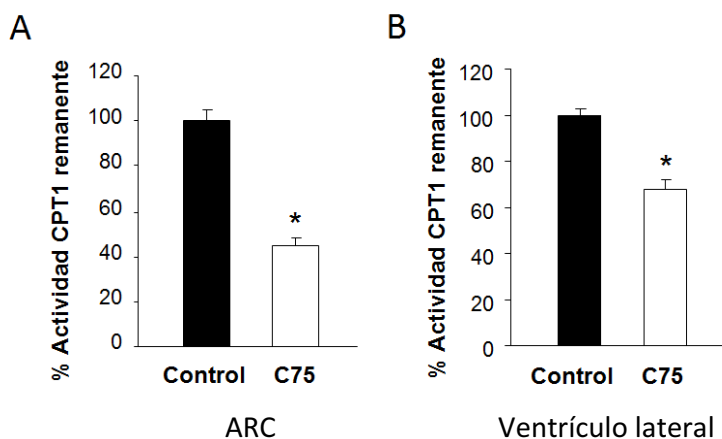


Figura 14. Actividad CPT1 hipotalámica tras la inyección central de C75. Los animales recibieron inyecciones de (A) 1 μ L en el núcleo ARC o (B) 10 μ L i.c.v. de una solución de C75 33 mM o del vehículo (DMSO:RPMI, 1:3) (control). Una hora después de la inyección los animales fueron sacrificados y el hipotálamo diseccionado y procesado para la obtención de extractos mitocondriales. 100 μ g de estos extractos fueron utilizados para ensayar la actividad CPT1. Los resultados se expresan como % de actividad remanente respecto al control (promedio \pm SEM). *: $p < 0,05$.

2. DERIVADOS DEL C75 SIN GRUPO METILENO: METHYLENE-LACKING-C75 (MLC)

2.1. ESTRUCTURA DE LOS MLCs

El conocimiento de la estructura de C75-CoA resaltó el papel clave del grupo metileno de la molécula de C75 en la formación de este aducto. Quisimos analizar el efecto que tendría la eliminación de este grupo funcional en la actividad biológica de C75. Para abordar esta cuestión se sintetizaron tres moléculas derivadas que se denominaron MLC-1, 2 y 3 (*methylene-lacking-C75*, C75 sin metileno). En el caso de MLC-1 el grupo metileno se sustituyó por un grupo metilo ($-\text{CH}_3$), en la molécula MLC-2 se eliminó el grupo metileno y en el caso de MLC-3 el doble enlace del grupo metileno pasó a estar en el interior de la lactona del C75. La estructura de todos estos derivados se muestra en la **Figura 15**.

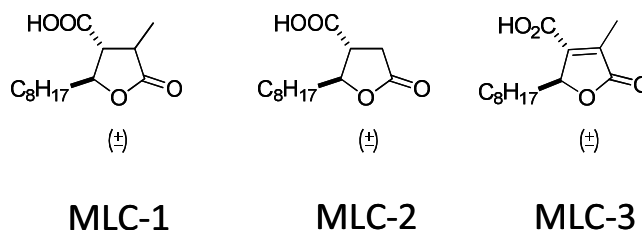


Figura 15. Estructura química de los *methylene-lacking-C75* (MLCs).

Los experimentos de RMN demostraron que, a diferencia de C75, cuando los MLCs se incuban con CoA-SH en un medio básico no reaccionan y por tanto no forman el aducto unido a coenzima A.

2.2. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1A *in vitro*

Una vez sintetizados los MLCs y comprobada la incapacidad que tienen de formar el correspondiente derivado $-\text{CoA}$, quisimos analizar el efecto que estos compuestos tienen sobre la actividad CPT1. Para ello realizamos ensayos de actividad con extractos mitocondriales de levaduras que sobre-expresan CPT1A de rata en presencia de concentraciones crecientes (1-100 μM) de los 3 MLCs. En estos experimentos se utilizó C75-CoA como control de la inhibición. Los resultados demostraron que ninguno de los MLCs afectan la actividad CPT1A *in vitro* (**Figura 16 A**),

sugiriendo que el grupo metileno es esencial para la formación del aducto y la consiguiente inhibición del enzima.

2.3. EFECTO SOBRE EL PESO Y LA INGESTA

Seguidamente analizamos el efecto que los MLCs tienen sobre el peso y la ingesta de los animales tratados. Para ello se realizaron inyecciones i.c.v. del vehículo (DMSO:RPMI, 1:3) o de MLC-1, MLC-2, MLC-3 y C75 (10 µL de una solución 33 mM). C75 se utilizó como control. Las inyecciones se realizaron 30 minutos antes del inicio del ciclo oscuro y se tomaron medidas de la ingesta 1, 2, 4 y 22 horas después de la administración. También se analizó la ingesta y el peso durante los tres días posteriores a la administración del compuesto, con objeto de determinar si los MLCs tienen algún efecto a medio plazo. Los resultados mostraron que, al contrario que C75, los MLCs no disminuyen ni el peso ni la ingesta de los animales tratados. Únicamente el compuesto MLC-1 tiene un acción moderada inhibiendo la ingesta 22 horas después de la inyección, sin embargo el peso de los animales tratados con esta molécula no mostró cambios respecto al grupo control (**Figura 16 B, C y D**).

2.4. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1 HIPOTALÁMICA

El siguiente paso consistió en la determinación de la actividad CPT1 hipotalámica tras la administración i.c.v. de los MLCs. Para ello el hipotálamo se diseccionó 1 hora después de la inyección de los compuestos y se procesó para obtener fracciones enriquecidas en mitocondrias, en las que se ensayó la actividad CPT1. Los resultados confirmaron que, tal y como ocurre *in vitro*, los compuestos MLC-1, MLC-2 y MLC-3 no afectan la actividad CPT1 en el hipotálamo (**Figura 16 E**). C75 fue inyectado como control de la inhibición. Los animales control recibieron inyecciones i.c.v. del vehículo en el que se disolvieron los fármacos (DMSO:RPMI, 1:3).

2.5. EFECTO SOBRE LA CONCENTRACIÓN HIPOTALÁMICA DE MALONIL-CoA

A causa del efecto que MLC-1 tiene sobre la ingesta 22 horas después de su administración i.c.v., analizamos la concentración de malonil-CoA en el hipotálamo tras la inyección central de este compuesto (10 µL de una solución 33 mM). Estudiamos

también el efecto de MLC-2, compuesto sin actividad anoréxica. Estos análisis se realizaron tras someter a los animales a un ayuno de 12 horas. Como control de los experimentos utilizamos ratas re-alimentadas durante tres horas antes de la determinación de malonil-CoA y un grupo tratado con C75, ya que está ampliamente descrito su efecto sobre la concentración de este metabolito en el hipotálamo.

Los resultados demostraron que la administración i.c.v. de MLC-1 causa un aumento significativo en la concentración hipotalámica de malonil-CoA respecto al grupo control, tratado únicamente con el vehículo en el que se disuelven los fármacos. Por el contrario, MLC-2 no tiene ningún efecto sobre la concentración de este metabolito. En los animales re-alimentados y los tratados con C75, tal y como se describe en la bibliografía, se observó un incremento significativo de las concentraciones de malonil-CoA (**Figura 16 F**).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la eliminación del grupo metileno de la molécula C75 imposibilita la formación del aducto -CoA. Asimismo, este hecho provoca la pérdida de poder anoréxico de C75 y la capacidad de inhibir CPT1.

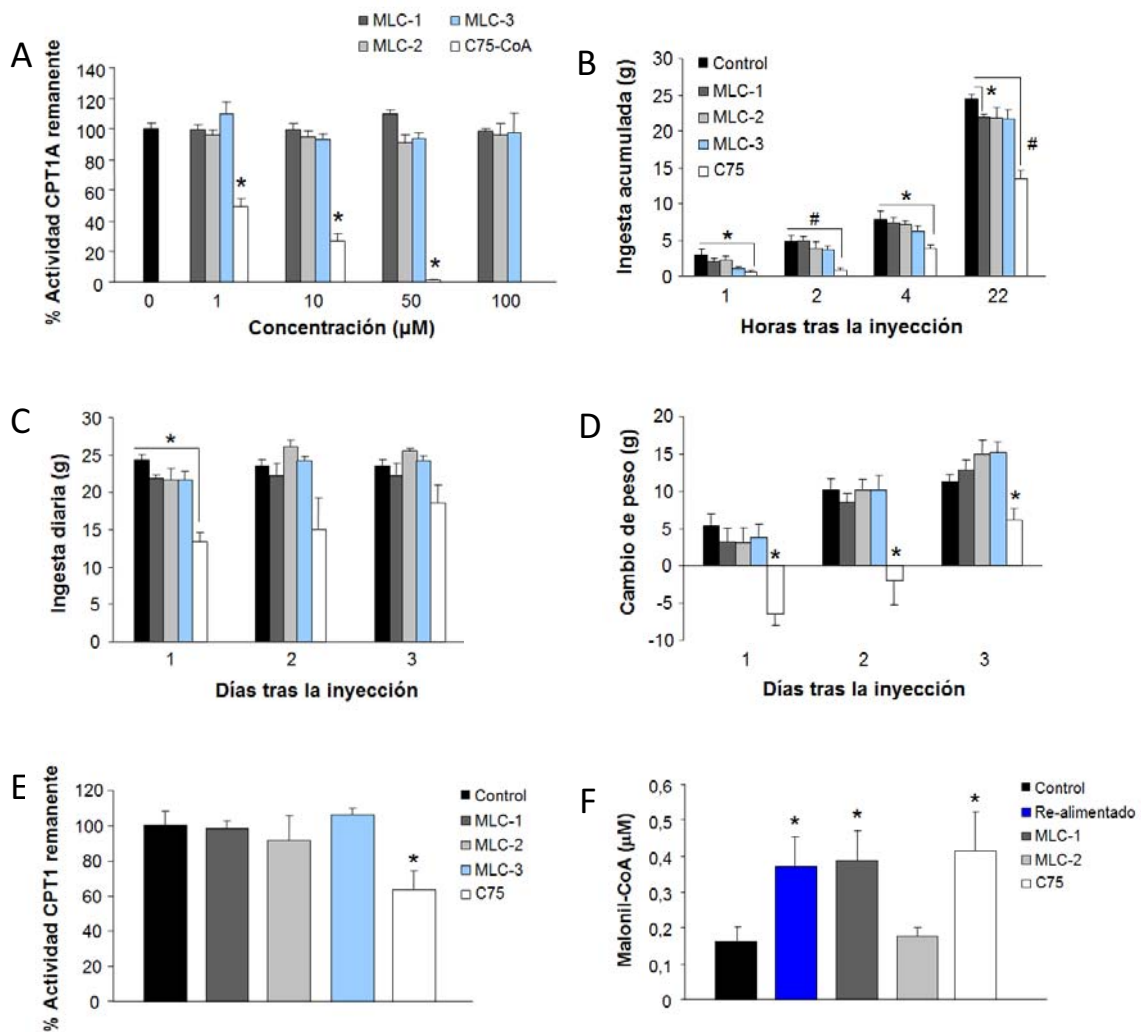


Figura 16. Efecto de los MLCs sobre el peso, la ingesta, la actividad CPT1 y la concentración de malonil-CoA en el hipotálamo. (A) 10-15 µg de extractos mitocondriales de levadura fueron pre-incubados con concentraciones crecientes de MLC-1, 2 y 3 durante 1 minuto a 30°C. A continuación se analizó la actividad CPT1A. C75-CoA, la forma activa sobre CPT1A, fue utilizado como control de la inhibición. (B-E) 10 µL de MLC-1, MLC-2, MLC-3 o C75 (33 mM) fueron administrados i.c.v. (B) 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección se realizaron medidas de la ingesta. 22 después y durante los tres días posteriores se realizaron medidas (C) del peso y (D) la ingesta. Los animales control fueron inyectados con el vehículo en el que se disolvieron los fármacos (DMSO:RPMI, 1:3). (E) Otro grupo de animales recibió inyecciones i.c.v. de los mismos compuestos 1 hora antes de ser sacrificados. A continuación se diseccionó el hipotálamo y se procesó para obtener extractos mitocondriales. 100 µg de estos extractos se utilizaron para la determinación de actividad CPT1. C75 fue utilizado como control de la inhibición. (F) Un tercer grupo de animales se sometió a un ayuno de 12 horas tras el que se realizaron inyecciones i.c.v. de 10 µL de MLC-1, 2, C75 (33 mM) o vehículo (en el caso del grupo control y el grupo re-alimentado). Una hora después se sacrificaron los animales y el hipotálamo fue diseccionado y procesado para la determinación de la concentración de malonil-CoA. En todos los casos los resultados se expresan como el promedio ± SEM. *: $p < 0,05$, #: $p < 0,01$.

3. ISÓMEROS DE C75

3.1. ESTRUCTURA DE LOS ISÓMEROS DE C75

C75 pertenece a la clase de los ácidos paracónicos caracterizados por la fracción de la γ -lactona con una cadena alquilo en la posición C-2, un grupo carboxílico en C-3 y un grupo metileno en C-4. La síntesis de este compuesto fue publicada por primera vez en el año 2000 (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000). Como parte de esta síntesis se obtuvieron los dos isómeros, *trans*- y *cis*-, de la lactona, sin embargo el isómero con configuración *trans*- fue el que finalmente se designó como C75. Todos los estudios realizados desde entonces se han hecho utilizando esta molécula, sin embargo poco se sabe del isómero *cis*- de C75. Durante esta Tesis nos planteamos estudiar su efecto biológico, centrándonos en su acción sobre la actividad CPT1, el peso y la ingesta. El primer paso fue sintetizar ambos isómeros, C75 (isómero *trans*-) y C75-*cis*, así como sus derivados -CoA. Este trabajo se realizó en el *Grupo de Investigación en Metodología Sintética Aplicada a Productos Bioactivos* del departamento de Química Orgánica (Facultad de Química) de la Universidad de Barcelona. Cabe resaltar que durante todo el trabajo se denomina C75 al isómero *trans*- de esta molécula, por este motivo durante esta sección se añade el sufijo *cis*- al isómero correspondiente para diferenciarlo de la forma *trans*- (Figura 17).

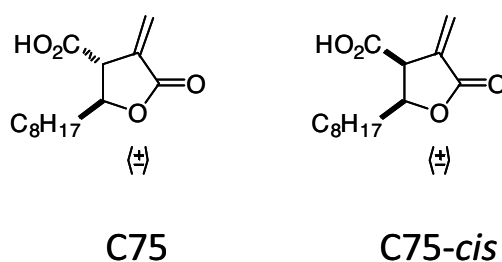


Figura 17. Estructura química de C75 y el C75-*cis*.

3.2. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1A *in vitro*

El primer objetivo fue el de analizar el efecto que los isómeros de C75 tienen sobre la actividad CPT1A *in vitro*. Para ello realizamos dos aproximaciones; en primer lugar analizamos la actividad CPT1A en extractos mitocondriales de levaduras que

sobre-expresan el enzima, incubados con concentraciones crecientes de C75-CoA y C75-*cis*-CoA. Estos experimentos nos permitieron calcular las constantes de inhibición, IC₅₀, de ambas moléculas. En segundo lugar realizamos experimentos de diálisis para analizar la estabilidad de la unión enzima-inhibidor. Estos experimentos permiten determinar cómo de fuerte es la unión entre el enzima y el inhibidor en función del tiempo de diálisis que se requiere para que ambos componentes del sistema se separen. Los resultados obtenidos mostraron que, *in vitro*, no existen diferencias significativas entre la inhibición de CPT1A causada por ambos isómeros (**Figura 18 A**), ni tampoco en el tipo de unión al enzima (**Figura 18 B**).

3.3. EFECTO SOBRE EL PESO Y LA INGESTA

A continuación investigamos el efecto de C75 y C75-*cis* sobre el peso y la ingesta en ratas. Para ello realizamos inyecciones i.c.v. de estos compuestos, 30 minutos antes del inicio de la fase oscura. Se midió la ingesta 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección. También analizamos el consumo de alimentos y el cambio de peso durante los tres días posteriores al tratamiento, con objeto de estudiar el efecto a corto y medio plazo. Los resultados obtenidos demostraron que C75-*cis* no tiene efecto anorexigénico ya que no se observaron diferencias ni en el peso ni en la ingesta en los animales inyectados con este compuesto respecto al control (inyectados con vehículo) (**Figura 18 C, D y E**).

Por lo tanto, C75-*cis*, a pesar de inhibir CPT1A *in vitro*, no presenta el efecto anorexigénico de C75. Este hecho planteó la posibilidad de que un compuesto que *in vitro* actúa como inhibidor del enzima, no actúe de la misma manera *in vivo*. En el caso de C75, la inhibición *in vivo* de CPT1 depende de la formación previa de su correspondiente derivado C75-CoA. Para solucionar estas cuestiones analizamos, por un lado, la actividad CPT1 hipotalámica tras la administración i.c.v. de C75-*cis* y, por otro, la formación de C75-*cis*-CoA en el hipotálamo.

3.4. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1 HIPOTALÁMICA

Para analizar el efecto que C75-*cis* tiene sobre la actividad CPT1 hipotalámica se realizaron inyecciones i.c.v de C75 y C75-*cis* (10 µL de una solución 33 mM). Una hora

después de la inyección se procedió a la disección del hipotálamo y la obtención de extractos enriquecidos en mitocondrias. Las fracciones mitocondriales se utilizaron para los ensayos de actividad CPT1.

Los resultados mostraron una disminución de la actividad CPT1 significativa en los animales tratados con C75 (porcentaje de inhibición del $39,6 \pm 18$). Sin embargo, los animales inyectados con C75-*cis* no presentaron diferencias en la actividad CPT1 respecto al control (**Figura 18 F**).

Una posible explicación a la falta de inhibición de CPT1 en el hipotálamo tras la administración de C75-*cis*, podría ser la incapacidad de este compuesto de formar el derivado C75-*cis*-CoA *in vivo*. Para aclarar esta cuestión se examinó la formación del aducto en hipotálamo tras la inyección de C75-*cis*.

3.5. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE C75-*cis*-CoA EN HIPOTÁLAMO DE RATA

Para analizar la formación de C75-*cis*-CoA en el hipotálamo seguimos el mismo protocolo que para el análisis de la formación de C75-CoA (Resultados, Parte II, 1.3). Realizamos inyecciones i.c.v. de 10 μ L de C75-*cis* (33 mM) o vehículo (DMSO:RPMI, 1:3). Una hora después de la inyección se diseccionó el hipotálamo, que fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente procesado para la extracción de aciles-CoA de cadena larga y, de haberse formado, C75-*cis*-CoA. Utilizando la técnica de HPLC-MS/MS analizamos las muestras en busca del compuesto derivado C75-*cis*-CoA.

El primer paso de los análisis por espectrometría de masas consistió en caracterizar los patrones C75-*cis*-CoA y C₁₇-CoA, que utilizamos como estándar interno. Los resultados mostraron tiempos de retención cromatográfica diferentes para ambos compuestos lo que nos garantizó poder separar las dos moléculas tanto por cromatografía como por su espectro de masas (**Figura 19 A y B**).

El siguiente paso consistió en el análisis de las muestras procedentes de los animales inyectados con C75-*cis*. Los resultados evidenciaron la ausencia de C75-*cis*-CoA en las muestras analizadas. El pico cromatográfico aparecido a los 8,72 minutos, correspondiente al estándar interno C₁₇-CoA, nos sirvió como control de la extracción de aciles-CoA (**Figura 19 C y D**).

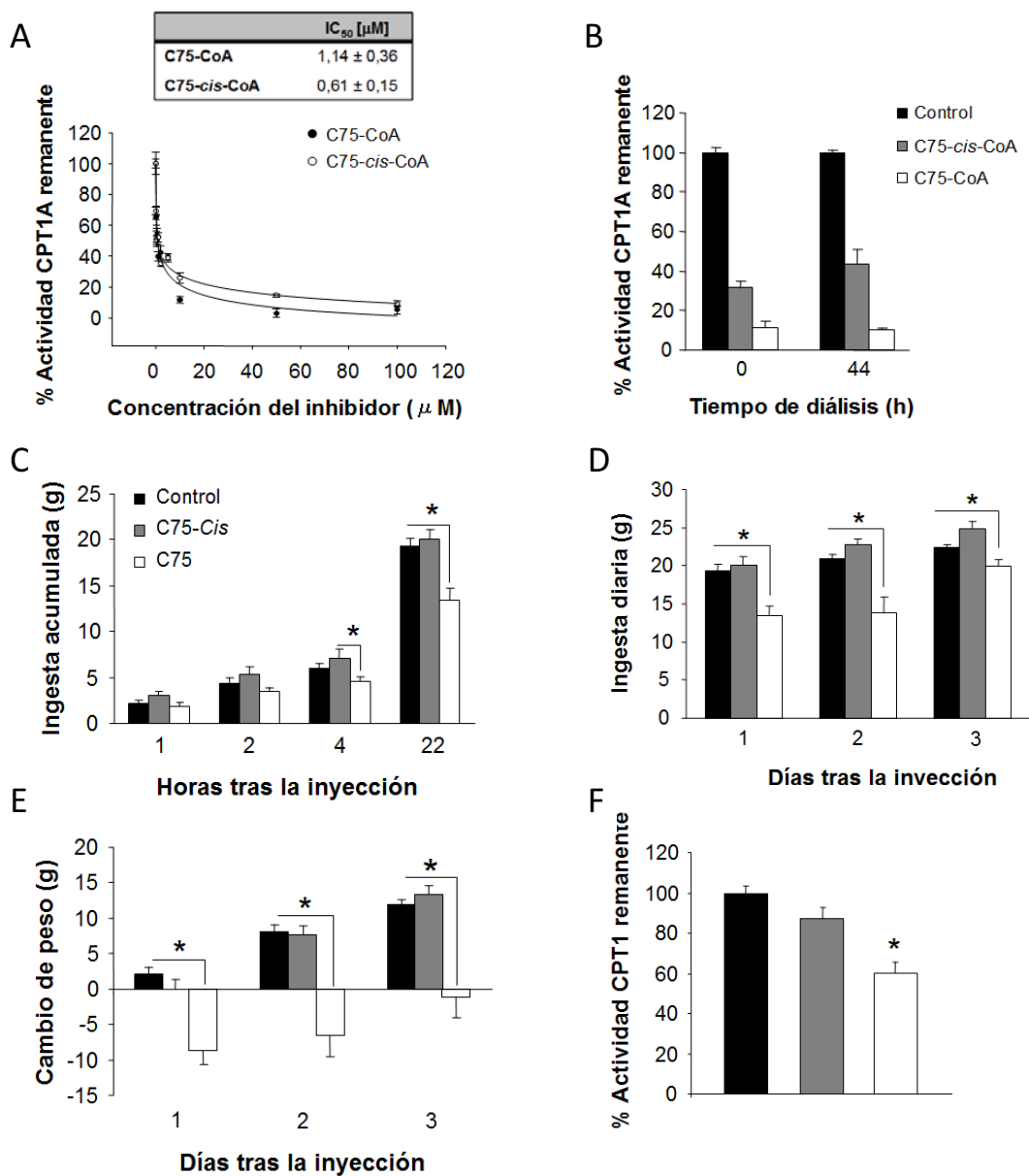


Figura 18. Efecto de los isómeros de C75 sobre el peso, la ingesta y la actividad CPT1. (A) 10-15 μg de extractos mitocondriales de levadura fueron pre-incubados con concentraciones crecientes de C75-CoA y C75-cis-CoA durante 1 minuto a 30°C. A continuación se analizó la actividad CPT1A. (B) En los experimentos de diálisis 160 μg de dichos extractos se pre-incubaron durante 5 minutos a 30°C con C75 y C75-cis (50 μM). A continuación las muestras se dializaron durante 44 h. La actividad CPT1A se analizó antes y después de la diálisis. (C-E) Un primer grupo de animales recibió inyecciones i.c.v. de 10 μL de C75-CoA o C75-cis-CoA (33 mM). 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección se realizaron medidas de la ingesta (C). 22 horas después, y durante los tres días posteriores a la inyección, se realizaron medidas (D) del peso y (E) la ingesta. Los animales control fueron inyectados con el vehículo en el que se disolvieron los fármacos (DMSO:RPMI, 1:3). (F) Un segundo grupo de animales recibió inyecciones i.c.v. de los mismos compuestos 1 hora antes de ser sacrificados. A continuación se diseccionó el hipotálamo y se procesó para obtener extractos mitocondriales. 100 μg de estos extractos fueron utilizados para analizar la actividad CPT1. En todos los casos los resultados se expresan como el promedio ± SEM. n = 4-12. *: p < 0,05.

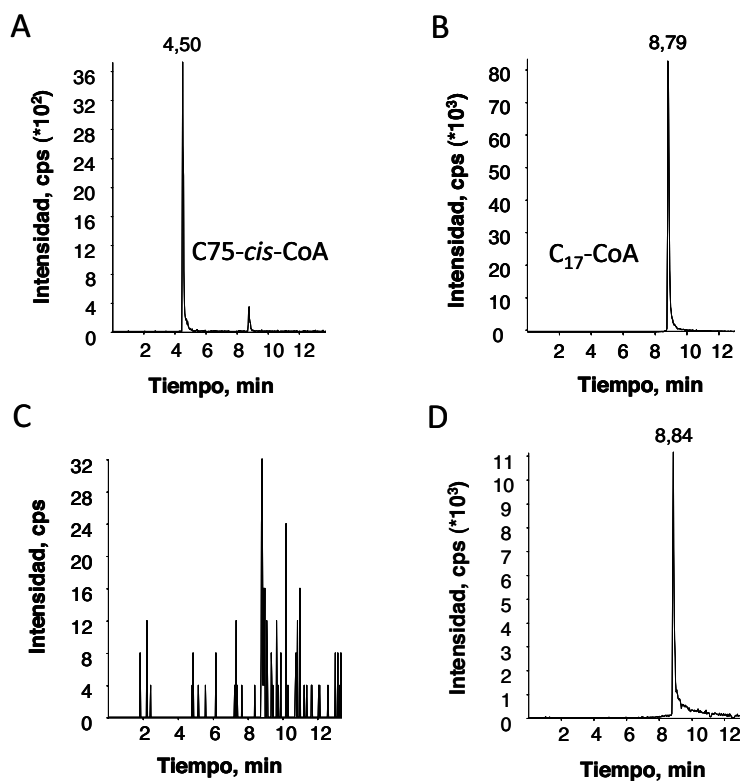


Figura 19. Análisis por HPLC-MS/MS de la formación de C75-*cis*-CoA en hipotálamo. Cromatogramas representativos en los que se muestra el tiempo de retención de los estándares (A) C75-*cis*-CoA y (B) C₁₇-CoA (patrón interno). Los tiempos de retención fueron diferentes para cada estándar, lo que permitió separarlos cromatográficamente. El análisis de la formación de C75-*cis*-CoA se realizó en animales que recibieron inyecciones i.c.v. de 10 μ L de una solución de C75-*cis* (33 mM). Una hora después de la inyección se diseccionó el hipotálamo y se procesó para el análisis por HPLC-MS/MS. En la figura se muestran los cromatogramas representativos correspondientes a las transiciones (C) 1022,5/515,6 (C75-*cis*-CoA) y (D) 1020,7/513,5 (C₁₇-CoA).

Los resultados obtenidos sugieren que la falta de inhibición de CPT1 en el hipotálamo tras la administración central de C75-*cis*, así como la ausencia de acción anorexigénica de este compuesto, podría deberse a la falta de actividad del derivado C75-*cis* *in vivo*, a causa de la imposibilidad de formar el aducto C75-*cis*-CoA.

4. ENANTIÓMEROS DE C75

Todos los trabajos realizados con los enantiómeros de C75 se han llevado a cabo en colaboración con el estudiante de doctorado Kamil Makowski.

4.1. ESTRUCTURA DE LOS ENANTIÓMEROS DE C75

Tanto los resultados obtenidos durante este trabajo, a partir de los estudios con los isómeros de C75, como los datos presentes en la bibliografía, demuestran que

el isómero *trans*- es el compuesto con actividad anorexigénica y capacidad de inhibir CPT1 *in vivo*, en el hipotálamo. Por este motivo, en experimentos posteriores, trabajamos siempre con el isómero *trans*- de C75.

Todos los trabajos publicados hasta el momento se han realizado con una mezcla racémica de este isómero ((±)-C75). Por este motivo, el primero de nuestros objetivos consistió en la síntesis por separado de los dos enantiómeros de (±)-C75 (**Figura 20**) y el estudio de las diferencias en la acción biológica de ambos compuestos.

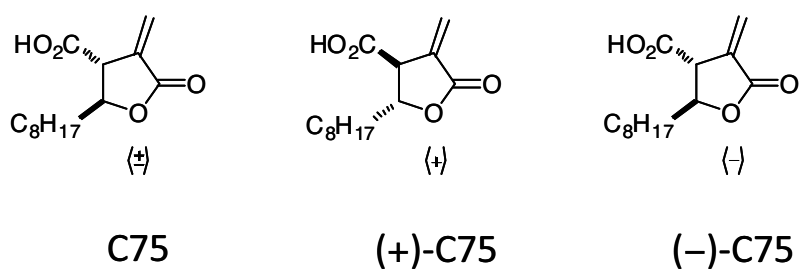


Figura 20. Estructura química de C75 y sus enantiómeros.

4.2. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1 *in vitro*

Una vez sintetizados por separado los enantiómeros de C75, y sus correspondientes derivados ((±)-C75-CoA, (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA), procedimos a analizar el efecto que tienen estos compuestos sobre la actividad CPT1A *in vitro*. Para ello pre-incubamos el enzima sobre-expresado en levaduras con concentraciones crecientes (1-100 μM) de cada uno de los enantiómeros de (±)-C75-CoA. Al mismo tiempo realizamos ensayos de diálisis para estudiar el tipo de unión de cada compuesto con el enzima. Para ello se incubaron los extractos mitocondriales con una concentración fija de cada inhibidor (50 μM) y se analizó la actividad CPT1 a tiempo cero y tras 44 horas de diálisis.

Los resultados obtenidos mostraron que solamente el enantiómero (+)-C75-CoA tiene capacidad de inhibir CPT1A. La inhibición causada por este enantiómero resultó ser similar a la ocasionada por la mezcla racémica, sin embargo la producida por (-)-C75-CoA fue mucho menor, con una $IC_{50} > 50 \mu M$ (**Figura 21 A**). Nos planteamos si esta baja inhibición podría deberse al hecho que este enantiómero estableciera una unión más débil con el enzima respecto al enantiómero (+)-C75-CoA.

Para solventar esta cuestión realizamos estudios de diálisis, que permiten analizar la estabilidad de la unión enzima-inhibidor. Los resultados obtenidos demostraron que (-)-C75-CoA se une al enzima en menor medida que el enantiómero (+)-C75-CoA, sin embargo la unión que se produce es estable pues no encontramos diferencias en el porcentaje de inhibición causado por estos compuestos antes y después de la diálisis. (**Figura 21 B**).

De estos resultados se puede concluir que los enantiómeros de C75 presentan enantioselectividad respecto a la diana CPT1, siendo (+)-C75-CoA el compuesto con capacidad de inhibir su actividad enzimática.

4.3. EFECTO SOBRE EL PESO Y LA INGESTA

Una vez analizado el efecto de los enantiómeros de C75 sobre la actividad CPT1A *in vitro*, pasamos a estudiar el efecto de la administración central de estos compuestos. Para ello realizamos inyecciones i.c.v. de (\pm)-C75, (+)-C75, (-)-C75 (10 μ L de una solución 33 mM) y vehículo (DMSO:RPMI, 1:3), 30 minutos antes del inicio de la fase oscura. Se efectuaron medidas del peso y la ingesta 22 horas después de la inyección de los compuestos. Los resultados demostraron que el enantiómero (+)-C75 presenta un efecto anorexigénico, causando una reducción significativa del peso y la ingesta en los animales tratados. Por el contrario, en los animales inyectados con (-)-C75 no se observaron diferencias significativas (**Figura 21 D y E**).

Estos resultados demuestran que el enantiómero con poder anorexigénico, (+)-C75, es un inhibidor de CPT1A *in vitro*. Por otro lado, el enantiómero (-)-C75, que *in vitro* no inhibe el enzima CPT1A, no tiene capacidad de suprimir la ingesta ni reducir el peso. Todo ello aporta nuevas evidencias sobre cuál es la estereoquímica del C75 con efecto anoréxico y al mismo tiempo sugiere que el efecto central de este compuesto está mediado por su acción sobre CPT1. Este último punto, sin embargo, debía ser confirmado con los análisis de actividad CPT1 *in vivo*, en el hipotálamo, tras la inyección central de (+)-C75 y (-)-C75 (Resultados, 4.4).

A pesar del efecto sobre la ingesta tras la administración central de estos compuestos, nos planteamos cuál sería el efecto de una administración periférica y repetida en el tiempo. Para ello elegimos un nuevo modelo animal, ratones de la cepa

C57/BL6. Se practicaron inyecciones i.p. diarias de 15 mg/Kg y el tratamiento se prolongó durante 5 días. Los resultados mostraron que, a diferencia de lo ocurrido tras la inyección central de los compuestos, los animales tratados con ambos enantiómeros de C75 sufrieron una reducción de peso respecto al grupo control, inyectado con vehículo. Sin embargo, la reducción del peso causada por (+)-C75 resultó ser significativamente mayor que la causada por (-)-C75 (**Figura 21 E**). El efecto de (±)-C75 resultó ser una mezcla de los efectos de los enantiómeros por separado.

4.4. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD CPT1 HIPOTALÁMICA

Realizamos inyecciones i.c.v. de 10 µL de (+)-C75, (-)-C75 y (±)-C75 (33 mM), este último se utilizó como control de la inhibición de CPT1. Una hora después de la inyección el hipotálamo fue diseccionado y procesado para obtener fracciones enriquecidas en mitocondrias, que fueron utilizadas para ensayar la actividad CPT1. Los resultados confirmaron los datos obtenidos *in vitro*, ya que la actividad de este enzima se encontró significativamente inhibida en el hipotálamo de los animales tratados con (+)-C75 (25,4 ± 3,6% de inhibición respecto al control) pero no en los tratados con (-)-C75 (**Figura 21 F**).

En conjunto, los resultados presentados hasta el momento demuestran que los enantiómeros de C75 presentan diferencias en su acción biológica, de manera que únicamente (+)-C75 tiene acción anoréxica. Notablemente, este enantiómero es un inhibidor de CPT1, *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que la inhibición de este enzima en el hipotálamo es necesaria para la supresión del apetito y la disminución del peso causada por C75.

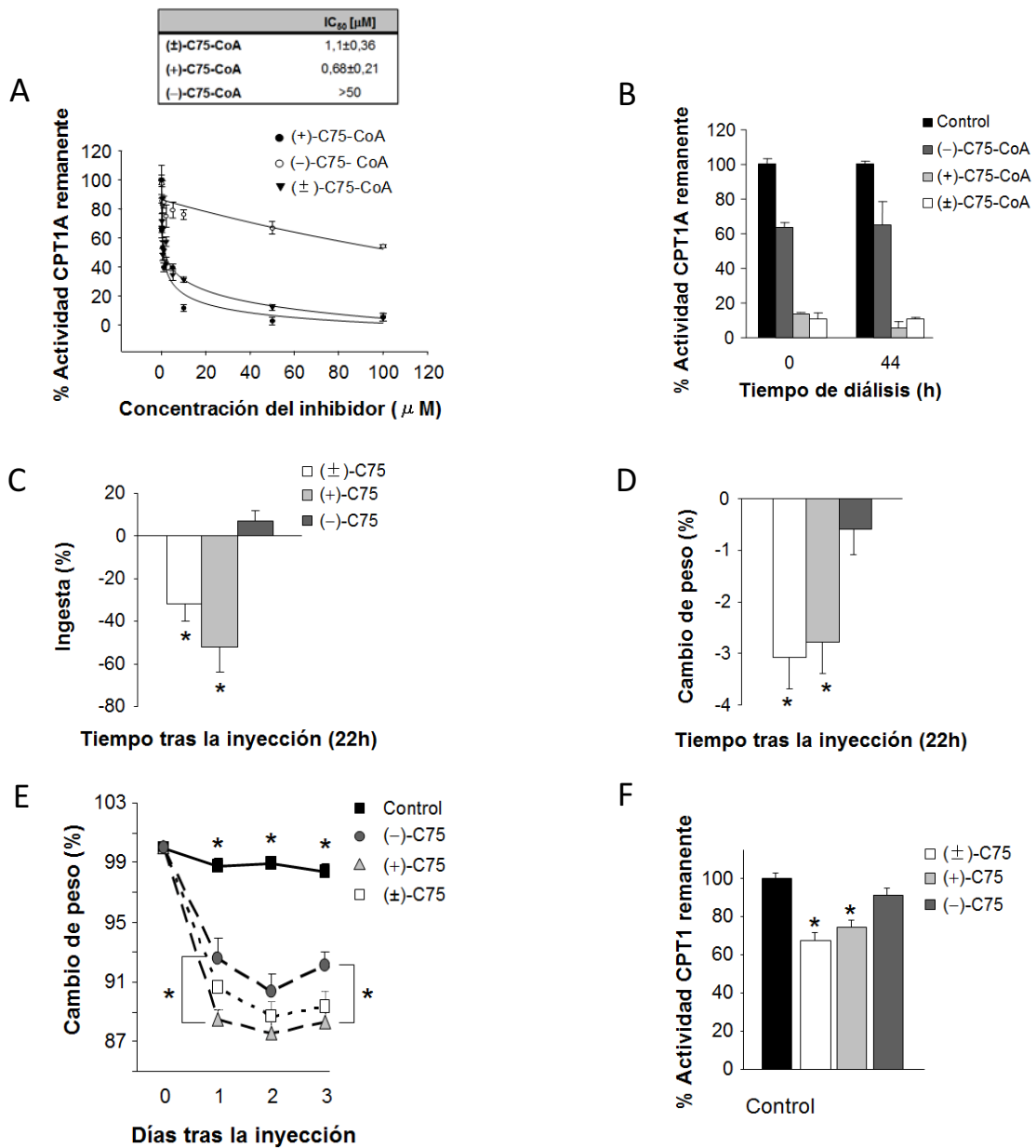


Figura 21. Efecto de los enantiómeros de C75 sobre el peso, la ingesta y la actividad CPT1. (A) 10-15 μg de extractos mitocondriales de levadura fueron pre-incubados con concentraciones crecientes de (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA y (±)-C75-CoA durante 1 minuto a 30°C. A continuación se analizó la actividad CPT1A. (B) En los experimentos de diálisis 160 μg de dichos extractos se preincubaron durante 5 minutos a 30°C con (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA y (±)-C75-CoA (50 μM). A continuación las muestras se dializaron durante 44 h. La actividad CPT1A se midió antes y después de la diálisis. (C,D) Un grupo de ratas recibió inyecciones i.c.v. de 10 μL de (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA y (±)-C75-CoA (33 mM). 22 horas después de la inyección se realizaron medidas de la ingesta (C) y del peso (D). (E) Un grupo de ratones recibió inyecciones i.p. (+)-C75-CoA, (-)-C75-CoA y (±)-C75-CoA (15 mg/Kg) cada día, durante 5 días. Los animales control fueron inyectados con el vehículo en el que se disolvieron los fármacos (DMSO:RPMI, 1:3). (F) Un segundo grupo de ratas recibió inyecciones i.c.v. de los mismos compuestos (10 μL de una solución 33 mM) 1 hora antes de ser sacrificados. A continuación se diseccionó el hipotálamo y se procesó para obtener extractos mitocondriales. 100 μg de estos extractos fueron utilizados para analizar la actividad CPT1. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. *n* = 4-10. *: *p* < 0,05.

Efecto sobre la actividad CPT1A *in vitro*

El primer paso de nuestro estudio fue analizar el efecto que UB-001-CoA tiene sobre la actividad CPT1A *in vitro*. Realizamos ensayos de actividad con extractos mitocondriales de levaduras que sobre-expresan el enzima, previamente incubados con concentraciones crecientes de UB-001-CoA. En estos experimentos utilizamos C75-CoA como control de la inhibición de CPT1A. Los resultados demuestran que la inhibición causada por UB-001-CoA es menor que la causada por el compuesto C75-CoA (**Figura 23 A**).

El objetivo de esta modificación de C75 era conseguir un compuesto con una capacidad de inhibir CPT1A significativamente mayor que la de C75-CoA. Los resultados demostraron que, *in vitro*, esta inhibición no es mayor. A pesar de los datos obtenidos, analizamos el efecto de UB-001 sobre el peso y la ingesta de los animales tratados.

Efecto sobre el peso y la ingesta

Realizamos inyecciones i.c.v. de 10 μ L de este compuesto y C75 (33 mM), que utilizamos como control. A continuación medimos la ingesta 1, 2, 4 y 22 horas después de la administración. Analizamos también el cambio de peso durante los tres días posteriores al tratamiento. Los resultados obtenidos demostraron que la administración del compuesto UB-001 no produce cambios ni en la ingesta ni en el peso de los animales tratados (**Figura 23 B y C**). Esta pérdida de acción anoréxica podría deberse a una disminución de potencia inhibidora del compuesto UB-001-CoA sobre CPT1A.

En base a los resultados obtenidos se tomó la decisión de analizar, en primer lugar, el efecto *in vitro* de todos los nuevos derivados de C75 y seleccionar, para estudios posteriores *in vivo*, solamente aquellos con capacidad de inhibir CPT1A de manera significativamente más potente que el propio C75-CoA.

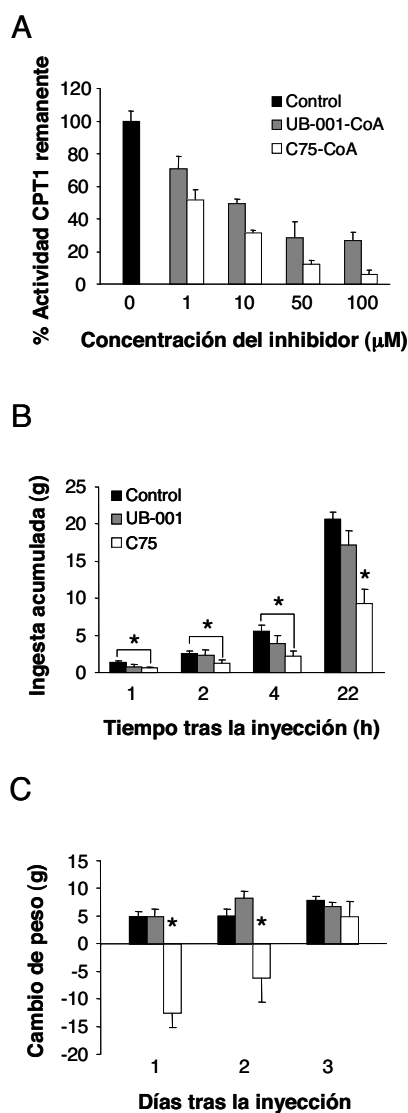


Figura 23. Efecto del compuesto UB-001 sobre la actividad CPT1 *in vitro*, el peso y la ingesta. (A) 10-15 µg de extractos mitocondriales de levadura que sobre-expresan el enzima CPT1A fueron pre-incubados durante 1 minuto con concentraciones crecientes de C75-CoA o UB-001-CoA a 30°C. A continuación se ensayó la actividad CPT1A. Los resultados se expresan como % de actividad remanente respecto al control (sin inhibidor) (promedio ± SEM). (B,C) Se realizaron inyecciones i.c.v. de 10 µL de UB-001 y C75 (33 mM). (B) 1, 2, 4 y 22 horas después de la inyección se realizaron medidas de la ingesta. (C) Durante los tres días posteriores al tratamiento se midió el peso de los animales tratados. Los datos se expresan como el promedio ± SEM. $n = 10$. *: $p < 0,05$.

5.2. INTRODUCCIÓN DE UN GRUPO CARNITINA EN LA POSICIÓN C-3 DE C75: KM079

Los estudios de *Docking* computacional realizados anteriormente indicaban que el ácido carboxílico de C75 se posicionaría en el lugar para el sustrato carnitina del enzima CPT1A (Mera, Bentebibel *et al.*, 2009). En base a estos resultados, decidimos realizar una nueva modificación a C75 consistente en la introducción de un grupo carnitina en el lugar del ácido carboxílico en la posición C-3 (KM079). El objetivo de

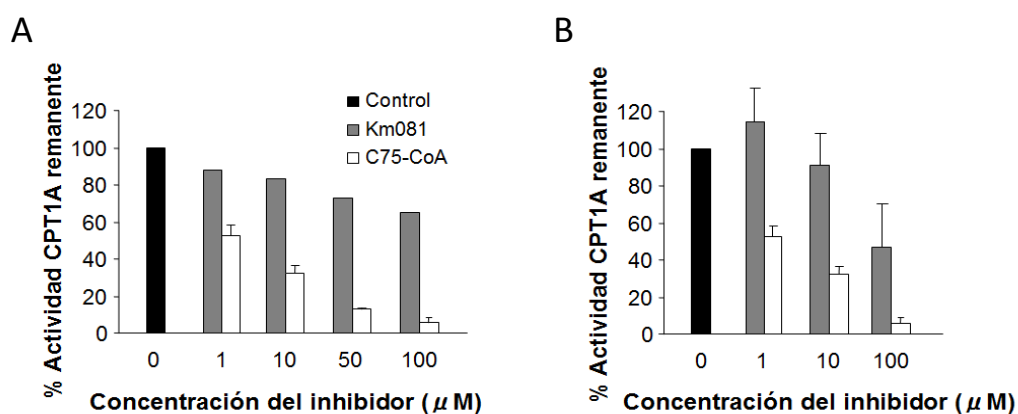


Figura 25. Actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de KM081 y C75-CoA. 10-15 µg de extractos mitocondriales de levadura sobre-expresando el enzima CPT1A fueron incubados durante 1 minuto con concentraciones crecientes de Km081 o C75-CoA a 30°C (A). 20 µg de extractos mitocondriales de hepatocitos primarios de rata fueron incubados durante 10 minutos con concentraciones crecientes de Km081 o C75-CoA a 30°C (B). A continuación se ensayo la actividad CPT1A. Los resultados se expresan como % de actividad remanente respecto al control (sin inhibidor) (promedio ± SEM).

De los resultados presentados se concluye que las modificaciones realizadas hasta el momento en la molécula de C75 producen una pérdida o disminución de función respecto a la capacidad de inhibir CPT1A *in vitro*. Este hecho remarca la importancia del grupo –COOH en la posición C-3 de esta molécula, en cuanto a su acción sobre CPT1A se refiere, y aporta nuevos datos para la futura síntesis de otros derivados de C75.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta segunda parte del trabajo, permiten afirmar que la inhibición de CPT1 en el hipotálamo por C75 es una pieza clave en el mecanismo de acción central de este compuesto. Al mismo tiempo, la síntesis por separado de los dos enantiómeros de esta molécula nos ha permitido separar su acción sobre las dianas CPT1 y FAS. Este logro permitirá avanzar en el diseño de nuevos compuestos, más específicos, para el tratamiento de diferentes patologías, como la obesidad o el cáncer.

Capítulo 5. DISCUSIÓN

- 1.** La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH produce hiperfagia
 - 2.** La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa
 - 3.** La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH altera la expresión de snoRNAs y HSPBs en el hipotálamo
 - 4.** La inhibición de CPT1 en el hipotálamo reduce el peso y la ingesta
 - 5.** Investigaciones futuras
-

La obesidad es una enfermedad con una incidencia cada vez mayor en las sociedades industrializadas. A pesar de tratarse de una patología multifactorial, el consumo masivo de alimentos calóricos y el sedentarismo son dos factores clave en su aparición. Por este motivo, entender los procesos fisiológicos y moleculares que controlan la ingesta y el gasto de energía es esencial en el desarrollo de terapias, no solo para el tratamiento, sino para la prevención de la obesidad y los trastornos asociados.

El metabolismo lipídico en el hipotálamo juega un papel fundamental en el mantenimiento del balance energético. La modulación de los enzimas que regulan la síntesis y oxidación de ácidos grasos en el hipotálamo se traduce en cambios en el consumo de alimentos, el peso corporal y el metabolismo glucídico, que se han atribuido a las variaciones en las concentraciones celulares de malonil-CoA y/o LCFA-CoA. Sin embargo, aún hoy existen dudas sobre los efectores de estas moléculas y los eventos moleculares que subyacen a estos cambios.

El presente trabajo se centra en el estudio de CPT1A en el hipotálamo, y su papel en la regulación de la ingesta. Esta isoforma se localiza en las mitocondrias y, a diferencia de CPT1C, regula la β -oxidación de ácidos grasos. Para analizar su función en la modulación del apetito realizamos dos aproximaciones diferentes, su sobre-expresión e inhibición en el hipotálamo.

Para la sobre-expresión de CPT1A, utilizamos un virus adenoasociado (AAV, *adenoassociated virus*) como vector. La obtención de estos virus por parte de nuestro grupo fue el resultado de una colaboración con la empresa holandesa AMT, especializada en el diseño de vectores para su utilización en terapia génica. El empleo de esta herramienta otorga varias ventajas. En primer lugar, los AAV permiten la expresión de una proteína exógena durante periodos largos. En segundo lugar, la respuesta inmunitaria que estos virus provocan en el organismo infectado es prácticamente nula, convirtiéndose en excelentes candidatos para la sobre-expresión de proteínas en modelos animales.

Un punto clave de este trabajo ha sido la utilización de CPT1AM, isoforma permanentemente activa e insensible a malonil-CoA de CPT1A. Esta característica permite desacoplar el eje malonil-CoA-CPT1 con el objetivo de determinar cuál es la

molécula señalizadora que, en el hipotálamo, conduce a una modulación de la ingesta. La insensibilidad de CPT1AM a su inhibidor fisiológico y su capacidad de mantener una mayor oxidación de ácidos grasos, ha sido comprobada en diferentes estudios publicados previamente por nuestro grupo (Orellana-Gavaldà, Herrero *et al.*, 2011; Morillas, Gómez-Puertas *et al.*, 2003; Herrero, Rubí *et al.*, 2005; Sebastián, Herrero *et al.*, 2007).

Por otro lado, para la inhibición de CPT1 utilizamos el compuesto C75 y sus derivados. La colaboración entre nuestro grupo y el *Grupo de Investigación en Metodología Sintética Aplicada a Productos Bioactivos* del departamento de Química Orgánica (Facultad de Química) de la Universidad de Barcelona, nos ha permitido disponer de una batería de moléculas derivadas de C75, que utilizamos con dos propósitos: en primer lugar, profundizar en la acción biológica de este compuesto centrándonos en su efecto sobre CPT1; en segundo lugar, tratar de obtener una molécula con una acción biológica más potente y/o específica, como primer paso en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados.

1. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1 EN EL VMH PRODUCE HIPERFAGIA

El hipotálamo ventromedial (VMH) ha estado considerado durante mucho tiempo como el centro de saciedad, pues las lesiones en este núcleo causan hiperfagia y obesidad en ratas (Hervey, 1959). En los últimos años se ha resaltado su acción integradora de señales en los procesos de regulación del apetito y el balance energético, destacando su papel en la modulación de la homeostasis glucídica (Kang, Routh *et al.*, 2004; Uyama, Geerts *et al.*, 2004). Por estos motivos decidimos analizar el efecto que la sobre-expresión de CPT1AM, específicamente en este núcleo, tiene sobre la ingesta y el metabolismo de la glucosa. Nuestras investigaciones se basan en la siguiente hipótesis: la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH generaría una tasa de oxidación de LCFA-CoA continua, disminuyendo la concentración de estas moléculas y desregulando, en las células infectadas, la capacidad de monitorizar la disponibilidad de ácidos grasos. De acuerdo con resultados publicados previamente (Pocai, Lam *et al.*, 2006), estos hechos alterarían la ingesta de alimentos, al menos a corto plazo, sin

embargo hasta el momento no se han reportado sus efectos a largo plazo. Para abordar esta cuestión utilizamos AAVs que permiten la expresión estable y prolongada de CPT1AM.

La sobre-expresión de esta proteína, no solo permitiría mantener una oxidación de ácidos grasos constante, sino que alteraría su concentración sin, a priori, afectar los niveles de malonil-CoA. Los niveles de este metabolito y de LCFA-CoAs están íntimamente ligados, pues los cambios del primero se traducen en una variación de los segundos. Por ello, es complicado determinar cuál de estas moléculas es la señal que comporta la modulación de la ingesta. Sin embargo, la sobre-expresión de una isoforma de CPT1A insensible a malonil-CoA permitiría disminuir los niveles celulares de LCFA-CoA independientemente de la concentración de malonil-CoA, permitiendo analizar los efectos de ambas moléculas separadamente.

Los datos obtenidos confirman que la inyección de AAV-CPT1AM produce un aumento en los niveles de mRNA, proteína y actividad CPT1 en el cerebro de los animales tratados, demostrando la funcionalidad de la herramienta utilizada en este tejido. Si bien no analizamos la tasa de β -oxidación tras la infección con los AAVs, estudios previos publicados por nuestro grupo demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en ratones provoca un aumento de la actividad enzimática y un incremento en la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Orellana-Gavaldà, Herrero *et al.*, 2011). También pudimos analizar la localización de las células infectadas tras la inyección de los virus en el VMH, gracias a la fluorescencia de la proteína utilizada como control (GFP). Si asumimos que las inyecciones se realizaron de la misma manera en los animales GFP y CPT1AM, estos resultados nos indican que la infección se limita, mayoritariamente, a la zona mediobasal del hipotálamo, concretamente al núcleo VMH.

Una vez demostrada la capacidad de nuestra herramienta para generar un aumento en la expresión de CPT1AM, estudiamos su efecto sobre la ingesta, el peso y el metabolismo glucídico en los animales tratados, durante los 5 meses posteriores a la administración de los virus.

Los resultados obtenidos demuestran que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa hiperfagia. El incremento en la ingesta de los animales tratados apareció

aproximadamente 3 semanas después de la administración de los AAVs, coincidiendo con el momento en el que estos virus alcanzan su nivel de expresión máxima (Wang, Wang *et al.*, 2003). Estos resultados están en consonancia con estudios anteriores en los que se demuestra que la estrategia contraria, la inhibición de CPT1A en el hipotálamo, causa una significativa disminución del consumo calórico (Obici, Feng *et al.*, 2003).

Sorprendentemente, a pesar de ingerir más alimentos, los animales CPT1AM no mostraron un aumento de peso respecto al grupo control. Si bien se observó una tendencia clara, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,07$). Por otro lado, la adiposidad, representada como el peso del TAB epididimal y los niveles circulantes de leptina, tampoco es mayor en los animales CPT1AM, aunque el análisis histológico del TAB sí reveló diferencias en el tamaño de los adipocitos entre ambos grupos, siendo más grandes en los animales CPT1AM. En este punto cabe hacer dos reflexiones: en primer lugar, es posible que con el tiempo las diferencias en el peso de los animales llegaran a ser significativas. En segundo lugar, existe la posibilidad que los animales CPT1AM presenten un mayor gasto energético que les lleva a consumir las calorías extra ingeridas. Sin embargo ésta hipótesis debería ser confirmada realizando un estudio metabólico más amplio.

A causa del fenotipo hiperfágico observado esperábamos encontrar un aumento en la expresión de NPY/AgRP y/o una disminución en la de POMC/CART. Curiosamente, no hallamos diferencias en la expresión de estos neuropéptidos, a pesar del aumento en la ingesta observado en los animales CPT1AM. Este dato resulta sorprendente si analizamos los resultados reportados en estudios anteriores, pues la modulación del metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo produce cambios en la ingesta acompañados de variaciones en la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos. Por ejemplo, la administración i.c.v. de ácido oléico provoca una disminución en la ingesta y la expresión de NPY en el hipotálamo (Obici, Feng *et al.*, 2002 (b)).

Si bien en los animales CPT1AM no se observan diferencias en los niveles de mRNA de estos péptidos reguladores del apetito, sí se produce un aumento significativo en la expresión del receptor Y1 del NPY (NPY1R) y el receptor de la

hormona orexigénica grelina (GHS-R). Estos resultados resultan novedosos, pues hasta el momento no se había descrito que la modulación del metabolismo lipídico en el hipotálamo alterara la expresión de estos receptores, y sugieren que los animales CPT1AM presentan mayor respuesta a NPY y grelina, explicando la hiperfagia observada. La regulación al alza del receptor NPY1R en un modelo de hiperfagia se reportó también en el año 1998, en animales sometidos a un tratamiento central con colchicina (Kalra, Dube *et al.*, 1998). Sin embargo, cómo en nuestro modelo la sobre-expresión de CPT1AM modula la expresión de estos receptores es una cuestión que aún debemos resolver.

Al analizar estos resultados, es importante tener en cuenta que las determinaciones de la expresión génica se realizaron tras someter a los animales a un ayuno de 6 horas. Puesto que los niveles de neuropéptidos, como NPY, son un indicativo del estado nutricional, su expresión y liberación varía entre las situaciones de ayuno y alimentación (Lopaschuk, Ussher, *et al.*, 2010). Por este motivo, tras la privación de alimentos los niveles de los péptidos orexigénicos son altos y los de los anorexigénicos bajos. Si en nuestro modelo, que sobre-expresa CPT1AM, la hiperfagia se debiera a un aumento moderado en la expresión de NPY/AgRP y/o una disminución en la de POMC/CART, podría resultar complejo detectar estas diferencias con el fondo propio de una situación de ayuno. Por ese motivo, resultaría muy interesante repetir estos análisis con el hipotálamo de animales alimentados.

Se ha descrito que también varios enzimas del metabolismo lipídico en el hipotálamo están regulados nutricionalmente (Dowell, Hu *et al.*, 2005; Hu, Cha *et al.*, 2003). Durante el ayuno se produce una fosforilación/activación de AMPK, la consiguiente fosforilación/inhibición de ACC y una reducción en los niveles de malonil-CoA. De igual manera, se disminuyen los niveles de mRNA y proteína FAS, específicamente en el núcleo VMH (López, Lage *et al.*, 2008). Esta reducción núcleo-específica es especialmente interesante, pues sugiere que FAS puede actuar como un sensor del estado nutricional en ciertas neuronas del hipotálamo. En nuestros experimentos observamos un aumento significativo de los niveles de mRNA de FAS en el MBH (VMH + ARC) de los animales CPT1AM respecto al control. Si bien no podemos asegurar que este aumento se traduzca en una mayor actividad enzimática, no

resultaría extraño que en una situación en la que se están oxidando ácidos grasos continuamente se indujera la expresión del enzima encargado de su síntesis, como un mecanismo compensador destinado a mantener el *pool* celular de lípidos. Al mismo tiempo, y teniendo en cuenta el papel sensor de FAS, se plantea una importante cuestión: la mayor expresión de este enzima en los animales CPT1AM podría traducirse en una actividad más alta y por tanto una disminución en la concentración de su sustrato, malonil-CoA, propuesto como importante molécula señalizadora en la regulación de la ingesta. De ser así, la sobre-expresión de CPT1AM no sólo se traduciría en una disminución de sus sustratos, LCFA-CoA, sino también de malonil-CoA, dificultando resolver la incógnita de cuál de las dos moléculas desencadena el efecto orexigénico observado. Sin embargo, resulta posible que a pesar de la activación transcripcional de FAS la concentración neta de malonil-CoA en el hipotálamo no varíe, por lo que se hace indispensable cuantificarla para extraer una conclusión válida.

El aumento en el mRNA del receptor de grelina en el hipotálamo de los animales CPT1AM se acompaña de un aumento en los niveles plasmáticos de esta hormona. Si bien se ha descrito ampliamente que el efecto de este péptido orexigénico en el hipotálamo se basa en su acción sobre el metabolismo lipídico (López, Lage *et al.*, 2008), cómo la sobre-expresión de CPT1AM causa un aumento en su síntesis y liberación es una cuestión sin resolver. Sin embargo, este aumento en los niveles plasmáticos de grelina está en consonancia con la hiperfagia observada en los animales CPT1AM. De hecho, con los datos de que disponemos podemos afirmar que estos animales comen más, sin embargo no sabemos si es porque tardan más tiempo en saciarse o porque tienen un estímulo iniciador de la ingesta más habitualmente que el grupo control. Si tenemos en cuenta que grelina es una señal hormonal muy importante en la iniciación del acto de comer, podríamos considerar el aumento observado como una señal que los animales CPT1AM tienen un impulso mayor para iniciar el consumo de alimentos. Sin embargo, deberíamos profundizar en esta cuestión investigando, entre otras cosas, el comportamiento alimenticio de los animales CPT1AM.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa hiperfagia y una tendencia al aumento de peso y la

adiposidad. Estos hechos van acompañados de un incremento en la expresión génica de FAS, NPY1R y GHS-R en el hipotálamo y de la concentración sérica de grelina-acilada.

2. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM EN EL VMH CAUSA RESISTENCIA A LA INSULINA E INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

El análisis de la concentración de insulina desveló un aumento de la misma en los animales CPT1AM respecto al control. Igualmente, se observó un incremento en la concentración de glucosa en sangre. Estos hechos demuestran la aparición de resistencia a la insulina en los animales sobre-expresando CPT1AM en el hipotálamo.

Cuando analizamos los datos obtenidos en diferentes momentos del experimento (0, 9, 19 y 23 semanas después de la inyección de los AAVs) observamos una progresión de la enfermedad hacia la resistencia a la insulina en primer lugar y la intolerancia a la glucosa y la hiperglucemia en último término. Tras 9 semanas de tratamiento se observó la aparición de hiperinsulinemia en los animales CPT1AM respecto al control. Diez semanas después de estos primeros análisis los animales CPT1AM resultaron ser intolerantes a la glucosa y, por último, 23 semanas después de la administración de los virus las medidas de glucosa en ayuno demostraron la aparición de hiperglucemia en el grupo CPT1AM.

Según estudios previamente publicados, la disponibilidad de LCFA-CoA en el hipotálamo regula la gluconeogénesis hepática (Obici, Feng *et al.*, 2002 (b); Obici, Feng *et al.*, 2003; Poci, Lam *et al.*, 2006). Se ha demostrado, que la abundancia de estos metabolitos en las neuronas genera una señal que se transmite hasta el hígado, a través del nervio vago, capaz de frenar la gluconeogénesis en ese tejido. En nuestro modelo animal, tras la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH, resultaría imposible generar esta señal de “abundancia”, en forma de niveles elevados de LCFA-CoA, lo que no solo produce hiperfagia sino también podría traducirse en un aumento de la gluconeogénesis hepática. El aumento en los niveles de mRNA de PEPCK en el hígado de los animales CPT1AM es un indicativo de una mayor actividad gluconeogénica en estos animales respecto al control. En base a estos resultados nos planteamos la siguiente hipótesis: la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH se traduce en una mayor

gluconeogénesis hepática. Esto implica la necesidad de liberar más insulina, con el propósito de mantener la glucemia en valores normales. Al prolongarse esta situación en el tiempo podría ocurrir que finalmente fallaran los sistemas destinados a compensar esta elevada gluconeogénesis generando, en primer lugar, intolerancia a la glucosa y, por último, hiperglucemia. La idea planteada resulta coherente con el fenotipo observado en nuestros animales, sin embargo son necesarios más estudios para investigar diferentes cuestiones: en primer lugar, deberíamos analizar la contribución de otros tejidos, y no solo el hígado, a este fenotipo. Realizando un clamp hiperinsulinémico-euglicémico podríamos investigar, no solo los flujos de glucosa hepáticos, sino también la captación de este sustrato por otros tejidos en los animales CPT1AM. Por otro lado, resultaría muy interesante explorar el eje hipotálamo-páncreas (Helman A, Marre M *et al.*, 1982; Thorens B, 2010) en estos animales, para tratar de entender cómo la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH afecta al metabolismo de la célula- β pancreática, encargada de la síntesis y secreción de insulina.

Por otro lado, cabe la posibilidad que la desregulación en el metabolismo glucídico se deba, al menos en parte, a la mayor ingesta calórica observada en el grupo CPT1AM. Realizando experimentos de *pair-fed*, en los que los animales CPT1AM recibirían una cantidad de comida equivalente a la ingerida por el grupo control, podríamos diseccionar qué efectos son debidos a la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH y cuáles lo son a la hiperfagia derivada de este hecho.

En resumen, los datos obtenidos demuestran por primera vez que la sobre-expresión, a nivel central, de CPT1AM tiene efectos sistémicos que se traducen en la aparición de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

3. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM EN EL VMH ALTERA LA EXPRESIÓN DE snoRNAs Y HSPBs EN EL HIPOTÁLAMO

Los resultados obtenidos con el chip de DNA nos permitieron tener una visión general del perfil génico originado en el hipotálamo tras la sobre-expresión de CPT1AM. De entre todos los transcritos diferencialmente expresados destacan los correspondientes a snoRNA (*small nucleolar RNA*) (expresión *up*-regulada en animales CPT1AM) y proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*) (expresión *down*-

regulada en animales CPT1AM). Estos datos resultan novedosos, aunque lo cierto es que poco se sabe de la relación entre éstas moléculas y la modulación del balance energético. Sin embargo, las importantes funciones reguladoras que desempeñan unos y otras acentúan la importancia de estos resultados.

Los snoRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificante que normalmente residen en los intrones de genes huésped y sólo en algunos casos se encuentran bajo el control de promotores independientes (Scott y Ono, 2011). Se ha descrito que estos RNAs presentan, esencialmente, funciones reguladoras entre las que destacan la biogénesis ribosomal, la modificación química de otros RNAs (rRNA, snRNA, tRNA), el *splicing* alternativo de mRNAs y en algunos casos actúan como miRNA (**Figura 1**). Estos últimos, a su vez, regulan la traducción del mRNA de diferentes maneras: inhiben la función ribosomal, desestructuran la capucha del extremo 5' de los mRNA, pueden causar la desadenilación de la cola de poli-A o degradar los mRNA diana (Galasso, Sana *et al.*, 2010).

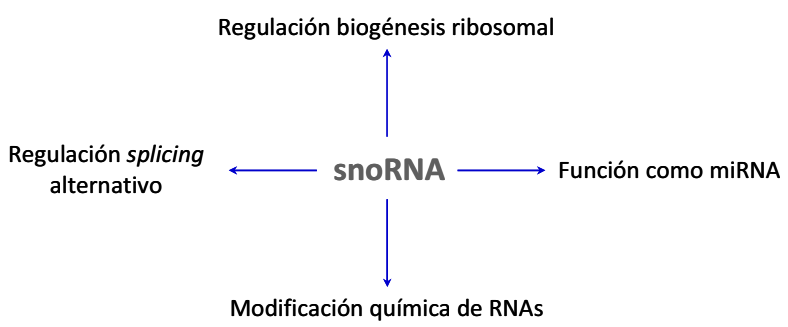


Figura 1. Funciones de los snoRNA.

Debido a la cantidad de funciones que realizan los snoRNAs, las implicaciones fisiológicas del aumento en su expresión son difíciles de establecer. En los animales CPT1AM encontramos *up*-regulados los snoRNAs SNORD113, SNORD115 y SNORD116. Para empezar, aún no se conocen todas las dianas de estos tres snoRNA, sin embargo, en humanos, la inactivación o delección de la zona cromosómica situada en 15q11.2, que codifica para los snoRNAs SNORD115 y SNONRD116 (designada como PWCR, *Prader-Willi chromosome*), se asocia a la enfermedad de Prader-Willi (PW). Esta enfermedad se caracteriza por la hiperfagia y severa obesidad que presentan los

pacientes afectados. Asimismo, la delección de SNORD116 en ratones también causa hiperfagia, revelando un nuevo rol para un RNA no codificante en la regulación de la homeostasis energética (Ding, Li *et al.*, 2008; Galasso, Sana *et al.*, 2010).

Concretamente, se ha descrito que SNORD115 regula el *splicing* alternativo de diferentes genes. Entre ellos cabe destacar el receptor 2C de serotonina (5-HT_{2C}R), que sufre un procesamiento alternativo a raíz de la interacción de SNORD115 con el exón Vb del mRNA de 5-HT_{2C}R (Kishore y Stamm, 2006). A raíz de esta interacción se generan transcritos que incluyen el exón Vb del receptor de serotonina. Este exón codifica para el segundo bucle intracelular del receptor, crucial para la unión de la proteína G acoplada y la correcta funcionalidad del mismo. La pérdida de SNORD115 promueve la maduración de un mRNA carente de Vb y codificante para un receptor con una eficacia entre 10 y 100 veces menor que el codificado por la forma no editada. En los pacientes PW este defecto en el sistema serotoninérgico explicaría muchos de los síntomas, entre ellos la hiperfagia severa asociada a la obesidad, pues la unión de serotonina al receptor 5-HT_{2C}R promueve la disminución de la ingesta y produce una señal de saciedad.

En nuestro modelo, la expresión de SNORD115 y SNORD116 se encuentra aumentada en los animales CPT1AM por lo que la hiperfagia observada no se debería a una menor eficacia del receptor 5-HT_{2C}R. De hecho, las consecuencias fisiológicas de este aumento en la expresión de los snoRNAs no están claras y, puesto que estas moléculas podrían regular el *splicing* de muchos otros transcritos desconocidos no podemos establecer la relación entre el aumento en su expresión y el fenotipo observado. Por este motivo, resultarían muy interesantes los estudios a nivel molecular con el objetivo de identificar nuevas dianas de los snoRNAs. Tal vez con la información obtenida podríamos descifrar la cascada de eventos moleculares que se derivan de la sobre-expresión de CPT1AM en el hipotálamo y que llevan a aumentar la ingesta y la aparición de resistencia a insulina.

Otros transcritos diferencialmente expresados (*down-regulados*) en los animales CPT1AM son los correspondientes a las proteínas de choque térmico HSPB1 y B8. La familia de las HSP se divide en distintos grupos con funciones específicas, sin embargo, tradicionalmente a estas proteínas con actividad chaperona se les otorga un

papel en la respuesta de las células al estrés. Concretamente en el SNC se les atribuyen funciones neuroprotectoras (Stetler, Gan *et al.*, 2010).

Las HSPB, o HSP pequeñas, se describieron recientemente y por tanto no existe tanta información como sobre otros miembros de la familia. Sin embargo se ha descrito que HSPB1 y B8 se expresan en cerebro, concretamente en astrocitos y otras células gliales (Stetler, Gan *et al.*, 2010; Wilhelmus, Otte-Holler *et al.*, 2006). Su expresión neuronal es limitada y se restringe a neuronas motoras y sensitivas del tronco del encéfalo y cerebelo (Plumier, Hopkins *et al.*, 1997; Chen y Brown, 2007).

El patrón de expresión de HSPB1 y B8 en células gliales nos llevó a plantearnos la siguiente cuestión: a pesar de que el serotipo de virus utilizado (serotipo 1) infecta más eficientemente neuronas que otros tipos celulares, se ha observado que también son capaces de infectar astrocitos y demás células gliales (Wang, Wang *et al.*, 2003). Por otro lado, las determinaciones de expresión génica se realizaron a partir de muestras de hipotálamo, conteniendo tanto neuronas como células de la glia. Por todo ello, no podemos saber si la disminución de HSPB1 y B8 observada en nuestros experimentos se produce en astrocitos, neuronas o en los dos tipos celulares. De igual manera no podemos asegurar que esta *down*-regulación se haya producido en las mismas células que sobre-expresan CPT1AM. Es decir, podría ocurrir que el aumento de CPT1AM en neuronas se tradujera en una disminución de la expresión de HSP en astrocitos y viceversa. Esta idea no resulta insólita si nos basamos en la estrecha relación que existe entre estos dos tipos celulares. La vinculación entre ambos es crucial para la función neuronal e incluso recientemente se les ha otorgado gran notoriedad a los astrocitos en la regulación hipotalámica del metabolismo glucídico (Chari, Yang *et al.*, 2011; Lam, Gutierrez-Juarez *et al.*, 2005). En esta misma línea, un trabajo publicado en el año 2001 demuestra que la inhibición de la ingesta producida por FGF-1 (factor de crecimiento de fibroblastos, *fibroblast growth factor-1*) se acompaña de una inducción de la expresión de HSPB1 de manera selectiva en los astrocitos del hipotálamo (Suzuki, Li *et al.*, 2001). En este trabajo, los autores sugieren que algunos supresores del apetito (como FGF-1) regulan la función de los astrocitos para suprimir la ingesta mientras que otros (como leptina) no utilizan este mecanismo. Para hacer esta afirmación se basan en la inducción selectiva de HSPB1 en los

astrocitos de los animales tratados con el péptido FGF-1, sin embargo puntualizan que los mecanismos por los que esta chaperona regula la ingesta son desconocidos. A pesar de que no se aporta ninguna evidencia experimental, los autores sugieren que HSPB1 podría actuar modulando la actividad de neuronas diana. Así pues, si la actividad de estas chaperonas en los astrocitos pudiera regular la actividad neuronal podríamos suponer que esto sucede también en nuestro modelo.

En el contexto celular la actividad chaperona de estas proteínas tiene implicaciones diversas. Por un lado las HSPB se han asociado a la regulación de la autofagia, que se define como la degradación controlada de proteínas u orgánulos subcelulares (Majeski y Dice, 2004). También juegan un papel crucial en la agregación/desagregación de proteínas, modulando el dinamismo de los filamentos de actina y por tanto la motilidad celular (Lavoie, Hickey *et al.*, 1993; Outeiro, Klucken *et al.*, 2006). Asimismo, se ha descrito que estas proteínas están presentes en algunas regiones sinápticas, sugiriendo la posibilidad de que tengan un papel en este proceso (Bechtold y Brown, 2000). Se han localizado en los núcleos de neuronas (Bryantsev, Chechenova *et al.*, 2007) donde se les ha atribuido la función de co-activar la transcripción (Friedman, Li *et al.*, 2009). Igualmente, se ha propuesto que también actúan como moduladoras de distintas cascadas de señalización, ya que forman parte de muchos complejos proteicos asociados a las mismas (Stetler, Cao *et al.*, 2008) (Figura 2).

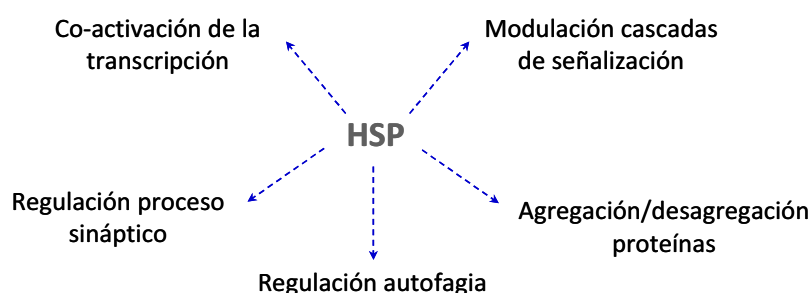


Figura 2. Funciones celulares moduladas por HSP.

A pesar de conocer algunas de sus funciones, no sabemos cómo HSPB1/B8 intervienen en la regulación del apetito. En nuestro modelo, resultaría crucial analizar en primer lugar la localización de la propia CPT1AM, con el objetivo de determinar si

ésta proteína y las HSP co-localizan en las mismas células para analizar la relación entre ambas.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la sobre-expresión de CPT1AM en el VMH produce hiperfagia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en ratas. Este fenotipo se acompaña de la sobre-expresión, en el hipotálamo, de FAS y los receptores NPY1R y GHS-R y, en el hígado, de PEPCCK y ACC1. Asimismo, en el hipotálamo se observa una inducción en la expresión de los snoRNAs SNORD113, 115 y 116, pequeñas moléculas de RNA con capacidad de regular diferentes procesos celulares, entre ellos el *splicing* alternativo de varios mRNA diana. Por otro lado, la sobre-expresión de CPT1AM también causa disminución en la expresión de HSPB1/B8, proteínas con actividad chaperona expresadas en astrocitos que podrían actuar modulando la actividad de neuronas diana. La caracterización molecular de los eventos que conectan una mayor oxidación de ácidos grasos con los fenómenos descritos deberá abordarse en investigaciones futuras.

4. LA INHIBICIÓN DE CPT1 EN EL HIPOTÁLAMO REDUCE LA INGESTA Y EL PESO

Las terapias clásicas para el tratamiento de la obesidad se basan en la implantación de una dieta hipocalórica y la realización de ejercicio físico. Sin embargo, la experiencia clínica demuestra que en un número significativo de pacientes estas medidas no resultan exitosas, generando la necesidad de su complementación con tratamientos farmacológicos.

Los fármacos destinados a reducir el peso actúan, principalmente, disminuyendo la ingesta (sibutramina, comercializado como *Reductil*®), aumentando el gasto energético (sibutramina) o reduciendo la absorción de nutrientes (orlistat, comercializado como *Xenical*®). A lo largo de la historia se han utilizado variedad de moléculas sin bien la gran mayoría han fallado en su propósito a causa de los indeseables efectos secundarios asociados al tratamiento. De hecho, en el año 2010 la FDA (*Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea del Medicamento ordenaron suspender la comercialización de sibutramina. A pesar de sus acciones beneficiosas, los pocos fármacos que están disponibles hoy día no han conseguido solucionar el

problema de la obesidad. Todo ello hace necesaria la investigación en este campo, y el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de esta patología.

En los últimos años se ha propuesto que CPT1 podría ser una buena diana para los compuestos destinados a suprimir el apetito pues varios estudios demuestran que la inhibición de este enzima en el hipotálamo, y el consiguiente acúmulo de LCFA-CoA, causa anorexia en roedores (Obici, Feng *et al.*, 2003; Poci, Lam *et al.*, 2006). Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que su sobre-expresión en el VMH causa hiperfagia y aumento de peso. Todo ello convierte a los inhibidores de CPT1 en buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos anti-obesidad.

C75 es un potente reductor del peso y la ingesta y, por tanto, un buen candidato para el tratamiento de la obesidad. El aumento de malonil-CoA, debido a la presumible inhibición de FAS, observado tras la administración de este compuesto explicaría su efecto anorexigénico (Loftus, Jaworsky *et al.*, 2000). Sin embargo los estudios publicados por Rorbach y colaboradores demuestran que existe una desconexión entre la inhibición de FAS en el hipotálamo y la supresión del apetito causada por C75 (Rohrbach, Han *et al.*, 2005). Otros autores proponen que este compuesto es, además de inhibidor de FAS, activador de CPT1 y que es precisamente la activación de este enzima la causa de su efecto anorexigénico y reductor del peso (Thupari, Landree *et al.*, 2002; Aja, Landree *et al.*, 2008). Estos hechos generaron una controversia sobre la actividad de C75 y nos instaron a profundizar en el estudio de su acción biológica, especialmente sobre CPT1.

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo demostraron que C75, una vez activado a C75-CoA, es un inhibidor de CPT1 tanto *in vitro* como *in vivo* (Bentebibel, Sebastian *et al.*, 2006). De igual manera, otros conocidos inhibidores de CPT1, como etomoxir o TDGA, también deben ser activados a sus derivados -CoA antes de ejercer su acción farmacológica. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo confirmamos que C75-CoA es un potente inhibidor de CPT1 y demostramos que, en su forma no conjugada, no tiene ningún efecto sobre dicha actividad enzimática. Estos datos están en contradicción con estudios publicados anteriormente que presentan a C75 como un activador de CPT1. El incremento en la actividad podría deberse al aumento en la expresión del enzima en hígado y músculo observado tras la

administración de C75 (Cha, Hu *et al.*, 2005; Tu, Thupari *et al.*, 2005), sin embargo varios estudios sugieren que la activación en la β -oxidación se debe al efecto directo de este compuesto estimulando CPT1 (Nicot, Napal *et al.*, 2004; Yang, Kays *et al.*, 2005). Hasta el momento, esta disparidad no ha sido resuelta. Por otro lado, hay que tener en cuenta que diferencias en el protocolo de análisis de la actividad CPT1 podrían conducir a resultados diversos.

Nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo* se ven reforzados por los datos obtenidos *in silico*. En colaboración con el *Grupo de Modelado Molecular* del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, generamos un modelo bioinformático del centro activo de la proteína CPT1A de rata, como parte del trabajo de esta Tesis. Toda la información sobre los métodos utilizados se detalla en (Mera, Bentebibel *et al.*, 2009). Utilizando este modelo se llevaron a cabo estudios de *docking* computacional en los que se analizó cómo sería la unión entre C75-CoA y CPT1A. Estos estudios sugieren que el inhibidor se colocaría en el centro activo del enzima bloqueando los sitios de unión de los sustratos palmitoil-CoA y carnitina. La cadena alifática de C75 se posicionaría en el bolsillo del enzima destinado a la unión de palmitoil-CoA y el grupo carboxilo lo haría, de manera similar a malonil-CoA, en el lugar destinado al sustrato carnitina (**Figura 3**) (Mera, Bentebibel *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes, analizamos si la activación de C75 a C75-CoA sucedía también *in vivo*. Los resultados obtenidos demuestran que, tras la administración central de C75, se forma C75-CoA y se inhibe la actividad CPT1 en el hipotálamo. Este hecho propone un nuevo mecanismo de acción para este compuesto basado en su acción inhibitoria sobre CPT1. La inhibición de CPT1 por C75-CoA no influiría en la inhibición de FAS causada por C75 en su forma no conjugada. Por ello, hipotetizamos que, a nivel central, C75 inhibiría CPT1 de manera directa e indirecta, por acumulación de malonil-CoA, causando así un aumento en los niveles de LCFA-CoA y una disminución del apetito. No obstante, la inhibición de CPT1 observada en nuestros experimentos tras la administración i.c.v. de C75 se debe exclusivamente a C75-CoA. Puesto que malonil-CoA es un inhibidor reversible de CPT1, no se mantiene unido al enzima durante el procesamiento del hipotálamo para la obtención de la muestra utilizada para los análisis de actividad enzimática. Sin embargo, C75-CoA es un

inhibidor fuerte que requiere más de 44 horas de diálisis para separarse del enzima y se mantiene unido al mismo a pesar del protocolo experimental utilizado. Este hecho permite asegurar que la inhibición de CPT1 observada tras la administración i.c.v. de C75 se debe únicamente a C75-CoA y no es un efecto indirecto por acumulación de malonil-CoA.

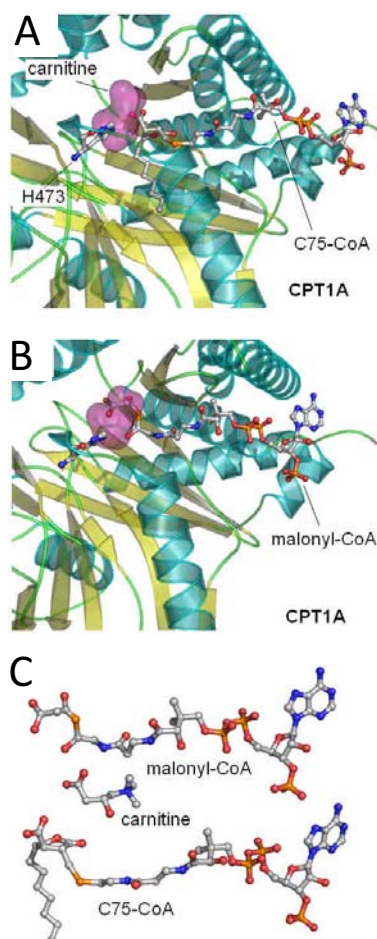


Figura 3. Docking in silico de C75-CoA y malonil-CoA en el modelo 3-D del centro activo de CPT1A de rata. Modelo propuesto para la colocación de una molécula de C75-CoA (A) y malonil-coA (B) en el centro activo de CPT1A. Se indican las posiciones del sustrato carnitina y el residuo catalítico His473. En el panel (A) se observa como el ácido carboxílico de C75-CoA llena parcialmente el volumen correspondiente al sustrato carnitina, de manera similar a como lo hace el inhibidor fisiológico de CPT1, malonil-CoA (B). (C) Estructura de los inhibidores malonil-CoA y C75-CoA y del sustrato carnitina. (Mera, Bentebibel *et al.*, 2009)

Los estudios de RMN permitieron analizar la estructura química de C75-CoA y determinar qué grupos funcionales son necesarios para la formación del aducto. Los resultados obtenidos demostraron que éste se forma por la reacción del grupo sulfhidrido del CoA-SH con el grupo metileno ($=CH_2$) de C75. Para analizar el impacto

que la pérdida del mismo tiene sobre la actividad anorexigénica de C75 y su efecto sobre CPT1, se sintetizaron tres derivados de este compuesto sin grupo metileno (MLC, *methylene lacking-C75*). De manera previa a los estudios biológicos, se comprobó la incapacidad de los MLCs en formar el aducto unido a coenzima A. Los resultados presentados demuestran que los MLCs son incapaces de inhibir el peso, la ingesta y la actividad CPT1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Únicamente MLC-1 causa una pequeña disminución de la ingesta 22 después del tratamiento, sin embargo esta disminución no se mantiene los días posteriores ni se traduce en una reducción del peso. Curiosamente, MLC-1 causa un incremento en los niveles de malonil-CoA, similar al causado por C75, una hora después del tratamiento i.c.v. Por el contrario, este aumento no se observa con el compuesto MLC-2. Estos datos sugieren que MLC-1 causaría un aumento de malonil-CoA a corto plazo que se traduciría en una reducción de la ingesta. Sin embargo, cabe resaltar que esta disminución es menor que la causada por C75, sugiriendo que la inhibición de CPT1 sería necesaria para producir la potente respuesta anorexigénica de este compuesto. Sorprendentemente, resultados obtenidos por nuestro grupo demuestran que, *in vitro*, ninguno de los tres MLCs inhibe la actividad del enzima FAS purificado (Trabajo de Máster de Macarena Pozo Ariza). Estos hechos indican que el aumento de malonil-CoA observado en el hipotálamo tras la administración i.c.v. de MLC-1 podría deberse a un efecto indirecto y no a la inhibición de FAS, si bien para solucionar esta cuestión deberíamos examinar la actividad de este enzima en el hipotálamo tras el tratamiento con MLCs.

Tratando de profundizar en los requerimientos estructurales que convierten a C75 en un supresor del apetito, analizamos la acción biológica del isómero *cis* de este compuesto (*C75-cis*). Cuando, en el año 2000, se publicó la síntesis de esta butirrolactona los autores se centraron en el estudio del isómero *trans* de la molécula. Uno de los motivos principales resultó ser la insolubilidad de *C75-cis* en medio acuoso. No obstante, inicialmente estudiaron el efecto de la mezcla racémica de ambos estereoisómeros sobre las células tumorales SKBr3. Sorprendentemente, descubrieron que esta mezcla presentaba una citotoxicidad menor que el isómero *trans* purificado (Kuhajda, Pizer *et al.*, 2000). Todos los trabajos publicados desde entonces se centraron en el estudio de dicho isómero, conociéndose muy poco sobre la actividad

de C75-*cis*. Como era de esperar, los resultados obtenidos durante el presente trabajo revelan que éste no presenta la capacidad de inhibir ni la ingesta, ni el peso, ni la actividad CPT1 hipotalámica de los animales tratados. Asombrosamente, su derivado -CoA es capaz de inhibir la actividad CPT1A *in vitro*. Estos resultados sugerían que, posiblemente, en el hipotálamo no se produjera, o lo hiciera en menor medida, el aducto C75-*cis*-CoA. Para aclarar esta cuestión analizamos su presencia en el hipotálamo de ratas inyectadas i.c.v. con C75-*cis*. Los resultados obtenidos confirmaron la ausencia de C75-*cis*-CoA en los animales tratados, justificando la falta de inhibición de CPT1. Una posible explicación a este fenómeno se basa en la mayor inestabilidad química de C75-*cis* con respecto al isómero *trans*. Durante la síntesis de este compuesto, miembros de nuestro grupo detectaron que la isomerización del enlace exocíclico de C75 a enlace endocíclico (termodinámicamente más estable) se producía más frecuentemente en el isómero *cis* que en el *trans*. Este fenómeno imposibilitaría la formación del aducto -CoA y, de suceder *in vivo*, explicaría los resultados logrados tras la administración de C75-*cis* en el hipotálamo.

A raíz de los datos obtenidos decidimos proseguir nuestros estudios con el isómero *trans* de C75. El siguiente objetivo consistió en la obtención, por separado, de los dos enantiómeros del compuesto y el estudio de sus acciones biológicas. Es un hecho ampliamente conocido que habitualmente los enantiómeros de una molécula presentan propiedades y actividades farmacológicas muy diversas. Por ello, resulta imprescindible el análisis de este fenómeno como primer paso en el diseño de moléculas con un potencial uso terapéutico. En el caso de C75, hasta el momento no se había descrito la síntesis ni la función de sus enantiómeros por separado, si bien recientemente se publicó un trabajo en el que se separaron ambas moléculas a partir de una mezcla racémica (Chakrabarty, Forzato *et al.*, 2010). Como parte de la colaboración entre nuestro grupo y el grupo dirigido por el Dr. Jordi García en el Departamento de Química Orgánica, se sintetizaron por primera vez los dos enantiómeros de C75 separadamente y se procedió a analizar su efecto sobre la actividad CPT1, el peso y la ingesta.

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que únicamente (+)-C75-CoA es inhibidor del enzima, con una IC₅₀ similar a la de la mezcla racémica de ambos

enantiómeros ((±)-C75-CoA). Asimismo, (+)-C75 es inhibidor de la actividad CPT1 hipotalámica, confirmando los resultados obtenidos *in vitro*. Interesantemente, este compuesto presenta una potente acción anorexigénica cuando es administrado a nivel central, mientras que la administración de (-)-C75 no genera esta respuesta. El hecho que (-)-C75 no inhiba CPT1, ni cause una reducción del apetito y el peso tras su administración i.c.v., aporta nuevas evidencias de la importancia de la inhibición de CPT1 en la acción central de C75. Es importante resaltar que, resultados obtenidos por otros miembros de nuestro grupo demuestran que ninguno de los enantiómeros inhibe la actividad FAS en el hipotálamo, por lo menos a la dosis estudiada. Curiosamente, a esta misma dosis (+)-C75 sí causa una reducción del apetito, sugiriendo que existe una desconexión entre la inhibición de FAS y la disminución de la ingesta producida por la administración central de este compuesto. Este hecho aporta una importante novedad y cuestiona los estudios publicados hasta el momento, en los que el efecto anorexigénico de C75 se atribuía a su acción central sobre FAS. Cabe mencionar, que en todos los estudios publicados se analizaron las concentraciones de malonil-CoA en el hipotálamo como un indicativo de la actividad FAS, sin embargo ésta es una medida indirecta de la misma y, dado que otros enzimas regulan la disponibilidad de malonil-CoA en el hipotálamo, cambios en sus niveles no pueden ser atribuidos exclusivamente a la actividad FAS.

A pesar de los datos obtenidos *in vivo*, en los que ninguno de los enantiómeros de C75 inhibe la actividad FAS, estudios llevados a cabo en nuestro grupo demuestran que, *in vitro*, (-)-C75 sí inhibe el enzima con una IC₅₀ similar a la de la mezcla racémica. Sin embargo, la inhibición de FAS causada por (+)-C75 es significativamente menor, demostrando así la separación de acciones biológicas que se deriva de la síntesis de los enantiómeros por separado. Así pues, (+)-C75 es inhibidor de CPT1 y su acción central causa una reducción del peso y la ingesta mientras que (-)-C75 es inhibidor de FAS, lo que le aporta una capacidad potencial de causar citotoxicidad en determinadas líneas tumorales. La posible utilización de (-)-C75 en terapia antitumoral generaría una clara ventaja respecto a la utilización de la mezcla racémica. Se trata de la pérdida de su capacidad anorexigénica, que hasta el momento se perfilaba como un claro efecto adverso en la utilización de C75 para el tratamiento del cáncer.

Como ya se ha comentado, tras la inyección central de (-)-C75 no se reduce la ingesta ni el peso, sin embargo no conocíamos el efecto de la administración periférica de este compuesto. Por ello realizamos un análisis a medio plazo para investigar esta cuestión. Estudios publicados con anterioridad demostraron que los ratones obesos y delgados responden de manera diferente a la administración crónica de C75, pues los segundos generan tolerancia al compuesto tras un día de tratamiento, mientras que los animales obesos empiezan a mostrar una cierta resistencia a medida que van perdiendo adiposidad (Kumar, Shimokawa *et al.*, 2002). Para nuestros experimentos elegimos ratones delgados con el objetivo de analizar el impacto que el tratamiento prolongado con los enantiómeros de C75 tiene sobre el peso y la ingesta, y de esta manera averiguar si las diferencias observadas a nivel central se mantenían tras una administración periférica y repetida en el tiempo. Curiosamente, los resultados obtenidos revelaron que ambos enantiómeros producen una pérdida de peso en los animales tratados. Si bien la disminución en el peso causada por (+)-C75 es significativamente mayor que con (-)-C75, éste tiene un impacto considerable sobre la masa corporal de los ratones, a diferencia de lo ocurrido tras su administración i.c.v. Estos resultados sugieren que, a nivel periférico, ambos enantiómeros tiene una acción inespecífica que se traduce en el adelgazamiento en mayor o menor proporción. A pesar de no conocer la causa molecular de este efecto, podríamos especular que, en cierta medida, se debe a una pérdida de agua, pues la observación nos indicó que los animales tratados con C75 presentan unas heces más blandas y abundantes que los animales control. Sin embargo, serían necesarios nuevos estudios en esta dirección para entender la acción de C75 y sus enantiómeros a nivel periférico.

Todos estos resultados nos permiten concluir que la síntesis por separado de los enantiómeros de C75 se traduce en una separación de sus acciones biológicas. De esta manera, no solo ganamos especificidad en los futuros tratamientos con C75, sino que confirmamos que la acción central anorexigénica de este compuesto se basa en la inhibición del enzima CPT1.

Una vez demostrada la importancia de inhibir CPT1 en el hipotálamo para causar una disminución de la ingesta, ésta se convierte en una buena diana para la acción de fármacos destinados a reducir el apetito y el peso. Con este propósito

procedimos a sintetizar nuevas moléculas tratando de obtener compuestos con la capacidad de inhibir CPT1 de manera más potente o específica que el propio C75. Durante el presente trabajo, todas las modificaciones realizadas se basan en la sustitución del ácido carboxílico de C75 por otros grupos funcionales. A pesar de conocer la incapacidad que (-)-C75 tiene para inhibir la ingesta, todos los derivados obtenidos se componen de una mezcla racémica de sus dos enantiómeros. El análisis de la acción de esta mezcla resulta una buena estrategia inicial, dada la dificultad técnica de obtener ambos enantiómeros por separado.

Basándonos en la predicción bioinformática de la colocación de C75-CoA en el centro activo de CPT1A (**Figura 3**), decidimos hacer dos modificaciones destinadas a incrementar la especificidad del inhibidor por el enzima. En primer lugar sustituimos el ácido carboxílico por un ácido malónico, con la intención de imitar la unión de malonil-CoA, inhibidor fisiológico del enzima, en el centro catalítico de CPT1. El compuesto, denominado UB-001, causó una reducción de la actividad CPT1A *in vitro* inferior a la producida por su antecesor y no disminuyó ni el peso ni la ingesta de los animales tras su administración i.c.v. Probablemente, esta molécula presente una estructura tridimensional que le dificulte acceder al centro activo de CPT1. De igual manera, el compuesto KM081 contiene un grupo carnitina, mucho más voluminoso, en lugar de =COOH. La incapacidad de inhibir CPT1 de este compuesto podría deberse también a su estructura tridimensional, que le imposibilita entrar y colocarse en el centro activo tal y como lo hace C75. Basándonos en estos resultados, y marcándonos como objetivo encontrar un inhibidor del enzima mejorado, decidimos realizar los ensayos *in vivo* únicamente con los derivados capaces de inhibir CPT1A *in vitro*.

A pesar de los resultados negativos obtenidos con estos derivados de C75, los datos presentados aportan nueva y valiosa información sobre los requerimientos estructurales necesarios para inhibir CPT1, que nos resultará de gran utilidad en la síntesis de nuevas moléculas.

Tomados en conjunto, los resultados presentados en la segunda parte de este trabajo demuestran que la inhibición de CPT1 se traduce en una disminución de la ingesta y aportan nuevas evidencias sobre el mecanismo de acción central de C75. Asimismo, evidencian cuáles son los requerimientos estructurales que hacen de este

compuesto un buen supresor de la ingesta aportando información para la futura síntesis de derivados, como primer paso en el diseño de fármacos para el tratamiento de la obesidad.

5. INVESTIGACIONES FUTURAS

Si analizamos todos los resultados obtenidos en este trabajo de manera global podemos concluir que CPT1A y los LCFA-CoA en el hipotálamo regulan la ingesta, el peso y el metabolismo de la glucosa. Mientras la activación de este enzima produce hiperfagia, su inhibición causa una pérdida del apetito y una disminución del peso, convirtiéndolo en una buena diana para el tratamiento de las enfermedades que cursen con un aumento de peso y una desregulación del metabolismo de la glucosa (**Figura 4**).

A pesar del trabajo realizado y los interesantes resultados obtenidos serían necesarias nuevas investigaciones con el objetivo de solucionar todas las incógnitas planteadas durante la discusión de los resultados. Las principales cuestiones a resolver son: 1) analizar los niveles de malonil-CoA en el hipotálamo de los animales CPT1AM. El objetivo de nuestro trabajo era disminuir los niveles de LCFA-CoAs en el VMH sin afectar los de malonil-CoA y de esta manera demostrar que las concentraciones de estos ácidos grasos *per se* son una señal moduladora de la ingesta; 2) tratar de establecer el nexo entre la modulación de los niveles de LCFA-CoAs y la síntesis de neuropéptidos y neuromoduladores encargados de regular el apetito; 3) analizar la contribución de otros tejidos a la resistencia a la insulina acontecida en los animales CPT1AM y estudiar el metabolismo energético en los mismos; 4) investigar el papel de los snoRNAs y las HSPBs en la regulación de la ingesta y el balance energético y su relación con CPT1 y el metabolismo lipídico en el hipotálamo.

Por otro lado, los trabajos realizados con C75 resultan esperanzadores en cuanto a la síntesis de nuevos compuestos se refiere. La separación de ambos enantiómeros permitirá obtener moléculas mucho más específicas para el tratamiento de, no solo la obesidad, sino también el cáncer.

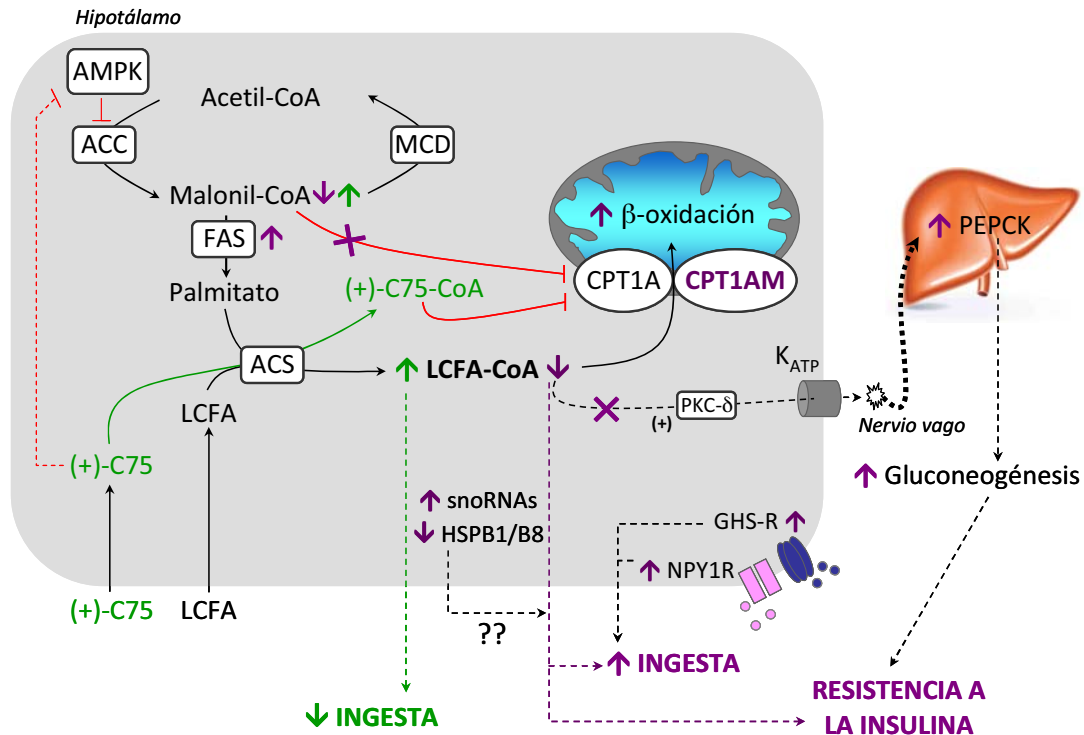


Figura 4. Modelo del papel de CPT1A hipotalámica en el control de la ingesta y el metabolismo glucídico. La inhibición de CPT1A en el hipotálamo produce una disminución de la ingesta mientras que la sobre-expresión causa un aumento del consumo de alimentos y la aparición de resistencia a la insulina. El compuesto C75 se transforma en C75-CoA en el hipotálamo, donde inhibe la actividad CPT1. Se ha descrito que C75, en su forma libre, inhibe FAS e, indirectamente, AMPK, causando el acúmulo de malonil-CoA, inhibidor fisiológico de CPT1. La sobre-expresión de CPT1AM, isoforma permanente activa del enzima, en el VMH causa un aumento en los niveles de mRNA de NPY1R y GHS-R, sugiriendo una mayor respuesta al neuropéptido orexigénico NPY y a la hormona grelina y explicando, en parte, la hiperfagia observada. También causa un aumento en los niveles de mRNA de HSPB1 y B8 y en los niveles de los snoRNAs SNORD113, 115 y 116. Estas moléculas con funciones reguladoras podrían modular la ingesta y el metabolismo glucídico, sin embargo los mecanismos moleculares subyacentes son desconocidos. La sobre-expresión de CPT1AM en el VMH causa un aumento en los niveles de mRNA de PEPCK en el hígado, sugiriendo un aumento en la producción de glucosa hepática. Este hecho podría contribuir al fenotipo insulino-resistente que se deriva de la expresión de CPT1AM en el hipotálamo. **AMPK:** proteína quinasa activada por AMP; **ACC:** acetil-CoA carboxilasa; **MCD:** malonil-CoA decarboxilasa; **FAS:** ácido graso sintasa; **LCFA-CoA:** aciles-CoA de cadena larga; **NPY1R:** receptor Y1 del NPY; **GHS-R:** receptor de grelina; **PKC-δ:** proteína quinasa C, isoforma δ; **K_{ATP}:** canal de potasio dependiente de ATP; **PEPCK:** fosfoenol piruvato carboxiquinasa; **snoRNAs:** *small nucleolar RNAs*; **HSPB:** proteína de choque térmico, familia B.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo aportan nuevos datos sobre el papel del metabolismo lipídico en el hipotálamo y la regulación de la ingesta y permiten iniciar nuevas líneas de investigación destinadas a profundizar en las causas moleculares de la saciedad y el apetito. Por otro lado, proponen un nuevo mecanismo de acción para un conocido compuesto anorexigénico, aportando al mismo tiempo información útil para la futura síntesis de moléculas con un potencial uso terapéutico.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

SOBRE-EXPRESIÓN DE CPT1AM MEDIANTE VIRUS ADENOSOCIADOS

1. La administración central de virus adenoasociados capaces de sobre-expresar la proteína CPT1AM de rata (isoforma insensible a malonil-CoA), nos ha permitido aumentar los niveles de mRNA ($113 \pm 59,8$ veces), proteína (2 veces) y actividad CPT1 ($2,8 \pm 0,9$ veces) en cerebro. La utilización de esta herramienta ha posibilitado mantener una expresión estable de CPT1AM durante 23 semanas.
2. La sobre-expresión de CPT1AM, específicamente en el VMH, produce hiperfagia y una tendencia hacia el aumento del peso y la adiposidad en los animales tratados, que muestran un TAB con adipocitos de mayor tamaño que los animales control.
3. La sobre-expresión a largo plazo de CPT1AM en el VMH produce, inicialmente, resistencia a la insulina y, en un estado posterior, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia.
4. Los animales que sobre-expresan CPT1AM en el VMH presentan unos niveles mayores del mRNA de genes relacionados con la regulación de la ingesta (FAS, NPY1R, GHS-R) en el hipotálamo y genes gluconeogénicos (PEPCK) en el hígado.
5. Los animales que sobre-expresan CPT1AM en el VMH presentan niveles mayores de snoRNAs, pequeñas moléculas de RNA no codificante con funciones reguladoras. Asimismo, presentan una expresión *down*-regulada de las chaperonas HSPB1 y HSPB8 en el hipotálamo.

INHIBICIÓN DE CPT1A POR C75 Y SUS DERIVADOS

6. C75 se convierte en C75-CoA en el hipotálamo, donde inhibe la actividad CPT1 y causa una reducción del peso y la ingesta.
7. Los derivados de C75 denominados MLC carecen del grupo metileno ($=CH_2$) característico de esta molécula. Esta modificación les impide reaccionar con el CoA-SH para formar el correspondiente aducto -CoA. Los MLCs no inhiben CPT1 ni *in vitro* ni *in vivo*, en el hipotálamo. Asimismo, su administración central no disminuye el peso ni reduce la ingesta.

8. La administración central del isómero *cis* de C75 (C75-*cis*), al contrario que el isómero *trans* (C75), no produce pérdida de peso ni disminución de la ingesta en los animales tratados. C75-*cis* inhibe la actividad CPT1 *in vitro* pero no *in vivo*. Esto se relaciona con el hecho que tras la administración de C75-*cis* en el hipotálamo no se forma el éster C75-*cis*-CoA, paso previo imprescindible para la inhibición de CPT1.
9. Los enantiómeros de C75 presentan diferencias en su actividad biológica. La administración i.c.v. de (+)-C75, pero no de (-)-C75, causa una reducción del peso, la ingesta y la actividad CPT1 en el hipotálamo. Asimismo, *in vitro*, (+)-C75-CoA, a diferencia de (-)-C75-CoA, inhibe la actividad CPT1A.
10. La sustitución del ácido carboxílico de C75 por un ácido malónico (UB-001) o un grupo carnitina (KM079) se traduce en una pérdida de función en cuanto a la inhibición de CPT1 se refiere. En el caso de UB-001 la menor inhibición de CPT1A *in vitro*, se acompaña de una pérdida de su poder anoréxico cuando se administra de manera central (i.c.v.).

Capítulo 7. BIBLIOGRAFÍA

A

Abbott CR, Rossi M *et al.* (2001). **Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei.** *Endocrinology* 142(8): 3457-63. PMID: 11459791.

Aja S, Bi S *et al.* (2006). **Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(1): R148-54. PMID: 16484442.

Aja S, Landree LE, *et al.* (2008). **Pharmacological stimulation of brain carnitine palmitoyl-transferase-1 decreases food intake and body weight.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(2): R352-61. PMID: 18056987.

Aja S, Sahandy S *et al.* (2001). **Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(6): R1862-7. PMID: 11705771.

Akkaoui M, Cohen I *et al.* (2009). **Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids.** *Biochem J* 420(3): 429-38. PMID: 19302064.

Altschul SF, Madden TL, *et al.* (1997). **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-402. PMID: 9254694.

Anand BK, Chhina GS *et al.* (1964). **Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose.** *Am J Physiol* 207: 1146-54. PMID: 14237464.

Andrews ZB, Liu ZW *et al.* (2008). **UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals.** *Nature* 454(7206): 846-51. PMID: 18668043.

Asnicar MA, Smith DP *et al.* (2001). **Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet.** *Endocrinology* 142(10): 4394-400. PMID: 11564703.

Azzara AV, Sokolnicki JP *et al.* (2002). **Central melanocortin receptor agonist reduces spontaneous and scheduled meal size but does not augment duodenal preload-induced feeding inhibition.** *Physiol Behav* 77(2-3): 411-6. PMID: 12419417.

B

Bagnol D, Lu XY *et al.* (1999). **Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain.** *J Neurosci* 19(18): RC26. PMID: 10479719.

Balthasar N, Dalgaard LT *et al.* (2005). **Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure.** *Cell* 123(3): 493-505. PMID: 16269339.

- Baskin DG, Figlewicz Lattemann D *et al.* (1999). **Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight.** *Brain Res* 848(1-2): 114-23. PMID: 10612703.
- Bechtold DA y Brown IR (2000). **Heat shock proteins Hsp27 and Hsp32 localize to synaptic sites in the rat cerebellum following hyperthermia.** *Brain Res Mol Brain Res* 75(2): 309-20. PMID: 10686353.
- Bentebibel A, Sebastián D *et al.* (2006). **Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation.** *Biochemistry* 45(14): 4339-50. PMID: 16584169.
- Bernardis LL y Bellinger LL (1987). **The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update.** *Brain Res* 434(3): 321-81. PMID: 3300862.
- Bewick GA, Gardiner JV *et al.* (2005). **Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype.** *Faseb J* 19(12): 1680-2. PMID: 16099943.
- Bianchi A, Evans JL *et al.* (1990). **Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase.** *J Biol Chem* 265(3): 1502-9. PMID: 1967254.
- Bieber LL y Wagner M (1996). **Effect of pH and acyl-CoA chain length on the conversion of heart mitochondrial CPT-I/CPTo to a high affinity, malonyl-CoA-inhibited state.** *Biochim Biophys Acta* 1290(3): 261-6. PMID: 8765129.
- Bittencourt JC, Presse F *et al.* (1992). **The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization.** *J Comp Neurol* 319(2): 218-45. PMID: 1522246.
- Bouret SG, Draper SJ *et al.* (2004). **Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice.** *J Neurosci* 24(11): 2797-805. PMID: 15028773.
- Bradford MM (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 72: 248-54. PMID: 942051.
- Brandt JM, Djouadi F *et al.* (1998). **Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *J Biol Chem* 273(37): 23786-92. PMID: 9726988.
- Britton CH, Mackey DW *et al.* (1997). **Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B).** *Genomics* 40(1): 209-11. PMID: 9070950.
- Broberger C, De Lecea L *et al.* (1998). **Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems.** *J Comp Neurol* 402(4): 460-74. PMID: 9862321.

Brüning JC, Gautam D *et al.* (2000). **Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction.** *Science* 289(5487): 2122-5. PMID: 11000114.

Bryantsev AL, Chechenova MB, *et al.* (2007). **Recruitment of phosphorylated small heat shock protein Hsp27 to nuclear speckles without stress.** *Exp Cell Res* 313(1): 195-209. PMID: 17123510.

Burnette WN (1981). **Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.** *Anal Biochem* 112(2): 195-203. PMID: 6266278.

C

Carling D (2004). **The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control.** *Trends Biochem Sci* 29(1): 18-24. PMID: 14729328.

Cha SH, Hu Z *et al.* (2005). **Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41): 14557-62. PMID: 16203972.

Cha SH, Hu Z *et al.* (2004). **Long-term effects of a fatty acid synthase inhibitor on obese mice: food intake, hypothalamic neuropeptides, and UCP3.** *Biochem Biophys Res Commun* 317(2): 301-8. PMID: 15063757.

Cha SH, Rodgers JT *et al.* (2006). **Hypothalamic malonyl-CoA triggers mitochondrial biogenesis and oxidative gene expression in skeletal muscle: Role of PGC-1 α .** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15410-5. PMID: 17030788.

Chakrabarty K, Forzato C, *et al.* (2010). **The First Kinetic Enzymatic Resolution of Methyl Ester of C75.** *Letters in Organic Chemistry* 7: 245-48.

Chang MC, Grange E *et al.* (1997). **Incorporation of [U-14C]palmitate into rat brain: effect of an inhibitor of beta-oxidation.** *J Lipid Res* 38(2): 295-300. PMID: 9162749.

Chang MC, Wakabayashi S *et al.* (1994). **The effect of methyl palmoxirate on incorporation of [U-14C]palmitate into rat brain.** *Neurochem Res* 19(9): 1217-23. PMID: 7824078.

Chari M, Yang CS, *et al.* (2011). **Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo.** *Diabetes* 60(7): 1901-6. PMID: 21562080.

Chatelain F, Kohl C *et al.* (1996). **Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes.** *Eur J Biochem* 235(3): 789-98. PMID: 8654430.

Chaudhri O, Small C *et al.* (2006). **Gastrointestinal hormones regulating appetite.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471): 1187-209. PMID: 16815798.

Chen S y Brown IR (2007). **Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative diseases.** Cell Stress Chaperones 12(1): 51-8. PMID: 17441507.

Claret M, Smith MA *et al.* (2007). **AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons.** J Clin Invest 117(8): 2325-36. PMID: 17671657.

Clark JT, Kalra PS *et al.* (1984). **Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats.** Endocrinology 115(1): 427-9. PMID: 6547387.

Clément L, Cruciani-Guglielmacci C *et al.* (2002). **Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats.** Eur J Physiol 445: 375-80. PMID: 12466940.

Coleman DL (1973). **Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice.** Diabetologia 9(4): 294-8. PMID: 4767369.

Coll AP, Farooqi IS *et al.* (2007). **The hormonal control of food intake.** Cell 129(2): 251-62. PMID: 17448988.

Cota D, Proulx K *et al.* (2006). **Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.** Science 312(5775): 927-30. PMID: 16690869.

Cotero VE y Routh VH (2009). **Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose.** Am J Physiol Endocrinol Metab 296(5): E1101-9. PMID: 19223652.

Couceyro PR, Koylu EO *et al.* (1997). **Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization.** J Chem Neuroanat 12(4): 229-41. PMID: 9243343.

Cummings DE, Purnell JQ *et al.* (2001). **A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans.** Diabetes 50(8): 1714-9. PMID: 11473029.

Cunningham ET Jr, Miselis RR *et al.* (1994). **The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: an axonal transport and immunohistochemical study in the rat.** Neuroscience 58(3): 635-48. PMID: 7513390.

D

Dallman MF, la Fleur SE *et al.* (2004). **Minireview: glucocorticoids--food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004.** Endocrinology 145(6): 2633-8. PMID: 15044359.

Di Marzo V y Fontana A (1995). **Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 53(1): 1-11. PMID: 7675818.

Di Marzo V y Matias I (2005). **Endocannabinoid control of food intake and energy balance.** *Nat Neurosci* 8(5): 585-9. PMID: 15856067.

Ding F, Li HH, *et al.* (2008). **SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice.** *PLoS One* 3(3): e1709. PMID: 18320030.

Dowell P, Hu Z *et al.* (2005). **Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors.** *Annu Rev Biochem* 74: 515-34. PMID: 15952896.

Drazen DL, Wortman MD *et al.* (2003). **Adrenalectomy alters the sensitivity of the central nervous system melanocortin system.** *Diabetes* 52(12): 2928-34. PMID: 14633853.

Dyck JR, Barr AJ *et al.* (1998). **Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation.** *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): H2122-9. PMID: 9843812.

E

Eckel LA, Langhans W *et al.* (1998). **Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in female rats.** *Am J Physiol* 275(1 Pt 2): R186-93. PMID: 9688978.

Emond M, Ladenheim EE *et al.* (2001). **Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload.** *Physiol Behav* 72(1-2): 123-8. PMID: 11239989.

Emond M, Schwartz GJ *et al.* (1999). **Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK.** *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): R1545-9. PMID: 10233050.

Esser V, Britton CH *et al.* (1993). **Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function.** *J Biol Chem* 268(8): 5817-22. PMID: 8449948.

Esser V, Brown NF *et al.* (1996). **Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes.** *J Biol Chem* 271(12): 6972-7. PMID: 8636126.

F

Fan W, Ellacott KL *et al.* (2004). **Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system.** *Nat Neurosci* 7(4): 335-6. PMID: 15034587.

Farooqi IS, Keogh JM *et al.* (2003). **Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene.** N Engl J Med 348(12): 1085-95. PMID: 12646665.

Farooqi IS, Matarese G *et al.* (2002). **Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency.** J Clin Invest 110(8): 1093-103. PMID: 12393845.

Flier JS (2004). **Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.** Cell 116(2): 337-50. PMID: 14744442.

Friedman JM (2000). **Obesity in the new millennium.** Nature 404(6778): 632-4. PMID: 10766249.

Friedman MJ, Li S, *et al.* (2009). **Activation of gene transcription by heat shock protein 27 may contribute to its neuronal protection.** J Biol Chem 284(41): 27944-51. PMID: 19656944.

G

Galasso M, Sana ME, *et al.* (2010). **Non-coding RNAs: a key to future personalized molecular therapy?** Genome Medicine 2: 12.
<http://genomemedicine.com/content/2/2/12>

Gao Q, Mezei G *et al.* (2007). **Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals.** Nat Med 13(1): 89-94. PMID: 17195839.

Gao S, Keung W *et al.* (2011). **Malonyl-CoA Mediates Leptin Hypothalamic Control of Feeding Independent of Inhibition of CPT-1a.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301(1): R209-17. PMID: 21508288.

Gao S, Kinzig KP *et al.* (2007). **Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake.** Proc Natl Acad Sci U S A 104(44): 17358-63. PMID: 17956983.

Gao S, Zhu G *et al.* (2011). **Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding.** Proc Natl Acad Sci U S A 108(23):9691-6. PMID: 21593415.

Gibbs J, Young RC *et al.* (1973). **Cholecystokinin decreases food intake in rats.** J Comp Physiol Psychol 84(3): 488-95. PMID: 4745816.

Golovko MY y Murphy EJ (2004). **An improved method for tissue long-chain acyl-CoA extraction and analysis.** J Lipid Res 45(9): 1777-82. PMID: 15210839.

Guan XM, Yu H *et al.* (1998). **Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice.** Neuroreport 9(15): 3415-9. PMID: 9855291.

Guzmán M, Kolodziej MP *et al.* (1994). **Evidence against direct involvement of phosphorylation in the activation of carnitine palmitoyltransferase by okadaic acid in rat hepatocytes.** *Biochem J* 300 (Pt 3): 693-9. PMID: 8010950.

Guzmán M, Velasco G *et al.* (1994). **Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I by hepatocyte swelling.** *FEBS Lett* 344(2-3): 239-41. PMID: 7910567.

H

Hahn TM, Breininger JF *et al.* (1998). **Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons.** *Nat Neurosci* 1(4): 271-2. PMID: 10195157.

Hardie DG y Sakamoto K (2006). **AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle.** *Physiology (Bethesda)* 21: 48-60. PMID: 16443822.

He W, Lam TK *et al.* (2006). **Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity.** *Nat Neurosci* 9(2): 227-33. PMID: 16415870.

Helman A, Marre M *et al.* (1982). **The brain-islet axis: the nervous control of the endocrine pancreas.** *Diabetes Metab* 8(1): 53-64. PMID: 6124468.

Herrero L, Rubí B *et al.* (2005). **Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion.** *Diabetes* 54(2): 462-71. PMID: 15677504.

Hervey GR (1959). **The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats.** *J Physiol* 145(2): 336-52. PMID: 13642304.

Hetherington AW y Ranson SW (1942). **The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat.** *J. Comp. Neurol.* 76: 475-99.

Higuchi R, Fockler C, *et al.* (1993). **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-30. PMID: 7764001.

Hu Z, Cha SH *et al.* (2003). **Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12624-9. PMID: 14532332.

Hu Z, Cha SH *et al.* (2005). **Effect of centrally administered C75, a fatty acid synthase inhibitor, on ghrelin secretion and its downstream effects.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 3972-7. PMID: 15728730.

Hu Z, Dai Y *et al.* (2005). **A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake.** *J Biol Chem* 280(48): 39681-3. PMID: 16219771.

Huszar D, Lynch CA *et al.* (1997). **Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice.** *Cell* 88(1): 131-41. PMID: 9019399.

K

Kahler A, Geary N *et al.* (1998). **Chronic administration of OB protein decreases food intake by selectively reducing meal size in male rats.** *Am J Physiol* 275(1 Pt 2): R180-5. PMID: 9688977.

Kahn BB, Alquier T *et al.* (2005). **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metab* 1(1): 15-25. PMID: 16054041.

Kaiyala KJ, Woods SC *et al.* (1995). **New model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system.** *Am J Clin Nutr* 62(5 Suppl): 1123S-1134S. PMID: 7484931.

Kalra PS, Dube MG *et al.* (1998). **Neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor mRNA is upregulated in association with transient hyperphagia and body weight gain: evidence for a hypothalamic site for concurrent development of leptin resistance.** *J Neuroendocrinol* 10(1): 43-9. PMID: 9510057.

Kang L, Routh VH *et al.* (2004). **Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons.** *Diabetes* 53(3): 549-59. PMID: 14988237.

Kennedy GC (1950). **The hypothalamic control of food intake in rats.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 137(889): 535-49. PMID: 14797669.

Kesterson RA, Huszar D *et al.* (1997). **Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome.** *Mol Endocrinol* 11(5): 630-7. PMID: 9139806.

Kim EK, Miller I *et al.* (2004). **C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase.** *J Biol Chem* 279(19): 19970-6. PMID: 15028725.

Kim J, Li Y *et al.* (2011). **Endocannabinoid signaling and energy metabolism: a target for dietary intervention.** *Nutrition* 27(6): 624-32. PMID: 21470818.

King BM (2006). **The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight.** *Physiol Behav* 87(2): 221-44. PMID: 16412483.

Kinzler NR y Edwards KS (2009). **Functional implications for modulating neuropeptide Y gene expression in the dorsomedial hypothalamus.** *J Neurosci* 29(23): 7389-91. PMID: 19515905.

Kishi T, Aschkenasi CJ *et al.* (2003). **Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat.** *J Comp Neurol* 457(3): 213-35. PMID: 12541307.

Kishore S y Stamm S (2006). **The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C.** Science 311(5758): 230-2. PMID: 16357227.

Kojima M, Hosoda H *et al.* (1999). **Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.** Nature 402(6762): 656-60. PMID: 10604470.

Kong WM, Martin NM *et al.* (2004). **Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure.** Endocrinology 145(11): 5252-8. PMID: 15297436.

Kong WM, Stanley S *et al.* (2003). **A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation.** Faseb J 17(12): 1688-90. PMID: 12958177.

Korner J, Woods SC *et al.* (2009). **Regulation of energy homeostasis and health consequences in obesity.** Am J Med 122(4 Suppl 1): S12-8. PMID: 19410672.

Kristensen P, Judge ME *et al.* (1998). **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.** Nature 393(6680): 72-6. PMID: 9590691.

Kudo N, Barr AJ *et al.* (1995). **High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase.** J Biol Chem 270(29): 17513-20. PMID: 7615556.

Kuhajda FP, Pizer ES *et al.* (2000). **Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase.** Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3450-4. PMID: 10716717.

Kumar MV, Shimokawa T *et al.* (2002). **Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice.** Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 1921-5. PMID: 11854492.

L

Lage R, Dieguez C, *et al.* (2008). **AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis.** Trends Mol Med 14(12): 539-49. PMID: 18977694.

Lage R, Vázquez MJ, *et al.* (2010) **Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender.** Faseb J 24(8): 2670-9. PMID: 20335227.

Lam CK, Chari M, *et al.* (2009). **CNS regulation of glucose homeostasis.** Physiology (Bethesda) 24: 159-70. PMID: 19509126.

Lam TK, Gutierrez-Juarez R, *et al.* (2005). **Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism.** Science 309(5736): 943-7. PMID: 16081739.

- Landree LE, Hanlon AL, *et al.* (2004). **C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism.** *J Biol Chem* 279(5): 3817-27. PMID: 14615481.
- Langhans W (1996). **Metabolic and glucostatic control of feeding.** *Proc Nutr Soc* 55(1B): 497-515. PMID: 8832815.
- Langhans W, Wiesenreiter F, *et al.* (1983). **Plasma metabolites and food intake reduction following heparinoid injection in rats.** *Physiol Behav* 30(1): 113-9. PMID: 6188180.
- Lavoie JN, Hickey E, *et al.* (1993). **Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27.** *J Biol Chem* 268(32): 24210-4. PMID: 8226968.
- Lavrentyev EN, Matta SG, *et al.* (2004). **Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes.** *Biochem Biophys Res Commun* 315(1): 174-8. PMID: 15013442.
- Leonhardt M y Langhans W (2004). **Fatty acid oxidation and control of food intake.** *Physiol Behav* 83(4): 645-51. PMID: 15621070.
- Letierrier JF, Rusakov DA, *et al.* (1994). **Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro.** *Microsc Res Tech* 27(3): 233-61. PMID: 8204913.
- Loftus TM, Jaworsky DE, *et al.* (2000). **Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors.** *Science* 288(5475): 2379-81. PMID: 10875926.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, *et al.* (2010). **Targeting Intermediary Metabolism in the Hypothalamus as a Mechanism to Regulate Appetite.** *Pharmacol Rev* 62:237-264. PMID: 20392806.
- Lopaschuk GD, Wall SR, *et al.* (1988). **Etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I inhibitor, protects hearts from fatty acid-induced ischemic injury independent of changes in long chain acylcarnitine.** *Circ Res* 63(6): 1036-43. PMID: 3197271.
- López M, Lage R, *et al.* (2008). **Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin.** *Cell Metab* 7(5): 389-99. PMID: 18460330.
- López M, Lelliott CJ, *et al.* (2006). **Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA.** *Diabetes* 55(5): 1327-36. PMID: 16644689.
- López M, Lelliott CJ, *et al.* (2007). **Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake.** *Bioessays* 29(3): 248-61. PMID: 17295284.

M

Maccarrone M, Gasperi V, *et al.* (2010) **The endocannabinoid system and its relevance for nutrition.** *Annu Rev Nutr* 30: 423-40. PMID: 20645854.

Majeski AE y Dice JF (2004). **Mechanisms of chaperone-mediated autophagy.** *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2435-44. PMID: 15325583.

Makimura H, Mizuno TM, *et al.* (2000). **Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient ob/ob mice.** *Diabetes* 49(11): 1917-23. PMID: 11078460.

Martin NM, Smith KL, *et al.* (2006). **Interactions between the melanocortin system and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis.** *Peptides* 27(2): 333-9. PMID: 16388877.

Mathis C, Moran TH, *et al.* (1998). **Load-sensitive rat gastric vagal afferents encode volume but not gastric nutrients.** *Am J Physiol* 274(2 Pt 2): R280-6. PMID: 9486282.

Matsuda LA, Lolait SJ, *et al.* (1990). **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature* 346(6284): 561-4. PMID: 2165569.

Mayer J y Thomas DW (1967). **Regulation of food intake and obesity.** *Science* 156(773): 328-37. PMID: 4886532.

McClellan KM, Parker KL, *et al.* (2006). **Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus.** *Front Neuroendocrinol* 27(2): 193-209. PMID: 16603233.

McGarry JD y Brown NF (1997). **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** *Eur J Biochem* 244(1): 1-14. PMID: 9063439.

McGarry JD, Mills SE, *et al.* (1983). **Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat.** *Biochem J* 214(1): 21-8. PMID: 6615466.

Mera P, Bentebibel A, *et al.* (2009). **C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight.** *Biochem Pharmacol* 77(6): 1084-95. PMID: 19094968.

Miller I, Ronnett GV, *et al.* (2004). **Anorexigenic C75 alters c-Fos in mouse hypothalamic and hindbrain subnuclei.** *Neuroreport* 15(5): 925-9. PMID: 15073544.

Mills SE, Foster DW, *et al.* (1983). **Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochem J* 214(1): 83-91. PMID: 6615474.

Mills SE, Foster DW, *et al.* (1984). **Effects of pH on the interaction of substrates and malonyl-CoA with mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I.** *Biochem J* 219(2): 601-8. PMID: 6743235.

Minokoshi Y, Alquier T, *et al.* (2004). **AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.** *Nature* 428(6982): 569-74. PMID: 15058305.

Mobbs CV y Makimura H (2002). **Block the FAS, lose the fat.** *Nat Med* 8(4): 335-6. PMID: 11927935.

Moche M, Schneider G, *et al.* (1999). **Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase.** *J Biol Chem* 274(10): 6031-4. PMID: 10037680.

Monnikes H, Lauer G, *et al.* (1997). **Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat.** *Brain Res* 770(1-2): 277-88. PMID: 9372230.

Morillas M, Gómez-Puertas P, *et al.* (2001). **Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity.** *J Biol Chem* 276(48): 45001-8. PMID: 11553629.

Morillas M, Gómez-Puertas P, *et al.* (2003). **Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition.** *J Biol Chem* 278(11): 9058-63. PMID: 12499375.

Mountjoy KG, Mortrud MT, *et al.* (1994). **Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain.** *Mol Endocrinol* 8(10): 1298-308. PMID: 7854347.

Munro S, Thomas KL, *et al.* (1993). **Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.** *Nature* 365(6441): 61-5. PMID: 7689702.

Murthy MS y Pande SV (1987). **Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes.** *Biochem J* 248(3): 727-33. PMID: 3435481.

N

Nakazato M, Murakami N, *et al.* (2001). **A role for ghrelin in the central regulation of feeding.** *Nature* 409(6817): 194-8. PMID: 11196643.

Nicot C, Napal L, *et al.* (2004). **C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system.** *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 660-4. PMID: 15541339.

O

Obici S, Feng Z, *et al.* (2002) (a). **Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats.** *Nat Neurosci* 5(6): 566-72. PMID: 12021765.

Obici S, Feng Z, *et al.* (2002) (b). **Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake.** *Diabetes* 51(2): 271-5. PMID: 11812732.

Obici S, Feng Z, *et al.* (2003). **Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production.** *Nat Med* 9(6): 756-61. PMID: 12754501.

Olney JW (1969). **Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.** *Science* 164(880): 719-21. PMID: 5778021.

Orellana-Gavaldà JM, Herrero L, *et al.* (2011) **Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation.** *Hepatology* 53(3): 821-32. PMID: 21319201.

Outeiro TF, Klucken J, *et al.* (2006). **Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation.** *Biochem Biophys Res Commun* 351(3): 631-8. PMID: 17081499.

P

Pardridge WM, Mietus LJ, *et al.* (1980). **Palmitate and cholesterol transport through the blood-brain barrier.** *J Neurochem* 34: 463-66. PMID: 7411157.

Park EA, Mynatt RL, *et al.* (1995). **Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I.** *Biochem J* 310 (Pt 3): 853-8. PMID: 7575418.

Paxinos G y Watson C (1998). **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 4th Edition, London, Academic Press.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, *et al.* (1995). **Characteristics of BDNF-induced weight loss.** *Exp Neurol* 131(2): 229-38. PMID: 7534721.

Pizer ES, Chrest FJ, *et al.* (1998). **Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines.** *Cancer Res* 58(20): 4611-5. PMID: 9788612.

Pizer ES, Jackisch C, *et al.* (1996). **Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 56(12): 2745-7. PMID: 8665507.

Plumier JC, Hopkins DA, *et al.* (1997). **Constitutive expression of the 27-kDa heat shock protein (Hsp27) in sensory and motor neurons of the rat nervous system.** J Comp Neurol 384(3): 409-28. PMID: 9254036.

Pocai A, Lam TK, *et al.* (2005). **Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production.** Nature 434(7036): 1026-31. PMID: 15846348.

Pocai A, Lam TK, *et al.* (2006). **Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats.** J Clin Invest 116(4): 1081-91. PMID: 16528412.

Pocai A, Obici S, *et al.* (2005). **A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis.** Cell Metab 1(1): 53-61. PMID: 16054044.

Price AC, Choi KH, *et al.* (2001). **Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomyacin and cerulenin. Structure and mechanism.** J Biol Chem 276(9): 6551-9. PMID: 11050088.

Price N, van der Leij F, *et al.* (2002). **A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I.** Genomics 80(4): 433-42. PMID: 12376098.

Prip-Buus C, Cohen I, *et al.* (1998). **Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in Saccharomyces cerevisiae.** FEBS Lett 429(2): 173-8. PMID: 9650584.

R

Ramsay RR, Gandour RD, *et al.* (2001). **Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.** Biochim Biophys Acta 1546(1): 21-43. PMID: 11257506.

Rinaman L (2003). **Postnatal development of hypothalamic inputs to the dorsal vagal complex in rats.** Physiol Behav 79(1): 65-70. PMID: 12818710.

Rinaman L, Baker EA, *et al.* (1998). **Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal.** Am J Physiol 275(1 Pt 2): R262-8. PMID: 9688987.

Rohrbach KW, Han S, *et al.* (2005). **Disconnection between the early onset anorectic effects by C75 and hypothalamic fatty acid synthase inhibition in rodents.** Eur J Pharmacol 511(1): 31-41. PMID: 15777777.

Ross R, Wang PY, *et al.* (2008). **Hypothalamic protein kinase C regulates glucose production.** Diabetes 57(8): 2061-5. PMID: 18511848.

S

Saiki RK, Gelfand DH, *et al.* (1988). **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** Science 239(4839): 487-91. PMID: 2448875.

- Saggerson ED (1982). **Carnitine acyltransferase activities in rat liver and heart measured with palmitoyl-CoA and octanoyl-CoA. Latency, effects of K⁺, bivalent metal ions and malonyl-CoA.** *Biochem J* 202(2): 397-405. PMID: 7092822.
- Sanacora G, Kershaw M, *et al.* (1990). **Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation.** *Endocrinology* 127(2): 730-7. PMID: 2373052.
- Sandoval D, Cota D, *et al.* (2008). **The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation.** *Annu Rev Physiol* 70: 513-35. PMID: 17988209.
- Schiestl RH y Gietz RD (1989). **High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier.** *Curr Genet* 16(5-6): 339-46. PMID: 2692852.
- Schwartz GJ (2000). **The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects.** *Nutrition* 16(10): 866-73. PMID: 11054591.
- Schwartz GJ (2006). **Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471): 1275-80. PMID: 16874932.
- Scott MS y Ono M (2011). **From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs.** *Biochimie* 93(11):1987-1992. PMID: 21664409.
- Sebastián D, Herrero L, *et al.* (2007). **CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(3): E677-86. PMID: 17062841.
- Semenkovich CF (1997). **Regulation of fatty acid synthase (FAS).** *Prog Lipid Res* 36(1): 43-53. PMID: 9373620.
- Sierra AY, Gratacós E, *et al.* (2008). **CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity.** *J Biol Chem* 283(11): 6878-85. PMID: 18192268.
- Simpson KA, Martin NM, *et al.* (2009). **Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(2): 120-8. PMID: 19466203.
- Smith PM y Ferguson AV (2008). **Neurophysiology of hunger and satiety.** *Dev Disabil Res Rev* 14(2): 96-104. PMID: 18646014.
- Song Z, Levin BE, *et al.* (2001). **Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus.** *Diabetes* 50(12): 2673-81. PMID: 11723049.
- Stetler RA, Cao G, *et al.* (2008). **Hsp27 protects against ischemic brain injury via attenuation of a novel stress-response cascade upstream of mitochondrial cell death signaling.** *J Neurosci* 28(49): 13038-55. PMID: 19052195.

Stetler RA, Gan Y, *et al.* (2010) **Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system.** *Prog Neurobiol* 92(2): 184-211. PMID: 20685377.

Sugiura T, Kondo S, *et al.* (1995). **2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.** *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97. PMID: 7575630.

Suzuki S, Li AJ, *et al.* (2001). **Feeding suppression by fibroblast growth factor-1 is accompanied by selective induction of heat shock protein 27 in hypothalamic astrocytes.** *Eur J Neurosci* 13(12): 2299-308. PMID: 11454034.

Swart I, Overton JM, *et al.* (2001). **The effect of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels.** *Peptides* 22(12): 2175-9. PMID: 11786207.

T

Takamura Y, Kitayama Y, *et al.* (1985). **Malonyl-CoA: acetyl-CoA cycling. A new micromethod for determination of acyl-CoAs with malonate decarboxylase.** *Biochim Biophys Acta* 834(1): 1-7. PMID: 3978111.

Thampy KG (1989). **Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart.** *J Biol Chem* 264(30): 17631-4. PMID: 2572585.

Thompson JD, Higgins DG, *et al.* (1994). **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-80. PMID: 7984417.

Thorens B (2010). **Central control of glucose homeostasis: the brain--endocrine pancreas axis.** *Diabetes Metab* 36(suppl. 3): S45-9. PMID: 21211735.

Thupari JN, Landree LE, *et al.* (2002). **C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9498-502. PMID: 12060712.

Tu Y, Thupari JN, *et al.* (2005). **C75 alters central and peripheral gene expression to reduce food intake and increase energy expenditure.** *Endocrinology* 146(1): 486-93. PMID: 15498887.

U

Ueno H, Yamaguchi H, *et al.* (2005). **Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis.** *Regul Pept* 126(1-2): 11-9. PMID: 15620408.

Urabe M, Ding C, *et al.* (2002). **Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors.** *Hum Gene Ther* 13(16): 1935-43. PMID: 12427305.

Uyama N, Geerts A, *et al.* (2004). **Neural connections between the hypothalamus and the liver.** *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 280(1): 808-20. PMID: 15382020.

W

Wang C, Wang CM, *et al.* (2003). **Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain.** *Gene Ther* 10(17): 1528-34. PMID: 12900769.

Weis BC, Cowan AT, *et al.* (1994). **Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme.** *J Biol Chem* 269(42): 26443-8. PMID: 7929365.

Weisberg SP, McCann D, *et al.* (2003). **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J Clin Invest* 112(12): 1796-808. PMID: 14679176.

Wilhelmus MM, Otte-Holler I, *et al.* (2006). **Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 32(2): 119-30. PMID: 16599941.

Williams GMD y Frühbeck G (2009). **Obesity: science to practice.** Chichester, Wiley-Blackwell.

Wolfgang MJ, Kurama T, *et al.* (2006). **The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(19): 7282-7. PMID: 16651524.

Wolfgang MJ y Lane MD (2006). **Control of energy homeostasis: role of enzymes and intermediates of fatty acid metabolism in the central nervous system.** *Annu Rev Nutr* 26: 23-44. PMID: 16704352.

Wolfgang MJ y Lane MD (2006). **The role of hypothalamic malonyl-CoA in energy homeostasis.** *J Biol Chem* 281(49): 37265-9. PMID: 17018521.

Woods A, Johnstone SR, *et al.* (2003). **LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade.** *Curr Biol* 13(22): 2004-8. PMID: 14614828.

Woods A, Dickerson K, *et al.* (2005). **Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells.** *Cell Metab* 2(1): 21-33. PMID: 16054096.

Woods SC, Stein LJ, *et al.* (1984). **Suppression of food intake by intravenous nutrients and insulin in the baboon.** *Am J Physiol* 247(2 Pt 2): R393-401. PMID: 6380317.

Wren AM, Small CJ, *et al.* (2000). **The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion.** *Endocrinology* 141(11): 4325-8. PMID: 11089570.

X

Xu B, Goulding EH, *et al.* (2003). **Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor.** *Nat Neurosci* 6(7): 736-42. PMID: 12796784.

Y

Yang L, Scott KA, *et al.* (2009). **Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance.** *J Neurosci* 29(1): 179-90. PMID: 19129396.

Yang N, Kays JS, *et al.* (2005). **C75 [4-methylene-2-octyl-5-oxo-tetrahydro-furan-3-carboxylic acid] activates carnitine palmitoyltransferase-1 in isolated mitochondria and intact cells without displacement of bound malonyl-CoA.** *J Pharmacol Exp Ther* 312(1): 127-33. PMID: 15356215.

Yaswen L, Diehl N, *et al.* (1999). **Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin.** *Nat Med* 5(9): 1066-70. PMID: 10470087.

Yeh LA, Lee KH, *et al.* (1980). **Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge.** *J Biol Chem* 255(6): 2308-14. PMID: 6102090.

Z

Zammit VA (2008). **Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function.** *IUBMB Life* 60(5): 347-54. PMID: 18421775.

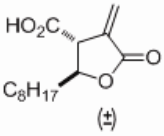
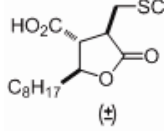
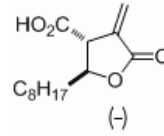
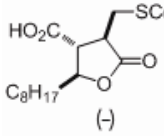
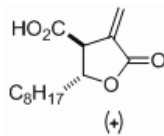
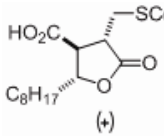
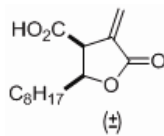
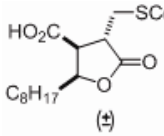
Zhang Y, Proenca R, *et al.* (1994). **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 372(6505): 425-32. PMID: 7984236.

APÉNDICES

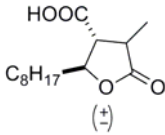
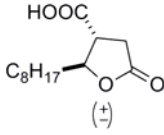
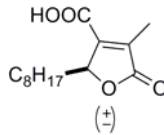
APÉNDICE 1

C75 Y DERIVADOS

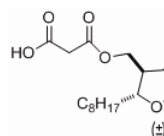
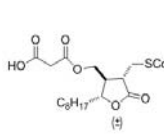
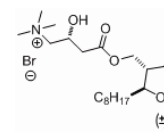
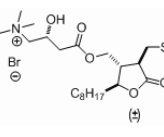
Isómeros y enantiómeros del C75 y C75-CoA

Nombre	Molécula	Nombre	Molécula
(±)-C75		(±)-C75-CoA	
(-)-C75		(-)-C75-CoA	
(+)-C75		(+)-C75-CoA	
(±)-C75-cis		(±)-C75-cis-CoA	

Derivados del C75 sin grupo metileno: MLC (*methylene-lacking C75*)

Nombre	Molécula	Nombre	Molécula	Nombre	Molécula
(±)-MLC-1		(±)-MLC-2		(±)-MLC-3	

Otros derivados del C75 y C75-CoA

Nombre	Molécula	Nombre	Molécula
(±)-UB001		(±)-UB001-CoA	
(±)-Km079		(±)-Km081	

APÉNDICE 2

OLIGONUCLEÓTIDOS

Genes relacionados con el metabolismo lipídico

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
CPT1F for	GCATCCATCGACAGCTACGC	59,6
CPT1wt rev	TCGGAAGAGCCGGGTCA	59,5
CPT1S for	CATCGACAGCTACGCCAAATC	58,6
CPT1mut rev	TCTCGGAAGAGCCGGGTAC	58,7
CPT1C for	GCCTGCCAATTTGTGAGAG	63,5
CPT1C rev	GGCAAGGCACTGTTGGTC	64,6
FAS for	CAGACGATGACAGGAGGTGGAA	69,2
FAS rev	CACTCACACCCACCCAGA	63,6
ACC1 for	GGACAGACTGATTGCAGAGAAA	63,3
ACC1 rev	TGAAGAGCCCCACACACA	64,4
ACC2 for	CCGGTTTTCCGTGCCTTTGTAC	70,1
ACC2 rev	CTCATCTCTCGCTCTGAACG	62,9

Receptores

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
NPY1R for	ATAAATTGCATCCAAAGGACTT	62,7
NPY1R rev	TGTGTCATCTGCCATGAAGGA	66,8
NPY5R for	CCTCCAGGTCCTGCTCCT	64,6
NPY5R rev	GCTCCTCAAGCTTAACTCCATA	63,1
MC3R for	CGGAGTGGCAGTGGGTTCT	67,7
MC3R rev	GTTGCCGTTCCCTACCACA	67,4
MC4R for	TGGCGAGGCTTCACATTAAGA	66,7
MC4R rev	CAAGGTAATTGCGCCCTTCA	66,9
GHS-R for	GAGATCGCTCAGATCAGCCAGT	67,3
GHS-R rev	TAATCCCCAACTGAGGTTCTG	67,0
ObRb for	TGTCAGAAATTCTATGTGGTTT	62,4
ObRb rev	TTGGATAGGCCAGGTAAGTG	61,5

Genes de la vía de la gluconeogénesis

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
G6Pasa for	GACCTCAGGAACGCCTTCTATG	65,9
G6Pasa rev	ATTGATGCCACAGTCTCTTGA	65,8
PEPCK for	GTCACCATCACTTCTGGAAGA	65,3
PEPCK rev	GGTGCAGAATCGCGAGTTG	67,0

Neuropéptidos

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
NPY for	TATCCCTGCTCGTGTGTTG	63,7
NPY rev	GTTCTGGGGGCATTTTCTG	64,4
AgRP for	AGCAGACCGAGCAGAAGATG	64,7
AgRP rev	GACTCGTGCAGCCTTACACA	64,2
POMC for	ACCTACCACGGAAAGCAA	65,7
POMC rev	CGGGGATTTTCAGTCAAGG	64,3
CART for	GCCAAGTCCCCATGTGTGAC	67,9
CART rev	CACCCCTCACAAAGCACTTCA	67,4

Varios

Nombre	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)
UCP2 for	CCGGGCCTCTGGAAAG	68,1
UCP2 rev	CCCAAGCGGAGGAAGGA	66,5
PKC δ for	GAGCGGCCCTGAACATCTA	68,5
PKC δ rev	AGCTTATGGGTGGCAGTCAC	64,1
Kir6.2 for	CAACGTCGCCACAAGAACATC	70,7
Kir6.2 rev	CCAGCTGCACAGGAAGGACATG	71,3
SUR1 for	CAGGACCAAGAGCTGGAGAAGG	69,9
SUR1 rev	CATCCAGCAGAAGGCCATCTCT	69,6
β -actina for	AAGTCCCTCACCTCCCAAAG	68,3
β -actina rev	AAGCAATGCTGTACCTTCCC	67,4

SONDAS

Nombre	Secuencia (5'→3')	Marcaje	T _m (°C)
CPT1A-FL	AGACAACAAAGGTGATGGACTTGTCAAACC	3'-fluoresceína	65,7
CPT1A-LC	CCTGTCAAAGCATCTTCCATGCAGCAG	5'-Red640	68,2

PUBLICACIÓN

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight

Paula Mera^{a,b,1}, Assia Bentebibel^{a,1}, Eduardo López-Viñas^{b,c}, Antonio G. Cordente^a, Chandrashekar Gurunathan^a, David Sebastián^a, Irene Vázquez^a, Laura Herrero^{a,b}, Xavier Ariza^d, Paulino Gómez-Puertas^{b,c}, Guillermina Asins^{a,b}, Dolors Serra^{a,b}, Jordi García^d, Fausto G. Hegardt^{a,b,*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology and IBUB (Institute of Biomedicine University of Barcelona), Spain

^bCIBER “Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición” (CB06/03), Instituto de Salud Carlos III, School of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^cCentro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain

^dDepartment of Organic Chemistry and IBUB, School of Chemistry, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2008

Accepted 20 November 2008

Keywords:

Fatty-acid metabolism

Anti-obesity drugs

C75

CPT1 carnitine palmitoyltransferase

FAS fatty-acid synthase

ABSTRACT

Central nervous system administration of C75 produces hypophagia and weight loss in rodents identifying C75 as a potential drug against obesity and type 2 diabetes. However, the mechanism underlying this effect is unknown. Here we show that C75-CoA is generated chemically, *in vitro* and *in vivo* from C75 and that it is a potent inhibitor of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), the rate-limiting step of fatty-acid oxidation. Three-D docking and kinetic analysis support the inhibitory effect of C75-CoA on CPT1. Central nervous system administration of C75 in rats led to C75-CoA production, inhibition of CPT1 and lower body weight and food intake. Our results suggest that inhibition of CPT1, and thus increased availability of fatty acids in the hypothalamus, contribute to the pharmacological mechanism of C75 to decrease food intake.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The brain plays an important role in the evaluation and control of energy homeostasis. Blood concentrations of glucose and fatty acids are sensed by neurons of the hypothalamus, which adjusts feeding behaviour and monitors fatty-acid metabolism. Several laboratories have attempted to

design anti-obesity drugs and modulate fatty-acid metabolism to inhibit food intake. C75 is a synthetic inhibitor of fatty-acid synthase (FAS) [1] and has been proposed as an anti-obesity agent since its administration decreases food intake and body weight in rodents [2–5]. C75 can alter the metabolism of neurons in the hypothalamus, where an increase in the level of malonyl-CoA due to FAS inhibition serves as a secondary

* Corresponding author. Tel.: +34 934024523; fax: +34 934024520.

E-mail address: fgarciaheg@ub.edu (F.G. Hegardt).

¹ Both authors contributed equally to this study.

Abbreviations: ARC, arcuate nucleus; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CrAT, carnitine acetyltransferase; FAS, fatty-acid synthase; wt, wild-type.

0006-2952/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2008.11.020

messenger of nutrient status, thereby mediating the suppression of food intake [6,7]. Hypothalamic levels of long-chain fatty acyl-CoA (LCFA-CoA) also signal nutrient availability and control food intake [8].

Malonyl-CoA signals the availability of lipid and carbohydrate fuels [9] and acts as a physiological inhibitor of the enzyme carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1). CPT1 catalyzes the first step in the transport of LCFA from the cytoplasm to the mitochondria, and is the rate-limiting step in β -oxidation. Mammalian tissues express three CPT1 isoforms: CPT1A, CPT1B and CPT1C which differ in their sensitivity to malonyl-CoA and tissue distribution [10,11]. CPT1A and CPT1C are expressed in the brain. CPT1A is located in the mitochondrial membrane and CPT1C is expressed in the endoplasmic reticulum of neurons where although it has CPT1 activity, it does not participate in mitochondrial fatty-acid oxidation [12]. Interestingly, our group has generated a mutant form of CPT1A insensitive to malonyl-CoA (CPT1A M593S), and a mutant form of carnitine acetyltransferase (CrAT) that swaps its preference from short to LCFA-CoA (CrAT D356A/M564G). These mutants have allowed us to examine the structural requirements of substrates and inhibitors [13–15].

The inhibition of FAS by C75 produces an accumulation of malonyl-CoA which is difficult to reconcile with the activation of CPT1 reported by others [2,16–18]. To unravel this paradox the mechanism of action of C75 needs to be examined. We recently demonstrated that C75 is converted *in vitro* to C75-CoA, a potent inhibitor of CPT1 [19]. CPT1 activity was also inhibited in mitochondria from pancreas-, muscle-, and kidney-derived cell lines incubated with C75, which indicates that C75-CoA is produced in these cells. This inhibition was followed by a decrease in fatty-acid oxidation. The role of CPT1 in heart, liver and pancreatic β -cells makes it a potential target in the treatment of diabetes, obesity, and other human diseases.

Here we show that C75-CoA, and not C75, directly inhibits CPT1 activity. We also show that C75-CoA is formed in the hypothalamus in a dose-dependent way, where it inhibits CPT1 activity and decreases food intake and body weight. These results indicate that direct inhibition of CPT1 by C75-CoA in the hypothalamus could control body weight and feeding behaviour.

2. Materials and methods

2.1. Materials

L-[Methyl- 3 H]carnitine hydrochloride was purchased from Amersham Biosciences (GE Healthcare, Europe, Barcelona, Spain). Yeast culture media products were from Difco™ Laboratories (Detroit, MI). Bradford solution for protein assays was from Bio-Rad Laboratories (Barcelona, Spain). RPMI 1640 was from Gibco-Invitrogen Corporation (Barcelona, Spain). C75, C₁₇-CoA, defatted bovine serum albumin (BSA), palmitoyl-CoA, malonyl-CoA, and other chemicals were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas* sp. was from Sigma (Madrid, Spain). Etomoxir was provided by H.P.O. Wolf (GMBH, Allensbach, Germany).

2.2. Animals

Sprague-Dawley female rats (210–230 g) were bred in our laboratory. Animals were maintained under a 12 h dark/light cycle with free access to food (2014, Harlan) and water. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee at the University of Barcelona, in accordance with current legislation.

2.3. Cannulation surgery

Chronic (i.c.v.) cannulae were stereotaxically implanted into lateral ventricle under ketamine (Imalgene, 90 mg/kg) and xylazine (Rompun, 11 mg/kg) anesthesia. The coordinates were 1.0 mm posterior to bregma, 1.4 mm lateral of the sagittal sinus and 6.2 mm ventral to the dura mater. Rats received subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) for analgesia.

2.4. Stereotaxic microinjection

Rats were anesthetized as previously described and immobilized in a stereotaxic apparatus. Injections were given bilaterally into the ARC nucleus of the hypothalamus (2.7 mm posterior to bregma, 0.2 mm lateral of the sagittal sinus and 9.8 mm ventral to the dura mater). 30 min after the injection rats were sacrificed and hypothalamus was dissected.

2.5. Treatments

After 1 week of postsurgical recovery, cannula placements were verified by assessing a feeding response to ghrelin [20]. I.c.v. injection (5 μ L) of etomoxir (190 μ g), C75 (40 μ g) or vehicle (RPMI 1640) were performed with a microliter syringe (Hamilton). For feeding experiments, rats received single injections of vehicle or compound dissolved in vehicle 30 min before the light was turned off. We measured intakes of chow, corrected for spillage, at 1, 2, 4 and 22 h. Body weight was measured after 22 h. For the activity experiments three rats were microinjected (ARC) with 2 μ L of RPMI 1640 medium as a control or with 2 μ L of C75 dissolved in the same medium at 33 mM final concentration. For the LC-MS/MS analysis, two rats were microinjected (ARC) with 2 μ L of RPMI 1640 medium as control or with 2 μ L of C75 dissolved in the same medium at 15, 30 or 60 mM final concentration. 30 min after injection rats were killed and hypothalamus was excised and stored at -80 °C for acyl-CoA extraction.

2.6. C75-CoA and acyl-CoAs extraction and quantification

Acyl-CoAs were extracted as described elsewhere [21], with some modifications. All procedures were performed at 0–4 °C. Hypothalamus from control- and C75-microinjected rats was thawed and 1 mL of 100 mM KH₂PO₄ pH 4.9 was added. 16 nmol of heptadecanoyl-CoA (C₁₇-CoA), as an internal standard, was added to all samples, which were then sonicated for 20 s. One millilitre of n-propanol was added and the emulsions were sonicated for a further 20 s, left on ice for 20 s, and sonicated again for 20 s. To this solution, 0.125 mL

of saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added, followed by 2 mL of 100% acetonitrile, and the mixture was then vortexed for 5 min at 4 °C. The tubes were then centrifuged for 5 min at $2100 \times g$ at 4 °C. The supernatant was removed and passed through a sterile 0.2 μm filter (Millipore). The filtrate was lyophilized and re-dissolved in the same mobile phase (buffer B: 10% acetonitrile in 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3)) used for the LC–MS/MS analysis. C_{17} -CoA and C75-CoA were used as standards to produce the calibration curves from which we quantified production of C75-CoA *in vivo*. The straight lines obtained had a regression coefficient of 99%.

2.7. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS)

LC analyses were performed using a Perkin Elmer series 200 equipped with a quaternary pump and thermostatted auto-sampler. An XBridge (Waters) C_{18} column (50 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm) was used at room temperature and the volume injected was 15 μL . The mobile phases were buffer A, 50% acetonitrile in 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3); buffer B, 10% acetonitrile in 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.3) and C, 100% acetone. The column was equilibrated with 15% buffer A for 10 min, and then the eluting gradient was as follows: 15% buffer A to 90% buffer A in 5.5 min, then 90% buffer A to 50% buffer A, 5% C to 45% C in 15.5 min, and 50% buffer A, 45% C in 25 min. The flow rate was 0.4 mL/min.

MS and MS/MS experiments were performed on an API 3000 triple-quadrupole mass spectrometer equipped with a Turbo IonSpray source. All the analyses were performed in positive mode with the following settings: capillary voltage, +3000 V; nebulizer gas (N_2), 10 (arbitrary units); curtain gas (N_2), 12 (arbitrary units); collision gas (N_2), 4 (arbitrary units); declustering potential, +30 V; focusing potential, +200 V; entrance potential, +10 V; collision energy, +40 V; collision cell exit potential, +15 V. Drying gas (N_2) was heated to 300 °C and introduced at a flow-rate of 6000 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. Full scan data acquisition was performed scanning from m/z 500 to 1200 in profile mode and using a cycle time of 2 s with a step size of 0.1 u and a pause between each scan of 2 ms. In order to achieve maximum sensitivity, samples were injected in multiple reaction monitoring mode (MRM) by monitoring the 1022.5/515.6 and the 1020.7/513.5 transitions, obtained through product ion scan experiments with the C75-CoA and C_{17} -CoA standard, respectively. To calculate the C75-CoA concentration in the samples, 15 μL of increasing concentrations of C75-CoA and C_{17} -CoA from 10 to 5000 nM was injected. The areas of the resulting peaks were used to produce the calibration curve. The C_{17} -CoA was used as internal standard to calculate the percentage of recovery in the acyl-CoA extraction.

2.8. Enzymatic synthesis of C75-CoA and etomoxiryl-CoA

C75 was converted first, *in vitro*, to its CoA derivative by long-chain acyl-CoA synthetase in the presence of CoA, as described previously [19]. The unreacted CoA from the C75-CoA activation solution (1 mL) was removed by incubation for 30 min at 4 °C with 1.25 mL of SulfoLink Coupling Gel (Pierce Biotechnology), as carnitine acyltransferase activity is inhibited by CoA [22]. C75-CoA synthesized in this enzymatic

reaction was used as a standard for LC–MS/MS analysis. The conversion of etomoxir to etomoxiryl-CoA was nearly complete, as deduced from the fluorometric assay of the remaining free CoA, as described elsewhere [23].

2.9. Non-enzymatic synthesis of C75-CoA

In the second experiment, a solution of C75 and CoA (pH 8.4) was stirred in the absence of acyl-CoA synthetase. The structure and relative stereochemistry of the C75-CoA adduct was determined by NMR. CoA sodium salt hydrate (8.6 mg), and $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (7.6 mg) were added to a solution of (\pm)-C75 (2.5 mg) in D_2O (0.8 mL) in an NMR tube. The structure of the C75-CoA adduct was fully determined by ^1H and ^{13}C NMR, gCOSY and gHSQC experiments.

2.10. Expression of rat CrAT and CPT1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmids pYESCrAT^{wt} [14], pYESCrAT^{D356A/M564G} [15], pYESLCPT^{wt} [24], pYESLCPT^{M593S} [13] containing CrAT wt, CrAT D356A/M564G mutant, CPT1A wt and CPT1A M593S mutant, respectively, were expressed in yeast cells, and mitochondrial cell extracts were prepared as previously described [24]. An *S. cerevisiae* strain devoid of COT and CPT1 activity and lacking the endogenous CAT2 gene (FY23 Δcat2 (MATa trp1 ura3 $\Delta\text{cat2}::\text{LEU2}$)) was used as an expression system [25].

2.11. Determination of carnitine acyltransferase activity

Mitochondrial-enriched fractions were obtained by differential centrifugation [26], with minor modifications. All protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay with bovine serum albumin as a standard.

Two methods were used for the assay of carnitine acyltransferase: a radiometric method [24] and an endpoint fluorometric method [14,23]. The radiometric assay was used in all cases, unless otherwise indicated.

2.11.1. Radiometric method

The forward reaction of carnitine acyltransferase activity was assayed in mitochondrial-enriched fractions obtained from yeast (5 μg protein for CrAT D356A/M564G and 3–4 μg protein for CPT1A) and from rat hypothalamus (100 μg protein for CPT1). Enzyme activity was assayed for 4 min at 30 °C in a total volume of 200 μL . The substrates were 400 μM L-[methyl- ^3H]-carnitine, and 50 μM myristoyl-CoA (for CrAT D356A/M564G) or palmitoyl-CoA (for CPT1A). Drugs were preincubated with the enzyme for 1–5 min depending on the assay. Drug concentrations ranging from 0.01 to 60 μM were used to calculate the IC_{50} . Enzyme assays were carried out to deduce the effects of the free acid (C75) versus the CoA ester (C75-CoA), that is, the potency of C75-CoA as inhibitor relative to C75 as an activator. In this case, CPT1A wt overexpressed in yeast (8 μg protein) was preincubated for 5 min with increasing concentrations of C75 (5–100 μM), C75-CoA (5–50 μM) with or without 100 μM C75 at each C75-CoA concentration. Enzyme activity was compared to the control (DMSO). In all cases, the molar ratio of acyl-CoA to albumin was kept at 5:1 to

avoid the presence of free acyl-CoA and its deleterious detergent effects and to prevent the formation of micelles.

2.11.2. Fluorometric method

The forward reaction of carnitine acyltransferase activity was assayed for 8 min at 30 °C in a solution containing 0.1 mM acyl-CoA, 1.5 mM EDTA, 1.5 mM L-carnitine, and 40 mM Hepes buffer, pH 7.8, in a total volume of 600 μ L. Acetyl-CoA was used as substrate for CrAT wt. Reactions were started by the addition of 5 μ g of yeast-expressed protein. Increasing concentrations of C75-CoA, etomoxiryl-CoA or malonyl-CoA were independently incubated with yeast-overexpressed mitochondrial CrAT wt. Parallel (blank) assays were run in the absence of L-carnitine.

2.12. Construction of rat CrAT and CPT1A models

A model of rat CrAT wt enzyme was constructed by homology modelling using as templates the structures deposited in the Protein Data Bank (PDB) corresponding to human (1NM8) [27], and mouse CrAT (1NDB, 1NDF and 1NDI) [28], essentially as described elsewhere [14]. CrAT D356A/M564G was modelled by the same procedures using rat CrAT wt as template. CPT1A was also modelled using as templates the structures of mouse carnitine octanoyltransferase (1XL7, 1XL8) [29] and carnitine palmitoyltransferase 2 (PDB entry 2H4T) [30], essentially as described elsewhere [31,32]. The quality of the models was checked using the WHAT-CHECK routines [33] from the WHAT-IF program [34] and the PROCHECK validation program from the SWISS-MODEL server facilities [35]. To optimize geometries and release local constraints or inappropriate contacts, the modelled structures were energy minimized with the implementation of the GROMOS 43B1 force field in the program DeepView [36], using 500 steps of steepest descent minimization followed by 500 steps of conjugate-gradient minimization.

2.13. In silico molecular docking

Structural models of the molecular docking of the inhibitors C75-CoA and malonyl-CoA to the active site of the receptor proteins CPT1A, and CrAT mutant D356A/M564G were performed using the suite of programs included in the Autodock 3.0 package [35], as described elsewhere [14].

2.14. Statistical analysis

Data are represented as mean \pm S.E.M. Student t-test was used for statistical analysis. Different experimental groups were compared with a one-way ANOVA followed by Turkey's test for comparisons post hoc. A probability level of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Synthesis and chemical characterization of C75-CoA by NMR

We have shown that C75-CoA can be synthesized from C75 and CoA in the presence of acyl-CoA synthetase from

Pseudomonas sp. [19]. Here we show that the MS spectrum of C75-CoA gave an $[M + H]^+$ ion at m/z 1022.5, corresponding to the protonated molecule of C75-CoA. This ion corresponded to the formation of the C75-CoA molecule by conjugation of the CoA group without the loss of a water molecule. The product showed the following: a fragmentation ion at m/z 515.6, which was assigned to the C75-pantethenoic group, and an ion at m/z 428.1, which corresponds to adenosine 3'-diphosphate (Supplemental Fig. S1).

We hypothesised that the -SH group in CoA would be sufficiently nucleophilic to add to the electrophilic methylene group in C75 without any external agent (acyl-CoA synthetase) in an alkaline medium in which the thiol group is partially deprotonated. We mixed both reagents, C75 and HSCoA in a deuterated water solution at pH 8.4 (Fig. 1A) and the mixture was analyzed by ^1H NMR, comparing the results with the unreacted C75 and CoA. The peaks assigned to the methylene group (black triangle) progressively decreased and a new signal at ~ 2.9 ppm appeared due to the formation of the new saturated methylene group (white triangle) (Fig. 1B). These changes were fast (30 min). In a parallel experiment at neutral pH the same transformation was observed, albeit much more slowly (data not shown).

The structure and relative stereochemistry of the C75-CoA adduct shown in Fig. 1C were determined by one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR techniques in order to assign every signal (gCOSY and gHSQC experiments) [37]. In particular, the *trans-trans* relative configuration on the lactone ring shown in Fig. 1C is well established on the basis of the observed coupling constants (J), especially $J_{d,e}$. These coupling constants depend on the dihedral angle (H-C-C-H) of the protons involved and give information about their relative position. When we compared the coupling constants of the lactone ring moiety of our adduct with those reported [38,39] for the related compounds I and II (Fig. 1C) high correlation with II was observed, suggesting the same relative configuration.

As described above, we used two methods to obtain C75-CoA. In one, a solution of C75 and CoA was incubated in the presence of acyl-CoA synthetase. In the other, the adduct was synthesised in the absence of the enzyme. We aimed to determine whether the structural and inhibitory properties of the C75-CoA adducts depended on the presence of acyl-CoA synthetase in their synthesis. Two analytical tests were applied. First, a comparative mass/mass spectroscopy analysis showed that the C75-CoA synthesised in the presence of the enzyme (Supplemental Fig. S1) had the same ion fragmentation profile as that synthesised in the absence of the enzyme (data not shown). Second, we assayed their capacity to inhibit CPT1, obtaining identical results for both adducts (Fig. 1D). We conclude that the two adducts synthesised in the presence or absence of the enzyme have identical structure and properties.

3.2. Effect of C75 and C75-CoA on CPT1 activity

To examine the controversial effect of C75 on CPT1 activity we incubated yeast mitochondria with increased concentrations of C75 (Fig. 2A). The results reported indicate that free C75 alone is neither an activator nor an inhibitor of CPT1. We also

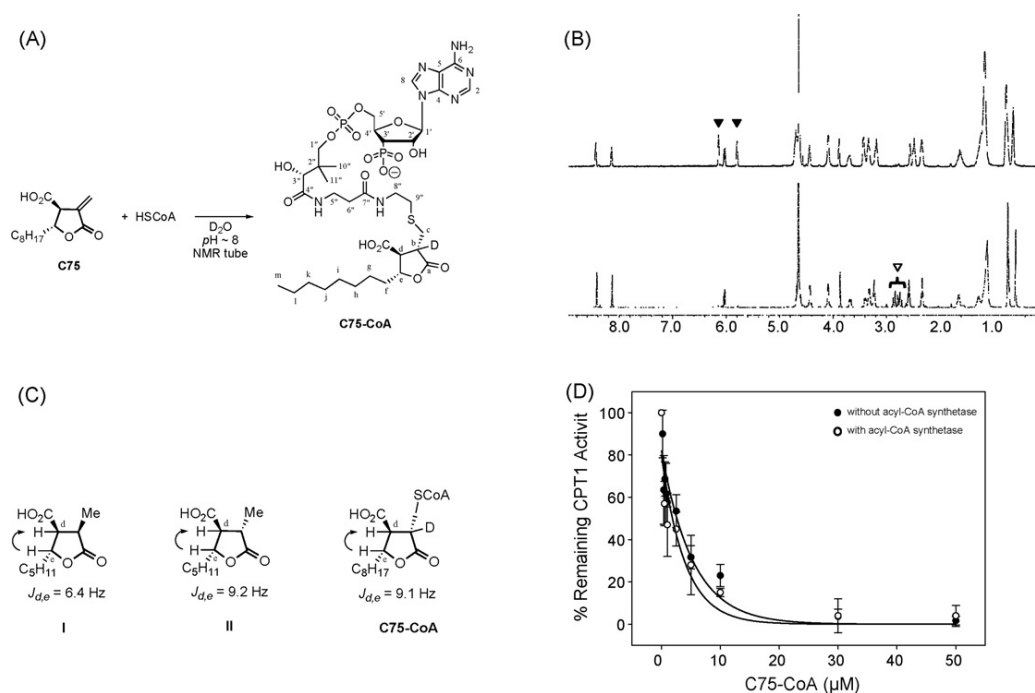


Fig. 1 – NMR structural studies. (A) Incubation of a ~1:1 mixture of C75 and CoA in D₂O (with 10% of DMSO-d₆ in order to increase the solubility of C75). Peaks assigned to the methylene group (black triangles), peaks assigned to the saturated methylene groups (white triangles). **(B)** ¹H NMR (300 MHz) of a ~1:1 mixture of C75 and CoA in D₂O at pH ~8 at time 0 min (upper panel) and ¹H NMR (400 MHz) of a ~1:1 mixture of C75 and CoA in D₂O at pH ~8 after 30 min (lower panel). **(C)** Comparison of coupling constants (J) of C75-CoA adduct lactone ring with those reported early for related compounds I and II. **(D)** Comparison between the CPT1 inhibitory properties of C75-CoA synthesized in absence (●) and in presence (○) of acyl-CoA synthetase.

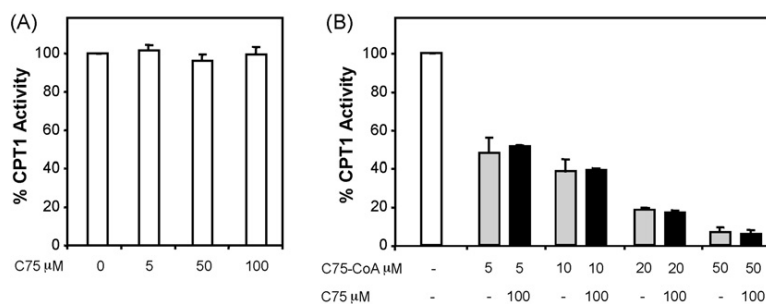


Fig. 2 – CPT1A wt overexpressed in yeast is inhibited by C75-CoA in presence of C75. (A) Mitochondrial fractions from yeast overexpression CPT1A wt were preincubated for 5 min with increasing concentrations of C75 and activity was measured. **(B)** Comparative CPT1A wt activity of mitochondrial fractions from yeast, incubated with increasing concentrations of C75-CoA and in presence or absence of a fixed concentration of C75 (100 μM). Data are represented as a percentage of the control value in the presence of DMSO and the results are the average of three independent experiments.

performed kinetic inhibitory experiments in which, in addition to increasing concentrations of C75-CoA, a fixed concentration of C75 (100 μM) was added to the mixture. CPT1 inhibition was not counteracted by the fixed amount of free C75 at any concentration of C75-CoA. In other words, even at the highest C75 concentrations, the free product did not overcome the inhibition by C75-CoA (Fig. 2B).

3.3. Inhibitory effects of C75-CoA on yeast-expressed mutated CPT1A and CrAT

To examine the structural requirements of the interaction between C75-CoA and CPT1 we carried out C75-CoA inhibitory experiments where we used specific acyltransferase mutants. We used CrAT D356A/M564G, which has a deep hydrophobic

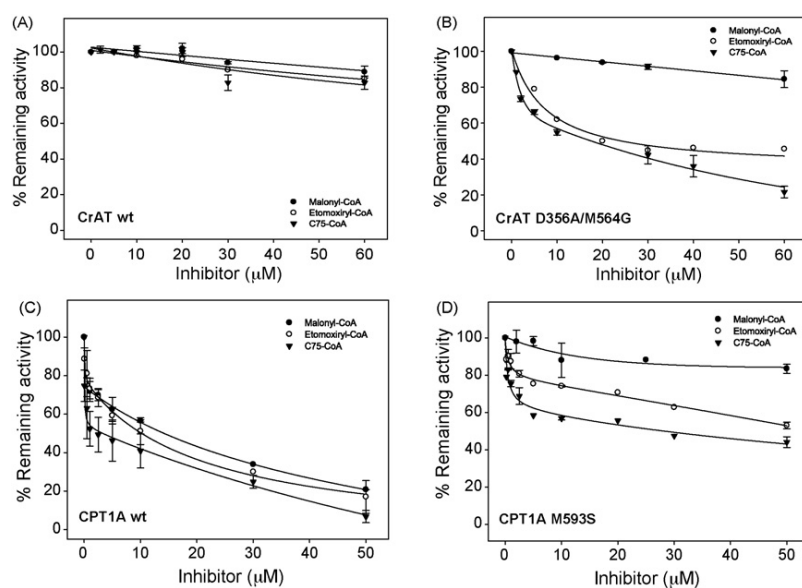


Fig. 3 – Effects of malonyl-CoA, etomoxiryl-CoA and C75-CoA on the activity of yeast-expressed wt CPT1A and CrAT, and the point mutants CPT1A M593S and CrAT D356A/M564G. Mitochondrial extracts from yeast expressing (A) CrAT wt, (C) CPT1A wt, and point mutants (B) CrAT D356A/M564G and (D) CPT1A M593S, were preincubated with increasing concentrations of malonyl-CoA (●), etomoxiryl-CoA (○) and C75-CoA (▼). Carnitine acyltransferase activity was measured, and data are expressed relative to control values in the absence of drugs (100%) as the mean of at least two independent experiments.

pocket for the binding of LCFA-CoAs instead of short acyl-CoAs and behaves like CPT1A in terms of acyl-CoA specificity [15]. We also used CPT1A M593S, which is active but insensitive to malonyl-CoA inhibition [13]. Experiments with etomoxiryl-CoA, a pharmacological inhibitor of CPT1, and malonyl-CoA, its physiological inhibitor, were carried out as controls.

C75-CoA and etomoxiryl-CoA inhibited CrAT D356A/M564G but had little effect on CrAT wt (Fig. 3A and B). At 60 μM of C75-CoA, the remaining CrAT activity was 83% for CrAT wt, and only 21% of the original level for CrAT D356A/M564G. For etomoxiryl-CoA, at a concentration of 60 μM, the remaining activity was 86% for CrAT wt, and 46% for the CrAT mutant. These results indicate that CrAT wt is insensitive to these drugs because the long aliphatic chain of C75-CoA and etomoxiryl-CoA does not fit in the shallow cavity of the wt enzyme, where only the acyl group of short-chain acyl-CoAs such as acetyl- and butyryl-CoA can enter. However, when this cavity was open and accessible to longer acyl-CoAs, as in the CrAT D356A/M564G mutant, the enzyme became sensitive to these inhibitors. In contrast, malonyl-CoA had little effect on mutant or wt CrAT (Fig. 3A and B). These results show that CrAT D356A/M564G, like the wt enzyme, does not contain the structural determinants needed for the initial interaction with malonyl-CoA and enzyme inhibition.

Next we compared the inhibitory effect of C75-CoA on CPT1A wt and CPT1A M593S. At 50 μM of C75-CoA, the remaining activity of the M593S mutant was about 45% of the original level (Fig. 3D), whereas the activity of the CPT1A wt was almost abolished (Fig. 3C). A similar effect was observed with etomoxiryl-CoA. Malonyl-CoA, as expected, inhibited CPT1A wt while the activity of the malonyl-CoA-insensitive CPT1A M593S was unaffected. The IC_{50} for C75-CoA

and CPT1A M593S was 108-fold higher than that for CPT1A wt (25.9 μM vs. 0.24 μM). In the case of etomoxiryl-CoA the IC_{50} increased 31-fold compared with the wt enzyme (168 μM vs. 4.1 μM). This indicates that CPT1A inhibitors in addition to fitting in the hydrophobic pocket also need to interact with the malonyl-CoA site of CPT1A to produce potent inhibition.

3.4. Molecular model of docking of C75-CoA into CPT1A wt, and CrAT D356A/M564G

Since CPT1 has not yet been crystallized, we do not know the location of C75-CoA in the CPT1 crystal. Therefore, we used computational docking methods to identify a putative location of C75-CoA molecule in the 3D models of the catalytic core of CPT1A wt and of CrAT D356A/M564G. The model locates the C75-CoA molecule (Fig. 4A) in CPT1A wt in a position that coincides with the site of palmitoyl-CoA substrate [32], thus introducing the aliphatic chain into the hydrophobic cavity in the protein active centre. The carboxyl group in the head of the C75-CoA molecule is positioned at the equivalent locus for the carnitine substrate in the CPT1A wt models, partially filling it. This indicates that this inhibitor could hamper the correct positioning of the carnitine substrate. Moreover, the head of C75-CoA is also located near the catalytic His residue (His⁴⁷³), which would impair the catalytic activity of CPT1A. The position of the carboxyl group on C75-CoA (Fig. 4A) is similar to that proposed for the dicarbonyl moiety of malonyl-CoA on CPT1A [32], which thus interferes with the correct positioning of carnitine substrate (Fig. 4C). This shared mode of action could be explained in part by the presence of a carboxyl group in carnitine, C75-CoA and malonyl-CoA molecules (Fig. 4D), putatively located in the active centre of the enzyme.

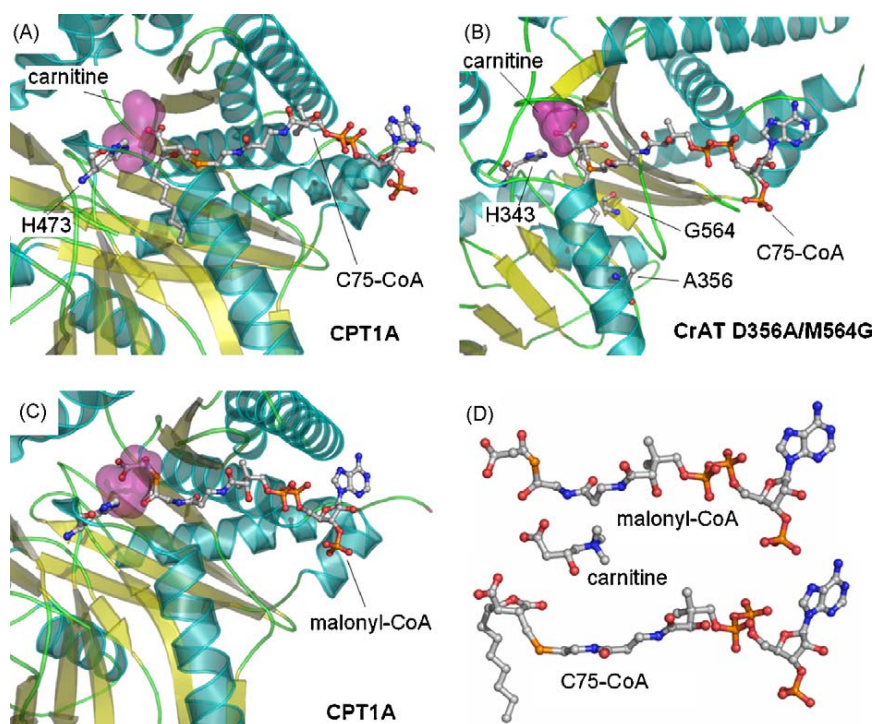


Fig. 4 – *In silico* docking of inhibitors to 3D models for the active centres of wt CPT1A and CrAT D356A/M564G mutant. (A) Predicted docked solution for C75-CoA molecule in the active centre of wt CPT1A. Location of catalytic residue His⁴⁷³ is indicated. Carboxylate group of C75-CoA partially occupies the volume corresponding to the carnitine substrate molecule (magenta). (B) Putative position for C75-CoA docking solution for C75-CoA in the active centre of CrAT D356A/M564G. The aliphatic chain of the inhibitor is located in the tunnel opened by mutated residues A356 and G564. The carboxylate group of C75-CoA is placed in the carnitine locus (magenta). Location of catalytic His³⁴³ is also indicated. (C) Docking of malonyl-CoA on CPT1A wt showing a similar positioning to C75-CoA, locating the dicarbonyl moiety in the space usually occupied by carnitine. (D) Molecular structures of malonyl-CoA, carnitine and C75-CoA, showing a similar arrangement of their corresponding carboxyl groups. Molecular representations were performed using PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos CA).

An analogous model was constructed for the location of C75 in CrAT D356A/M564G mutant structure. The position of the C75 aliphatic chain moiety is similar to that proposed for stearyl-CoA in the same enzyme derivative [15], in which the hydrocarbon chain is located in the cavity that opens up when Asp³⁵⁶ and Met⁵⁶⁴ are replaced by Ala and Gly, respectively (Fig. 4B). The carboxyl group at the head of C75 is located in the carnitine locus, close to the catalytic His³⁴³ residue as mentioned above for CPT1A.

3.5. C75 is converted to C75-CoA in rat hypothalamus

Since C75 has been proposed as a regulator of food intake through its action on the hypothalamus, we examined whether C75-CoA is produced in the hypothalamus following direct injection of C75. We injected 7.6, 15.2 and 30.4 μ g of C75 in the arcuate (ARC) nucleus by stereotaxic surgery. Thirty minutes after injection the rats were killed and acyl-CoAs, including C75-CoA, were extracted from the hypothalamus. Analysis of the samples by LC-MS/MS showed a peak corresponding to C75-CoA (Fig. 5). The production of C75-CoA increased with the amount of C75 injected. Considering that in our conditions the average weight of the rat

hypothalamus was 50 mg, the concentrations of C75-CoA produced in the hypothalamus after an injection of 7.6, 15.2 and 30.4 μ g of C75 were 3.7, 15.9 and 25.1 nmol/g tissue, respectively.

3.6. Central nervous system administration of C75 inhibits CPT1 activity and decreases food intake and body weight

Having demonstrated the conversion of C75 into C75-CoA in the rat hypothalamus, we then studied the effect of a stereotaxic microinjection of C75 into the rat ARC nucleus on CPT1 activity. Hypothalamic mitochondrial fractions from rats injected with 16.8 μ g of C75 were assayed for CPT1 activity and the value was compared to hypothalamic mitochondrial fractions from rats injected with RPMI medium. Activity was decreased by 46% in C75-treated rats (Fig. 6A).

Next we administered C75 in the lateral cerebral ventricle of the rat and measured food intake and body weight. Consistent with previous results [2–5], C75 produced a decrease in food intake and body weight (Fig. 6B and C). The anorectic action of etomoxir was seen at a later point (22 h).

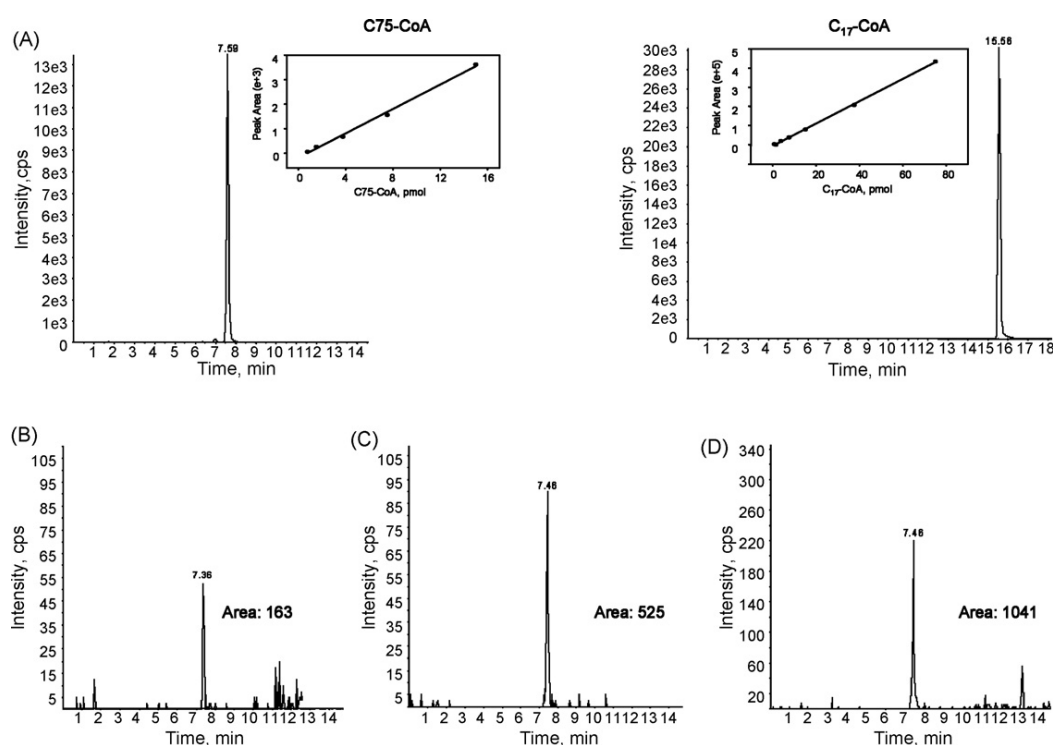


Fig. 5 – Analysis of the C75-CoA levels after hypothalamic C75 injections. (A) LC-MS/MS representative chromatograms of C75-CoA and C₁₇-CoA. Five concentrations of C75-CoA: 50, 100, 250, 500 and 1000 nM and seven concentrations of C₁₇-CoA: 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 and 5000 nM were injected and the areas below the resulting peaks were calculated. The calibration curves are shown in insets. Representative LC chromatograms for C75-CoA obtained from rat hypothalamus after the injection in the hypothalamic ARC nucleus of 2 μ L of C75 at various concentrations: (B) 15 mM, (C) 30 mM and (D) 60 mM. 30 min after injection rats were decapitated, and the hypothalamus was excised, immediately frozen and stored at -80°C . Acyl-CoAs were extracted as described in Experimental Procedures, and C₁₇-CoA was used as internal standard. Peak areas are shown in arbitrary units.

4. Discussion

Energy balance is monitored by the hypothalamus, where inhibitors of FAS have been described to suppress food intake [40,41]. C75 acts on fatty-acid metabolism by inhibiting FAS activity. Inhibition of FAS produces accumulation of malonyl-CoA, which, as a physiological inhibitor of CPT1, prevents the oxidation of newly synthesized fatty acids. Moreover, C75 may activate CPT1 [2,18]. The effect of C75 on FAS is difficult to reconcile with the C75-activation of CPT1 as they have opposite effects: inhibition by malonyl-CoA and direct activation of CPT1. The simultaneous activation and inhibition of CPT1 by C75 appears paradoxical, and it has not been addressed satisfactorily. Kuhajda et al. suggested that C75 could modulate the inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPK) which would lead to an increase in acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity and a subsequent increase in malonyl-CoA levels [42]. This does not solve the paradox, since there would be an increase in malonyl-CoA (putatively inhibiting CPT1 activity) and a simultaneous activation of CPT1 produced by C75 itself (Fig. 7).

Here we attempt to explain the anorectic effects of C75 in terms of its inhibitory action on CPT1. Inhibition of CPT1 could prevent the oxidation of fatty acids of the ARC nucleus in the

hypothalamus leading to a local accumulation of LCFA-CoAs. The increase in LCFA-CoA is a central signal of 'nutrient abundance' which in turn activates a chain of neuronal events, via up-regulation of anorexigenic genes and down regulation of orexigenic genes, that would promote a switch in fuel sources from carbohydrates to lipids and limit food intake [8]. The detailed mechanism of this up- or down-regulation has not been addressed yet. Likewise, central administration of fatty acid suppresses food intake. Here we demonstrated that C75 is transformed into C75-CoA in the hypothalamus where it inhibits CPT1 activity. We propose that this direct effect *in vivo* of C75-CoA on CPT1 would explain by itself the inhibition of CPT1 activity. However, FAS could be inhibited by C75 in the hypothalamus. Therefore, malonyl-CoA could be in excess, inhibiting CPT1, together with C75-CoA. The anorectic effects of C75 are similar to those produced by other CPT1 inhibitors such as ST1326 and tetradecylglycidic acid, and to those of a riboprobe that specifically cleaves CPT1A mRNA [8]. The CPT1 inhibitor etomoxir also decreased feeding and reduced body weight in rats supporting those previous results [8].

It was important to discern whether C75 was an inhibitor or an activator of CPT1. Our results indicate that C75 is neither an activator nor an inhibitor of CPT1 when incubated with

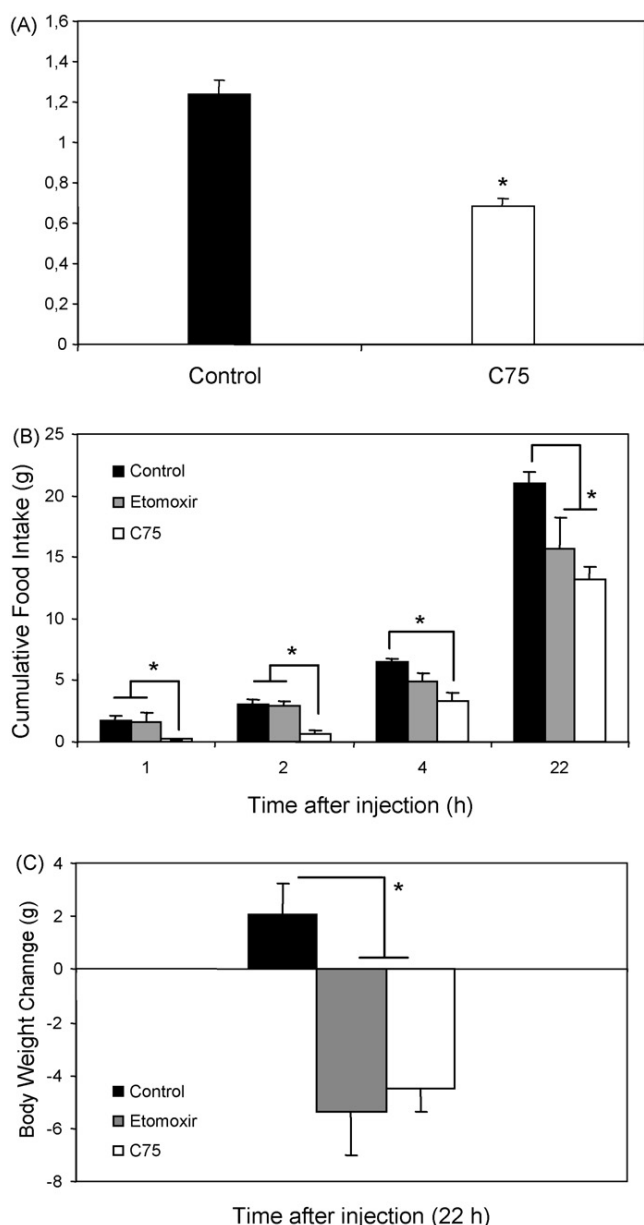


Fig. 6 – Central nervous system administration of C75 inhibits CPT1 activity and decreases food intake and body weight. (A) Determination of CPT1 activity after the injection of C75 in ARC nucleus. Control injections ($n = 3$; 2 μL of RPMI 1640 medium as a control, black bar). C75 injections ($n = 3$; 2 μL of C75 33 mM in RPMI 1640 medium, white bar). (B) Food intake measured in rats at 1, 2, 4 and 22 h after i.c.v. injection of C75 (white bars), etomoxir (grey bars) and control (RPMI medium, black bars). $n = 5$. (C) Body weight measured in rats at 22 h after i.c.v. injection of C75 (white bar), etomoxir (grey bar) and control (RPMI medium, black bar). $n = 5$. * $P < 0.05$.

yeast-expressed CPT1A. C75 did not overcome the inhibition caused by C75-CoA. This agrees with the observed net effect of inhibition of CPT1 activity. Results shown here and elsewhere [19] demonstrate that C75-CoA inhibits CPT1A *in*

vitro more strongly than etomoxiryl-CoA (IC_{50} values are 0.24 μM and 4.1 μM , respectively).

The finding that C75 forms a CoA adduct before it can inhibit CPT1 is reminiscent of the case of etomoxir. McGarry and co-workers [43,44] showed that the CPT1 inhibitory molecules were neither tetradecylglycidic acid nor etomoxir themselves, but rather their CoA esters produced in the presence of acyl-CoA synthetase. The CoA group may direct and fix the drug molecule in the cavities of CPT1, as it does with the natural physiological inhibitor malonyl-CoA and with the substrate palmitoyl-CoA. The synthesis of C75-CoA is produced stereo specifically through the electrophilic methylene group of C75. Moreover, our finding that C75-CoA is produced in absence of acyl-CoA synthetase indicated that it could be synthesised in the hypothalamus, irrespective of whether it is expressed in hypothalamic neurons.

Our results indicate that C75-CoA is formed in the hypothalamus following stereotaxic injection of C75. Inhibition of hypothalamic CPT1 by C75-CoA *in vivo*, as seen in our experiments, is independent of the putative inhibition by malonyl-CoA, which may be formed after the action of C75 either on FAS or on AMPK. Hypothalamic CPT1 activity was determined in twice-washed mitochondria. Therefore, malonyl-CoA was unlikely to remain within CPT1, as this metabolite leaves CPT1 freely when mitochondria are washed. In contrast, C75-CoA, as it is a tight-binding inhibitor, remains bound to the enzyme after washing, which means that its inhibition is persistent [19]. Hence, C75-CoA not only inhibits CPT1 *in vitro*, but it also inhibits CPT1 activity in the hypothalamus after C75 has been converted to its CoA derivative.

That C75-CoA is an inhibitor of CPT1A is also supported by the docking analysis of the CPT1A model. Comparison of computer-calculated docking models shows that CoA is bound at the same site, whether it belongs to C75-CoA or malonyl-CoA, or palmitoyl-CoA. The carboxylic acid bound to the lactone of C75 protrudes into the carnitine site. The inhibitory mechanism of C75-CoA resembles that observed for malonyl-CoA (Fig. 4C) [32]. Several authors reported the competition between malonyl-CoA and carnitine [45,46]. The carboxylate group of malonyl-CoA and C75-CoA may partially mimic the interaction between the enzyme and the carboxylate group of carnitine, thus preventing the positioning of this substrate and inhibiting the catalytic activity of the enzyme. Several authors [47,48] suggest that the presence of two carbonyl groups in close juxtaposition in the malonyl-CoA molecule might be responsible for the interaction and the inhibitory effect on CPT1A. Because C75-CoA also has these two carbonyl groups, it may behave like malonyl-CoA. Indeed the docking models show that C75-CoA could bind to the malonyl-CoA site of the enzyme [32].

Moreover, the hydrocarbon chain of C75 is located at the same site as the hydrocarbon long-chain of palmitic acid. The kinetic experiments of inhibition of C75-CoA against palmitoyl-CoA [19] are confirmed by the docking studies, and both support the notion that C75-CoA is a strong inhibitor of CPT1A.

To assess the involvement of the hydrocarbon chain of C75-CoA positioning in the acyl group binding pocket, we carried

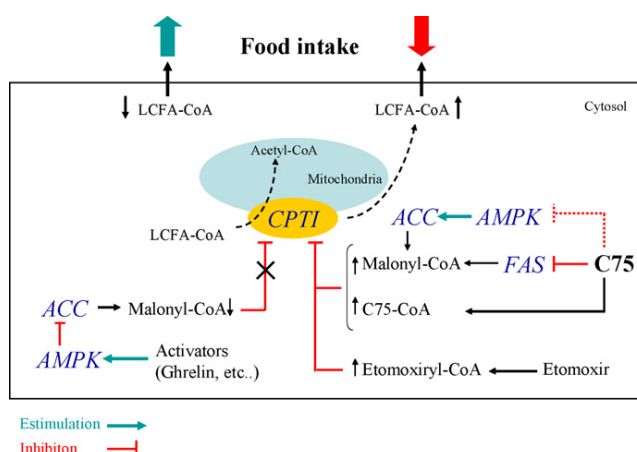


Fig. 7 – Model of action of C75 on hypothalamic fatty-acid metabolism. Energy balance is monitored by the hypothalamus. The accumulation of malonyl-CoA due to FAS-inhibition by C75 leads to a reduction in CPT1 activity. This would increase the cytosolic pool of LCFA-CoA and thus a decrease of food intake. In addition, C75 has been suggested to inhibit AMPK resulting in an activation of ACC and consequent increase of malonyl-CoA levels [42]. Here we have shown that C75 is converted into C75-CoA in the hypothalamus contributing to the direct inhibition of CPT1. Our experiments also demonstrate that other CPT1 inhibitors such as etomoxir produce similar effects decreasing food intake. On the other hand, AMPK-activators such as ghrelin [49] lead to ACC inactivation reducing malonyl-CoA levels and CPT1 inhibition. Thus, increased β -oxidation produces a reduction on LCFA-CoAs promoting food intake.

out C75-CoA inhibitory experiments with the new mutated protein, CrAT D356A/M564G. This protein has a deep hydrophobic pocket for the binding of long-chain instead of short-chain acyl-CoAs and shows CPT1-like behaviour in terms of acyl-CoA specificity, although unlike CPT1A, it is not inhibited by malonyl-CoA [15]. The inhibition by C75-CoA of the mutant CrAT D356A/M564G suggests that C75-CoA fits in the large hydrophobic pocket of this enzyme, as in CPT1A wt, and that the presence of this pocket is necessary for C75-CoA inhibition. However, CrAT D356A/M564G is not as sensitive as CPT1A wt to C75-CoA, since the IC_{50} for C75-CoA acting on CPT1A wt is 50-fold lower than that observed for the CrAT double mutant. These results indicate that factors other than the presence of a hydrophobic pocket contribute to the inhibitory potency of C75-CoA toward CPT1. CPT1A M593S, which is insensitive to malonyl-CoA inhibition, shows limited sensitivity towards C75-CoA, but its IC_{50} for C75-CoA is similar to that of CrAT double mutant (25.9 μ M vs. 12.8 μ M, respectively). Therefore, the lack of a “malonyl-CoA-like” interaction between CrAT double mutant or CPT1A M593S and the carbonyl groups in the polar head of C75-CoA might explain their limited sensitivity to the inhibitor.

We conclude that C75 is converted into C75-CoA and that it strongly inhibits CPT1 *in vitro* and *in vivo*. Docking and kinetic analysis revealed the molecular basis by which C75-CoA interacts with the enzyme and its substrates. We also show that C75-CoA is formed *in vivo* in the hypothalamus, where it inhibits CPT1. Here the inhibition of CPT1 could alter fatty-acid oxidation, thus putatively promoting down-regulation of orexigenic genes and up-regulation of anorexigenic genes, which induces restriction in food intake. These results point to the potential use of drugs to inhibit

CPT1 activity, and control food intake in the treatment of obesity and diabetes.

Acknowledgements

We thank Jeus Perez-Clausell from the Department of Cell Biology, School of Biology, University of Barcelona, Felipe Casanueva's group from the Department of Molecular Endocrinology and Carlos Diéguez's group from the Department of Physiology, School of Medicine, University of Santiago de Compostela for their support in stereotaxis experiments, to Olga Jauregui from the Scientific-Technical Services of the University of Barcelona for her technical assistance in the LC-MS/MS analysis. We also thank Biomol-Informatics SL (<http://www.biomol-informatics.com>) for bioinformatics consulting. This study was supported by Grant SAF2007-61926 and by grant CTQ2006-13249 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain; by grant C3/08 from the Fondo de Investigación Sanitaria of the Instituto de Salud Carlos III; by the Activities Program among R&D groups of the Comunidad de Madrid in Biosciences (S-BIO-0260/2006-COMBACT) and by the Ajud de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (2005SGR-00733), Spain. Financial support of “Fundación Ramón Areces” to CBMSO is also acknowledged. A.G.C. and D.S. were recipients of fellowships from the University of Barcelona, and A.B. and C.G. from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bcp.2008.11.020](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.020).

REFERENCES

- [1] Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3450–4.
- [2] Thupari JN, Landree LE, Ronnett GV, Kuhajda FP. C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9498–502.
- [3] Thupari JN, Kim EK, Moran TH, Ronnett GV, Kuhajda FP. Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E97–104.
- [4] Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, McOsker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* 2002;51:3196–201.
- [5] Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1921–5.
- [6] Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, et al. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 2000;288:2379–81.
- [7] Hu Z, Cha SH, Chohann S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12624–9.
- [8] Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 2003;9:756–61.
- [9] McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1–14.
- [10] Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem* 1996;271:6972–7.
- [11] Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, et al. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* 2002;80:433–42.
- [12] Sierra AY, Gratacos E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, et al. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* 2008;283:6878–85.
- [13] Morillas M, Gomez-Puertas P, Bentebibel A, Selles E, Casals N, Valencia A, et al. Identification of conserved amino acid residues in rat liver carnitine palmitoyltransferase I critical for malonyl-CoA inhibition. Mutation of methionine 593 abolishes malonyl-CoA inhibition. *J Biol Chem* 2003;278:9058–63.
- [14] Cordente AG, Lopez-Vinas E, Vazquez MI, Swiegers JH, Pretorius IS, Gomez-Puertas P, et al. Redesign of carnitine acetyltransferase specificity by protein engineering. *J Biol Chem* 2004;279:33899–908.
- [15] Cordente AG, Lopez-Vinas E, Vazquez MI, Gomez-Puertas P, Asins G, Serra D, et al. Mutagenesis of specific amino acids converts carnitine acetyltransferase into carnitine palmitoyltransferase. *Biochemistry* 2006;45:6133–41.
- [16] Nicot C, Napal L, Relat J, Gonzalez S, Llebaria A, Woldegiorgis G, et al. C75 activates malonyl-CoA sensitive and insensitive components of the CPT system. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:660–4.
- [17] Aja S, Bi S, Knipp SB, McFadden JM, Ronnett GV, Kuhajda FP, et al. Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R148–54.
- [18] Aja S, Landree LE, Kleman AM, Medghalchi SM, Vadlamudi A, McFadden JM, et al. Pharmacological stimulation of brain carnitine palmitoyl-transferase-1 decreases food intake and body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R352–61.
- [19] Bentebibel A, Sebastian D, Herrero L, Lopez-Vinas E, Serra D, Asins G, et al. Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation. *Biochemistry* 2006;45:4339–50.
- [20] Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, et al. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 2006;55:1327–36.
- [21] Golovko MY, Murphy EJ. An improved method for tissue long-chain acyl-CoA extraction and analysis. *J Lipid Res* 2004;45:1777–82.
- [22] Zierz S, Engel AG. Different sites of inhibition of carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA, and by acetyl-CoA and CoA, in human skeletal muscle. *Biochem J* 1987;245:205–9.
- [23] Hassett RP, Crockett EL. Endpoint fluorometric assays for determining activities of carnitine palmitoyltransferase and citrate synthase. *Anal Biochem* 2000;287:176–9.
- [24] Morillas M, Gomez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, et al. Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem* 2001;276:45001–8.
- [25] Swiegers JH, Dippenaar N, Pretorius IS, Bauer FF. Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain. *Yeast* 2001;18:585–95.
- [26] Rickwood D, Graham JM. Subcellular fractionation: a practical approach. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1997.
- [27] Wu D, Govindasamy L, Lian W, Gu Y, Kukar T, Agbandje-McKenna M, et al. Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer. *J Biol Chem* 2003;278:13159–65.
- [28] Jogl G, Tong L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell* 2003;112:113–22.
- [29] Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity. *J Biol Chem* 2005;280:738–44.
- [30] Hsiao YS, Jogl G, Esser V, Tong L. Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:974–80.
- [31] Morillas M, Lopez VE, Valencia A, Serra D, Gomez-Puertas P, Hegardt FG, et al. Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal. *Biochem J* 2004;379:777–84.
- [32] Lopez-Vinas E, Bentebibel A, Gurunathan C, Morillas M, de Arriaga D, Serra D, et al. Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem* 2007;282:18212–24.
- [33] Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. *Nature* 1996;381:272.
- [34] Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 1990;8:52–6. 29.

- [35] Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* 1996;9:1–5.
- [36] Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714–23.
- [37] d'Ordine R, Paneth P, Anderson VE. ¹³C NMR and ¹H-¹H NOEs of Coenzyme-A: conformation of the pantoic acid moiety. *Bioorg Chem* 1995;23:169–81.
- [38] Amador M, Ariza X, García J. A versatile stereoselective approach to paraconic acids. *Heterocycles* 2006;705–20.
- [39] Ariza X, García J, López M, Montserrat L. A concise synthesis of (-)-methylenoactocin and (-)-phaseolinic acid from (6S,9S)-tetradec-7-yne-6,9-diol. *Synlett* 2001;120–2.
- [40] Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD. Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:66–71.
- [41] Lane MD, Wolfgang M, Cha SH, Dai Y. Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(Suppl. 4):S49–54.
- [42] Kuhajda FP, Landree LE, Ronnett GV. The connections between C75 and obesity drug-target pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:541–4.
- [43] Weis BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD. Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J Biol Chem* 1994;269:26443–8.
- [44] Declercq PE, Falck JR, Kuwajima M, Tyminski H, Foster DW, McGarry JD. Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. I. Use of inhibitors. *J Biol Chem* 1987;262:9812–21.
- [45] McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 1983;214:21–8.
- [46] Bird MI, Saggerson ED. Interacting effects of L-carnitine and malonyl-CoA on rat liver carnitine palmitoyltransferase. *Biochem J* 1985;230:161–7.
- [47] Cook GA, Mynatt RL, Kashfi K. Yonetani-Theorell analysis of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I inhibition indicates two distinct inhibitory binding sites. *J Biol Chem* 1994;269:8803–7.
- [48] Kashfi K, Mynatt RL, Cook GA. Hepatic carnitine palmitoyltransferase-I has two independent inhibitory binding sites for regulation of fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1994;1212:245–52.
- [49] Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, et al. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 2008;7:389–99.