



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL
RECEPTOR GPR55 EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y
METABÓLICA**

Tesis Doctoral

Adenis Ibett Díaz Arteaga

Octubre 2012



DEPARTAMENTO DE FISIOLOXIA

Prof. Dr. Carlos Diéguez González, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dr. Rubén Nogueiras Pozo, Investigador del Programa Ramón y Cajal de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican que:

La presente Tesis Doctoral titulada **“Regulación de la expresión y función del receptor GPR55 en la homeostasis energética y metabólica”**, fue realizada por Adenis Ibett Díaz Arteaga, bajo su dirección en los Laboratorios del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela 2012.

Fdo.: Prof. Dr. Carlos Diéguez González

Fdo.: Dr. Rubén Nogueiras Pozo

Fdo.: Adenis Ibett Díaz Arteaga

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	19
1. HOMEOSTASIS ENERGETICA Y OBESIDAD	19
1.1. Homeostasis energética.....	19
1.2. Obesidad	21
2. REGULACIÓN DE LA INGESTA	22
2.1. Señales periféricas.....	23
2.1.1. Hormonas del tejido adiposo	23
• Leptina	23
• Adiponectina	24
• Resistina (RSTN).....	25
• Interlukinas (IL-6 e IL-1).....	26
• Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).....	27
2.1.2. Señales del tracto gastrointestinal que regulan la ingesta	27
• Ghrelin	27
• Colecistoquinina (CCK)	28
• GLP-1 (Glucagón-like-peptide)	30
• Péptido YY (PYY)	30
2.1.3. Hormonas pancreáticas.....	32
• Insulina	32
• Polipéptido pancreático (PP).....	32
2.2. Señales del Sistema Nervioso Central	33
2.2.1. Núcleos hipotalámicos y señales de adiposidad	34
• Núcleo arcuato	34
• Núcleo ventromedial	35
• Hipotálamo lateral.....	36
• Núcleo paraventricular	37
• Núcleo dorsomedial	37
2.2.2. Señales de recompensa	38
3. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	39

3.1. Uso terapéutico del cannabis.....	39
3.2. Orígenes del Sistema Endocannabionide.....	39
3.3 Localización y características farmacológicas de los EC.....	42
3.4. Biosíntesis y metabolismo de los EC	42
3.5. Ligandos y Receptores.....	43
3.5.1. Receptor Cannabinoide CB1	44
3.5.2 Receptor Cannabinoide CB2	47
3.6. Agonistas.....	48
3.7. Antagonistas.....	49
3.8. SEC: adipogénesis y lipogénesis	52
3.9. SEC: Obesidad, hiperglicemia y diabetes en animales y humanos	52
3.9.1. Modelos animales.....	53
3.9.2. Estudios en humanos.....	56
4. RECEPTOR HUÉRFANO GPR55 (Receptor acoplado a proteínas G-55)	58
4.1. Localización de GPR55.....	60
4.2. Farmacología de GPR55	61
4.3. Funciones de GPR55.....	63
OBJETIVOS	67
OBJETIVO GENERAL.....	67
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	67
MATERIAL Y METODOS	69
1. Animales de Experimentación.....	69
1.1. MODELOS ANIMALES	69
1.1.1. Rata Sprague-Dawley.....	69
1.1.2. Ratas Lewis enanas (dwarf).....	70
1.1.3. Ratón knock-out de Leptina ob/ob.....	70
1.1.4. Ratón knockout para GPR55.....	70
2. TECNICAS EXPERIMENTALES	71
2.1. Administración de la anestesia	71
2.2. Implantación cánula i.c.v. para tratamiento agudo	72

2.3. Colocación de bombas osmóticas para tratamiento crónico.....	72
3. MODELOS EXPERIMENTALES.....	73
3.1. Modelos experimentales in vivo	73
3.1.1. Desarrollo Postnatal y Dimorfismo sexual	73
3.1.2. Efecto hormonas gonadales.....	73
3.1.3. Ayuno	73
3.1.4. Ayuno y tratamiento con Leptina	74
3.1.5. Gestación	74
3.1.6. Restricción alimenticia crónica	74
3.1.7. Dieta alta/baja en grasas	75
3.1.8. Efecto de las hormonas Tiroideas.....	76
3.1.9. Adrenalectomía.....	76
4. TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS.....	77
4.1. Tratamientos con O-1602.....	77
4.1.1. Efectos metabólicos del tratamiento agudo con O-1602	77
4.1.2. Efectos metabólicos del tratamiento subcrónico con O-1602.....	77
4.1.3. Efectos metabólicos del tratamiento intraperitoneal agudo con O-1602 en ratones deficientes del gen GPR55	78
4.2. Tratamientos con LPI.....	79
4.2.1. Estudio periférico en ratones knockout de GPR55	79
4.2.2. Efectos metabólicos del tratamiento agudo con LPI	79
4.2.3. Efectos in vitro de la administración de O-1602 y LPI en una línea celular de roedores.....	80
4.2.3.1. Efecto de O-1602 en la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1	80
4.2.3.2. Efecto de O-1602 en la movilización intracelular de calcio ([Ca ²⁺] _i) en adipocitos 3T3-L1.....	81
4.2.3.3. Efecto de LPI en la diferenciación adipocitaria de células 3T3- L1	82
5. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA E HIGADO EN HUMANOS.....	82
• Pacientes y métodos	82
• Recolección de tejidos.....	83
5.1. Ensayos en sangre	84
5.2. Análisis de LPI	85

5.3. Experimentos ex-vivo usando explantes de tejido adiposo subcutáneo y visceral ..	87
5.4. Efecto de LPI sobre los niveles intracelulares de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en cultivos de adipocitos diferenciados	88
5.5. Extracción de ARN y PCR a tiempo real.....	89
6. TECNICAS EXPERIMENTALES	91
6.1. Extracción de ARN total.....	91
• Aislamiento del ARN.....	92
• Precipitación del ARN	92
• Lavado del ARN.....	92
6.1.1. Cuantificación del ARN.....	93
6.1.2. Retrotranscripción (RT)	93
6.1.3. PCR a tiempo real.....	94
6.1.4. Condiciones para la PCR en Tiempo Real con Sondas de Hidrólisis.....	95
6.1.5. Diseño de primers	95
6.2. Western Blot (WB)	100
6.2.1. Extracción de proteínas totales:	100
6.2.2. Electroforesis y Transferencia:.....	101
6.2.3. Inmunodetección	103
7. ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACIONES GRAFICAS.....	105
RESULTADOS	107
I. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA	107
1. Efecto del ayuno sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT	107
2. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT: ayuno, administración de leptina, restricción alimenticia y dieta.	108
3. Efecto de la gestación sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT	112
4. Efecto del desarrollo postnatal sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT	112
5. Efecto de alteraciones en función hipofisaria sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT: adrenalectomías, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento	114
6. Efecto de las gonadectomías sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT	116

II. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN HIGADO	118
1. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado: ayuno y administración de leptina	118
2. Efecto de la restricción alimenticia sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado	119
3. Efecto de la dieta sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado	119
4. Efecto del desarrollo postnatal sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado	120
5. Efecto de alteraciones en la función hipofisaria sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado	122
III. EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACION DE LIGANDOS DEL RECEPTOR GPR55: O-1602 vs LPI.....	123
1. Efectos de la administración aguda de O-1602.....	123
1.1. Administración aguda i.c.v., dosis y tiempo respuesta	123
1.2. Administración aguda i.p. dosis y tiempo respuesta	123
1.3. Efectos de la administración aguda central del O-1602 sobre neuropéptidos hipotalámicos	124
1.4. Administración aguda i.p. de O-1602 sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55	126
2. Efectos de la administración crónica de O-1602.....	127
2.1. Administración i.c.v crónica (7 días) de O-1602: Efectos sobre la ingesta, la composición corporal y el tejido adiposo blanco.....	127
2.2. Administración i.p crónica (7 días) de O-1602: Efectos sobre la ingesta, la composición corporal, parámetros metabólicos y el tejido adiposo blanco.	129
3. Efectos de O-1602 sobre adipocitos in vitro	134
IV. EFECTOS METABÓLICOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPI	136
1. Efectos de la administración aguda de LPI	136
1.1. Administración central i.c.v de LPI	136
1.2. Administración i.p. aguda de LPI	137
2. Administración i.p. crónica (7 días) de LPI. Efectos sobre la ingesta, la composición corporal y el tejido adiposo blanco	137
3. Efectos de LPI sobre células 3T3-L1 in vitro	138

4. Efectos de la administración aguda i.p. de LPI sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55	139
V. REGULACION DE GPR55, CB1 Y CB2 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE HUMANOS	140
1. Influencia de la obesidad sobre los niveles de expresión de ARNm de GPR55, CB1 y CB2 en tejido adiposo visceral y subcutáneo	142
2. Correlaciones para GPR55 y CB1 en tejido adiposo blanco con diferentes factores metabólicos	145
3. Expresión relativa de ARNm de GPR55 en adipocitos versus fracción vascular estromal	151
4. Niveles circulantes de LPI total.....	153
4.1. Niveles circulantes de LPI en sujetos delgados y obesos	153
4.2. Correlación de niveles circulantes de LPI en hombres y mujeres y diferentes factores metabólicos.....	155
5. Efectos de LPI sobre explantes de tejido adiposo de humanos: tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo	158
5.1. Tejido adiposo visceral	158
5.2. Tejido adiposo subcutáneo	160
6. Efectos de LPI sobre la movilización de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados de humanos	161
7. Efecto de LPI sobre adipocitos diferenciados de células 3T3-L1.....	163
VI. REGULACION DE GPR55 EN HIGADO DE HUMANOS	164
DISCUSION	167
I. ESTADO NUTRICIONAL Y EXPRESION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA	167
II. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN HIGADO	170
III. EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACION DE LIGANDOS PUTATIVOS DEL RECEPTOR GPR55: O-1602 vs LPI	173
IV. EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPI.....	176
V. REGULACION DE GPR55, CB1 Y CB2 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE HUMANOS	177
VI. . REGULACION DE GPR55 EN HIGADO DE HUMANOS.....	182

CONCLUSIONES 183

BIBLIOGRAFIA 185

ÍNDICE DE FIGURAS 209

ÍNDICE DE TABLAS 213

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
ABN-CBN	Receptor anormal de cannabidiol
ACC1	Acetil-CoA carboxilasa 1
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AdipoR1 y R2	Adiponectin receptor 1 y 2
Adr-β2, Adr-β3	Receptores adrenérgicos β1, β 2 y β3
ADX	Adrenalectomía
AEA	Anandamida
AgRP	Agouti related protein
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Area premotora
ARC	Núcleo Arcuato
ARNm	Acido desoxirribunucleico mensajero
BAT	Tejido Adiposo Pardo
BSX	<i>brain-specific homeobox</i>
<i>CaMK-CB1-KO mice</i>	Ratones mutantes condicionales <i>knockout</i> para CB1
CART	Transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CD14	<i>Monocyte differentiation antigen</i>
cDNA	Acido desoxirribunucleico codificado
CEBP-α y CEBP-β	<i>Enhancer-binding protein alpha & beta</i>
col – HDL	Niveles de lipoproteína de densidad alta
col – LDL	Niveles de lipoproteína de densidad baja
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase I

CRH	Corticotropina
CRP	<i>High sensitivity C-reactive protein</i>
DIO	Obesidad inducida por dieta
DMH	Núcleo dorsomedial
DPP-IV	Dipeptidil petidasa IV
DT2	Diabetes tipo 2
Dwarf	Ratas Lewis enanas
EC	Endocannabinoide
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FAS	Fatty acid synthasa
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FEV	<i>Fracción vascular estromal</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FPG	Concentración de glucosa plasmática en ayunas
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	<i>Growth hormone</i>
GLP-1	<i>Glucagón-like-peptide</i>
GLUT1 - GLUT4	<i>Glucose transporter 1 y 4</i>
GPCRs	Proteínas G
GPCRS	Receptor acoplado a proteínas G
GPR119	Receptor 119 acoplado a proteínas G
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteínas G
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	Dieta alta en grasas o <i>High Fat Diet</i>
HOMA-IR	Indice de resistencia a la insulina
HSL	Hormona sensible de lipasa

i.c.v	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IG	Intolerancia a la glucosa
IL-6 e IL-1	Interlukinas 6 y 1
IMC	Índice de Masa Corporal
LC ó HPLC-MS	Cromatografía Líquida - Espectrofotometría de Masas
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LFD	Dieta baja en grasa - <i>Low fat diet</i>
LH	Hormona luteinizante
LHA	Hipotálamo lateral
LPI	Lípido bioactivo L- α -lysophosphatidylinositol
LPL	Lipoprotein Lipase
MCH	Hormona concentradora de melanina
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MSH-α	Hormona estimulante de melanocitos alfa
NAc	Núcleo arcuato
NG	Normogluemia
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del tracto solitario
O-1602	Cannabinoide atípico que puede estimular a los receptores cannabinoides GPR55
OEA	Oleiletanolamida
OGTT	Test oral de tolerancia a la glucosa
CR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCREB	Phosphorylated cAMP (Adenosine 3'5' Cyclic Monophosphate)

PKA	Proteína kinasa A
POMC	Nroopiomelanocortina
PP	Nolipéptido pancreático
PPAR-γ	Peroxisoma proliferador-activado por receptor- γ
PVH	Núcleo paraventricular
PYY	Péptido YY
r.c.f.	Relative centrifugal force
rCB1	Receptor endocanabinoide tipo 1
rCB2	Receptor endocanabinoide tipo 2
RhoA	Ros homolog genefamily member A
RIO	Ensayo clínico Rimonabant en obesidad
RQ	Cociente respiratorio
RSTN	Resistina
SCD-1	<i>Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1</i>
SD	<i>Estándar diet</i> – dieta estándar
SEC	Sistema endocannabinoide
SHAM	Grupo control que no es sometido a una adrenalectomía
SNC	Sistema Nervioso Central
SR141716A	Antagonista específico de CB2
SREBP1	Factor de transcripción lipogénico
TGs	Triglicéridos
THC	Δ 9- Tetrahidrocannabinol
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAAK	<i>Potassium channel subfamily K member 4 (KCNK4)</i>
TREK-1	<i>Potassium channel subfamily K member 2 (KCNK2)</i>

TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TRPV1	Receptor vanilloide tipo 1
TSH	Hormona estimulante de la glándula tiroides
VMH	Núcleo ventromedial
VTA	Área tegmental ventral
WAT	Tejido Adiposo Blanco
WATg	Tejido Adiposo Blanco gonadal
WB	Western Blot

INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS ENERGETICA Y OBESIDAD

1.1. Homeostasis energética

La capacidad de ajustar los alimentos ingeridos en respuesta a las cambiantes necesidades de energía, es esencial para la supervivencia. Los avances recientes han proporcionado una visión de los mecanismos, moleculares, celulares y comportamentales vinculados a los cambios de almacenamiento de grasa en el cuerpo y a su adaptación al comportamiento alimenticio. La importancia fisiológica de este sistema de control homeostático radica en que la obesidad puede ser el resultado de una disfunción severa en cualquiera de estos mecanismos (Morton *et al.*, 2006)

Parece fácil elegir qué alimentos son más apetitosos y cuáles no, pero la manera cómo el sistema nervioso central procesa esta información es compleja, dado que además del sustrato genético, señales cognitivas, visuales y olfativas también están implicadas. (Morton *et al.*, 2006).

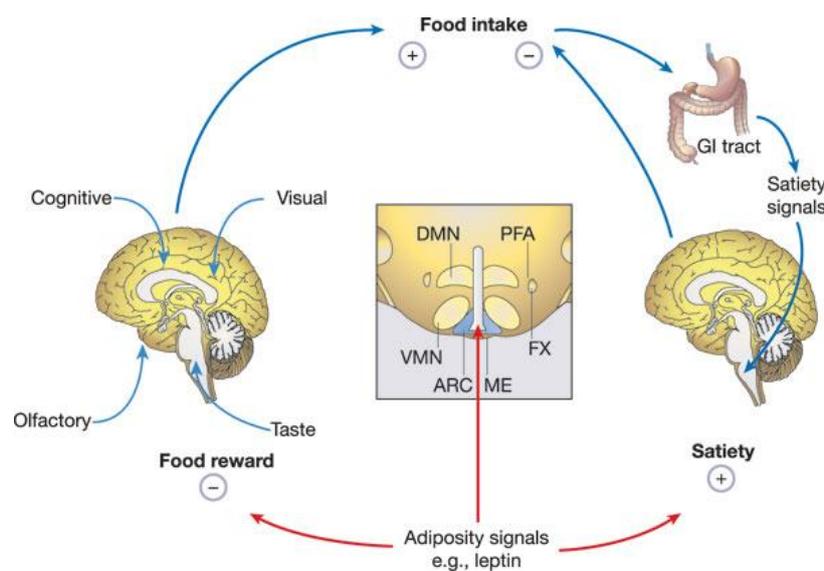


Figura 1. Modelo para la regulación de retroalimentación negativa de la ingesta de alimentos en respuesta a cambios en el contenido de grasa corporal (Morton *et al.*, 2006).

Los cambios en la energía requerida son otro factor que influye en el consumo de alimentos. Este proceso conocido con el nombre de homeóstasis energética tiene la finalidad de regular la ingesta en un tiempo determinado para controlar el combustible corporal almacenado en forma de grasa (Morton *et al.*, 2006). A través de la corriente sanguínea y de señales neuronales aferentes, la información del estado nutricional y de la reserva de energía se comunica al cerebro y ésta es integrada con las señales cognitivas, visuales, olfativas y de gusto, las cuales suceden de manera inconsciente antes de que se lleve a cabo el acto de comer (Morton *et al.*, 2006).

Por tanto, en la regulación del peso corporal parecen importantes dos acciones, por un lado, la motivación para elegir el alimento y por otra parte la percepción de saciedad. Adicionalmente, la transformación de alguna de las moléculas involucradas en este proceso, podría causar obesidad tanto en modelos animales como humanos (Morton *et al.*, 2006).

Se ha dado un rápido progreso hacia la comprensión de los procesos cerebrales y a su relación con las propiedades psicológicas y sensoriales de los alimentos, y cómo las señales de saciedad regulan el apetito durante y después de comer (Rolls E.T., 2006).

Si bien existen mecanismos cerebrales que controlan el apetito, un gran número de factores sensoriales y medioambientales contribuyen a sobre estimular el sistema sensorial, dando lugar a importantes señales de recompensa que pueden ser fácilmente controladas por las señales de saciedad (Rolls E.T., 2006).

Se están llevando a cabo avances científicos en neurociencia y psicología para identificar y comprender algunos de los muchos factores que regulan la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la obesidad. Es crucial desarrollar esta comprensión, ya que este conocimiento supondrá un gran potencial en la prevención y tratamiento de la obesidad.

Por esta razón, es necesario conocer cómo interactúan los diferentes factores y cómo los seres humanos pueden ser ayudados a controlar su peso corporal utilizando

las combinaciones más eficaces, así como quizás, tener en cuenta otros factores aún desconocidos (Rolls E.T., 2006).

1.2. Obesidad

La obesidad, por definición, resulta de un almacenamiento de calorías que excede los requerimientos de energía del organismo. Aunque factores medioambientales y de estilo de vida contribuyen a la patogénesis de la obesidad, existe una importante adaptación homeostática en el proceso de pérdida de peso inducida por restricción calórica voluntaria, tanto en individuos delgados como en obesos (Morton *et al.*, 2006). Por tanto, ciertos mecanismos biológicos, parecen proteger a individuos con peso corporal normal, frente un aumento (inducido por sobre alimentación) o pérdida de peso (Morton *et al.*, 2006).

En consecuencia, la interacción entre factores genéticos, factores medioambientales que promueven la obesidad y el sistema de control homeostático, contribuyen al desarrollo de diferentes tipos de obesidad, y por ende, a aumentar la pandemia global de obesidad (Morton *et al.*, 2006).

En este sentido, la obesidad se ha convertido en la enfermedad del siglo XXI y está afectando a más de un billón de personas en todo el mundo. En un futuro se duplicará o se triplicará el número de personas con sobrepeso (Malecka-Tendera E & Mazur A., 2006).

Desafortunadamente, el crecimiento de este problema está afectando a niños y datos de la *International Obesity Task Force*, indican que 22 millones de niños menores de 5 años son obesos o tienen sobrepeso (Malecka-Tendera E, Mazur A., 2006).

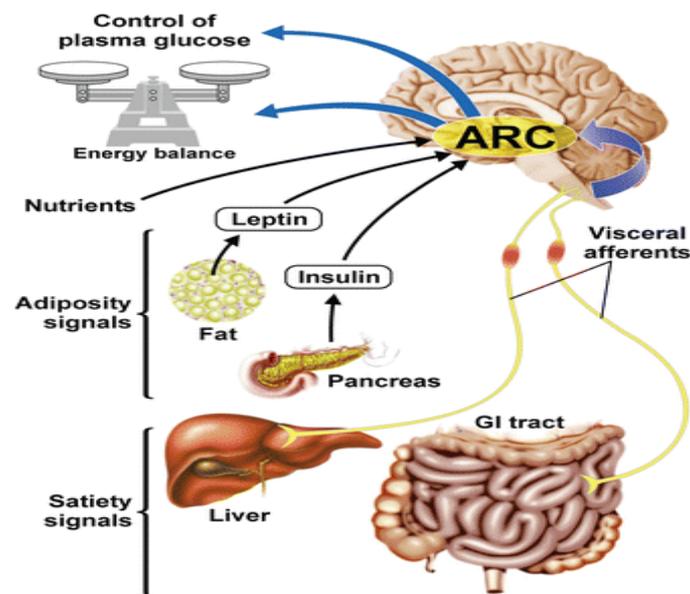
El sobrepeso y la obesidad infantil están asociados con varias consecuencias adversas y además conllevan un mayor riesgo de padecer obesidad en la edad adulta y en consecuencia, la obesidad en adultos aumenta la morbilidad (Malecka-Tendera E, Mazur A., 2006).

Desde 2008, aproximadamente 1.500 millones de individuos en todo el mundo se consideran ahora preobesos, incluidos 500 millones que se consideran obesos (Finucane MM. *et al.*, 2011).

Investigaciones llevadas a cabo por el Grupo de Colaboración Repercusión Global de los Factores de Riesgos Metabólicos de las Enfermedades Crónicas, dirigido por Majid Ezzati (*Imperial College London, UK*), informan que el IMC normalizado para la edad se incrementó en casi 0,4 kg/m² por decenio en los hombres y en 0,5 kg/m² en las mujeres (Danaei G. *et al.*, 2011).

Anand & Yusuf señalan que es decisivo comprender las modificaciones en la obesidad y en factores de riesgo cardiovascular como la presión arterial y el colesterol total, de esta manera podrían aclararse conceptos útiles que podrían ayudar a mitigar los efectos adversos de la epidemia de obesidad. Estos autores consideran que la forma más eficaz de reducir la morbilidad global de las enfermedades cardiovasculares sigue siendo el control de los factores de riesgo al nivel de la población (Anand & Yusuf, 2011).

2. REGULACIÓN DE LA INGESTA



 Woods SC, et al. 2008.
Annu. Rev. Nutr. 28:295–311.

Figura 2. Control del sistema nervioso central y periférico en el balance de la homeostasis energética (Woods SC. *et al.*, 2008)

2.1. Señales periféricas

2.1.1. Hormonas del tejido adiposo

Durante un tiempo, el tejido adiposo fue considerado un reservorio, donde se acumulaba la energía en forma de grasa. Sin embargo, con el descubrimiento de la leptina en 1994 (Zhang *et al.*, 1994), se estableció con certeza que el tejido adiposo era un órgano endocrino caracterizado por sintetizar y secretar muchos péptidos denominados adipoquinas que pueden actuar a nivel local (autocrina/paracrina) o sistémico (endocrina), así como expresar numerosos receptores que le permiten recibir señales procedentes de otros órganos entre ellos el sistema nervioso central (SNC).

La capacidad de recibir información desde distintos órganos y poder responder a ella mediante la liberación de adipoquinas, hace que el tejido adiposo además de ser uno de los mayores tejidos del cuerpo, se considere un elemento clave en funciones biológicas tan importantes como la regulación del metabolismo y del balance energético (Welsch, 2009) y de funciones neuroendocrinas e inmunológicas (Kershaw EE & Flier JS, 2004).

Adicionalmente, el tejido adiposo está constituido principalmente por células adiposas o adipocitos que además de almacenar los lípidos, también pueden sintetizarlos a partir de los hidratos de carbono. Existen dos tipos fundamentales de adipocitos que van a dar origen a dos clases de tejido adiposo; el tejido adiposo pardo (BAT) y el tejido adiposo blanco (WAT).

Entre las hormonas secretadas por el WAT se encuentran:

► Leptina

Entre las hormonas adipocitarias, la que más ha cambiado el concepto del WAT como un tejido inerte es la leptina (López M. *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 1994). La leptina se expresa principalmente en adipocitos (Zhang *et al.*, 1994) y a niveles

inferiores en el tracto gastrointestinal (Bado *et al.*, 1998) y la placenta (Señarís *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 1997) entre otros tejidos.

Los niveles circulantes de leptina están estrechamente correlacionados con la masa de tejido adiposo (Maffei *et al.*, 1995; López M. *et al.*, 2007) y la restricción alimenticia reduce los niveles circulantes de leptina (Frederich *et al.* 1995; Maffei *et al.* 1995), la cual puede ser revertida mediante realimentación.

La administración central y periférica de leptina reduce la hiperfagia (Ahima *et al.*, 1996; López M. *et al.*, 2007), inducida por el ayuno y la administración periférica crónica reduce la ingesta dando como resultado una disminución de la masa grasa y del peso corporal (Halaas *et al.*, 1995; López M. *et al.*, 2007).

La carencia absoluta de leptina en los ratones *ob/ob*, trae grandes consecuencias sobre la homeostasis del peso corporal, causando hiperfagia y obesidad, así como también desregulación neuroendocrina e inmune, la cual es revertida por la administración de leptina (Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995; López M. *et al.*, 2007). Al igual que en roedores, en humanos la deficiencia de leptina causa obesidad mórbida e hipogonadismo, lo cual puede ser mejorado con leptina recombinante (Farooqi & O'Rahilly, 1999).

➤ **Adiponectina**

Es una proteína de 244 aminoácidos secretada por el tejido adiposo principalmente y en menor medida por otros tejidos entre los que se encuentran la placenta y los cardiomiocitos (Hu *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 2002; López M. *et al.*, 2007). Es importante en la homeostasis energética (López M. *et al.*, 2007), ya que los niveles plasmáticos de adiponectina guardan una correlación inversa con la adiposidad en varias especies, incluidos los humanos (Hu *et al.*, 1996; Arita *et al.*, 1999; Hotta *et al.*, 2001; López M. *et al.*, 2007).

La adiponectina se une y activa dos receptores de membrana, *adipoR1* y *adipoR2* (Yamauchi *et al.* 2003; López M. *et al.*, 2007). *AdipoR1* se expresa altamente en el músculo esquelético; tiene gran afinidad por el dominio globular de la

adiponectina y baja afinidad por el ligando de duración completa. AdipoR2 es altamente expresado en hígado y se une preferencialmente a la longitud total del ligando. Se han detectado receptores para adiponectina en diversos órganos entre ellos, el hipotálamo (Qi *et al.* 2004) y la placenta (Caminos *et al.* 2005), tracto gastrointestinal y tejido adiposo (Gonzalez *et al.* 2010).

En roedores, los niveles de adiponectina se incrementan después de la restricción de alimentos y con la administración periférica de esta hormona se observa una atenuación en la ganancia del peso corporal debida a un incremento en el consumo de O₂, sin afectar la ingesta (Berg *et al.*, 2001; Fruebis *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2003).

Este efecto sobre el gasto energético parece estar mediado por el sistema de melanocortinas en el hipotálamo, sin afectar a otros neuropéptidos regulados por la leptina (Qi *et al.*, 2004; López M. *et al.*, 2007). Los niveles circulantes de adiponectina se correlacionan negativamente con la resistencia a la insulina (Hotta *et al.*, 2001) y el tratamiento con adiponectina puede reducir la ganancia de peso corporal, incrementar la sensibilidad a la insulina y disminuir los niveles lipídicos en roedores (Berg *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2004; Winzell *et al.*, 2004). De acuerdo con estas evidencias, los ratones carentes de adiponectina desarrollan una importante resistencia a la insulina inducida por dieta (Liu *et al.*, 2007)

► Resistina (RSTN)

Esta hormona es producida por el tejido adiposo y en roedores parece estar involucrada en la modulación de la sensibilidad a la insulina y en la diferenciación de adipocitos (Steppan *et al.* 2001a, b; Vidal-Puig & O'Rahilly, 2001; Steppan & Lazar, 2002). Adicionalmente al tejido adiposo, la RSTN también se expresa en estómago, intestino, glándula adrenal, testículo y músculo esquelético (Nogueiras *et al.* 2003a, b, 2004a).

La restricción de alimentos produce una disminución en los niveles de expresión de mRNA de RSTN solamente en tejido adiposo (Nogueiras *et al.* 2003a, b). Los niveles circulantes de RSTN se incrementan con la obesidad tanto en roedores

como en humanos (Savage et al. 2001; López M. *et al.*, 2007) y disminuyen después de la pérdida de peso (Valsamakis et al. 2004; López M. *et al.*, 2007).

En ratones en los que se ha eliminado la expresión de RSTN y se han modificado para que sus macrófagos produzcan RSTN humana, al someterlos a dieta alta en grasas (HFD), muestran un aumento en la inflamación del WAT, lo cual permite una acumulación de lípidos en el músculo y de esta manera el incremento de la resistencia a la insulina (Qatanani *et al.*, 2009).

Estas evidencias sugieren que la RSTN puede contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina y a la diabetes en la obesidad (Steppan *et al.* 2001a, b; Vidal-Puig & O'Rahilly, 2001; Steppan & Lazar, 2002). Además de sus efectos sobre la sensibilidad a la insulina, también existen evidencias que sugieren que la RSTN administrada a nivel central inhibe la ingesta de manera transitoria a través de mecanismos hipotalámicos (Tovar *et al.* 2005) y modula el metabolismo periférico de lípidos (Vazquez et al. 2008).

► **Interlukinas (IL-6 e IL-1)**

La IL-6 es una citoquina inmuno-moduladora multifuncional que tiene funciones importantes sobre el metabolismo lipídico y la glucosa (López M. *et al.*, 2007). Esta hormona es secretada desde el tejido adiposo hacia la circulación y su expresión se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal (IMC) y el tejido graso total.

Los ratones *knockout* para el receptor IL-6 desarrollan obesidad que puede ser revertida en parte por la administración exógena de IL-6, sugiriendo que esta hormona regula a largo plazo la masa del tejido adiposo. Adicionalmente, la administración central a dosis bajas de IL-6, disminuye la ingesta e incrementa el consumo de energía en ratas (Wallenius *et al.*, 2002b; López M. *et al.*, 2007).

La IL-1 está también involucrada en la homeostasis del peso corporal. Los ratones *knockout* para el receptor IL-1 muestran un fenotipo obeso insulino-resistente. Este fenotipo obeso se caracteriza por una disminución en la sensibilidad a la insulina,

la utilización de la grasa y la actividad locomotora (García *et al.*, 2006; López M. *et al.*, 2007).

➤ **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)**

Esta citokina es una proteína transmembrana de 26-kDa que se procesa en una proteína de 17- kDa, biológicamente activa, que ejerce sus efectos vía receptor TNF α tipo I y tipo II. En el tejido adiposo se expresa tanto en adipocitos como en células de la fracción del estroma vascular (Fain *et al.*, 2004), al igual que los dos tipos de receptores, pudiendo encontrarse unidos a membrana o en sus formas solubles (Ruan & Lodish, 2003).

El hecho de que TNF α induzca caquexia in vivo, llevó a una exhaustiva evaluación de su papel sobre la homeostasis energética. Actualmente se ha visto que puede estar implicada en la patogénesis de la obesidad y de la resistencia a la insulina (Ruan & Lodish, 2003): está altamente expresada en tejido adiposo de humanos y roedores obesos, y disminuye con la pérdida de peso pudiendo observarse una mejoría en la sensibilidad a la insulina. La exposición crónica a TNF α induce resistencia a la insulina, tanto in vivo como in vitro, mientras que el tratamiento con neutralizantes solubles de TNF α mejora la sensibilidad a la insulina en roedores pero no en humanos (Ruan & Lodish, 2003).

Los ratones carentes de TNF α están protegidos frente a la resistencia a insulina causada por obesidad inducida por HFD (Uysal KT. *et al.*, 1997).

2.1.2. Señales del tracto gastrointestinal que regulan la ingesta

➤ **Ghrelin**

Aunque se produce principalmente en las células X/A de la mucosa estomacal (Date *et al.*, 2000), también se expresa en otros tejidos como: intestino, hipotálamo (Kojima *et al.*, 1999; Horvath *et al.*, 2001; Cowley *et al.*, 2003), hipófisis (Caminos *et al.*, 2003a), ovarios (Caminos *et al.*, 2003b), testículo (Barreiro *et al.*, 2002; Tena-Sempere *et al.*, 2002), corazón (Iglesias *et al.*, 2004) y placenta (Gualillo *et al.*, 2001).

Es un péptido que consta de 28 aminoácidos en la que la serina 3 es octanoilada, siendo esta característica clave para desempeñar sus funciones, tanto en la secreción de la glándula de crecimiento (*Growth hormone - GH*) (Seoane *et al.*, 2000), en la regulación de la ingesta (Kojima *et al.*, 1999), y en la motilidad y el vaciado gástrico (Masuda *et al.*, 2000).

Se sabe que ghrelin es una hormona muy importante en la regulación de la homeostasis energética, caracterizada por un fuerte efecto orexigénico y cuyos niveles circulantes se incrementan 2 horas antes del inicio de la ingesta.

A corto plazo la administración periférica o central de ghrelin aumenta la ingesta; y a largo plazo, la administración crónica tiene efectos no sólo sobre la ingesta sino que también produce un incremento en la adiposidad y en el peso corporal (Tschöp *et al.*, 2000).

Para ejercer la mayoría de sus acciones biológicas se une al receptor GHS-R1a, y realiza su efecto orexigénico mediante la modulación de distintas neuronas hipotalámicas a nivel del núcleo arcuato (ARC), neuropéptido Y y péptido relacionado con agouti (NPY/AgRP). Datos recientes (López *et al.*, 2008) indican que ghrelin ejerce su efecto a nivel hipotalámico modificando el metabolismo de ácidos grasos mediante la activación de AMPK (*activated protein kinase*) y activando diferentes factores de transcripción como Bsx, FOXO1 (*Forkhead box protein*) y pCREB, modula la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta (Diéguez *et al.*, 2010).

► **Colecistoquinina (CCK)**

Es una proteína secretada por las células I de la mucosa del intestino delgado, en respuesta a la comida; pero también se expresa de forma significativa en el SNC. A partir de un precursor de 115 aa, y mediante procesamiento proteolítico, se obtienen distintos péptidos (caracterizados por presentar un octapéptido carboxiterminal), de los cuales CCK-8, CCK-22 y CCK-33 son las formas bioactivas que se encuentran en niveles más elevados en sangre.

Se han descrito dos receptores para CCK: CCK1R, también denominado CCK-A recordando su implicación en procesos de “alimentación”, se expresa mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, y CCK2R, o CCK-B (*brain*) que se encuentra en cerebro.

Se sabe que la CCK inhibe la ingesta tanto en humanos como en roedores (Ballinger *et al.*, 1995; Kissileff *et al.*, 2003). Al administrar CCK periféricamente justo antes de la comida, se disminuye la cantidad ingerida de manera dosis dependiente, sin afectar la ingesta de agua o causar aversión; y además, en las ratas se desencadena una serie de comportamientos que normalmente están asociados con la saciedad.

El efecto anorexigénico de CCK es de corta duración e indetectable si el péptido se administra más de 30 minutos antes de la comida. Sus efectos están mediados por el receptor CCK1R, y se transmite al cerebro mediante el nervio vago ya que se ha comprobado que la vagotomía disminuye el efecto anoréxico de la CCK periférica (Moran & Kinzig, 2004; Zittel *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta que este receptor se encuentra también en distintas zonas del cerebro, entre ellas el hipotálamo, y que la microinyección de CCK en varios núcleos hipotalámicos inhibe la ingesta, la CCK aporta al cerebro señales de saciedad, tanto directa como indirectamente.

Aunque no de forma exclusiva, la saciedad inducida por la CCK se consigue mediante la inhibición del vaciado gástrico a través de la información recogida por mecanorreceptores y transmitida por el nervio vago al cerebro. Tanto en monos como en humanos la distensión gástrica aumenta el efecto anoréxico de la CCK8 (Kissileff *et al.*, 2003).

Sin embargo, ratas con daño funcional en el CCK1R son diabéticas, hiperfágicas y obesas, mientras que en ratón la deficiencia del receptor no causa ninguna variación en el fenotipo (Swartz *et al.*, 2010). Posiblemente, el papel más importante de la CCK sobre la regulación del peso corporal podría venir por la interacción sinérgica con señales de adiposidad a largo plazo, como por ejemplo la leptina.

➤ **GLP-1 (Glucagón-like-peptide)**

Otro de los péptidos derivados de preproglucagon es GLP-1. Es secretado por las células L, en respuesta a la ingesta de nutrientes (grasa e hidratos de carbono, principalmente) de forma directa o indirecta. Cuenta con dos formas bioactivas, GLP-17–36 y GLP-17–37, que pueden ser inactivadas en circulación mediante la enzima DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV). El GLP-1 disminuye la ingesta en distintas especies incluyendo los humanos y es efectivo en personas con peso normal, obesas y diabéticas (Halimi S, 2010; DePaula *et al*, 2009).

Se une al receptor GLP-1R y aunque el mecanismo a través del cual ejerce su efecto anorexigénico no es del todo conocido, parece que la información es transmitida a través del nervio vago hacia distintas zonas cerebrales. Aunque el GLP-1 puede cruzar la barrera hematoencefálica, parece improbable que llegue en cantidad suficiente teniendo en cuenta la rapidez con la que es degradado en circulación por la DPP-IV. Sin embargo, tiene efectos a nivel central ya que se expresa en distintas neuronas del cerebro que emiten proyecciones sobre el hipotálamo y otras áreas implicadas en la regulación de la homeostasis energética (Drucker D. 2005; Mendieta-Zeron *et al.*, 2008; Cummings & Overduin 2007).

➤ **Péptido YY (PYY)**

Es un péptido secretado postprandialmente por células L del tracto gastrointestinal, especialmente en las porciones más distales del íleon, colon y recto. La secreción del PYY está correlacionada con el gasto energético (Stanley *et al.* 2005; López *et al.*, 2007).

El PYY se unen a una familia de receptores asociados a proteína G: Y1R, Y2R, Y4R, Y5R, y Y6R. Circula en sangre de dos formas: PYY1-36, sobre el que rápidamente actúa la enzima DPP-IV dando lugar a la forma predominante y bioactiva PYY3-36. La administración periférica de PYY3-36 inhibe la ingesta y reduce el peso corporal en roedores, primates y humanos (Batterham *et al.*, 2002; Challis *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2005).

Sin embargo, la administración a nivel central tanto de PYY como de PYY3-36 provoca el aumento de la ingesta. Una posible explicación a esto es la existencia de distintos receptores y la distinta accesibilidad a estos. El PYY se une a todos los receptores Y, siendo el efecto orexigénico mediado por Y1 y Y5, que se encuentran en el núcleo paraventricular, sobre los que actúa también NPY.

Aunque algunos grupos no han conseguido replicar el efecto anoréxico de PYY3-36 administrado periféricamente, otros lo han descrito tanto en roedores como en primates no humanos. Quizás estas discrepancias puedan ser explicadas por diferencias metodológicas en los tratamientos tales como dosis, vías e inicio de la administración (Mendieta *et al.*, 2008; Cummings & Overduin 2007).

Aunque el PYY3-36 activa selectivamente Y2R y Y5R, se cree que el PYY3-36 circulante tiene mayor acceso a Y2R, ya que este se encuentra en el ARC, el cual se caracteriza por una mayor permeabilidad a la barrera hematoencefálica (Batterham *et al.*, 2002).

El Y2R es un receptor autoinhibidor presináptico de las neuronas orexigénicas que expresan NPY y AgRP. Por tanto, la unión PYY3-36 al Y2R reduce la ingesta mediante la inhibición de las neuronas NPY/AgRP, dejando éstas de inhibir a POMC (Pro-opiomelanocortinas), con lo que aumentaría la producción de α -MSH (hormona estimulante de melanocitos – alfa), conocido por su efecto anoréxico (Pétevári *et al.*, 2011).

A pesar de los datos que indican que la administración periférica de PYY3-36 reduce la ingesta a nivel hipotalámico, otros estudios sugieren la intervención del nervio vago, basándose en que el Y2R se expresa también en las proyecciones vagales aferentes y que mediante la vagotomía se impide el efecto anoréxico del PYY3-36 (Neary *et al.*, 2004).

2.1.3. Hormonas pancreáticas

► Insulina

La insulina es también una señal de adiposidad. Las concentraciones de insulina plasmáticas pueden modificar tanto los depósitos de grasa corporal total, como su distribución, siendo el tejido visceral el que mayor relevancia tiene en este sentido. La secreción de insulina se incrementa rápidamente en el páncreas después de comer, ejerciendo un efecto anoréxico a través del SNC (Schwartz *et al.* 1992a, 2000; López *et al.*, 2007).

La insulina atraviesa la barrera hematoencefálica entrando así en el SNC y fue la primera hormona propuesta como factor circulante implicado en la regulación del peso corporal a través de distintos neuropéptidos del cerebro (Baskin *et al.*, 1999).

La administración central de insulina reducen la ingesta y el peso corporal en roedores y primates y la administración de un antagonista para el receptor de insulina induce hiperfagia y aumento de masa grasa (Woods *et al.*, 1979; López *et al.*, 2007); en este mismo sentido, la supresión de la expresión del receptor de insulina en el SNC, produce obesidad, hiperinsulinemia y dislipidemia en ratones (Bruning *et al.* 2000).

Los receptores de insulina están muy extendidos en el cerebro, especialmente en los núcleos hipotalámicos implicados en la ingesta de alimentos; tales como el ARC, el núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular (PVH) (Corp *et al.* 1986; Marks *et al.*, 1990). Las acciones de la insulina en el hipotálamo están mediadas por NPY y por el sistema melanocortinas (Hagan MM. *et al.*, 1999).

► Polipéptido pancreático (PP)

El PP pertenece a la familia de péptidos, tales como PYY y NPY (Conlon, 2002). El PP se produce mayoritariamente en células de los islotes de Langerhans, el páncreas exocrino y el área distal del tracto gastrointestinal (Small & Bloom, 2004; Stanley *et al.*, 2005).

Las concentraciones de PP en plasma se incrementan proporcionalmente a la energía consumida (Small & Bloom, 2004; Stanley *et al.*, 2005), lo cual parece ser inversamente proporcional a la adiposidad, por ello se ha encontrado que los niveles de PP son mayores en sujetos anoréxicos y se reducen en sujetos obesos (Lassmann *et al.*, 1980; Fujimoto *et al.*, 1997).

La administración periférica de PP reduce la ingesta y el peso corporal en roedores obesos (Malaisse-Lagae *et al.* 1977). Su efecto anoréxico está mediado por el receptor Y5 y sus acciones se ejercen vía tallo cerebral (área postrema), regulación de los neuropéptidos hipotalámicos (NPY y OX) y la modulación de la expresión de ghrelin (Asakawa *et al.* 2003).

De manera contraria a los efectos periféricos, la administración central de PP incrementa la ingesta (Clark *et al.*, 1984); por tanto, los receptores que median su acción y los mecanismos involucrados no están claros.

2.2. Señales del Sistema Nervioso Central

El SNC es de suma importancia dentro de la regulación de la ingesta, ya que la información procedente de la periferia, es recibida, analizada y procesada en el cerebro (Gao & Horvath, 2008).

Otras investigaciones corroboraron esta idea y demostraron que, mediante experimentos de lesiones en diferentes zonas del SNC, el hipotálamo desempeñaba una función fundamental en la regulación de la ingesta. En estos estudios se observó que la destrucción de diferentes núcleos hipotalámicos como el hipotálamo ventromedial (VMH) , el DMH y el PVH, llevaba asociada la aparición de hiperfagia y obesidad, o en zonas como el hipotálamo lateral (LHA), en donde se pudo observar la aparición de hipofagia tras su lesión (Anand & Brobeck, 1951). Los experimentos de estimulación eléctrica han confirmado los datos obtenidos de lesiones cerebrales; sugiriendo la existencia de dos centros reguladores de la ingesta: un *centro de hambre* ubicado en el LHA, y un *centro de saciedad* situado en el VMH (Khisi & Elmquist., 2005).

Además del hipotálamo también existen otras zonas del SNC implicada en la regulación de la homeostasis energética. Por ejemplo, en el tronco cerebral, el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área premotora (AP) integran la información sensorial y hormonal procedente del tracto gastrointestinal y del hígado (vía nervio vago y aferencias del ganglio cervical superior), así como la información sobre el sabor, procedente de la cavidad bucal (vía nervios craneales), el olor y la apariencia (Schwartz *et al.*, 2000).

2.2.1. Núcleos hipotalámicos y señales de adiposidad

➤ Núcleo arcuato

Dentro de los núcleos hipotalámicos más importantes, el ARC, tiene un papel crucial en la regulación de la ingesta debido a su posición en hipotálamo, en donde la barrera hematoencefálica está modificada lo que permite el paso de factores y proteínas circulantes (Broadwell & Brightman, 1976).

En este núcleo se identifican dos grupos de neuronas que están próximos y se interconectan para recibir señales del estado nutricional, NPY/AgRP y POMC/CART.

Estas neuronas secretan neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos respectivamente y constituyen el primer orden de neuronas implicadas en la regulación de la ingesta (Cone *et al.*, 2001). Estas poblaciones neuronales reciben y regulan las acciones de gran cantidad de hormonas provenientes de la periferia.

NPY y AgRP son inhibidos por la leptina, la insulina y el PPY3-36, y por otra parte son estimulados por ghrelin. En consecuencia la pérdida de peso es activada gracias a la combinación de este proceso de inhibición y estimulación (Morton *et al.*, 2006).

La POMC, es un polipéptido precursor del cual se derivan melanocortinas tales como la α -MSH. En los axones terminales, la α -MSH se une y activa a las neuronas de los receptores de melanocortinas, disminuyendo así la ingesta y favoreciendo la pérdida de peso. Las neuronas de POMC son estimuladas por la leptina e inhibidas por

ghrelin. En respuesta a la pérdida de peso, la activación de NPY/AgRP está acoplada a la inhibición de POMC, una combinación que favorece la recuperación de la pérdida de peso y refleja la integración de diversos procesos humorales y neuronales (Morton *et al.*, 2006).

La ausencia de leptina en modelos animales obesos (Lep^{ob}/Lep^{ob}), reduce la expresión de POMC en el ARC, mientras que se incrementan los niveles de NPY y AgRP (Morton *et al.*, 2006).

Similarmente, la ausencia de la α -MSH en ratones *knockout* de POMC causa hiperfagia y obesidad. El bloqueo de la señalización neuronal de melanocortinas reduce la respuesta a la administración central de leptina (Morton *et al.*, 2006).

Las neuronas del ARC están reguladas además de por las señales humorales, por sinapsis excitatorias e inhibitorias, y el balance de este proceso está afectado por el estado nutricional. Específicamente, el ayuno disminuye la excitación mientras se intensifican los contactos sinápticos inhibitorios en las neuronas de POMC, lo contrario se aplica para NPY/AgRP (Morton *et al.*, 2006).

► Núcleo ventromedial

El VMH ha sido denominado “centro de saciedad” al comprobarse que lesiones bilaterales causaban hiperfagia y obesidad. Al igual que con el ARC, se ha demostrado que el VMH del hipotálamo es esencial para la regulación de la ingesta y del balance energético (Morton *et al.*, 2006).

El VMH puede aumentar directamente la actividad de las neuronas POMC mediante microcircuitos, estimulando su actividad excepto en estado de ayuno en el que disminuye. Además de proyectar al ARC, también lo hace hacia otros núcleos hipotalámicos y al tronco cerebral (Irani *et al.*, 2008).

La administración de NPY en el VMH aumenta la ingesta, mientras que el ayuno está asociado con unos niveles elevados de NPY en esta región. Por otro lado la respuesta electrofisiológica de las neuronas en el VMH a α -MSH está disminuida en animales en ayuno y/o tratados con AgRP (Irani *et al.*, 2008).

Este núcleo ha adquirido gran importancia recientemente al haberse demostrado que el efecto orexigénico está mediado por la activación de AMPK y metabolismo lipídico (López M. *et al.*, 2008). Además se ha visto que los efectos de otras señales como hormonas tiroideas (Varela L. *et al.*, 2012) y la nicotina (Martínez de Morentin PB. *et al.*, 2012) se ejercen a este nivel regulando el gasto energético.

A este respecto, se ha visto que estados de hipotiroidismo, el cual se caracteriza por un mayor gasto energético y una marcada hiperfagia y las alteraciones en la termogénesis relacionada con este estado, están asociados con la desregulación del eje hipotalámico AMPK y el metabolismo de los ácidos grasos (Varela L. *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha encontrado que la pérdida de peso inducida por la nicotina está asociada con la inactivación de AMPK en el hipotálamo. De manera contraria, la abstinencia de la nicotina o la activación genética de AMPK en el VMH del hipotálamo revierte el balance energético negativo inducido por la nicotina (Martínez de Morentin PB. *et al.*, 2012).

➤ **Hipotálamo lateral**

El LHA, forma parte del segundo orden de integración de señales implicadas en la regulación energética, especialmente del ARC. En él se sintetizan dos tipos de péptidos orexigénicos: hipocretinas (orexinas) y hormona concentradora de melanina (MCH). Estas neuronas están inervadas por axones de neuronas POMC y NPY, sugiriendo que su función en la estimulación de la ingesta, podría estar mediada por el sistema de melanocortinas del ARC (Gao & Horvath, 2008).

Es considerado el “centro del hambre”, ya que animales con lesiones provocadas en esta área desarrollaron un fenotipo hipofágico y delgado.

Las neuronas del LHA se caracterizan por emitir proyecciones a un amplio número de zonas del SNC (córtex, tálamo o sistema límbico) participando en numerosas funciones tales como aprendizaje, memoria, emoción, y respuestas

motoras en función del estado energético ya que están reguladas por numerosas hormonas, entre ellas, ghrelin y leptina (Peyron *et al.*, 1998; Broberger *et al.*, 1998).

El LHA puede ser también un lugar de acción para el sistema endocanabinoide (SEC) ya que las neuronas orexigénicas de esta zona (orexina y MCH) expresan el receptor endocanabinoide CB1 (rCB1) (Bellocchio *et al.*, 2008).

➤ **Núcleo paraventricular**

El PVN está situado en la parte anterior del hipotálamo, próximo a la parte superior del tercer ventrículo (3V) y se ha descrito que su destrucción implica la aparición de hiperfagia. Al igual que el VMH, es un núcleo que integra señales (tales como NPY, AgRP o POMC) procedentes del ARC y de otras regiones del SNC. Además es un núcleo muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta, como CCK, NPY, ghrelin o leptina (Neary *et al.*, 2004).

Su principal característica es que es el núcleo productor de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de hormona liberadora de tirotrópina (TRH), ambos factores anorexigénicos (Fekete & Lechan, 2007).

➤ **Núcleo dorsomedial**

El DMH está implicado en la regulación de una variedad de mecanismos reguladores que incluyen la modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño y ritmos circadianos de la actividad locomotora (Gooley *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2003).

Este núcleo recibe proyecciones de las neuronas del ARC y de otras zonas cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta. Se ha visto que lesiones provocadas en este núcleo inducen hiperfagia, aunque los animales mantienen la misma composición corporal (Bellinger & Bernardis, 2002).

2.2.2. Señales de recompensa

El concepto de que la percepción de recompensa está sujeta a la regulación homeostática, proviene de la evidencia de que la privación de alimentos aumenta de manera intensa el valor de la recompensa. El ayuno incrementa el valor del refuerzo estimulando el “centro de placer” en el cerebro y con la menor disponibilidad de alimentos parece ejercerse una estimulación global sobre la percepción de recompensa (Morton *et al.*, 2006).

Un mecanismo para explicar este efecto, supone que la leptina y la insulina inhiben los circuitos de recompensa en el cerebro y que al reducirse los niveles circulantes de estas hormonas, la restricción de energía incrementa la sensibilidad de los circuitos de recompensa. De acuerdo con esta hipótesis, la administración central de insulina o de leptina disminuye la preferencia por la sacarosa (medida de alimento-recompensa) y el ayuno incrementa las propiedades de recompensa de la estimulación eléctrica del centro de placer (sistema límbico cerebral), el cual está ubicado en el núcleo accumbens del hipotálamo (Morton *et al.*, 2006; Kelley *et al.*, 2005).

De acuerdo con esta hipótesis, la insulina o la leptina administradas a nivel central disminuyen tanto la preferencia por la sacarosa y el efecto de ayuno para aumentar las propiedades de recompensa de la estimulación eléctrica del centro de placer. A nivel celular, existe una mayor expresión en la recaptación de los transportadores de dopamina en las neuronas del área tegmental ventral (VTA), lo cual reduce los niveles sinápticos de dopamina en el núcleo arcuato (NAc) y esto, puede contribuir al efecto inhibitorio de las hormonas de adiposidad relacionadas con los mecanismos de recompensa (Morton *et al.*, 2006).

Estas observaciones sugieren que al disminuir las señales de adiposidad, la restricción de energía aumenta las respuestas dirigidas a la búsqueda de estímulos de recompensa como un mecanismo de adaptación; es el caso de animales amenazados por falta de calorías, motivados a buscar y obtener alimentos más apetitosos (Morton *et al.*, 2006).

3. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

3.1. Uso terapéutico del cannabis

El cannabis fue usado con fines medicinales en China 4.000 años a.C. Desde allí, la planta se extendió por India y el Sudeste Asiático, llegando a la civilización grecorromana. En la India, en el siglo XV a.C., se usaba el cáñamo por su efecto estimulante sobre el apetito (Grinspoon y Bakalar, 1993).

Durante la Edad Media, los árabes (Al-Badri, 1251 d.C.) recomendaron el uso médico del cannabis por esa propiedad. En 1842, el empleo del cannabis como remedio medicinal fue introducido en Gran Bretaña con el regreso de un cirujano irlandés que había estado en la India, O'Shaughnessy. Este médico hizo popular la utilización de la denominada tintura de cannabis para distintos estados patológicos, describiendo su efecto sobre el apetito (Ramos & Fernández, 2000).

En una publicación en la revista Lancet en 1889, Birch refirió el empleo del cannabis para la dependencia de opiáceos, observando dicho incremento sobre el apetito. En 1942, la revista JAMA en una editorial, reconoce el uso del cannabis como un potencial terapéutico para la pérdida de apetito.

De forma interesante, los consumidores de cannabis describían un incremento pertinaz del apetito, incluso estando saciados previamente y con frecuencia se hacía referencia a una mayor apetencia por los dulces (Hollister, 2001).

3.2. Orígenes del Sistema Endocannabionide

El SEC fue identificado a principios de 1990 durante investigaciones del mecanismo de acción del mayor compuesto psicotrópico derivado del cannabis, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Di Marzo, 2008; Mechoulam, 1999; Pertwee, 2005).

La clonación de los receptores cannabionoides condujo a la identificación de moléculas endógenas capaces de unirse y activarse a sus propios receptores, tomando

de allí el nombre de “endocannabinoides” (EC), pues pese a ser diferentes del THC, son capaces de reconocer sus sitios de unión específicos (Di Marzo, 2008).

El interés del tema ha resurgido a raíz de la descripción del SEC y la síntesis de agonistas y antagonistas de éste, produciéndose una gran proliferación de trabajos en experimentación animal que va constatando la relevancia del SEC en la regulación del apetito.

Adicionalmente a su implicación con la obesidad, el SEC está involucrado en la patofisiología de la osteoporosis, la adicción a la nicotina y la adicción a las drogas (Rodríguez de Fonseca F. *et al.*, 2005) en enfermedades mentales, dolor inflamatorio y neuropático, enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple (Rodríguez de Fonseca F. *et al.*, 2005), desorden cardiovascular, enfermedades del hígado, entre otros (Di Marzo, 2006; Fowler *et al.*, 2005; Ross, 2009).

Los principales cannabinoides son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC o THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) (Turner *et al.*, 1980). El Δ^9 -THC es el cannabinoide con mayor potencia psicoactiva. Presenta propiedades hidrofóbicas por lo que es muy soluble en lípidos. Esto hace que su distribución en el organismo y su eliminación presenten diferencias con lo descrito para otras drogas de abuso.

Dada la elevada liposolubilidad tanto del Δ^9 -THC como de otros cannabinoides naturales, durante mucho tiempo se pensó que estos compuestos ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron mecanismos mediados por el receptor como los responsables de los efectos ejercidos por los cannabinoides.

En un inicio se clonaron dos receptores para cannabinoides: el receptor CB1 (Matsuda *et al.*, 1990), densamente expresado en el sistema nervioso central, y el receptor CB2 (Munro *et al.*, 1993), localizado fundamentalmente a nivel del sistema inmune.

La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los

cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de ligandos endógenos que activaran estos receptores. De esta manera, a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo se aisló la anandamida (AEA) (Devane et al., 1992), el primer EC conocido que resultó ser una amida de un ácido graso poliinsaturado, concretamente del ácido araquidónico. Posteriormente, a partir de intestino de perro y cerebro de rata se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (Mechoulam et al., 1995). Todas estas observaciones han proporcionado una clara evidencia acerca de la existencia de un sistema cannabinoide endógeno.

Además de los receptores CB1 y CB2, acoplados a proteínas G (*GPCRs*) y caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana; se reconoce también el receptor vanilloide tipo 1 (*TRPV1*), canal iónico (Brown, 2007).

CB1 y CB2 son también receptores de lípidos y reconocen análogos de la aciletanolamida, tipificada por la anandamida (araquidonoiletanolamida, AEA), y 2-arachidonoilglicerol (2-AG). TRPV1 es activado por varios lípidos incluyendo aciletanolamidas tales como AEA (Brown, 2007).

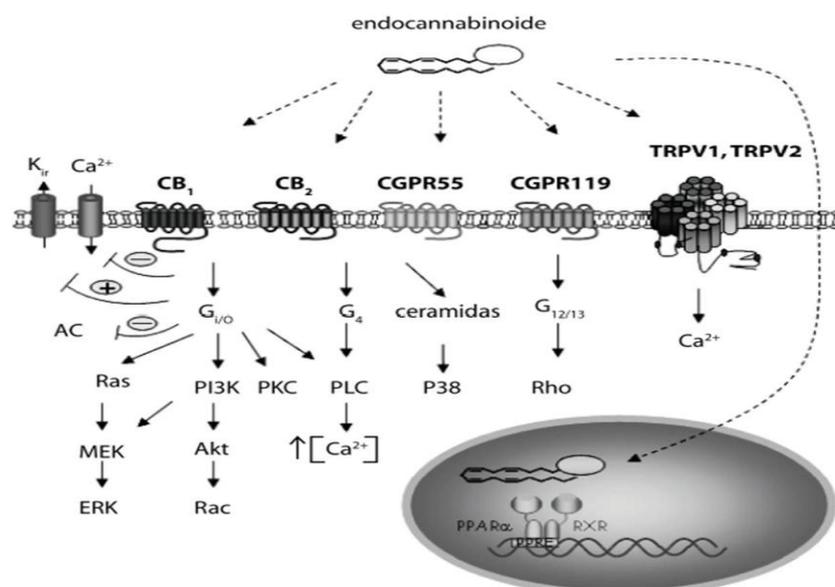


Figura 3. Principales receptores y vías de señalización del sistema endocannabinoide.

Estudios experimentales en roedores han demostrado los efectos hiperfágicos de los cannabinoides endógenos, AEA y 2-AG. Adicionalmente la evidencia de que los EC participan en el control del apetito a través del SNC se deriva de las observaciones de que la administración directa de AEA en el hipotálamo ventromedial (un área rica en el receptor cannabinoide CB1) estimula la ingesta. Además las concentraciones de 2-AG en el procenséfalo límbico (forebrain) e hipotálamo están correlacionados positivamente con la estimulación de la ingesta en ratas (Hildebrandt *et al.*, 2003).

3.3 Localización y características farmacológicas de los EC

Las concentraciones de AEA en el cerebro son muy bajas ya que, este EC no es almacenado en las células en su forma biológicamente activa sino que es sintetizado en respuesta a un determinado estímulo a partir de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular (Felder *et al.*, 1996). Las concentraciones que se alcanzan en el cerebro de 2-AG son mucho mayores que las de AEA (Stella *et al.*, 1997).

La AEA es capaz de unirse a los receptores CB1 y CB2 aunque muestra una mayor afinidad por los CB1 (Felder *et al.*, 1995). A pesar de que la AEA comparte con el Δ^9 -THC así como con otros cannabinoides la mayoría de sus propiedades farmacológicas tanto a nivel del SNC como a nivel periférico, existen diversos efectos ejercidos por este EC que no son mediados por los otros receptores cannabinoides conocidos hasta el momento. De hecho, otros receptores diferentes a los de cannabinoides, como son los TRPV1, pueden ser activados también por la AEA y mediar alguno de los efectos de la misma (Zygmunt *et al.*, 1999).

3.4 Biosíntesis y metabolismo de los EC

Los EC cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula.

Únicamente, a diferencia de lo que ocurre en el caso de otros neurotransmisores y dada la naturaleza lipofílica de estos compuestos, los EC no son almacenados en el interior de vesículas sinápticas. La síntesis de AEA, que es el cannabinoide endógeno más estudiado hasta la fecha, se produce mediante hidrólisis, catalizada por una fosfolipasa D de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, el N-araquidonilfosfatidiletanolamina (Di Marzo *et al.*, 1994).

Este compuesto sirve como depósito de almacenaje para la AEA que es sintetizada y liberada en el momento en que existe una necesidad de la misma. La vida media de la AEA es muy corta ya que es rápidamente recaptada por un transportador de alta afinidad, aún no caracterizado molecularmente, que está presente tanto en neuronas como en células gliales (Hillard *et al.*, 1997; Beltramo *et al.*, 1997).

Una vez que la AEA se encuentra en el interior de la célula es degradada por la acción de una amido-hidrolasa que cataliza la hidrólisis de este EC dando lugar a sus dos componentes fundamentales: ácido araquidónico y etanolamina (Di Marzo *et al.*, 1998).

3.5. Ligandos y Receptores

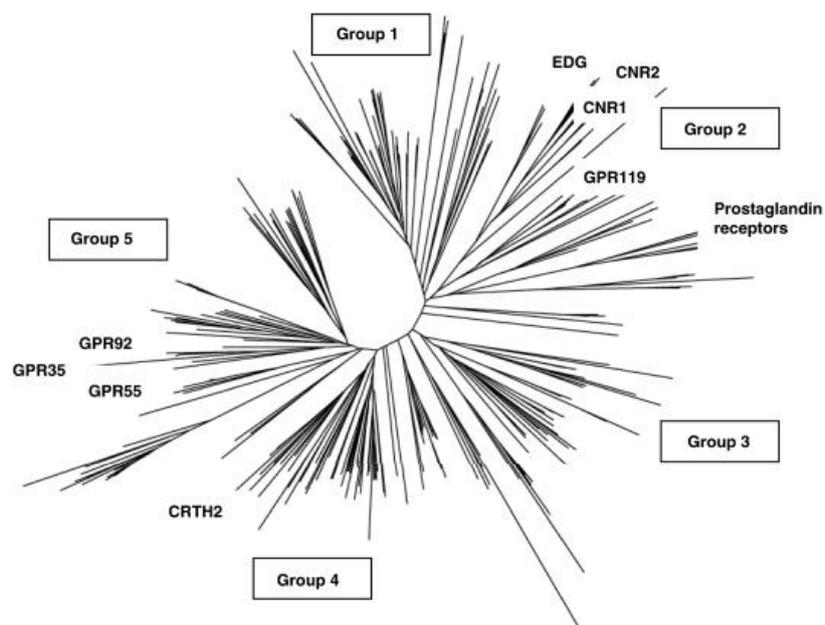


Figura 4. Análisis filogenético de los receptores no-sensoriales humanos acoplados a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Cada línea representa un GPCR, se identifican los receptores de cannabinoides conocidos y otros receptores putativos como GPR55 y GPR119 (Brown, 2007).

Los ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más representativos la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como AEA (Devane *et al.*, 1992) y el 2-AG (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995).

La AEA y parte del 2-AG, que actúa como cannabinoide (2-AG es también un producto intermedio de los triglicéridos y de los fosfolípidos) son liberadas desde las células inmediatamente después de su producción (es decir, sin almacenamiento intermedio en vesículas) para activar sus dianas a nivel local (Di marzo, 2008).

Los EC producen una elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular, y son inactivados con la finalización de la activación autocrina o paracrina del receptor cannabinoide (Pomelli, 2003; Di Marzo *et al.*, 2004). La función endocannabinoide es restaurar la homeóstasis local cuando es alterada por alguna condición de estrés.

El estrés emocional agudo o crónico en mamíferos conduce a cambios en el SEC, activando los receptores CB1 en un sitio y momento específico del cerebro, este mecanismo ayuda al organismo a recuperarse de las consecuencias del estrés (Marsicano *et al.*, 2002; Rademacher *et al.*, 2008).

3.5.1. Receptor Cannabinoide CB1

El receptor CB1 se localiza fundamentalmente en el SNC y está relacionado con el control motor, la cognición, las respuestas emocionales, conducta motivada y la homeostasis (Rodríguez de Fonseca F. *et al.*, 2005). Mediante la aplicación de diferentes técnicas autorradiográficas y de estudios inmunohistoquímicos se ha descrito de forma detallada la distribución de este receptor en el cerebro de rata (Herkenham *et al.*, 1990; Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Tsou *et al.*, 1998).

En este sentido, la mayor densidad del rCB1 se encuentra en los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo entopeduncular y caudado-putamen lateral), capa molecular del cerebelo y ciertas partes del hipocampo (región CA3 del asta de Ammón y capa molecular del giro dentado) (Galiegue *et al.*, 1995). La densidad de este receptor es más moderada en las capas I y IV de la corteza cerebral, mientras

que un escaso número de receptores se encuentra en el hipotálamo, tallo cerebral y médula (Galiegue *et al.*, 1995).

Además de su localización en el cerebro, los receptores CB1 también están presentes a nivel periférico. De esta forma, se han encontrado receptores CB1 en la glándula pituitaria, células inmunes, tejidos reproductivos, tejidos gastrointestinales, bazo, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, vesícula biliar y glándula adrenal. Recientemente, el hígado y el tejido adiposo se han añadido a esta lista (Cota *et al.*, 2003; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). A nivel presináptico, el rCB1 se localiza en terminales nerviosos simpáticos (Galiegue *et al.*, 1995; Ishac *et al.*, 1996).

El rCB1 es de interés en la regulación del apetito. El agonista exógeno Δ^9 -tetrahydrocannabinol (el principal componente psicoactivo de la marihuana) es hiperfágico en roedores y humanos (Hildebrandt *et al.*, 2003).

Además, un ensayo crítico de la supuesta supresión del apetito a través de antagonistas y agonistas inversos de CB1, es la observación sistemática del modo en que estos compuestos provocan comportamientos similares a la saciedad natural (Hodge *et al.*, 2008). La secuencia comportamental de saciedad es una técnica observacional que examina sesiones de alimentación, para registrar una progresión ordenada de comportamientos predominantes, que va desde la alimentación hasta el acicalamiento y finalmente el descanso (Hodge *et al.*, 2008).

Adicionalmente, durante la pasada década, se encontró que los receptores cannabinoides y sus ligandos endógenos, se encuentran distribuidos dentro del SNC de mamíferos. Aunque actualmente se sabe poco acerca de la participación de estos sistemas en el control del comportamiento, existe un soporte histórico para un posible rol en la regulación del apetito. Por ejemplo, un efecto reportado comúnmente por la intoxicación espontánea de marihuana es comer de manera compulsiva.

De igual manera los agonistas de CB1 han sido estudiados por su potencial como tratamientos en la anorexia, el síndrome de desgaste asociado a la quimioterapia y el SIDA (Salamone *et al.*, 2007).

En animales, los efectos de los agonistas cannabinoideos en la ingesta de alimentos dependen en gran medida de la dosis. A pesar de que en algunos documentos bibliográficos se ha descrito que la administración de agonistas de CB1 disminuye la ingesta, estos estudios han utilizado normalmente dosis más altas que causan catalepsia y supresión locomotora. Por otra parte, la literatura donde se describe el uso de dosis bajas a moderadas ha mostrado que los agonistas de CB1 pueden aumentar la ingesta (Williams *et al.*, 2002).

Por otra parte los ratones *knockout* para el rCB1 comen menos que sus controles *wild type* y el tratamiento con un antagonista del mismo receptor reduce la ingesta en los ratones *wild type* pero no en los *knockout* (Hildebrant *et al.*, 2003).

Estos ratones no sólo consumen menor cantidad de alimento después de una privación de los mismos, sino que además acumulan menos grasa en el tejido adiposo, en comparación con sus controles *wild type* pair-feed (Cota *et al.*, 2003).

Adicionalmente, estudios cuando se compararon ratones *knockout* para el rCB1 con sus correspondientes controles *wild type*, los ratones carentes de este receptor presentaron una reducción espontánea en el consumo de calorías y como consecuencia de una masa grasa reducida, se observó una disminución en el peso corporal (Cota *et al.*, 2003).

A nivel hipotalámico se encontró que los niveles de expresión de ARNm de CB1 coexpresan con neuropéptidos tales como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART), MCH y la prepro-orexina, neuropéptidos conocidos por modular la ingesta de alimentos. Se encontró que los ratones carentes del rCB1, mostraron un incremento significativo de los niveles de ARNm de CRH en el núcleo paraventricular y reducción de los niveles de ARNm de CART en las áreas dorsomedial y lateral del hipotálamo (Cota *et al.*, 2003).

Adicionalmente, estudios llevados a cabo por el grupo de Pagotto (Quarta C. *et al.*, 2010) en ratones mutantes condicionales *knockout* para CB1 – CaMK (*CaMK-CB1-KO mice*), caracterizados por una delección del rCB1 en las neuronas del prosencéfalo, (Marsicano *et al.*, 2003) al comparar su fenotipo con el de ratones *knockout* de CB1

(Marsicano *et al.*, 2002) y de ratones tratados con el Rimonabant, mostraron la ausencia de la expresión de mRNA de CB1 en neuronas intrínsecas del hipotálamo en ratones CaMK- *knockout* para CB1.

Los resultados encontrados indicaron que la expresión de CB1 en las neuronas del cerebro anterior y simpático es un importante mediador de los efectos agudos de Rimonabant en la ingesta de alimento, peso corporal, y la oxidación de lípidos (Quarta C. *et al.*, 2010). La exposición a HFD estimula la actividad del SEC a través de los endocannabinoides (Kunos *et al.*, 2008) y debido a los efectos inhibitorios de la señalización de CB1, la activación de el SEC inducida por HFD probablemente puede atenuar las vías neuronales que controlan la actividad del SNS, conduciendo a una disminución en la actividad del SNS, favoreciendo a su vez, el almacenamiento de energía y la acumulación de grasa (Quarta C. *et al.*, 2010). De manera contraria en los ratones CaMK-CB1-*knockout* la reducida señalización del SEC a nivel de las neuronas del cerebro anterior y del simpático, favorece la hiperactividad del SNS, lo cual conduce al fenotipo delgado observado en estos ratones, particularmente cuando se someten a HFD (Quarta C. *et al.*, 2010).

3.5.2 Receptor Cannabinoide CB2

Poco después de la caracterización molecular del rCB1, Munro y cols. (1993) describieron la existencia de un segundo receptor para compuestos cannabinoides que exhibe una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con el rCB1, pero que a diferencia de éste, no parece expresarse en tejido cerebral (Galiegue *et al.*, 1995).

El receptor CB2 (rCB2), alcanza densidades importantes en distintos tipos de células inmunes: macrófagos, células B y “natural killer” (NK), monocitos, neutrófilos y células T. En algunas de estas poblaciones celulares, los niveles de expresión de los rCB2 son equiparables, desde el punto de vista cuantitativo, a los de los rCB1 en el SNC (Galiegue *et al.*, 1995).

Todos los tipos celulares mencionados intervienen en los procesos inflamatorios, por lo que se considera que los rCB2 pueden desempeñar importantes funciones en esos fenómenos. Su presencia en esas células podría explicar buena parte de los efectos moduladores que ejercen los cannabinoides naturales y sintéticos sobre la respuesta inmune (Kaminski, 1998).

3.6. Agonistas

Los agonistas cannabinoides producen incremento del apetito y del peso corporal en experimentación animal. Por lo cual, una serie de investigaciones se han centrado en el estudio del papel del SEC en la regulación del apetito, el peso y el balance energético en animales.

Se han usado modelos de animales deprivados de alimentos desde 1 hora hasta 24 horas, posteriormente pre-saciados antes de la administración de la sustancia experimental o no pre-saciados (modelo de animales hiperfágicos en este último caso), y podían estar deprivados de agua o no simultáneamente. Otros autores han empleado modelos de animales con libre acceso a comida, con dietas ricas en hidratos de carbono, ricas en grasas o dietas estándar. Por otro lado, son interesantes los datos aportados por los modelos animales de obesidad, ya sean inducidos por dieta (DIO) o manipulados genéticamente (modelos de ratones *ob/ob* o *db/db*, ya sean con déficit del gen de la leptina o déficit del receptor de ésta, respectivamente, modelo de ratas obesas Zucker, etc). Por último, son muy útiles los modelos de animales *knockout* para el rCB1.

Los experimentos más recientes confirman el efecto orexígeno de los agonistas incluso en animales saciados y dicho efecto está mediado por los rCB1.

Los agonistas cannabinoides más usados son el Δ^9 -THC y un agonista endógeno como la AEA que aumentan la ingesta en distintos procedimientos experimentales (Berry & Mechoulam 2002). Otros agonistas como el 2-AG producen un efecto similar (Kirkham *et al.*, 2002). Así mismo, se ha descrito que el Δ^8 -THC, con menos efectos

psicoactivos que el Δ^9 -THC, podría tener un efecto orexigénico más potente (Avraham *et al.*, 2004).

El efecto orexigénico se observa con la administración de agonistas en centros cerebrales relacionados con la regulación de la ingesta, como el VMH (Jamshidi & Taylor, 2001); NAc (Kirkham *et al.* 2002) o en el cuarto ventrículo por la proximidad del núcleo parabraquial (Miller, Murray, Freeman y Edwards, 2004).

3.7. Antagonistas

El desarrollo de antagonistas específicos para los receptores cannabinoides ha sido también de vital importancia para la investigación en este campo. Compuestos que bloquean al rCB1 han generado un gran interés como supresores del apetito.

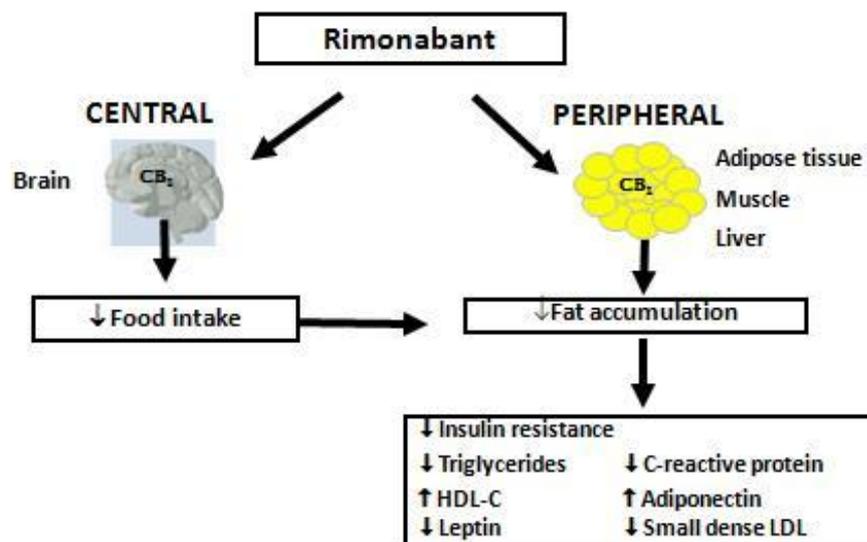


Figura 5. Efectos metabólicos del bloqueo del receptor cannabinoide CB1.

Dentro de este grupo de compuestos destacan el SR141716A (Rimonabant) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994), compuesto que exhibe una marcada selectividad por los rCB1 frente a los rCB2, y frente a otros tipos de receptores para neurotransmisores, es capaz de prevenir y/o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides que actúan a

través del rCB1 tanto *in vitro*, como *in vivo* (Pertwee, 1997); y por otra parte se halla el SR144528 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998), antagonista específico de rCB2.

A partir de la estructura del SR141716A se han desarrollado moléculas como el AM-251 y el AM-281, que también antagonizan de forma selectiva efectos cannabimiméticos derivados de la activación de rCB1.

El SR141716A (N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-Pyrazole-3-Carboxamide) mostró tener eficiencia anorexigénica en un buen número de estudios a corto plazo (agudos) en ratas, ratones y monos (Hildebrant *et al.*, 2003). Estos estudios investigaron la actividad anorexigénica a corto plazo después de una sola dosis del compuesto. Estudios realizados en ratas y ratones han demostrado que la eficacia a largo plazo del SR141716A es transitoriamente anorexigénica pero con el tiempo se produce una reducción sostenida del peso corporal en comparación con el grupo control que es independiente de la ingesta (Hildebrant *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que la administración de Rimonabant a dosis de 1-10 mg/kg en experimentos durante 14 a 35 días, disminuye la ingesta en animales con acceso ilimitado a la comida (Colombo *et al.*, 1998; Simiand *et al.*, 1998) y en animales privados de alimentos (Gómez *et al.*, 2002). La pérdida de peso oscila alrededor del 20% del peso basal (Pagotto y Pasquali, 2006).

En humanos, la administración del fármaco (Rimonabant) se ha asociado con la reducción de peso (aunque se observó una recuperación del peso después de la interrupción del tratamiento), el aumento en el colesterol HDL, una disminución de las concentraciones de triglicéridos, reducción de los niveles de glucosa e insulina en plasma, disminución de los niveles de leptina en plasma y aumento de los niveles de adiponectina plasmáticos (Bermudez-Silva FJ *et al.*, 2010). Adicionalmente al Rimonabant, otros antagonistas/agonistas inversos del rCB1, como el taranabant (M (CP-945598, SLV-319) están en fase de estudio (Bermudez-Silva FJ *et al.*, 2010).

Sin embargo, el mecanismo por el cual el SR141716A reduce la ingesta no es suficientemente conocido y es posible que la reducción de peso pueda ser

consecuencia de acciones provocadas por diferentes mecanismos homeostáticos y hedónicos (Hodge *et al.*, 2008).

Algunos autores han puesto de manifiesto que el SR141716A revierte los efectos de la AEA con menos potencia que los de otros agonistas cannabinoides en determinados sistemas *in vitro*, y también se ha sugerido que este antagonista cannabinoide no es capaz de bloquear algunos efectos farmacológicos de la AEA en ensayos *in vivo*, a concentraciones que revierten totalmente las acciones de otros agonistas (Smart *et al.*, 2000). En los sistemas *in vivo*, esta discrepancia se ha atribuido a la capacidad de la AEA para activar receptores vanilloides, además de receptores cannabinoides (Di Marzo *et al.*, 1998)

Por otra parte, los resultados obtenidos en estudios de modelos animales con obesidad inducida por dieta, donde se han bloqueado a nivel periférico los rCB1, utilizando el LH-21 como antagonista neutral de la acción periférica de estos receptores, el cual tiene poca penetración en el cerebro, han mostrado ser un tratamiento seguro y eficaz contra la obesidad, aparentemente carece de los efectos adversos secundarios a nivel psiquiátrico producidos por los antagonistas de acción central de los rCB1 (Alonso M. *et al.*, 2012).

3.8. SEC: adipogénesis y lipogénesis

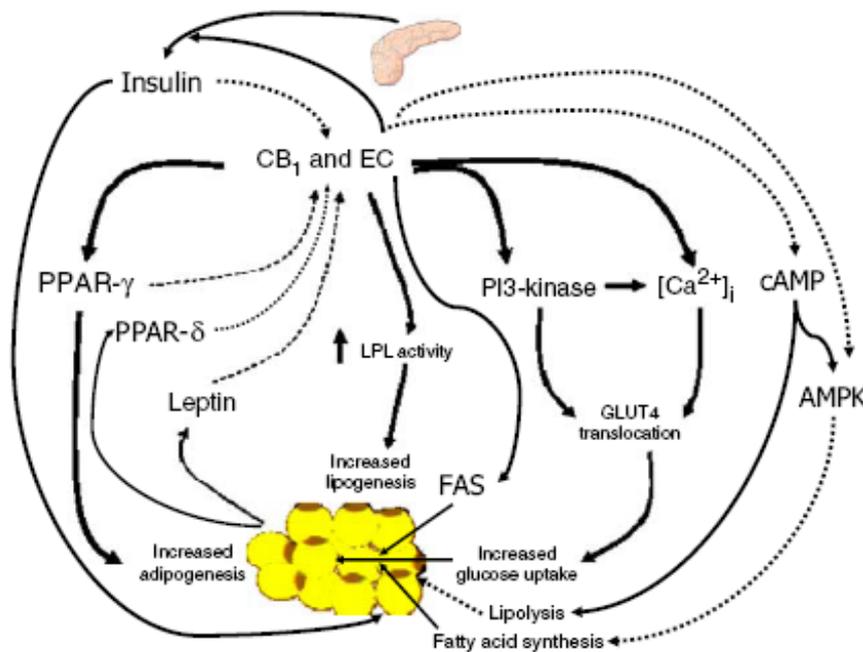


Figura 6. Rol del sistema endocannabinoide en la regulación de la adipogénesis y la lipogénesis (Di Marzo, 2008).

Existe evidencia de que el SEC juega un papel importante en la adipogénesis. Los niveles de CB1 se incrementan durante la diferenciación de pre-adipocitos de células 3T3-F442A, en ratones (Bensaid *et al.*, 2003; Pagano *et al.*, 2007).

La estimulación de CB1 en pre-adipocitos 3T3-F442A de ratones y adipocitos humanos se acompaña de un incremento en la expresión de los niveles de mRNA de PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) y por un incremento en el tamaño de los adipocitos y un mayor contenido de triacilglicerol (Matias *et al.*, 2006). El bloqueo del rCB1 inhibe la proliferación de adipocitos 3T3-F442A (Gary-Bobo *et al.*, 2006).

3.9. SEC: Obesidad, hiperglicemia y diabetes en animales y humanos

Además de otras implicaciones del SEC en procesos fisiológicos y terapéuticos, éste participa también en el control del metabolismo de lípidos y la glucosa (Di marzo, 2008).

Cuando existe un desequilibrio en el consumo de energía, el SEC también sufre alteraciones en algunos órganos que participan en la homeóstasis energética, en particular, en el tejido adiposo intra-abdominal. Esta desregulación podría contribuir a una acumulación excesiva de grasa visceral y a una reducción en la liberación de adiponectina en este tejido, trayendo consigo, la aparición de varios factores de riesgo cardiometabólico asociados con la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) (Di marzo, 2008).

Este fenómeno podría ser la base de los mecanismos de acción de los agonistas y antagonistas inversos de CB1 desarrollados recientemente por varias empresas farmacéuticas como coadyuvantes a la modificación en el estilo de vida para la reducción de peso, el control glucémico y la dislipidemia, presentes en personas obesas y en pacientes con DT2. Sin embargo, aunque su eficacia clínica ha sido demostrada en humanos, el hecho de que produjese algunos efectos secundarios indeseables hizo que se retirara del mercado el Rimonabant y que otros en diferentes estadios de estudios en fase clínica se haya detenido su desarrollo.

3.9.1. Modelos animales

En ratones obesos con un mal funcionamiento en el sistema de señalización de leptina, se observa permanentemente una elevación de los niveles de EC en tejido y mayores niveles de expresión de leptina en el hipotálamo, donde la leptina disminuye la biosíntesis de EC (Di Marzo et al., 2001).

En los órganos periféricos, se ha confirmado que la insulina disminuye los niveles de EC o contribuye a la degradación de EC en animales delgados, como se observa en células de insulinoma de ratas, en adipocitos 3T3-L1 de ratón y en células de grasa subcutánea de humanos; por otra parte, la resistencia a la insulina puede dar origen a un aumento en los niveles de EC (Matias *et al.*, 2006).

El incremento en los niveles de 2AG y/o AEA precede al desarrollo de la obesidad, acompañada de hiperglicemia en el hígado (Osei-Hyama *et al.*, 2005), páncreas (Di Marzo *et al.*, 2008), tejido adiposo marrón, músculo sóleo y corazón de ratones alimentados con HFD (Matias *et al.*, 2008).

En el páncreas de ratones jóvenes de 3 a 8 semanas de edad alimentados con HFD, se observa un incremento en los niveles tanto de AEA como de 2AG, acompañado por la presencia de enzimas biosintéticas en células alfa y beta y la disminución de FAAH (*Fatty acid amide hydrolase*) en células alfa (Di Marzo *et al.*, 2008).

La disminución en los niveles de FAAH y el aumento en los niveles de CB1, se acompañó también de un incremento en los niveles de EC a nivel hepático en ratones alimentados durante 3 semanas con una dieta distinta a las dietas altas en grasa (Oshei-Hyama *et al.*, 2005).

Ratones alimentados con HFD muestran una redistribución de los EC en varios depósitos grasos: disminución en los niveles de grasa subcutánea, sin cambios en la grasa mesentérica y un incremento en la grasa epididimal (Di Marzo *et al.*, 2008; D'Eon *et al.*, 2008).

Por otra parte, experimentos *in vivo* realizados en ratas, han sugerido el rol del SEC en el control de la glicemia. La administración intraperitoneal aguda de agonistas de CB1 retrasa la salida de glucosa en plasma después de su administración oral. Los agonistas de CB2, por su parte, ejercen el efecto contrario (Bermúdez *et al.*, 2007).

Existe evidencia de que la administración del antagonista de CB1, AVE1625 causa glicogenolisis en hígado y un incremento inmediato en el consumo de energía, lo cual ha sido atribuido no solo a un incremento en la oxidación de grasa, sino también a un aumento transitorio en la oxidación de glucosa (Herling *et al.*, 2007).

Por otra parte, la disminución en la utilización de glucosa podría ser una ventaja para que los EC medien la captación de glucosa en los adipocitos para la biosíntesis de nuevo triacilglicerol. Estos efectos de los EC, podrían deberse a la reducción de la liberación de insulina en las células beta o a la inhibición de la sensibilidad a la insulina a nivel de tejidos no adiposos que utilizan glucosa, o a ambos (Di Marzo, 2008).

Adicionalmente, el rol de los EC en el metabolismo de la glucosa hepática no es muy conocido, quizá debido a que la cantidad del receptor CB1 en hígado es baja

(aunque en ratones con obesidad inducida por dieta puede observarse una mayor regulación de la producción de CB1 en hígado) (Di Marzo, 2008).

Se ha encontrado que ratones expuestos a HFD desarrollan obesidad y esteatosis y son resistentes a la insulina y a la leptina así como cambios en los lípidos plasmáticos similares a los asociados con el síndrome metabólico (Poirier *et al.*, 2005).

Osei-Hyiaman *et al.*, (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008) encontraron que la activación de los rCB1 en ratones *wild type* estimula la lipogénesis de novo en el hígado a través de la inducción del factor de transcripción lipogénico SREBP1c y su enzima diana acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1) y el ácido graso sintasa (FAS) (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005).

El grupo de Kunos G. (2008), probó la función de los rCB1 a nivel hepático, a través de la generación de un modelo de ratón con la supresión selectiva de CB1 en el hígado y compararon los efectos metabólicos de la HFD, así como también los efectos del tratamiento con el agonista y el antagonista de cannabinoides HU-210 y Rimonabant respectivamente, y se compararon con los ratones *wild type* y con ratones *knockout* para el rCB1 (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

La resistencia de los ratones deficientes del rCB1 a la obesidad y a la esteatosis inducida por dieta a pesar de una ingesta calórica similar, indicó un aumento del gasto energético y la oxidación de la grasa (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

En consecuencia, estos estudios indicaron que los EC actúan en los rCB1 hepáticos mediando la esteatosis inducida por la dieta a través del incremento de la lipogénesis de novo y la inhibición de la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

En este mismo sentido, se ha demostrado que el tratamiento crónico con un antagonista del rCB1 reduce de manera importante la esteatosis en ratas genéticamente obesas (Gary-Bobo *et al.*, 2007).

A nivel de salud pública, la importancia de la esteatosis hepática mediada por los rCB1 ha sido ilustrada por hallazgos epidemiológicos donde el uso diario de la

marihuana, predispone a la esteatosis hepática en pacientes con hepatitis C (Hezode, C. *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el alto consumo de marihuana también se ha relacionado con el aumento a nivel plasmático de la apolipoproteína C-III (Jayanthi, S., *et al.*, 2008), un componente plasmático derivado del hígado, el cual se correlaciona con la dislipidemia y el riesgo cardiovascular en el síndrome metabólico (Ooi, E. *et al.*, 2008).

Estos hallazgos respaldan el potencial terapéutico del bloqueo del rCB1 en el tratamiento del hígado graso de diversas etiologías, las cuales son factores predisponentes tanto en la DT2 como en la cirrosis hepática (Osei- Hyiaman *et al.*, 2008).

3.9.2. Estudios en humanos

La primera evidencia del aumento de EC en humanos proviene de estudios en mujeres con sobrepeso/obesidad que tienen un importante desorden en la alimentación (Monteleone *et al.*, 2005) y en mujeres postemopáusicas obesas (Engeli *et al.*, 2005), en quienes se encuentran elevados los niveles de AEA en sangre o AEA y 2-AG respectivamente.

Sin embargo, en un estudio posterior el incremento de los niveles de 2-AG en personas con sobrepeso/obesidad, solo fue observado en el tejido adiposo visceral, pero no en el tejido subcutáneo (Matias *et al.*, 2006).

La sobre expresión del sistema EC en los depósitos de grasa visceral y subcutánea se confirmó con estudios que mostraron una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de 2-AG, no de AEA, y la cantidad de grasa intra-abdominal (medida a través de tomografía computarizada) (Blüher *et al.*, 2006; Côte *et al.*, 2007).

En pacientes con DT2, no obesos (IMC ~30), controlada parcialmente la hiperglicemia, los niveles de AEA y 2-AG se encuentran elevados en comparación con los controles no diabéticos (Matias *et al.*, 2006).

La desregulación del sistema EC y los niveles de CB1 pueden afectar todas aquellas acciones biológicas que son ejercidas por el SEC en varios órganos. En el tejido adiposo, el desequilibrio de los EC en los depósitos grasos visceral y subcutáneo podría determinar una acumulación excesiva de grasa (Di Marzo et al., 2008).

Teniendo en cuenta el rol desempeñado por la grasa intra-abdominal en la resistencia a la insulina y a la inflamación aterogénica, esto podría contribuir al desarrollo de la DT2 y la aterosclerosis.

La relación causa-efecto entre la sobre activación del SEC (particularmente en grasa intra-abdominal) y los factores de riesgo cardiometabólicos en humanos, se ha encontrado en la correlación entre los niveles plasmáticos de 2-AG y el incremento de triacilglicerol, de glucosa en ayunas y la disminución de la sensibilidad a la insulina y el HDL-colesterol en pacientes obesos (Blüer *et al.*, 2006, Côte *et al.*, 2007).

Adicionalmente, entre los años 2001 y 2004 se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorio en humanos donde participaron centros de Europa y Estados Unidos, denominado RIO-Europa (*Rimonabant In Obesity*) con el fin de evaluar la eficacia y seguridad del Rimonabant en la reducción del peso corporal y en la mejora de los factores de riesgo cardiovascular en pacientes con sobrepeso u obesidad (Van Gaal *et al.*, 2005).

En un estudio de 1507 pacientes con un IMC de 30 kg/m^2 o más y sujetos con masa corporal superior a 27 kg/m^2 con dislipidemia tratada o sin tratar, con hipertensión o las dos, fueron randomizados para recibir tratamiento doble ciego con placebo, 5 mg de Rimonabant, o 20 mg de Rimonabant una vez al día, además de una dieta hipocalórica (600 kcal /de déficit al día). El criterio de valoración de la eficiencia del uso del Rimonabant, fue el cambio de peso originado desde el inicio hasta después de un año de tratamiento (Van Gaal *et al.*, 2005).

Este estudio demostró que el tratamiento durante un año con Rimonabant llevaba a una pérdida de peso clínicamente significativa y sostenida, una reducción de

la circunferencia abdominal y mejoras asociadas a varios factores de los riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, incluyendo el colesterol (HDL) y los triglicéridos, el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y la prevalencia del síndrome metabólico (Van Gaal *et al.*, 2005).

Sin embargo, la FDA (*Food and Drug Administration*) rechazó la venta del Rimonabant en los Estados Unidos en junio del 2007, debido a que el tratamiento con este medicamento aumentaba la incidencia de enfermedades psiquiátricas, incluyendo un mayor riesgo de suicidio y problemas neurológicos (Ugur T. *et al.*, 2008).

4. RECEPTOR HUÉRFANO GPR55 (Receptor acoplado a proteínas G-55)

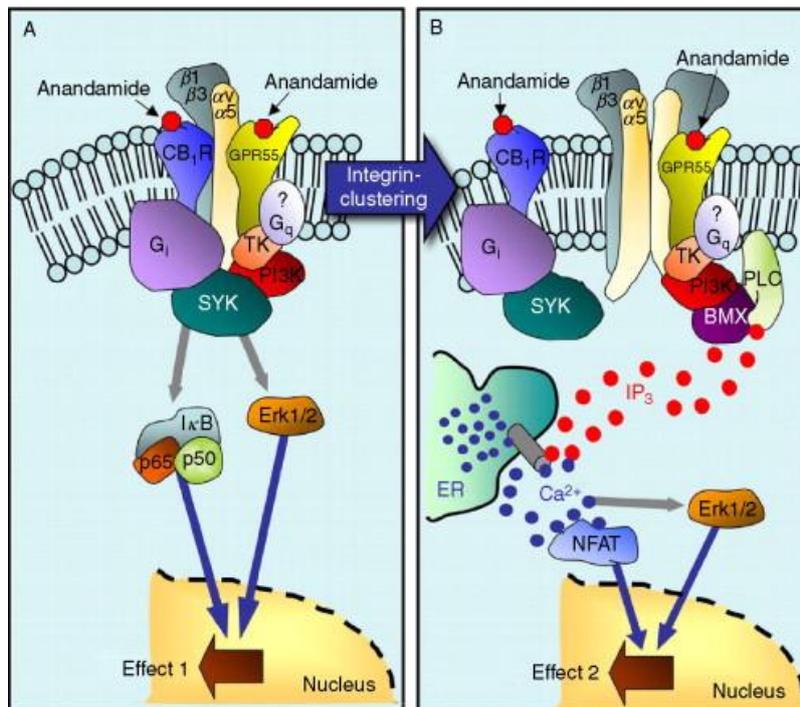


Figura 7. Vía de señalización para la interacción entre GPR55 y el receptor CB1 propuesto por Waldeck-Weiermair *et al.* (2008).

Filogenéticamente, GPR55 (ortólogo) ha sido identificado solo en genomas de rata, ratón, perro (GenBank Catalogo No XM_543283), vaca (GenBank Catalogo No XM_584870), chimpancé y humano; no se ha encontrado en aves, ni en peces. Por tanto, parece que el GPR55 pudo haber surgido sólo en mamíferos (Baker *et al.*, 2006).

El GPR55 fue considerado un receptor huérfano de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), identificado originalmente *in silico* a partir de la base de datos de la secuencia expresada. El mapa genético de este gen se encuentra en el cromosoma 2q37 de humanos y codifica una proteína de 319 aminoácidos, que contiene secuencias para la glicosilación y varios sitios de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA) (Baker *et al.*, 2006).

Adicionalmente, muestra una baja homología con las secuencias de los receptores, CB1 (13%) y CB2 (14%) (Moriconi *et al.*, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, los cannabinoides están implicados en numerosos efectos fisiológicos y desde la identificación de sus dos receptores, CB1 y CB2, acoplados a proteínas G, y TRPV1, y sus correspondientes ligandos endógenos, se ha encontrado que ejercen acciones fisiológicas que están mediadas por estos receptores específicos.

Sin embargo, existen varios ejemplos donde estos receptores clásicos no explican la farmacología observada. Estudios realizados en ratones *knockout* para CB1 o CB2, han confirmado la existencia de dianas adicionales llamadas en términos generales, receptores *non-CB1/CB2*. Pese a los esfuerzos de los investigadores, la identidad molecular de estos receptores aún es confusa (Brown, 2007).

En 1999, Wagner y cols., indicaron que podía existir otro receptor adicional a CB1 y CB2. En lechos arteriales de ratas perfundidas, se observó que el cannabinoide endógeno AEA, producía vasodilatación, mientras que algunos potentes agonistas de los receptores de CB1 y CB2 no causaban esta respuesta. Estos datos provocaron que se postulara la existencia de un receptor cannabinoide endotelial no-CB1/no-CB2, o “receptor anormal de cannabidiol (*ABN-CBD*)”. Así en el mismo año se identificó y se clonó el nuevo receptor 55 acoplado a proteínas G, GPR55 (Járai *et al.*, 1999).

Las evidencias surgidas de la literatura acerca de que algunos ligandos de cannabinoides podrían unirse a GPR55, destacaron la posibilidad de encontrar una nueva proteína que pudiese actuar como un nuevo receptor cannabinoide “tipo 3 (CB3)” (Brown, 2007). Se ha implicado a dos receptores huérfanos acoplados a

proteínas G, como nuevos receptores de cannabinoides; estos son, GPR119, propuesto como receptor para la oleoiletanolamida (OEA) (Overton *et al.*, 2006), y GPR55, como un receptor activado por múltiples ligandos cannabinoides (Brown, 2007).

Inicialmente la poca información que se tenía sobre GPR55 como un receptor cannabinoide provino de una patente y de presentaciones públicas no publicadas (Baker *et al.*, 2006).

Por su parte, Staton *et al.*, (2006) describieron fenotipos cardiovasculares de ratones *knockout* para GPR55, en modelos de dolor inflamatorio y neuropático.

De esta manera, se han estudiado receptores no CB1/CB2 en la resistencia a la vascularización de arterias mesentéricas, donde la AEA y otros análogos causan vasodilatación; no ocurre lo mismo con agonistas sintéticos de cannabinoides. Este efecto es abolido por supresión endotelial y es sensible de ser bloqueado por SR141716A, pero no por un antagonista químico similar, AM251, del cual se requieren concentraciones altas para inhibir a CB1 (Begg *et al.*, 2005).

En este mismo sentido y basados en las patentes de Brown & Wise (2001 - Glaxosmithkline) y Drmota *et al.* (2004 – Astrazenca); Baker y cols en 2005, también han hecho referencia a la existencia de GPR55, como un nuevo receptor acoplado a proteínas G, el cual, como se ha mencionado anteriormente, podría ejercer sus acciones de forma independiente a los receptores de cannabinoides conocidos, CB1 y CB2.

4.1. Localización de GPR55

El ARNm de GPR55 se localiza ampliamente en numerosos órganos, especialmente en las glándulas adrenales, tracto gastrointestinal, bazo y SNC de humanos (Moriconi *et al.*, 2010; Ryberg *et al.*, 2007).

A nivel cerebral se han encontrado mayores niveles de expresión de ARNm de GRP55 en núcleo caudal y el putamen, en menor cantidad en hipocampo, tálamo,

pons, cerebelo y corteza frontal e hipotálamo (Brown, 2007; Sawzdargo *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2006).

Estas localizaciones sugieren que el GPR55 puede ejercer un papel importante en la regulación de varios procesos fisiológicos.

El análisis por PCR tiempo real (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ha mostrado la expresión de GPR55 en varios tejidos humanos. Adicionalmente, se encontraron niveles de mRNA de GPR55 en tejido adiposo omental pero no en tejido adiposo subcutáneo. Sin embargo, la importancia funcional de esta distribución requeriría la generación de ligandos específicos y de animales *knockout* condicionales (Brown & Wise, 2001).

4.2. Farmacología de GPR55

El GPR55 está acoplado a proteína G13 y la activación de este receptor, conduce a la estimulación de rhoA, CDC42 y rac1 (Lauckner *et al.*, 2008).

El GPR55 es activado por los cannabinoides de la planta *cannabis sativa*, Δ^9 -THC y cannabidiol, y por los endocannabinoides anandamida, 2-AG y noladin éter (Ryberg *et al.*, 2007). El cannabinoide sintético CP-55940 (Ryberg *et al.*, 2007), también es capaz de activar a GPR55, mientras que cannabinoides estructuralmente similares como WIN55, 212-2, no activan el receptor (Johns *et al.*, 2007).

Existen pruebas que indican que el GPR55 es activado por ciertos ligandos cannabinoides y por el lípido bioactivo *L- α -lysophosphatidylinositol (LPI)*. Este se acopla a proteínas G12, activando RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) y movilizando Ca^{2+} intracelular, posiblemente en un agonista y dependiendo del tejido, esto podría indicar la “selectividad agonista funcional” de GPR55 (Ross, 2009). El GPR55 tiene una homología más alta con GPR23, GPR35, P2Y5 Y CCR2 (Sawzdargo *et al.*, 1999).

Se han observado efectos en receptores de cannabinoides que no son ni CB1, ni CB2, con una serie de ligandos cannabinoides incluyendo AEA y virodhamina (los

cuales son eicosanoides) y compuestos fitocannabinoides como O-1602 y el cannabinoide análogo conocido como CBD-anormal. Estos efectos son antagonizados por CBD y su análogo O-1918 y concentraciones micromolares del antagonista del receptor CB1, SR141716A (Rimonabant) (Ross, 2009).

Esta nueva diana se ha conocido con el nombre de receptor cannabinoide anormal (CBD), receptor CBX o receptor endotelial de AEA (Begg *et al.*, 2005; Mackie & Stella, 2006). Es evidente que la farmacología que rodea al CBD, podría abarcar varios nuevos receptores hasta ahora no reconocidos como cannabinoides, uno de los cuales podría ser GPR55.

Teniendo en cuenta que los cannabinoides abarcan tres categorías: los EC, los phytocannabinoides y pequeñas moléculas sintéticas que tienen como objetivo los receptores CB1 y CB2; los efectos hasta ahora no reconocidos de los phytocannabinoides mediados por GPR55 y por ciertos ligandos, no clasificados anteriormente como receptores selectivos de cannabionides, podrían haber originado una interpretación errónea del papel de CB1 y CB2 en varios sistemas.

En el mismo sentido, LPI y otros lípidos relacionados también interactúan con GPR55 (Oka *et al.*, 2007); y no existe evidencia de que estos compuestos se unan a los receptores CB1 y CB2.

El efecto de los compuestos ya mencionados sobre el GPR55 ha sido investigado usando varios ensayos farmacológicos incluyendo [³⁵S] GTPγS (el cual mide el cambio GDP-GTP, inducido por el agonista, como un indicador de activación del receptor); y la medición de la capacidad de los compuestos para aumentar los niveles de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i), inducir la rápida fosforilación de la señal extracelular regulada por kinasa (ERK) o la activación de las pequeñas proteínas GTPasa rhoA, y cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) (Ross, 2009).

Es importante señalar también, que LPI podría activar varias dianas adicionales incluyendo el doble dominio de canales de potasio (*two-pore-domain K⁺ channels*), TREK-1 (*Potassium channel subfamily K member 2*) y TRAAK (*Potassium channel subfamily K member 4*) (Maingret *et al.*, 2000).

Adicionalmente, Oka *et al.* (2007) realizaron estudios en células embrionarias 293 de riñón humano (HEK293), en los cuales obtuvieron pruebas de que GPR55 es un receptor intrínseco funcional para LPI.

4.3. Funciones de GPR55

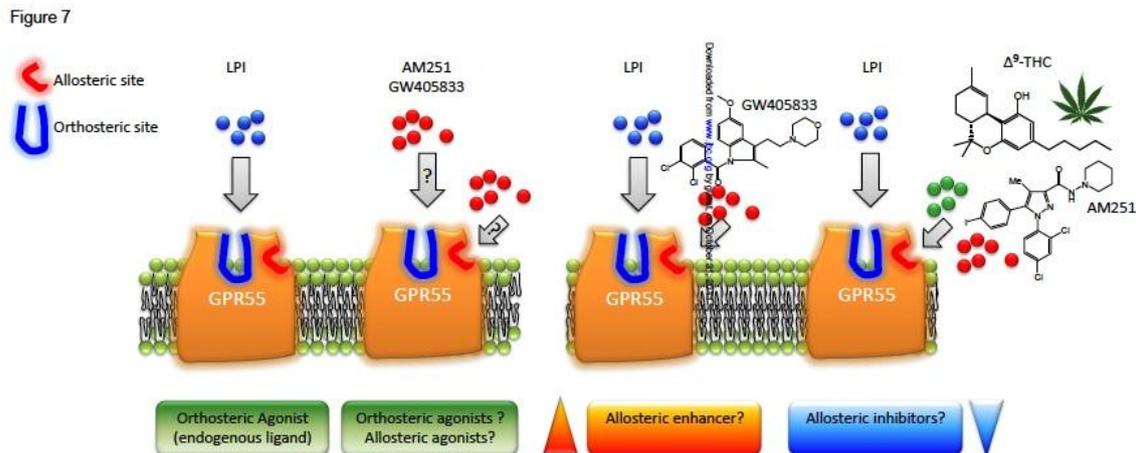


Figura 8. GPR55 demuestra actividad cannabinoide (J. Biol. Chem. 2011)

La patente de GlaxoSmithKline describió por primera vez la asociación entre GPR55 y cannabinoides. Describieron la expresión de GPR55-humano en cepas de levadura que coexpresaban proteínas G quiméricas (Brown, 2007).

Estas células crecen sólo bajo condiciones de activación del receptor, permitiendo una detección sensible y específica del receptor, o la activación del receptor por ligandos agonistas (Brown, 2007).

Debido a la falta de GPCRs endógeno en las células de levadura, este acercamiento ha sido un método útil para identificar ligandos endógenos u otros ligandos para GPCRs huérfanos (Brown, 2007).

Debido a que el GPR55 tiene una alta expresión en tejido adiposo, la patente de Brown & Wise (2001), postuló que este receptor tenía implicaciones sobre la lipólisis, pero también se ha sugerido su participación en el control de la presión arterial (Baker *et al.*, 2006).

El GPR55 se expresa en ciertos lechos vasculares y se ha encontrado que estimular este receptor con un potente análogo del cannabidiol anormal, O-1602 disminuye espontáneamente la presión arterial en ratas hipertensas (Járai *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2006).

Estudios adicionales acerca de la farmacología de GPR55 han usado células HEK293 transfectadas con GPR55 encontrando una amplia distribución (Sawzdargo *et al.*, 1999; Ryberg *et al.*, 2007), sin embargo, la función fisiológica de GPR55 *in vivo* aún es ampliamente desconocida.

Adicionalmente, LPI está involucrado en numerosas acciones fisiológicas, incluyendo la reproducción, angiogénesis, apoptosis e inflamación, entre otros, procesos que están muy relacionados con la biología del tejido adiposo (Choi *et al.*, 2008).

Estudios recientes han indicado que el GPR55 juega un papel importante en el dolor inflamatorio (Staton *et al.*, 2008), en la regulación de la fisiología ósea normalizando el número de osteoclastos y sus funciones, así como el recambio óseo *in vivo* (Whyte *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se ha implicado al sistema LPI/GPR55 en cáncer. Existe evidencia que el sistema LPI/GPR55 desempeñan un rol importante en la proliferación y migración de células cancerosas (Ross, 2011).

Se ha encontrado que el GPR55 se expresa en tumores de humanos y su expresión se correlaciona con la agresividad del tumor. En general la supervivencia del paciente es menor en los pacientes cuyos glioblastomas expresan mayores niveles de GPR55 (Ross, 2011).

Adicionalmente, investigaciones en ratones deficientes para GPR55, han probado la hipótesis de que el GPR55 es el receptor cannabinoide vasodilatador en ratón. Sin embargo, la observación de que la presión arterial basal y el ritmo cardiaco no fueron diferentes entre los ratones *knockout* de GPR55 y sus controles *wild type*, sugiere que el GPR55 no está involucrado en la regulación de la presión arterial en condiciones fisiológicas normales (Johns DG. *et al.*, 2007).

No obstante, esto no excluye necesariamente el papel de GPR55 en la mediación de los efectos de la presión arterial causados por los cannabinoides atípicos administrados exógenamente. Al respecto, estudios previos han encontrado efectos hipotensores de GPR55 al ser inyectado en animales anestesiados, incluyendo el perro (Adams *et al.*, 1977) y el ratón (Jarai *et al.*, 1999; Offertaler *et al.*, 2003).

Así mismo, McHugh D. *et al.*, (2008), demostraron que el O-1602 inhibe la migración de los neutrófilos humanos y en este sentido, la acumulación o el aumento de la actividad de los neutrófilos son características de la inflamación del colon (Kozol RA., 1992; Lampinen M. *et al.*, 2005; Schicho R. *et al.*, 2011).

Adicionalmente, en ratones *knockout* para GPR55, se encontró que el tratamiento con DSS (*dextran sodium sulfate polymers*) solo inducía una colitis leve respecto al grupo control *wild type* (Schicho R. *et al.*, 2011). En este sentido, se ha demostrado que el O-1602 ofrece una protección significativa contra la colitis experimental murina y sus efectos protectores involucran la inhibición del reclutamiento de neutrófilos independiente del receptor GPR55, lo que indica que estos efectos son mediados a través de otro receptor.

En resumen, acciones como la vasodilatación (Johns DG. *et al.*, 2007) y la colitis (Schicho R. *et al.*, 2010) están mediadas de manera independiente de GPR55.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar las acciones de los ligandos putativos O-1602 y LPI del receptor GPR55 sobre la regulación de la ingesta y el control metabólico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la regulación de los niveles de expresión del ARNm del receptor cannabinoide CB1 y del GPR55 en el tejido adiposo blanco e hígado en roedores en diferentes estadios fisiológicos relacionados con alteraciones en la homeostasis energética.
2. Investigar los efectos metabólicos de la administración de O-1602 y LPI sobre la ingesta y la adiposidad en ratas.
3. Determinar in vitro los efectos del tratamiento con O-1602 y LPI en células 3T3-L1.
4. Investigar la expresión de CB1, CB2 y GPR55 en el tejido adiposo blanco e hígado de pacientes obesos y diabéticos y sus correlaciones con otros parámetros metabólicos
5. Determinar in vitro los efectos del tratamiento con LPI en explantes y adipocitos aislados de pacientes obesos.

MATERIAL Y METODOS

1. Animales de Experimentación

Todos los protocolos de manipulación animal han sido revisados y aprobados de acuerdo con las normas institucionales y en estricto cumplimiento de las Normas de la Comunidad Europea 86/609/EEC que regula el cuidado de animales y la experimentación animal.

Los animales permanecen en el animalario durante 5 ó 6 días antes de ser usados para los experimentos, con el fin de que se adapten a las condiciones controladas de iluminación (12 horas luz/oscuridad), temperatura (22°C) y humedad constante. Los animales son alimentados con pienso comercial y tienen libre acceso a agua y comida (excepto en los experimentos indicados). En cada experimento se usaron de 8 a 10 animales por grupo.

1.1. MODELOS ANIMALES

1.1.1. Rata Sprague-Dawley

En los experimentos realizados con ratas macho (*Rattus norvergicus*), se usaron animales de la cepa Sprague-Dawley procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. En los casos donde se han usado otros modelos animales, se especifica en cada experimento.

CEPA	MASA (gramos)	EDAD
Sprague-Dawley	250-300 g	10 a 12 semanas

1.1.2. Ratas Lewis enanas (*dwarf*)

Las ratas Lewis enanas (*dwarf*) (HsdOla: Dwarf-dw-4) (*Harlam Ibérica*) carecen de GH como consecuencia de una mutación en el gen de la GH (Charlton et al., 1988; Carmignac & Robinson, 1990). Como controles de este experimento se utilizaron ratas Lewis de tipo salvaje (LEW/SsNHsd) (*Harlam Ibérica*).

Después de una semana en el animalario para su adaptación se sacrifican y se extrae hígado y tejido adiposo blanco gonadal (WAT) para el análisis a través de RT-PCR a tiempo real de la expresión de CB₁ y GPR55.

CEPA	MASA (gramos)	EDAD
Lewis	250-300 g	10 a 12 semanas
Dwarf	150-175 g	10 a 12 semanas

1.1.3. Ratón knock-out de Leptina *ob/ob*

Los ratones (*Mus musculus*) son procedentes de la compañía *Charles River*. Llegan al animalario con 6 semanas de edad y se estabulan durante una semana para su adaptación.

CEPA	MASA (gramos)	EDAD
C57BL6/J	25-30 g	6 Semanas

1.1.4. Ratón knockout para GPR55

Los ratones (*Mus musculus*) deficientes para el gen GPR55 y su correspondiente control *wild type* fueron enviados por la Profesora Ruth Ross (Universidad de Aberdeen, UK).

Los ratones llegaron al laboratorio con una edad de 6 a 8 semanas y se estabularon durante una semana para su adaptación antes de realizar los experimentos.

2. TECNICAS EXPERIMENTALES

2.1. Administración de la anestesia

Para llevar a cabo los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados previamente, aplicando una inyección intraperitoneal. En el caso de las ratas, se utiliza una dosis de ketamina/xylazina en proporciones determinadas 200µl/100 gramos de peso corporal, considerándose ésta una dosis adecuada para conseguir una anestesia de grado II-III durante períodos de una o dos horas.

SOLUCION ANESTÉSICA:

- KETAMINA: 42.5% Ketolar, Parke-Davis, Morris Plañís N.J., (USA). 50 mg/ml.
- XILAZINA: 20% Rompun, Bayer Leverkusen, Alemania. 2 mg/ml.
- SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA: 37.5%.

En el caso de los ratones se usa Avertina (Ref. T4.840-2, 25gramos) (Sigma Aldrich) (2,2,2-Tribromoethanol, 97%), este producto viene liofilizado y se disuelven los 25 gramos en 15.5 ml de alcohol isoamílico ($C_5H_{12}O$) (MERCK) consiguiendo un stock inicial concentrado al 50X, se almacena a -20°C.

Cuando va a usarse, se descongela en un baño calentando a 37°C y se preparan alícuotas de 20 ml diluyendo la Avertina concentrada al 50X en una cantidad de salino determinada para obtener una solución final concentrada al 1X. Para anestesiarse a los ratones se usa esta solución en una proporción de 150µl/10 gr (15µl/gr).

2.2. Implantación cánula i.c.v. para tratamiento agudo

Este procedimiento debe llevarse a cabo aproximadamente unos cuatro días antes del experimento. El objetivo de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral. Se utilizan cánulas de polietileno (PE-20, Clay-Adams, Becton-Dickinson, New Jersey, USA) de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro interno). En uno de los extremos de la cánula se pone un tope y se corta en bisel a unos 3/4 mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce en el cerebro y que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se sella hasta el día del experimento. La cánula se implanta a las ratas estereotáxicamente usando las siguientes coordenadas: 1.3 mm posterior al bregma, 1.9 mm lateral a la sutura sagital media y a una profundidad de 3.5 mm (Nogueiras *et al.*, 2004) y se sella con un pegamento comercial (*Loctite Super Glue-3*) asegurándose que quede perfectamente fijada.

2.3. Colocación de bombas osmóticas para tratamiento crónico

Para la realización de un tratamiento crónico (7 días) a nivel central se usan bombas osmóticas (modelo 2001; Alza Corp., Palo Alto, CA) conectadas mediante un tubo xilastic a la cánula i.c.v. Estas bombas, que tienen un volumen de expulsión constante de 1 μ l/hora, se rellenan con el compuesto a estudiar o su vehículo hasta un volumen total de 233 μ l y se ponen sobre salino en un baño a 37°C durante, al menos, 4 horas previas a la operación para asegurar que ya están liberando el tratamiento cuando se colocan sobre el animal.

Para colocar la bomba, se procede primero a implantar la cánula i.c.v. tal y como se ha descrito previamente. Luego se inserta la bomba en la parte retrocervical del animal, creando un bolsillo subcutáneo y conectándola mediante xilastic, dilatándola con Xileno para que quede perfectamente pegado a la cánula i.c.v.

Posteriormente se sella la zona craneal con pegamento comercial (*Loctite Super Glue-3*), la incisión es cerrada con suturas.

3. MODELOS EXPERIMENTALES

3.1. Modelos experimentales *in vivo*

3.1.1. Desarrollo Postnatal y Dimorfismo sexual

Se utilizaron ratas macho y hembra de la raza Sprague-Dawley de distintas edades: 25, 45, 60 y 90 días postnatales. Tras mantenerlas estabuladas una semana se procedió a sacrificarlas el día que alcanzaron dicha edad (Gonzalez *et al.*, 2008). De los tejidos extraídos se usó el WATg para el correspondiente análisis de la expresión de *CB1* y *GPR55*.

3.1.2. Efecto hormonas gonadales

Se extrajeron las gónadas a ratas macho y hembra de 21 días (prepúberes) y se usó un grupo control (Sham) simulando la cirugía. Tras 15 días de estabulación se sacrificaron contando 45 días de edad (postpuberal) (Gonzalez *et al.*, 2008). De la misma forma que en el modelo descrito anteriormente, de los tejidos extraídos se usó el WATg para el correspondiente análisis de la expresión de *CB1* y *GPR55*.

3.1.3. Ayuno

Para este ensayo se utilizaron ratas macho adultas, las cuales se mantuvieron en el animalario durante una semana para su adaptación a las condiciones estándar. Después de este período, las ratas fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos:

- Control: alimentadas *ad libitum*
- Deprivación alimenticia a 24 horas
- Deprivación alimenticia a 48 horas
- Ayuno a 48 horas con realimentación *ad libitum* durante otras 48 horas

3.1.4. Ayuno y tratamiento con Leptina

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho adultas de 250 gr. El experimento se dividió en cuatro grupos de 6 animales cada uno; dos grupos con libre acceso a comida y dos a los que se sometieron a un ayuno de 48h. Para el tratamiento con leptina, uno de los grupos tuvo alimento y bebida *ad libitum*; a uno de los grupos de ayuno se le administró una inyección intraperitoneal cada 6 horas de leptina humana recombinante de *Sigma* (disolución según instrucciones del fabricante) en una dosis de 0.5 µg/g de rata (peso corporal) por inyección. A los grupos control se les administró el mismo número de inyecciones, pero de vehículo. De los tejidos extraídos se usó el WATg para el correspondiente análisis de la expresión de CB1 y GPR55.

La eficiencia del tratamiento con leptina fue documentado mediante la cuantificación de la ingesta y el peso corporal de los animales.

3.1.5. Gestación

Ratas hembras fueron estabuladas durante una semana en el animalario para su adaptación y regulación de su ciclo. Una vez transcurrido este tiempo las ratas fueron sometidas a un frotis vaginal diario para comprobar su estado estral. Este frotis se realiza con salino y el estadio de las células se observa con un microscopio óptico. El día en que las ratas se encontraban en proestro, se cruzaban con una rata macho durante una noche. A la mañana siguiente se separaban y comenzaba a contarse este día como el día 1 de gestación. Cuando las ratas alcanzaban el tiempo requerido de gestación (12, 16, 19 y 21 días) eran sacrificadas para la posterior extracción de tejidos. Como controles se utilizaron ratas pseudopreñadas, es decir hembras que fueron cruzadas con un macho pero que no fueron fecundadas (Gualillo *et al.*, 2002; Caminos *et al.*, 2005).

3.1.6. Restricción alimenticia crónica

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho adultas de 250 gr se mantuvieron en el animalario una semana y pasado este período se dividieron aleatoriamente en dos grupos: alimentadas *ad libitum* y sometidas a una restricción alimenticia del 70%. Las

ratas que fueron deprivadas parcialmente de ingesta se mantuvieron en cajas individuales con el fin de evitar la competencia entre varios animales. A medida que las ratas alcanzaban la edad requerida se sacrificaban y se les extrajo el tejido adiposo para su correspondiente análisis.

3.1.7. Dieta alta/baja en grasas

A partir de camadas nacidas en nuestro animalario, al cumplirse el día 24 los animales fueron destetados. Se les suministraron dos tipos de dieta: baja en grasa (*LF*) y alta en grasa (*HF*) creando dos subgrupos que se llevaron hasta del día 90. Se les extrajo el WATg para su posterior análisis.

Tabla 1. Composición de macronutrientes de las dietas empleadas.

	<i>DIETA BAJA EN GRASA (LFD)</i>		<i>DIETA ALTA EN GRASA (HFD)</i>	
	<i>g%</i>	<i>Kcal%</i>	<i>g%</i>	<i>Kcal%</i>
<i>Proteínas</i>	19	20	24	20
<i>Carbohidratos</i>	67	70	41	35
<i>Grasas</i>	4	10	24	45
<i>Kcal/g</i>	3.8		4.7	

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de las dietas LFD y HFD

	<i>DIETA BAJA EN GRASA (LFD)</i>	<i>DIETA ALTA EN GRASA (HFD)</i>
<i>Saturadas (g)</i>	11	69.4
<i>Monoinsaturadas (g)</i>	15.2	86.7
<i>Poliinsaturadas (g)</i>	17.6	35.4
<i>Saturadas (g)</i>	25.1	36.3
<i>Monoinsaturadas (g)</i>	34.7	45.3
<i>Poliinsaturadas (g)</i>	40.2	18.5

3.1.8. Efecto de las hormonas Tiroideas

Se utilizaron ratas macho adultas, las cuales se mantuvieron en el animalario durante una semana para su adaptación. Después de este período, las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos: eutiroideo (grupo control), hipotiroideos e hipertiroideos.

- El hipotiroidismo fue inducido por la adición de 0.1% aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazole; *Sigma*) disuelto en agua con albúmina de suero bovina al 3% y CIH al 0.22%; esta solución se administró a los animales como bebida durante un período de tres semanas. Para evitar el deterioro, el compuesto fue guardado a 4º y cambiado periódicamente a las ratas cada 2 o 3 días.
- El hipertiroidismo fue inducido por la administración subcutánea durante 21 días de L-tiroxina (L-thyroxine sodium salt pentahydrate; *Sigma*) a una dosis de 1mg/día, disuelto en 200 µl de salino (pH= 10.5). Pasado el período correspondiente de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el WATg.

3.1.9. Adrenalectomía

Se utilizaron ratas machos adultas, las cuales se mantuvieron en el animalario durante una semana para su adaptación. Después de este período, fueron divididas en dos grupos: un grupo al que se realizó las adrenalectomías (ADX) y otro grupo como control, en el que las ratas fueron anestesiadas y operadas pero sin extirparles las glándulas adrenales (SHAM). Tras una semana, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el WATg.

4. TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS

4.1. *Tratamientos con O-1602*

El O-1602 (*Tocris – Bioscience*), es un análogo del cannabidiol y es un supuesto potente agonista del receptor cannabinoide GPR55 (EC_{50} valores están entre 13, > 30000 y > 30000 nm para los receptores GPR55, CB1 y CB2 respectivamente).

Se han observado efectos tanto en los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y en el receptor de cannabinoide anormal GPR55, con una serie de ligandos cannabinoides incluyendo anandamida y virodhamina y compuestos fitocannabinoides como O-1602 (Ross, 2009).

4.1.1. *Efectos metabólicos del tratamiento agudo con O-1602*

- **Estudio periférico:** Para el estudio del efecto periférico agudo de O-1602, las ratas fueron tratadas con una única inyección i.p. de vehículo (DMSO 5%), y O-1602 a dosis de 2, 20, y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal.
- **Estudio central:** Para el estudio del efecto central agudo de O-1602, las ratas fueron tratadas con una única inyección i.c.v., de vehículo (DMSO 5%), y O-1602 a dosis de 0.02, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{rata}$.

En los dos experimentos se midió la ingesta de alimento a 1, 2, 4, 6 y 24 horas después de la inyección de O-1602.

4.1.2. *Efectos metabólicos del tratamiento subcrónico con O-1602*

Tanto en el estudio periférico como en el central, las ratas recibieron tratamiento con el compuesto durante una semana.

Durante esta semana se registraron diariamente la ingesta de alimento y el peso corporal de cada rata. La composición corporal fue evaluada antes y después de la

administración periférica y central de O-1602 mediante un sistema de resonancia magnética nuclear (*Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI*).

- **Estudio periférico:** A nivel periférico, las ratas fueron tratadas diariamente durante siete días con una inyección i.p. diaria de O-1602 a dosis de 0.1, 0.5 y 1 mg/kg de peso corporal.
- **Estudio central:** Para este experimento, los animales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico para implantar una cánula i.c.v. Para ello, fueron anestesiados previamente y luego se implantó la cánula siguiendo las siguientes coordenadas; 1.3 mm posterior al bregma, 1.9 mm lateral a la sutura sagital media y a una profundidad de 3.5 mm, como se describe previamente (Nogueiras *et al.*, 2004).

Las bombas osmóticas contienen el tratamiento que va a hacer inoculado a través del catéter hacia el cerebro, así los animales fueron tratados con vehículo y O-1602 en dosis de 1, 10 and 100 µg/día durante 7 días.

4.1.3. Efectos metabólicos del tratamiento intraperitoneal agudo con O-1602 en ratones deficientes del gen GPR55

Para evaluar si los efectos orexigénicos de O-1602 estaban mediados específicamente por GPR55, los ratones deficientes de GPR55, fueron tratados con una sola inyección i.p. El grupo control fue inyectado con vehículo (DMSO 5%), y los dos grupos adicionales fueron tratados con O-1602 a dosis de 200 µg/kg y 2 µg/kg de peso corporal respectivamente. La ingesta de alimento fue medida después de 1, 2, 4, 6 y 24 horas de la inyección de O-1602.

4.2. Tratamientos con LPI

4.2.1. Estudio periférico en ratones knockout de GPR55

Peso de los animales: 20 - 30 gramos

n: 20 (9 *knockout* - 11 *wild type*)

Grupos:

- Vehículo
- 2 µg/kg

Para evaluar si el ligando endógeno del GPR55, denominado L- α -Lysophosphatidylinositol (LPI), también ejercía un efecto orexigénico, los ratones deficientes de GPR55, fueron tratados con una sola inyección i.p. El grupo control fue inyectado con vehículo (DMSO 5%), y los dos grupos adicionales (*wild type* y *knockout*), fueron tratados con LPI (*Sigma-Aldrich*) a dosis de 2 µg/Kg de peso corporal respectivamente. La ingesta de alimento fue medida después de 1, 2, 4, 6 y 24 horas de la inyección de LPI.

4.2.2. Efectos metabólicos del tratamiento agudo con LPI

- Estudio del efecto periférico en ratas

Peso de los animales: 250 - 300 gramos

n: 40 ratas

Grupos:

- Vehículo
- 2 µg/kg
- 20 µg/kg
- 200 µg/kg

- Los animales fueron pesados individualmente antes del tratamiento y el volumen final en el que fueron inyectadas las

dosis de LPI fue de 500 μ l. A continuación se procede a inyectar a cada rata en el área peritoneal. Una vez se ha terminado de pinchar a cada rata, se monitoriza la ingesta a 1, 2, 4, 6, y 24 horas. Al término de las 24 horas, las ratas vuelven a ser pesadas individualmente.

- **Estudio del efecto a nivel central en ratas**

Peso de los animales: 250 - 300 gramos

n: 40 ratas

Grupos:

- Vehículo
- 0.02 μ g
- 0.1 μ g
- 0.5 μ g

Se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente en la administración central de O-1602.

4.2.3. Efectos in vitro de la administración de O-1602 y LPI en una línea celular de roedores

4.2.3.1. Efecto de O-1602 en la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1

El procedimiento de diferenciación de adipocitos se llevó a cabo en presencia o ausencia de O-1602 (10 μ M) durante 10 días. Durante este período, el tratamiento fue renovado cada 2 días. Al cabo de 10 días, las células fueron fijadas en paraformaldehído 4% por un período de 15 minutos.

A continuación se lavan exhaustivamente en isopropanol 60% y se incubaron en la solución *Oil Red O (Sigma)* durante 30 minutos. Después se lavó el exceso de

colorante con H₂O₂ y las placas se observaron al microscopio y se tomaron fotos de campos al azar usando un objetivo de 10X.

Posteriormente, la solución *Oil Red O* se eluyó incubando las células con isopropanol 100% durante 10 minutos y se determinó la densidad óptica a 500 nm para estimar la incorporación de colorante.

4.2.3.2. Efecto de O-1602 en la movilización intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) en adipocitos 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos como se describió previamente. Las células 3T3-L1 se cultivaron sobre cubreobjetos de 25 mm recubiertos con poli-L-lisina (0.1 mg/ml) en DMEM complementado con FBS 10%, glutamina 4mM y solución de antibiótico-antimicótico al 1%. Al 100% de confluencia (día 0), las células se incubaron en DMEM que contenía FBS 10%, isobutilmetilxantina (IBMX) 0.5 mM, dexametasona 0.25 μM e insulina 10 μg/ml durante 72 horas (día 3). Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM con FBS 10% e insulina 10 μg/ml por un período adicional de 72 horas (día 6) y luego fue cambiado por DMEM sin insulina hasta completar los días 10-12, cuando las células fueron procesadas para las mediciones de [Ca²⁺]_i. A las células 3T3-L1 diferenciadas se les adicionó Fura-2AM 2.5 μM (*Molecular Probes, Eugene, OR*) y Pluronic F127 0.02% (*Molecular Probes, Eugene, OR*) en medio libre de rojo fenol que contenía NaHCO₃ 20 mM (pH 7.4) durante 30 min a 37°C. Los cubreobjetos con las células fueron lavados con DMEM libre de rojo fenol y montados en soportes *Sykes–Moore* y colocados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-E (*fluorescence microscope*) (Tokio, Japón) a temperatura controlada y observados con aceite de inmersión PLAN-FLUOR con el objetivo 40X.

Las células fueron secuencialmente iluminadas desde arriba a 340- y 380-nm por 100 ms cada 5 segundos durante 8 – 10 minutos. La adquisición de las imágenes se controló utilizando el programa Metafluor PC (*Universal Imaging Corp., West Chester, PA*) y la emisión de fluorescencia se capturó a 505/510 nm antes (línea basal) y después de adicionar O-1602 (100 μM) utilizando una cámara digital CCD en frío (*ORCA*

II BT; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón) en el modo 1 bit. Los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ se interpretaron como la relación de las ondas de excitación (F340/F380).

4.2.3.3. Efecto de LPI en la diferenciación adipocitaria de células 3T3-L1

Para valorar los efectos de LPI sobre adipocitos in vitro, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito previamente en el análisis de los efectos de O-1602.

De esta manera, adipocitos de células 3T3-L1 fueron cargados con una sonda sensible al calcio, Fura-2; y después de la manipulación farmacológica con LPI a 1 y 10 μ M durante 10 días, se monitorizó la movilización de calcio intracelular.

5. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA E HIGADO EN HUMANOS

➤ **Pacientes y métodos**

Cohorte 1:

Participaron voluntariamente 95 individuos Caucasianos entre personas sanas y pacientes atendidos en el Departamento de Endocrinología y Cirugía de la Clínica Universitaria de Navarra. Los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica que incluyó historia clínica, examen físico, análisis de composición corporal y valoración de co-morbilidad.

La obesidad se clasificó de acuerdo con el IMC (Índice de Masa Corporal) (>30 kg/m²). La grasa corporal fue estimada mediante pletismografía por desplazamiento de aire (*Bod-Pod*[®], *Life Measurements, Concord, CA*) (Ginde *et al.*, 2005).

Los pacientes obesos fueron subclasificados de acuerdo a los umbrales de diagnóstico de diabetes establecidos:

- *Normoglicemia (NGT)*: Concentración de glucosa plasmática en ayunas (FPG) entre < 100 mg/dL y PG < 140 mg/dL, 2 horas después del test oral de tolerancia a la glucosa (OGTT).

- *Intolerancia a la glucosa (tolerancia alterada) (IGT)*: Concentración de glucosa plasmática en ayunas entre 100-125 mg/dL o PG entre 140-199 mg/dL 2 horas después del test oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Concentración de glucosa plasmática en ayunas (FPG) > 126 mg/dL o PG ≥ 200 mg/dL 2 horas después del OGTT.
- *Sujetos con diabetes Tipo 2*: Sujetos con Diabetes tipo 2 que no fueron tratados con terapia de insulina o medicamentos que pudiesen influir en los niveles de insulina endógena.

➤ **Recolección de tejidos**

Las muestras de tejido adiposo visceral (68 muestras) y subcutáneo (59 muestras) fueron recogidas de pacientes que se someten a una Funduplicatura de Nissen (Voluntarios delgados, que han sido operados de hernia de hiato) o sujetos obesos con cirugía de bypass gástrico (*Roux-en-Y gastric bypass*), como tratamiento de la obesidad mórbida. Las muestras de tejido extraído, fueron congeladas y almacenadas inmediatamente a -80°C.

El estudio fue aprobado, respetando la perspectiva ética y científica, por el Comité ético del hospital responsable de la investigación y con el consentimiento informado de los participantes.

Cohorte 2:

Las muestras de tejido adiposo visceral de 64 sujetos (35 con tolerancia normal a la glucosa, 17 con intolerancia a la glucosa en ayunas y 12 con diabetes tipo 2), fueron obtenidas del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta (Girona, España).

El IMC estuvo entre 20 y 68 kg/m². Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron de depósitos viscerales durante procedimientos quirúrgicos electivos (colecistectomía, cirugía de hernia abdominal y cirugía de bypass gástrico).

Todos los sujetos fueron de origen Caucásico y dieron su consentimiento por escrito después de explicarles el objetivo del estudio. Se excluyeron expresamente enfermedades renales y hepáticas mediante análisis bioquímicos.

El estudio fue aprobado, desde una perspectiva ética y científica, por el Comité Ético del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta (Girona, España).

Las muestras de tejido adiposo fueron lavadas, cortadas y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido antes de almacenarlas a -80°C . Para realizar el aislamiento de adipocitos, los tejidos no congelados fueron lavados de tres a cuatro veces con tampón fosfato salino (PBS) y suspendida en igual volumen de PBS suplementado estreptomina- penicilina al 1% y colagenasa tipo I al 0.1% precalentado a 37°C .

Los tejidos fueron puestos en un baño a 37°C en agitación continua durante 60 minutos y centrifugados durante 5 minutos entre 300 y 500g a temperatura ambiente. A continuación se recogió el sobrenadante que contiene los adipocitos maduros. El pellet fue identificado como células de la fracción del estroma vascular.

5.1. Ensayos en sangre

Cada individuo de la cohorte 1, permaneció en ayunas la noche anterior a la toma de la muestra. Todas las muestras se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugarlas a 1300g durante 10 minutos. Las muestras de plasma fueron luego alicuoteadas en eppendorf (Sigma-Aldrich) y congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C .

La glucosa fue analizada a partir de reacciones enzimáticas en un analizador automático de espectrofotometría (*Hitachi Modular P800, Roche, Basel, Suiza*). La insulina fue medida por medio de un ensayo de quimiluminiscencia de enzima amplificada (*IMMULITE[®], Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA*).

El colesterol total, los niveles de lipoproteína de densidad alta (HDL-colesterol) y la lipoproteína de densidad baja (LDL-colesterol) fueron calculados como se describió

previamente. (Catalán *et al.*, 2007). Las concentraciones de CRP (*High sensitivity C-reactive protein - CRP*) fueron determinadas como se describió previamente. (Gómez-Ambrosi *et al.*, 2006; Gómez-Ambrosi *et al.*, 2007).

La leptina fue medida por el método RIA de doble anticuerpo (*Linco Research, Inc., St. Charles, MO*). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 5.0 y 4.5 %, respectivamente.

5.2. Análisis de LPI

Las muestras de plasma para la medición de LPI fueron obtenidas a partir de 78 individuos de la cohorte 1. Estos permanecieron en ayunas la noche anterior a la toma de la muestra (Tabla 3). El LPI total fue calculado por combinación de 16:0, 18:0 y 20:4. El LPI estándar; LPI 16:0, LPI 18:0, LPI 20:4 y LPA 17:0 se adquirieron en *Avanti Polar lipids, INC*[®].

Las muestras de plasma (30µl) por triplicado fueron disueltas con metanol (70µl) conteniendo un patrón interno (LPA 17:0) a una concentración de 100 ng/mL. Las muestras se vortearon fuertemente y se centrifugaron a 10.000x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido y almacenado a -80 °C para su posterior análisis por cromatografía líquida - espectrofotometría de masas (LC ó HPLC-MS).

La separación de fosfolípidos por cromatografía de líquido fue llevada a cabo mediante el sistema de Agilent 1100 HPLC (*Agilent Technologies, Wokingham, UK*) usando una columna de Phenomenex Jupiter 150 mm x 2 mm C18.

El gradiente utilizado para separar los fosfolípidos consistió en una fase móvil donde la solución A fue Acetato de Amonio (1 µM) y la solución B, metanol/acetonitrilo 9:1 (v/v). El gradiente comenzó con un 70% de B y se aumentó linealmente al 100% de B durante 10 min antes de completar el 100% durante 8 min. El caudal es de 300 µl/min, con un volumen de inyección de 5 µl.

El LC eluyente fue dirigido sin separarlo hacia un espectrómetro de masas cuadrupolar - Q-trampa 4000 triple (*Applied Biosystems, Warrington, UK*) equipado con un turbo Ion Spray™ (TIS).

Para el análisis de fosfolípidos, el espectrómetro de masas se utilizó en modo de iones negativos con la siguiente configuración de la fuente: voltaje ión spray 4500 V, temperatura de la fuente 400 °C, gases 1 & 2 a 25 V y 40 V respectivamente y la Cortina de gas de 10 V.

Los fosfolípidos fueron cuantificados usando un monitor de múltiples reacciones por comparación a las muestras estándar. El ion de las transiciones para cada una de las muestras se determinó con base a su ion molecular y a un gran fragmento de ion (el cual correspondía a la pérdida de cabeza de grupo); (16:0, 18:0 y 20:4; Q1 = 571.4, 599.4 y 619.4 respectivamente y Q2 = 241.2 para todos). LPA (17:0; Q1 437.20; Q2 153.10).

Las curvas de calibración se prepararon para cada muestra, utilizando una serie de estándares que van de 2 ng/μl a 10 pg/μl y los límites de detección estuvieron dentro de este rango.

Tabla 3. Características antropométricas y analíticas de los sujetos de la cohorte 1 usadas para la determinación de los niveles circulantes de LPI.

	Delgados	Obesos NGT	Obesos IGT	Obesos DMT2	P
N (hombres/mujeres)	5 (2/3)	29 (11/18)	24 (12/12)	20 (8/12)	
Edad (años)	38 ± 4	36 ± 2	42 ± 2	45 ± 2 ^{††}	0.053
BMI (kg/m ²)	21.3 ± 1.1	43.1 ± 1.2 ^{**}	45.5 ± 1.1 ^{**}	48.9 ± 2.3 ^{**}	<0.001
Grasa Corporal (%)	26.5 ± 2.8	48.7 ± 1.6 ^{**}	53.3 ± 1.0 ^{**}	52.6 ± 1.3 ^{**}	<0.001
Glucosa en ayuno(mg/dL)	86.8 ± 3.5	89.0 ± 1.9	104.7 ± 2.2	151.3 ± 15.8 ^{**††,##}	<0.001
Insulina en ayuno (μU/mL)	8.2 ± 1.7	17.0 ± 1.6	18.5 ± 2.3	21.1 ± 2.9	0.070
Triglicéridos (mg/dL)	68 ± 11	101 ± 9	140 ± 25	204 ± 53	0.069
Colesterol (mg/dL)	192 ± 10	181 ± 8	209 ± 9	204 ± 8	0.081
LDL (mg/dL)	118 ± 10	119 ± 6	131 ± 8	130 ± 8	0.562
Colesterol -HDL (mg/dL)	58 ± 2	41 ± 2 [*]	50 ± 2 [†]	43 ± 2 [*]	<0.01
Leptina (ng/mL)	7.8 ± 1.5	51.0 ± 5.8 [*]	58.9 ± 6.5 ^{**}	68.3 ± 9.6 ^{**}	<0.01
CRP (mg/L)	1.8 ± 0.3	6.8 ± 1.4	13.1 ± 2.4 [*]	9.3 ± 1.9	0.016

BMI, índice de masa corporal; CRP, proteína C reactiva -. Datos medidos por ± SEM. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA seguido del test post hoc de Tukey. *P<0.05 y **P<0.01 vs delgados. †P<0.05 y ††P<0.01 vs obesos NG. ##P<0.01 vs obesos IGT.

5.3. Experimentos ex-vivo usando explantes de tejido adiposo subcutáneo y visceral

En los experimentos ex vivo se usaron muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral. Las muestras de los dos tipos de tejido fueron transportadas inmediatamente al laboratorio (5-10 minutos) y su manipulación fue llevada a cabo bajo estrictas condiciones de asepsia. Los tejidos fueron cortados con ayuda de tijeras en pequeñas piezas (5-10mg), e incubados en buffer de albumina plus (3 ml/g de tejido) entre 5 - 30 min aproximadamente. Después de la incubación, los explantes de tejido se centrifugaron durante 30s a 400g. Los 100 mg de tejido mezclado fueron colocados en 1 ml M199 (Gibco, Invitrogen) conteniendo suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Thermo

Fisher Scientific Inc.), penicilina 100 unit/ml (*Gibco, Invitrogen*), estreptomina 100 µg/ml (*Gibco, Invitrogen*) e incubados durante 48h en suspensión bajo condiciones de asepsia (Moreno-Navarrete *et al.*, 2011). Se compararon los grupos de control tratado (M199) y LPI (1 y 10 µM).

Las dosis fueron seleccionadas con base a referencias previas (Bondarenko *et al.*, 2010; Kapur *et al.*, 2009). Después de 48 h, todas las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido antes de ser almacenadas a -80°C.

El experimento fue llevado a cabo en cinco réplicas de cada muestra de tejido adiposo y tratamiento. Para evaluar la integridad celular, la actividad de la deshidrogenasa láctica (*lactate deshidrogenasa, LDH*) de las células dañadas fue analizada mediante el kit de detección de citotoxicidad (*Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para todos los tratamientos.

La expresión de los genes *FASN*, *ACC1*, *ADIPOQ*, *PPARG*, *LEP* and *GPR55* fue analizada usando TaqMan®, técnica utilizada para la cuantificación de la expresión génica relativa, como se describe posteriormente.

5.4. Efecto de LPI sobre los niveles intracelulares de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en cultivos de adipocitos diferenciados

Las fracciones del estroma vascular de células de humanos fueron aisladas a partir de tejido adiposo visceral y subcutáneo de sujetos obesos sometidos a cirugía abdominal (bypass gastrointestinal) como se describió previamente (Rodríguez *et al.*, 2009). Las fracciones del estroma vascular fueron cortadas en 25-mm aproximadamente y puestos sobre los cubreobjetos (30.000 células/cubreobjeto) para el posterior sembrado de adipocitos en DMEM/F-12 [1:1] (*Invitrogen, Paisley, UK*), 16 µM biotín, 18 µM pantotenato, 100 µM ascorbato y antibiótico-antimicótico complementado con NCS (*newborn calf serum*) al 10% a 37°C en atmósfera húmeda al 95%, CO₂ al 5% en aire. Después de cuatro días, las células cultivadas fueron inducidas para diferenciarlas con un medio de diferenciación estándar de adipocitos que contiene NCS 3%, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 0.5 mM, dexametasona 0.1 µM,

BRL49653 1 μM e insulina a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después del tercer día del período de inducción, las células fueron cultivadas en un medio de diferenciación IBMX and BRL49653. Los cultivos fueron repuestos cada dos días.

Al día 9, los cultivos de adipocitos diferenciados fueron procesados para realizar las medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Posteriormente, las células fueron grabadas con Fura-2AM (*Molecular Probes, Eugene, OR*) 2.5 μM y Pluronic F127 0.02% (*Molecular Probes, Eugene, OR*) y DMEM libre de rojo fenol que contiene NaHCO_3 (pH 7.4) 20 mM durante 30 minutos a 37 °C.

Para remover el tinte extracelular, las células fueron lavadas tres veces con DMEM libre de rojo fenol. A continuación los cubreobjetos con las células tintadas fueron montados en soportes Sykes-Moore y colocados a una temperatura controlada en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E (Tokio, Japón).

Las células fueron secuencialmente iluminadas desde arriba a 340-y 380-nm durante 100ms cada 5 segundos durante 8-10 minutos. La adquisición de la imagen fue controlada usando el programa Metafluor PC (*Universal Imaging Corp., West Chester, PA*) y la emisión de fluorescencia fue capturada a 505/510 nm antes y después de la adición de LPI a 5 μM usando una cámara digital (*ORCA II BT; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón*) corriendo en el modo 1 bite.

La respuesta de diferenciación de adipocitos primarios para LPI fue determinada después del establecimiento de una imagen estable. Los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron grabados como un ratio de la correspondiente excitación (F340/F380). Salvo indicación contraria, todos los reactivos adicionales se adquirieron en *Sigma-Aldrich*.

5.5. Extracción de ARN y PCR a tiempo real

El procedimiento seguido para la extracción de ARN de tejido adiposo e hígado de roedores y tejido adiposo de humanos, y el análisis de las muestras por PCR a tiempo real se describe posteriormente.

La siguiente tabla de primers y sondas TaqMan® abarcan fragmentos de áreas desde los extremos de la secuencia codificante, diseñados para asegurar la amplificación del transcripto correspondiente en humanos (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en humanos

Gen	N. de Acceso	Secuencia	
GPR55	NM_005683.3	Sentido	5'- GCA TGG ATC ACC CCA AGT TTC - 3'
		Antisentido	5'- TCA TCA ACA CCC CAC TCA GTC A -3'
		Sonda	FAM-5'- CCG TGC CCG TGA GAA GAC TGC AAA-3'-TAMRA
CB1	AY995204.1	Sentido	5'- AGG ACC TGC GAC ACG CTT T -3'
		Antisentido	5'- CGA GTC CCC CAT GCT GTT ATC -3'
		Sonda	FAM-5'- TGT TTC CCT CTT GTG AAG GCA CTG CG-3'-TAMRA
CB2	NM_001841.2	Sentido	5'- CCTGGGAGAGGACAGAAAACAA -3'
		Antisentido	5'- TGGGCCCTTCAGATTCCA -3'
		Sonda	FAM-5'- CAGCCACCCACAACACAACCCAAA-3'- TAMRA
FASN	NM_004104.4	Applied Biosystems, referencia Hs00188012_m1	
ACCA	AY237919.1	Applied Biosystems, referencia Hs00167385_m1	
SREBP	NM_001005291.2	Applied Biosystems, referencia SREBP1: Hs00231674_m1	
CD14	M86511.1	Applied Biosystems, referencia Hs00169122_g1	
Adiponectina	EU420013.1	Applied Biosystems, referencia Hs00605917_m1	
PPARG	L40904.2	Applied Biosystems, referencia Hs00234592_m1	
Leptina	NM_000230.2	Applied Biosystems, referencia Hs00174877_m1	
Ciclophilina A	NM_021130.3	Applied Biosystems, referencia 4333763	

El cDNA fue amplificado siguiendo las siguientes condiciones: 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 59°C, usando la Master Mix Universal para PCR - TaqMan® (*Applied Biosystems*).

Las concentraciones de los primers y las sondas para la amplificación de cada gen fueron de 300 nmol/L and 200 nmol/L, respectivamente. Todos los resultados fueron normalizados con los niveles de ARN de ciclofilina A (*Applied Biosystems*) y la cuantificación relativa fue calculada usando la fórmula de $\Delta\Delta C_t$ (Catalán *et al.*, 2007).

La expresión relativa de ARNm fue expresada usando el promedio de la expresión del gen correspondiente a los grupos LN y obesos NG, como se describió

previamente (Catalán *et al.*, 2007). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado y se calculó el promedio de estos valores.

6. TECNICAS EXPERIMENTALES

6.1. Extracción de ARN total

En este procedimiento se siguió la siguiente metodología:

- **Homogenización de tejidos** (WATg de rata y humanos, hígado, e hipotálamo).

El ARN fue extraído usando el reactivo Trizol[®] (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta técnica se lleva a cabo en su mayor parte en frío, colocando para ello todas las muestras sobre hielo.

El tejido extraído se homogenizó mecánicamente en un homogeneizador (*Tissue Lyser, Quiagen*) colocando en cada eppendorf de 2 ul; un trozo de tejido junto con una bola de acero (*Quiagen*) para conseguir romper el tejido y 1 ml de trizol. El homogeneizador se usa a una frecuencia de 30.0 oscilaciones por minuto, durante 3 minutos.

Una vez homogenizadas las muestras, se centrifugan (*centrifuge 54150 R-eppendorf[®]*) a 4º C, a una velocidad de 12.000 r.c.f. durante 10 min. Aquí se consigue separar la capa de lípidos y extraer la fase intermedia para optimizar la pureza del ARN extraído.

➤ **Aislamiento del ARN**

Una vez extraída la fase intermedia y trasladada a éppendorf nuevos, bajo campana de extracción se adicionan 200 ul de cloroformo y se vortean fuertemente durante varios segundos.

En este paso, las muestras se mantienen a temperatura ambiente durante 5 minutos. Trascurrido este tiempo se observan dos fases separadas. A continuación se centrifuga 15 minutos a 12.000 r.c.f. a 4 °C, consiguiendo así dos fases, una de ellas acuosa en la superficie (se halla en ARN) y una fase fenólica en el fondo (contiene proteínas y lípidos); entre la dos se observa una fina capa donde se encuentra el ADN.

Seguidamente se extrae la fase acuosa cuidando y se pasa esta nueva fase a eppendorf autoclavados, desechando la fase fenólica.

➤ **Precipitación del ARN**

A continuación se añade 1 ml de isopropanol agitando fuertemente en el vortex, seguidamente se colocan las muestras en un -20°C, durante 10 minutos para que precipite el ARN.

Trascurrido este tiempo, se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 r.c.f. a 4 °C. El ARN precipita en el fondo en forma de pellet.

➤ **Lavado del ARN**

El sobrenadante se decanta y se añade 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC, se agita durante unos segundos, consiguiendo que el pellet se desprenda del fondo.

Seguidamente se centrifugan las muestras durante 5 minutos a 12.000 r.c.f. a 4 °C. Se decanta nuevamente, se mantienen las muestras en hielo y se centrifugan durante 1 minuto a 13.200 r.p.m. con el objetivo de extraer la mayor parte del etanol sobrante.

El etanol sobrante es retirado con una pipeta cuidando de no aspirar el pellet. Finalmente el pellet es resuspendido en agua DEPC.

Para disolver el pellet las muestras se calientan a 60 °C vorteadando cada 3 minutos hasta completar 9 minutos.

6.1.1. Cuantificación del ARN

La concentración del ARN de la muestra se determina usando un espectrofotómetro ajustado a dos longitudes de onda: 260/280 nm. La absorción a 260 nm proporciona la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determina a través del cociente 260/280, considerándose aceptable una oscilación entre 1.5 y 1.8. Se descartan las muestras que están fuera de este parámetro.

6.1.2. Retrotranscripción (RT)

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo en un volumen total de 30 µl, con las siguientes proporciones:

- 6 µl de tampón de reverso transcripción (5X *first strand buffer*; *Invitrogen*)(250 mM Tris-HCl, Ph 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂).
- 6 µl de mezcla de dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp). Se usa cada uno a una concentración de 10mM.
- 3 µl de MgCl₂ de 25mM (*Invitrogen*).
- 0.17 µl de cebadores (*Random primers*, *Invitrogen*).
- 0.25 µl de ARNsa (*RNaseOUT*[®], 40 U/ µl *Invitrogen*).
- 1 µl de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/ µl, *Invitrogen*).

- Volumen correspondiente de agua DEPC autoclavada para obtener el volumen final de 30 μ l.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se da un spin a las muestras y a continuación se incuban en un termociclador donde se han programado con anterioridad las siguientes condiciones:

1 hora a 37°C

15 minutos a 42°C

5 minutos a 96°C (inactiva la enzima)

Finalmente, las muestras se mantienen a 4°C

6.1.3. PCR a tiempo real

Se usa como sistema de detección las sondas Taqman (Sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptador). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580nm.

Los primers usados fueron diseñados según las base de datos BLAST y se indican en las Tablas 4, 5, 6 y 7.

La mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final es de 12 μ l, está constituida por:

- 2.92 μ l de agua MQ autoclavada
- 0.3 μ M de cada Primer
- 0.15 μ M de la sonda
- 6 μ l de Taqman Universal PCR Master mix (*TaqMan; Applied Biosystems*)

6.1.4. Condiciones para la PCR en Tiempo Real con Sondas de Hidrólisis

Desnaturalización inicial 50°C 2 min, seguido de otro periodo de 10 min a 95°C y a continuación 40 ciclos para el gen problema y 35 para el *housekeeping* 18s de desnaturalización a 95°C 15 segundos e hibridación - extensión a 60°C 1 minuto.

La fluorescencia detectada por el aparato al final de la fase de hibridación /elongación nos permite cuantificar la cantidad de producto de PCR formado durante ese ciclo. La emisión de fluorescencia se debe a los fluoróforos FAM (Fluorescein-6) en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3' de la sonda. Mientras la sonda se encuentra libre o hibridada con la zona del gen que es homóloga, la señal que emite FAM (Donante o Reporter) es excitada por la luz es absorbida por TAMRA (Aceptor o Quencher). Cuando la ADN-polimerasa realiza la elongación en esta zona, la sonda es hidrolizada y los fluoróforos se liberan, liberando así la señal que es captada por los filtros y transformada en dato por el Software de Applied Biosystems: *Sequence Detection Software*. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron con un gen "housekeeping" o gen control: 18S.

6.1.5. Diseño de primers

Para el diseño de los primers para PCR a tiempo real con sondas TaqMan se utilizó el programa Primer Express 2.0 (*Applied Biosystems*). Los diseños están basados en las secuencias disponibles en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Tabla 5. Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en rata

ARNm	Nº Gen Bank	Cebador	Secuencia
18S	V01270.1	Sentido	5'-CGGCTACCATCCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
		Sonda	FAM-5'-GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA-3'-TAMRA
ACCα	NM_022193	Sentido	5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT-3'
		Antisentido	5'-AGTCGCAGAAGCAGCCCATT-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCTTTGAAGATTTTCGTCAGGATCTTTGATGA-3'-TAMRA
ADIPONECTINA	NM_144744.3		<i>Applied biosystems Rn00595250 m1</i>
Adrβ1	NM_012701.1	Sentido	5'-CCCCAAGTGCTGCGATTTC-3'
		Antisentido	5'AGGTACACGAAGGCCATGATG-3'
		Sonda	FAM-5'-TCGTCCGTCGTCTCCTTCTACGTGC-3'-TAMRA
Adrβ2	NM_012492.2	Sentido	5'-GTGGATCGCTATGTTGCTATCACA-3'
		Antisentido	5'CACTCGGGCCTTATTCTTGGT-3'
		Sonda	FAM-5'-CGCCCTTCAAGTACCAGAGCCTGCT-3'-TAMRA
Adrβ3	NM_013108.1	Sentido	5'-CACCGCTCAACAGTTTTGATG-3'
		Antisentido	5'CCCAGAAGTCCTGCAAAAACG-3'
		Sonda	FAM-5'-ACGTGAAGGGCCGTGAAGATCCAGC-3'-TAMRA
AgRP	NM_033650.1	Sentido	5'-GCACAAGTGCCAGGAACTC-3'
		Antisentido	5'CAGGACACAGCTCAGCAACATT-3'
		Sonda	FAM-5'-CAAGGATCAACAAGCAAAGGCCATGC-3'-TAMRA
ATGL	NM_001108509.2	Sentido	5'-CCGCTGGAGAGTGCAGTGT-3'
		Antisentido	5'CACCGGATATCTTCAGGGACAT-3'
		Sonda	FAM-5'-CACCATCCGCTTGTGGAGTGCC-

			3'-TAMRA
CART	NM_017110.1	Sentido	5'-GGACATCTACTCTGCCGTGGAT-3'
		Antisentido	5'GCGCTTCAATCTGCAACACA-3'
		Sonda	FAM-5'- TCCCATGAGAAGGAGCTGCCAAGGC-3'- TAMRA
CPT-1M	NM_013200.1		Applied biosystems Rn00566242_m1
FAS	NM_017332	Sentido	5'-GACATTTTCATCAGGCCACC-3'
		Antisentido	5'-CCTCTAGCAGCCGCACCTC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGCCCAGGACAGGAACCG-3'- TAMRA
GLUT1	NM_138827.1	Sentido	5'-GCATCGTCGTTGGGATCCT-3'
		Antisentido	5'CAAGTCTGCATTGCCCATGA-3'
		Sonda	FAM-5'- TTGCCCAGGTGTTTCGGCTTAGACTCC-3'- TAMRA
GLUT4	NM_012751.1	Sentido	5'-CATTCTCGGACGGTTCCTCAT-3'
		Antisentido	5'GCGATTTCTCCACATACATAGG-3'
		Sonda	FAM-5'- CGCCTACTCAGGGCTAACATCAGG GTT G- 3'-TAMRA
HSL	NM_012859.1	Sentido	5'-CCAAGTGTGTGAGCGCCTATT-3'
		Antisentido	5'TCACGCCCAATGCCTTCT-3'
		Sonda	FAM-5'- AGGGACAGAGACGGAGGACCATT TGACTC-3'-TAMRA
IL6	NM_012589.1	Sentido	5'-TGCCCTTCAGGAACAGCTATG-3'
		Antisentido	5'TGTCAACAACATCAGTCCCAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'- CTCCGCAAGAGACTTCCAGCCAGTTG-3'- TAMRA
LPL	NM_012598.2	Sentido	5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA-3'
		Antisentido	5'CCGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'

		Sonda	FAM-5'-CCTGCCGGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA
MCP1	NM_031530.1	Sentido	5'-GGCCTGTTGTTACAGTTGCT-3'
		Antisentido	5'GCATTAAGTGCATCTGGCTGAGA-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGTAGCATCCACGTGC-3'-TAMRA
NPY	NM_012614.1	Sentido	5'-CACAGAAAATGCCCCAGAA-3'
		Antisentido	5'TCAGGAGAGCAAGTTTCATTT CC-3'
		Sonda	FAM-5'-AAGGCTTGAAGACCCTTCCATGTG GTG-3'-TAMRA
POMC	NM_139326.2	Sentido	5'-CGTCCTCAGAGAGCTGCCTTT-3'
		Antisentido	5'TGTAGCAGAATCTCGGCATCTTC-3'
		Sonda	FAM-5'-CGCGACAGAGCCTCAGCCACC-3'-TAMRA
PPARγ	NM_013124.3	Sentido	5'-CCTGTTGACCCAGAGCATGGT-3'
		Antisentido	5'TGGGCCAGAATGGCATCT C-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGATGCACTGCCTATGAGCACTTCA CA-3'-TAMRA
SCD-1	NM_139192.2	Sentido	5'-TGCCAGAGGGAATAGGGAAA-3'
		Antisentido	5'-CTCTCCCATCCTTACTTACAAACCA-3'
		Sonda	FAM-5'-TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCACGC ACGG-3'-TAMRA
TNFα	NM_012675.3	Sentido	5'-CTAACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3'
		Antisentido	5'CCTCGGGCCAGTGTATGAGA-3'
		Sonda	FAM-5'-CAGCCAGGCAGGTTCCGTCC-3'-TAMRA

Tabla 6. Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en ratón

ARNm	Nº Gen Bank	Cebador	Secuencia
ACCα	NM_022193	Sentido	5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT-3'
		Antisentido	5'-AGTCGCAGAAGCAGCCCATT-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCTTTGAAGATTCGTCAGGATCTTTG ATGA-3'-TAMRA
CPT-1L	NM_031559	Sentido	5'-ATGACGGCTATGGTGTCTCC-3'
		Antisentido	5'-TCATGGCTTGTCTCAAGTGC-3'
		Sonda	FAM-5'-TGAGACAGACTCAGACCGCT-3'-TAM
CPT-1M	NM_013200.1		<i>Applied biosystems</i> Rn00682395_mg1
18S	M11188	Sentido	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
		Sonda	FAM-5'-GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA-3'-TAMRA
INSIG2	NM_178082	Sentido	5'-CGTGCTGCGGTACAGCC-3'
		Antisentido	5'-GGCTCTCCTAGATGCCTGTCA-3'
		Sonda	5'-CAGCTGTGATTGGACTATTGTACCCCTGCA-3'
PPARγ	NM_0011273 30.1	Sentido	5'-CCTGTTGACCCAGAGCATGGT-3'
		Antisentido	5'-TGGGCCAGAATGGCATCTC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGATGCACTGCCTATGAGCACTTC ACA-3'- TAM
CEBPα	NM_007678.3	Sentido	5'-CGCAAGAGCCGAGATAAAGC-3'
		Antisentido	5'-CGGTCATTGTCACTGGTCAACT-3'
		Sonda	FAM-5'-CAACGTGGAGACGCAACAGAAGGTGC-3'- TAM
CEBPβ	NM_009883.3	Sentido	5'-CAGAGTAGCCCCTGTCTTTTGG-3'
		Antisentido	5'-GGATTGCAGGTCAGACACAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-TGAGGATAGCCAGGTCAAAGCCCA-3'-TAM
PPARα	NM_013196.1	Sentido	5'-TGGAGTCCACGCATGTGAAG-3'
		Antisentido	5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'
		Sonda	FAM-5'-CTGCAAGGGCTTCTTCGGCGA-3'-TAM
EPGC1α	NM_013196.1	Sentido	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Antisentido	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT-3'
		Sonda	FAM-5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA-

			3`-TAM
SREBP1	NM_011480.3	Sentido	5`-GCGGCTGTTGTCTACCATAAGC-3`
		Antisentido	5`-TGTTGCCATGGAGATAGCATCTC-3`
		Sonda	FAM-5`-ACCAGCTGCATGCCATGGGCAAGTA-3`- TAM
PEPCK	NM_011044.2	Sentido	5`-CCACAGCTGCTGCAGAACAC-3`
		Antisentido	5`-GAAGGGTCGCATGGCAA-3`
		Sonda	FAM-5`-AGGGCAAGATCATCATGCACGACCC-3`- TAM
G6Pase	NM_008061.3	Sentido	5`-CCAGGTCGTGGCTGGAGTCT-3`
		Antisentido	5`-TGTAGATGCCCCGGATGTG-3`
		Sonda	5`-CAGGCATTGCTGTGGCTGAACTTTCAG-3`-TAM
NFKβ	NM_009045.4	Sentido	5`-GCCGTGGAGTACGACAACATCT-3`
		Antisentido	5`-GTGTAGTCCCATCATAGGTGGTACTGT-3`
		Sonda	FAM-5`-CTGCTTCTGGAGGGTGTGCCAC-3`-TAM
LPL	NM_008509.2	Sentido	5`-GGGAAATGATGTGGCCAGATT-3`
		Antisentido	5`-CCCTAAGAGGTGGACGTTGTCT-3`
		Sonda	FAM-5`-ACTGGATGGAGGAGGAGTTTAACTACC CCC-3`-TAM

6.2. Western Blot (WB)

El análisis mediante WB de las distintas proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos se realiza con base en protocolos estandarizados por nuestro grupo de investigación.

6.2.1. Extracción de proteínas totales:

Se realiza todo el proceso en hielo para evitar que las proteínas se degraden.

- Las muestras de tejido se homogenizan mecánicamente hasta que estén completamente disgregadas.

- Se añade tampón de lisis en proporción al tejido (1:5 peso:volumen).
- **Tampón de lisis (500ml):** 3.0285 ml TRIS-HCL pH=7.5, 5 ml TritonX-100 v/v, 0.185 ml EDTA 0.19 ml Ortovanadato sódico, 1.0495 ml Fluoruro Sódico, 1.115 ml Pirofosfato Sódico, y 42.75 Sacarosa.

Esta solución se conserva a 4 ° y en el momento de su uso se le añaden los inhibidores de proteasas (RocheDiagnostics): 1 pastilla de cóctel de inhibidores / 5 ml de tampón de lisis. Después de añadir los inhibidores de proteasas se añade β-mercaptoetanol. Así, en cada ml de Tampón de lisis: 900 μl Tampón de lisis, 100 μl inhibidores y 10 μl β-mercaptoetanol.

- Se centrifuga a 13500 rpm a 4 °C durante 30 minutos. En el sobrenadante se determina la concentración de proteína (método colorimétrico de Bradford) mediante el reactivo Bio-Rad Protein Assay Kit, (Bio-Rad Laboratorios, Inc., Richmond, CA).
- Después se guarda la muestra a -80°C, hasta que se vaya a usar.
- En el momento en que se utilicen las muestras se añade el tampón de carga y tampón de lisis y se calientan a 95 °C durante 10 minutos.

6.2.2. Electroforesis y Transferencia:

- La separación por peso de las proteínas se realiza por electroforesis en geles SDS-PAGE, compuesto por dos fases: fase superior o *stacking* (permite homogenizar la entrada de las proteínas en el gel separador), y la fase inferior o separadora (permite la separación de las proteínas exclusivamente en función del tamaño). El porcentaje de acrilamida de esta última fase varía en función del tamaño de las proteínas a estudiar.

- Gel 6 % : 7 ml H₂O, 13.5 ml Tampón A (90.1 g Tris-HCl, 2 g SDS, 1 l H₂O: pH=8.8), 5.4 ml Acrilamida, 75 μ TEMED y 150 μl APS.
- Gel 8 % : 5.2 ml H₂O, 13.5 ml Tampón A, 7.2 ml Acrilamida, 75 μ TEMED y 150 μl APS.

La cantidad total de proteína cargada: 40 μg de hipotálamo, 20 μg de hígado o 15 μg en el caso del tejido adiposo.

Para determinar el peso de las proteínas y confirmar la transferencia de las muestras se utiliza un marcador comercial (*Precision plus protein Estándar*, Bio-Rad).

Para cargar el gel, la proteína se lleva a un volumen de 16 μl con tampón de lisis y se le añade tampón de carga 5X (el tampón de carga debe quedar en la muestra a 1X).

- Tampón de carga 5X (25 ml): 12.5 ml glicerol, 1.25 ml β-mercaptoetanol, 2.5 g SDS, 0.125 ml azul de bromofenol y 6.25 ml Tris-HCl pH6.8.
- La electroforesis se realiza durante 60-75 minutos bajo las siguientes condiciones: Voltaje constante 130 V y Amperaje 180 mA.
- Tampón de electroforesis 5X (1l): 72 g Glicina, 15 g Tris base y 5S DS. Para pasar a 1X: 100 ml de tampón de electroforesis 5X en un volumen final de 500ml.
- La transferencia (Transferencia Semiseca) se realiza sobre membrana de PVDF (Millipore), que debe ser activada previamente (5 minutos en Etanol, 2 minutos en H₂O y 2 minutos en Tampón de Transferencia).
- Tampón de Transferencia 25X (500 ml): 72.5 g Tris base, 36.5 g Glicina y 4.5 g de SDS. Para pasar a 1X: 40 ml del tampón de

transferencia 25X, 200 ml de Metanol en un volumen final de 1 L de H₂O.

Duración transferencia: 90 minutos a 25 V y 180 mA.

- Finalizada la transferencia se bloquea la membrana con exceso de proteína (BSA3%) durante 60 minutos de agitación a temperatura ambiente.

6.2.3. Inmunodetección

- Se lava la membrana con solución de lavado TBS-TWEEN 0.1 % (24.2 g Tris Base, 80 g NaCl y 1 ml Tween20[®] en un volumen final de 1 L, a un pH=7.6) durante unos 30 minutos.
 - Se incuba con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C ó 2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo (TBS-TWEEN 0.1 % + 3 % BSA) en agitación.
 - Se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.
 - Se incuba 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo.
 - Se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.
 - Se incuba la membrana durante 1-2 minutos con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia a volúmenes iguales (1 ml de cada uno), en oscuridad y sin agitación.
-
- Para detectar la proteína se usa anticuerpo secundario conjugado con HRP y quimioluminiscencia.
 - Sustrato de Quimioluminiscencia: Pierce[®]ECLWb substrate (*Thermoscientific*).

Cuando el anticuerpo secundario se incuba con el sustrato y el potenciador se emite una reacción luminosa que permite la visualización, mediante autorradiografía, de la interacción de los anticuerpos con la proteína de la muestra.

- Se coloca la membrana en un casete de autorradiografía con películas fotográficas (*Amersham, Hi.perfilm Mrpn6k*) y se revelan las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

Tabla 7. Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados y sus correspondientes diluciones

Anticuerpo Primario	DILUCION	Casa Comercial	Anticuerpo Secundario	DILUCION	Casa Comercial
<i>B-Actina</i>	1:500	<i>Sigma Aldrich</i>	anti-mouse	1:5000	<i>Dakocytomation</i>
<i>GPR55 mouse</i>	1:500	<i>Abcam</i>	Anti-mouse	1:5000	<i>Dakocytomation</i>
<i>GPR55 humanos</i>	1:500	<i>Abcam</i>	anti-rabbit	1:5000	<i>Dakocytomation</i>

- Para rehibridar la membrana con otros anticuerpos es necesario incubarla en solución de “*stripping*” durante 30 minutos a 50 °C. Así se consigue despegar el anticuerpo de la membrana.
 - Solución de “*stripping*”: 6.25 ml Tris-HCl pH 6.8, 20 ml SDS, 710 μ l β -mercaptoetanol. Completar con H₂O hasta un volumen final de 100 ml.

A continuación se lava con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos) y se procede a bloquear de nuevo la membrana.

Para conservar la membrana para futuros experimentos se lava en PBS, se seca al aire sobre un papel de filtro y se guarda.

7. ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACIONES GRAFICAS

Los datos obtenidos de la experimentación animal, se expresaron como MEDIA±SEM y fueron representados en relación a las unidades de expresión del grupo tratado respecto al control (porcentaje). Los valores de probabilidad (P) de que la hipótesis nula sea correcta fueron representados por un asterisco en la gráfica de acuerdo al código siguiente.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Los datos de ingesta y peso se analizan mediante el test no paramétrico Mann-Whitney, tomando como grado de significación p<0.05. Las representaciones gráficas fueron realizadas con el programa Excel (*Office de Microsoft*) y el análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad InStat 3.05 (*GraphPad software*).

En el caso del análisis estadístico de los datos obtenidos de muestras de humanos, se usó el programa estadístico SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL).

A menos que se indique lo contrario, la descripción de los resultados de las variables continuas se expresó como media y desviación típica de las variables Gaussianas.

Las variables que no cumplían una distribución normal fueron transformadas logarítmicamente en posteriores análisis. La relación entre variables se analizó mediante correlación simple (test de Pearson) y análisis de regresión múltiple.

La ANOVA fue utilizada para comparar NGT, IGT y pacientes con diabetes tipo 2 seguido por un test *pair-wise a posteriori*. Para las mediciones del $[Ca^{2+}]_i$ se usó la prueba t.

RESULTADOS

I. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA

1. Efecto del ayuno sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT

Estados nutricionales como el ayuno y la saciedad tienen efecto sobre la expresión de los receptores cannabinoides CB1 y GPR55. Después de 48h de privación alimenticia los resultados muestran un incremento significativo ($P < 0,05$) en la expresión de CB1 en WATg (Figura 9A) y en los niveles de ARNm de GPR55 (Figura 9B), observándose un aumento de la expresión de los genes cuanto mayor ha sido el tiempo de ayuno. De manera inversa, al someter a las ratas a una realimentación se observa una disminución de la expresión tanto de CB1 como de GPR55.

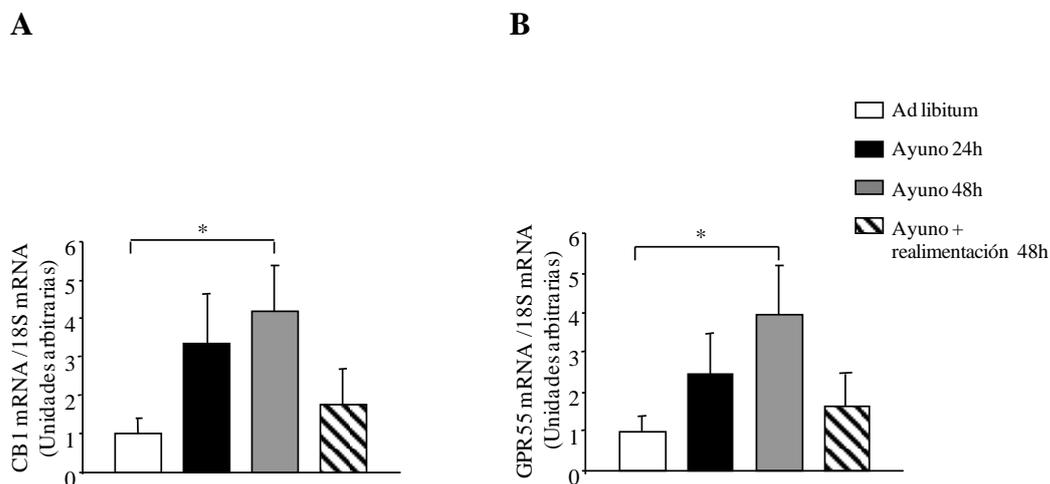


Figura 9. Efecto del ayuno sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT de ratas macho medidos por RT-PCR en tiempo real. A. Efecto del ayuno a distintos tiempos 24h, 48h y ayuno/realimentación a 48h sobre la expresión de ARNm de CB1. **B.** Efecto del ayuno a distintos tiempos 24h, 48h y ayuno/realimentación a 48h sobre la expresión de ARNm de GPR55. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$.

2. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT: ayuno, administración de leptina, restricción alimenticia y dieta.

Investigamos la regulación de la expresión del gen GPR55 en WATg bajo diferentes condiciones que pueden afectar el balance energético y la sensibilidad a la insulina, y comparamos esta regulación con la expresión de ARNm de CB1.

La administración intraperitoneal de leptina a dosis de 0,5 µg/kg durante 3 días disminuye la expresión de ARNm de CB1 (Figura 10A) y de GPR55 (Figura 10B), tanto en ratas alimentadas *ad libitum* como en ratas sometidas a ayuno, sugiriendo que el incremento en la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 después del ayuno puede estar regulado por la leptina.

De manera similar al ayuno, donde los niveles de leptina son bajos, se sabe que cuando las ratas son sometidas a una restricción alimenticia crónica existe también una disminución considerable en los niveles de leptina. De esta manera y siguiendo un protocolo de privación parcial de alimentos, las ratas comenzaron a bajar de peso como se esperaba y se encontró una disminución paralela de los niveles de leptina (Gonzalez CR. *et al.*, 2009; Fruhbeck G, 2006) (Figura 10A y 10B).

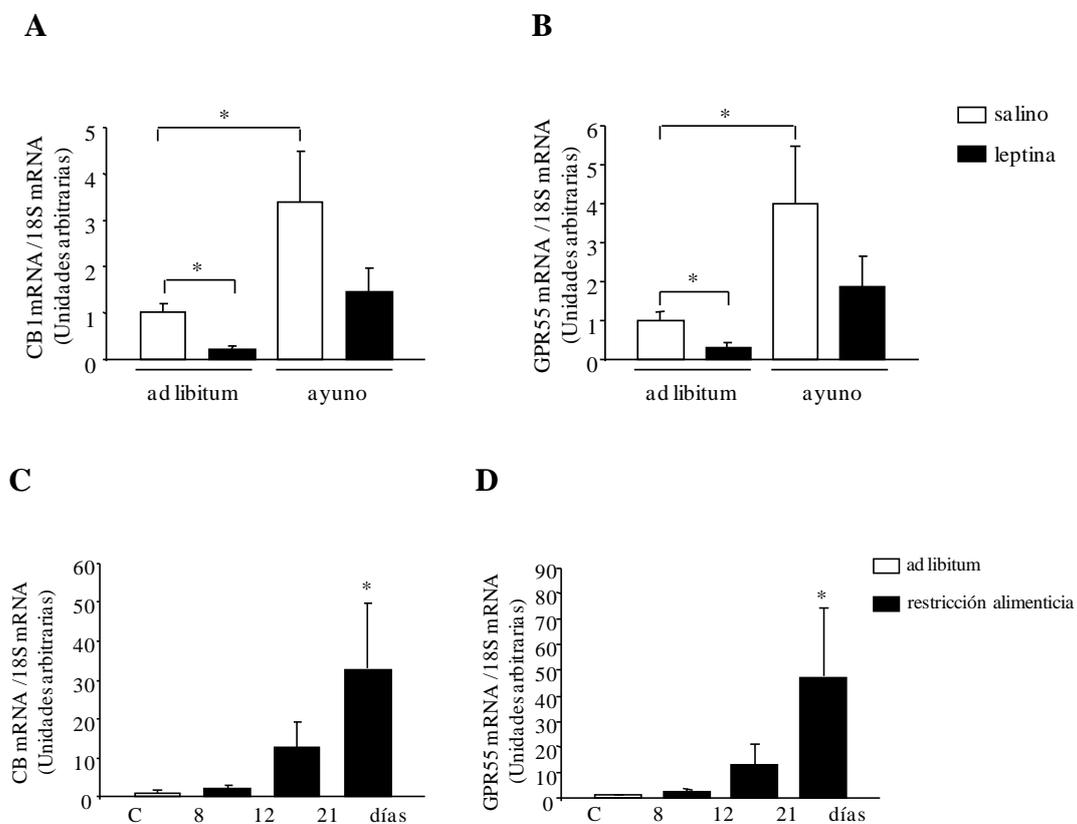
Acorde con la disminución del peso corporal y los niveles de leptina, los niveles de ARNm de CB1 y GPR55 se incrementaron durante el período de restricción alimenticia (Figura 10C y 10D).

En consecuencia lo que observamos es que en una restricción alimenticia de tres semanas, la expresión de los receptores aumenta de forma significativa ($P < 0,05$) cuanto mayor es el tiempo de la restricción alimenticia (Figura 10C y 10D). Por tanto existe una relación inversa entre la leptina y la expresión de los receptores de cannabinoides.

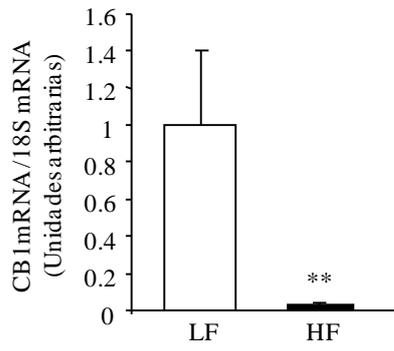
Por otra parte, cuando las ratas fueron alimentadas con dieta alta en grasa (HFD) durante 12 semanas, con el consiguiente aumento de la adiposidad (Gonzalez CR. *et al.*, 2009) y los niveles de leptina, los niveles de ARNm de CB1 (Figura 10E) y GPR55 (Figura 10F) en WATg disminuyeron en comparación con las ratas alimentadas con dieta baja en grasa (LFD). Lo anterior sugiere una vez más que la leptina juega un

importante un papel regulador sobre la expresión génica de CB1 y GPR55 en el tejido adiposo blanco.

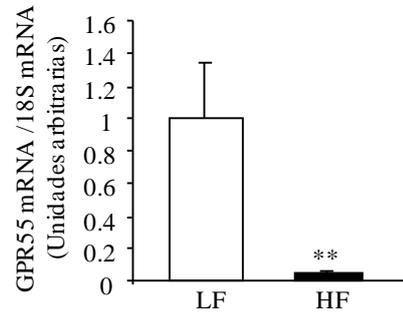
Adicionalmente, ratones carentes de leptina mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de ARNm de GPR55 en tejido adiposo blanco al ser comparados con animales delgados (Figura 10G, 10H). En concordancia, los niveles de proteína de GPR55 también disminuyen en los dos modelos obesos (Figura 10I y 10J).



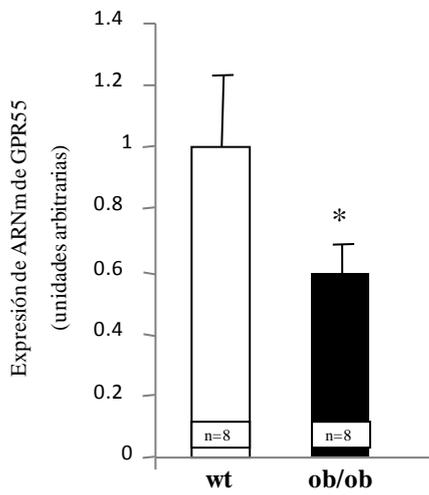
E



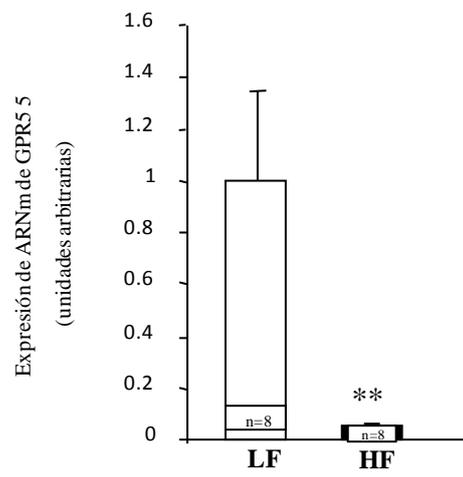
F



G



H



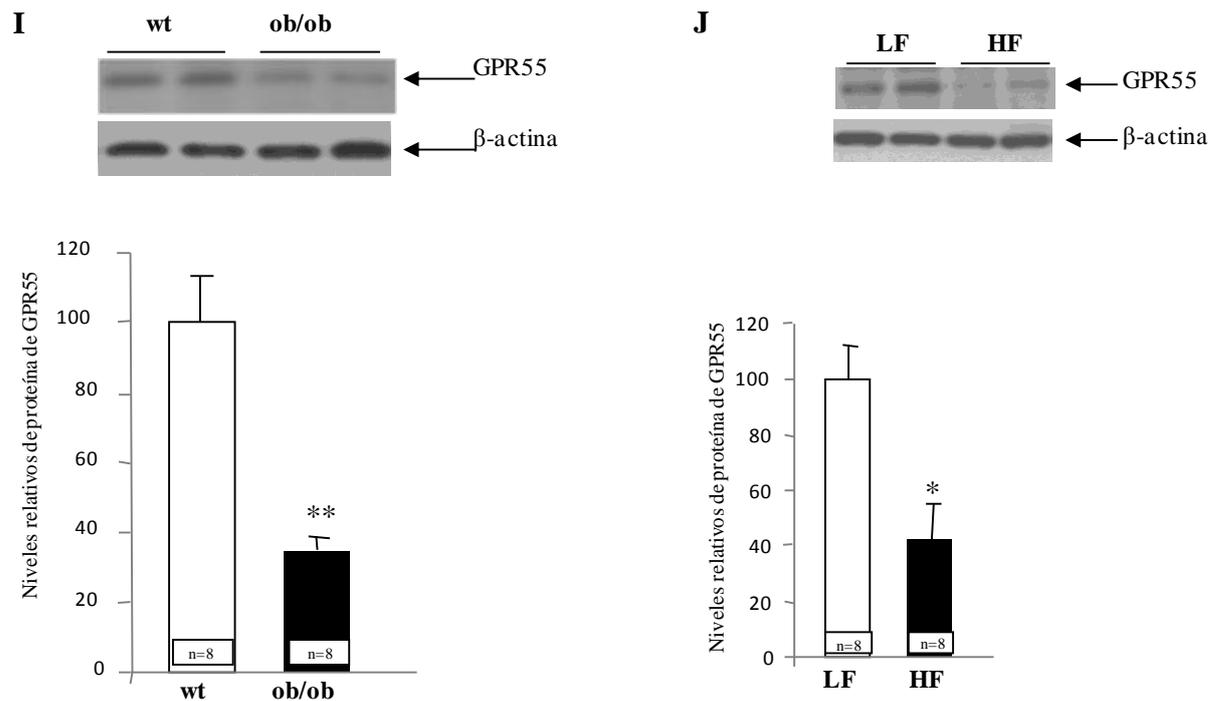


Figura 10. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 y sobre los niveles de proteína en WAT gonadal de ratas macho y ratones ob/ob.

A. Efecto del ayuno y la administración de leptina sobre la expresión de CB1 en tejido adiposo blanco de ratas macho con respecto a su control. **B.** Efecto del ayuno y la administración de leptina sobre la expresión de GPR55 en tejido adiposo blanco de ratas macho. **C.** Niveles de expresión de ARNm de CB1 durante una restricción alimenticia al 70% a diferentes tiempos; 8h, 12h y 21h. **D.** Expresión del ARNm de GPR55 durante la restricción alimenticia al 70% a diferentes tiempos; 8h, 12h y 21h. **E.** Niveles de expresión del ARNm de CB1, en ratas sometidas a dieta alta en grasa en relación a sus controles alimentados con dieta baja en grasa. **F.** Expresión génica de GPR55, en ratas sometidas a dieta alta en grasa en relación a sus controles alimentados con dieta baja en grasa. **G y H.** Niveles de expresión de GPR55 en ratones carentes de leptina (ob/ob) y sometidos a dieta alta en grasa. **I y J.** Niveles de proteína de GPR55 en ratones ob/ob y alimentados con dieta baja y alta en grasa. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3. Efecto de la gestación sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT

Dado que la gestación es un modelo fisiológico caracterizado por aumento en la ingesta, en la cantidad de grasa y la hiperleptinemia (García MD., *et al* 2000), estudiamos la expresión de los dos receptores en ratas gestantes. Nuestros resultados mostraron que tanto los niveles de CB1 (Figura 11A) y GPR55 (Figura 11B) en WATg disminuyen significativamente ($P < 0,01$) durante la gestación, alcanzando los niveles más bajos durante el último período de gestación, a los 19 y 21 días.

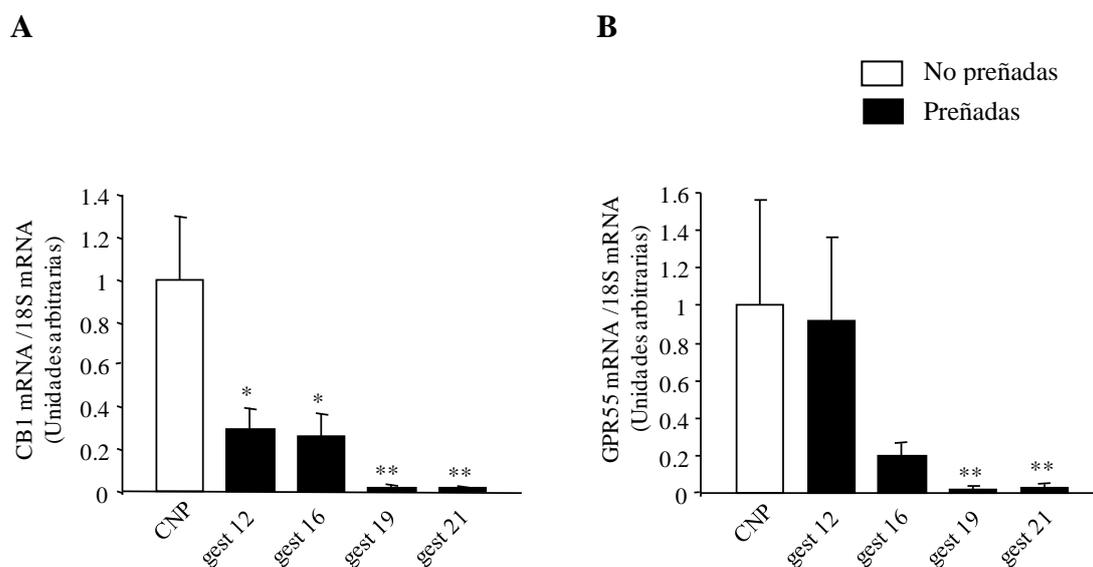


Figura 11. Efecto del estado gestacional sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT de ratas medidos por RT-PCR en tiempo real. A. Niveles de expresión de CB1 durante la gestación. **B.** Expresión génica de GPR55 durante la gestación. Los valores fueron normalizados por los niveles de 18S, como control interno, y los resultados se expresan en unidades arbitrarias. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4. Efecto del desarrollo postnatal sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT

Una de las principales características fisiológicas de la leptina es que sus niveles circulantes se incrementan durante el desarrollo postnatal junto con la ganancia en masa del tejido adiposo. Además, existe una importante influencia del género sobre los niveles de leptina, observándose diferencias entre hembras y machos independientemente de adiposidad (Pinilla L., *et al* 1999). Por lo tanto, hemos evaluado los niveles de expresión génica en WATg de CB1 y GPR55 durante las

distintas etapas del desarrollo tanto en machos (Figura 12A y 12B) como en hembras (Figura 12C y 12D).

Con respecto a los machos se encontró que los niveles de ambos receptores están aumentados en fases adultas.

Durante el desarrollo postnatal en ratas macho, encontramos un incremento muy significativo ($P < 0,001$) en los niveles de expresión de ambos receptores en fases adultas, 60 y 90 días (Figura 12A y 12B).

En el caso de las hembras, el mayor incremento se observa a los 60 días (Figura 12C y 12D).

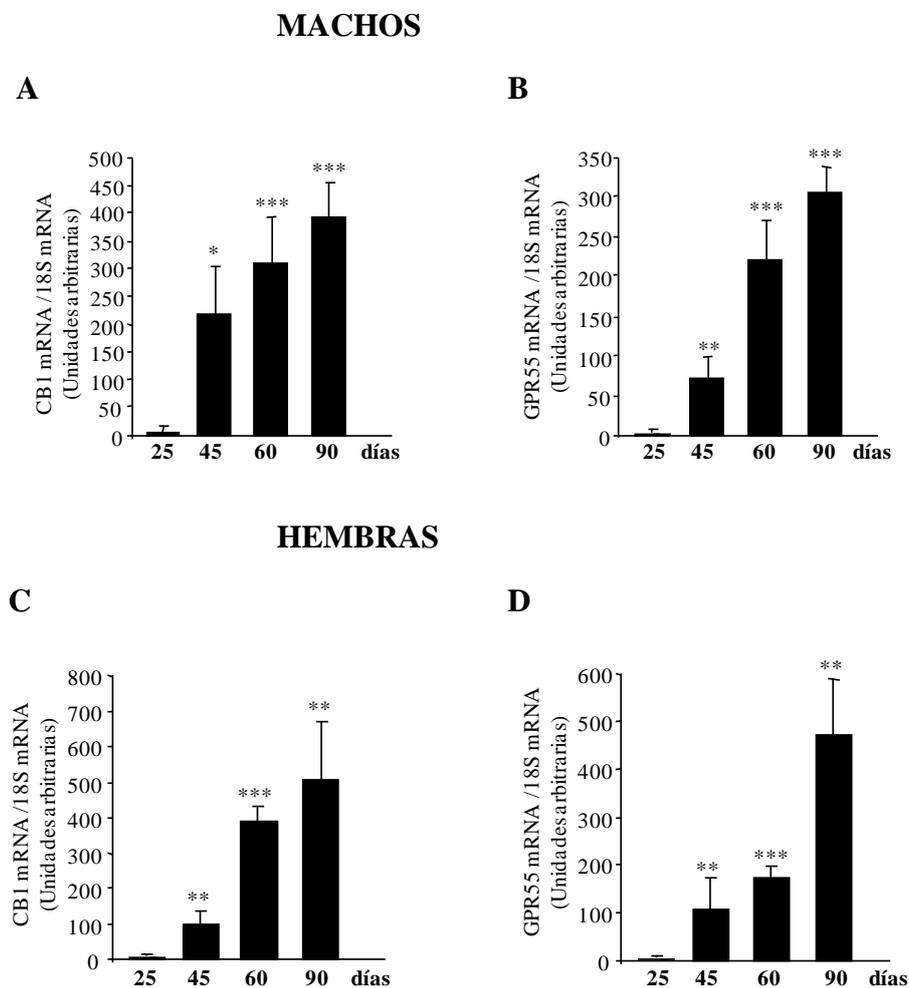


Figura 12. Efecto del desarrollo postnatal de ratas macho sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT. A. Niveles de expresión de ARNm de CB1 a lo largo del desarrollo postnatal en ratas macho. **B.** Expresión de ARNm de GPR55 a lo largo del desarrollo postnatal en ratas macho. **C.** Niveles de expresión génica de CB1 a lo largo del desarrollo postnatal en ratas hembra. **D.** Niveles de expresión de ARNm de GPR55 a lo largo del desarrollo postnatal en ratas hembras. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5. Efecto de alteraciones en función hipofisaria sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT: adrenalectomías, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento

La glándula pituitaria segrega varias hormonas que cumplen un rol importante en la regulación del balance energético. Por lo tanto, hemos evaluado el efecto específico de alteraciones funcionales relacionadas con varias hormonas hipofisarias, y los consiguientes cambios en los ejes por ellas regulados, en la expresión de CB1 y GPR55.

- * Hormona estimulante de la glándula tiroides (Tirotropina-TSH).
- * Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH); involucradas en la síntesis de las hormonas gonadales.
- * Hormona del crecimiento (GH); además de su papel en el crecimiento lineal, desempeña un papel importante en la homeostasis metabólica.
- * Hormona adrenocorticotrópica (ACTH); actúa sobre de la corteza suprarrenal, estimulándola para producir glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides gonadales.

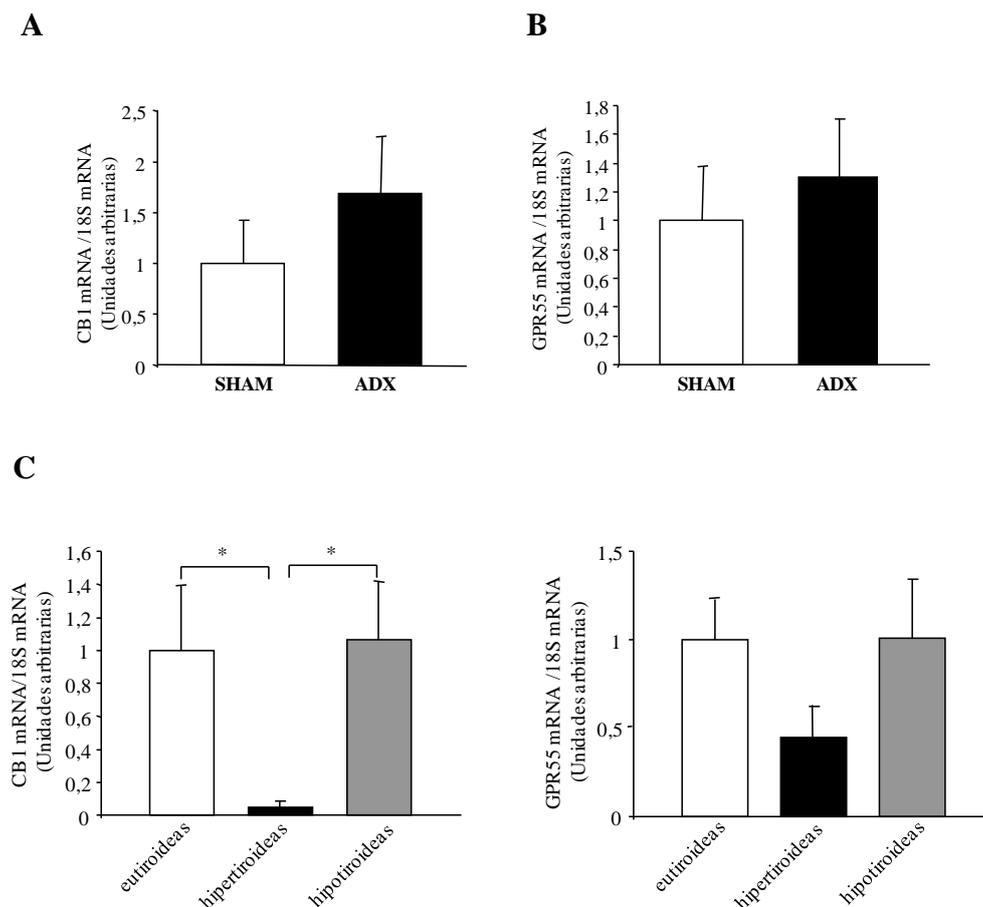
En primer lugar analizamos el rol de las glándulas adrenales. La eliminación de los glucocorticoides por adrenalectomía (ADX) reduce la ingesta y el peso corporal en roedores y previene la ganancia de peso en muchos modelos dietéticos y genéticos de obesidad (Andrews RC. & Walker BR., 1999). Para determinar si la expresión de CB1 y GPR55 se regula por glucocorticoides endógenos, las ratas fueron sometidas a una ADX.

Encontramos que la expresión tanto de CB1 (Figura 13A) como de GPR55 (Figura 13B), no fue modificada después de la ADX, esto nos indica que los glucocorticoides no son importantes mediadores de estos dos receptores.

En segundo lugar, cambios en la función hipofisaria producidos por las hormonas tiroideas tienen efectos importantes sobre la regulación del crecimiento, el desarrollo y el metabolismo y al ser potentes moduladores de la termogénesis adaptativa, pueden contribuir al desarrollo de la obesidad (Krotkiewski M., 2002).

Así, en el caso de los estados hipertiroideos existe una ingesta aumentada y un gasto energético mayor (Krotkiewski M., 2002). En nuestros resultados se observa una disminución en la expresión de los niveles de ARNm del rCB1 en estados hipertiroideos, sin cambios en el grupo hipotiroidismo (Figura 13C). Aunque hubo una disminución en los niveles de expresión de ARNm de GPR55 (Figura 13D) en el grupo hipertiroideos ésta no fue significativa.

Finalmente, la GH está implicada en diversos procesos metabólicos que afectan la composición corporal, influenciando el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Rizza RA., *et al* 1982; Casanueva & Diéguez, 1998). Las ratas deficientes de GH (Dwarf) no mostraron diferencias en la expresión tanto de CB1 (Figura 13E) como de GPR55 (Figura 13F) al compararlas con las ratas control acordes a la edad, lo que sugiere que la falta de GH no es relevante en la expresión de estos dos receptores.



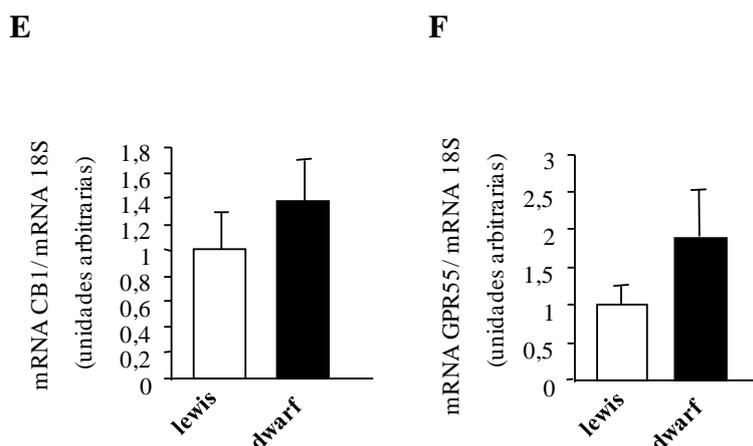


Figura 13. Efecto de los factores pituitarios sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT. A y B. Análisis de la expresión génica de CB1 y GPR55 tras una adrenalectomía. **C.** Niveles de expresión de ARNm de CB1 en estados de hipotiroidismo ($P < 0,05$). **D.** Niveles de expresión de GPR55 en wat de ratas hipertiroideas e hipotiroideas. **E y F.** Niveles de expresión de CB1 y GPR55 en ratas enanas o dwarf (deficientes de GH) respecto a sus controles (Lewis). Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

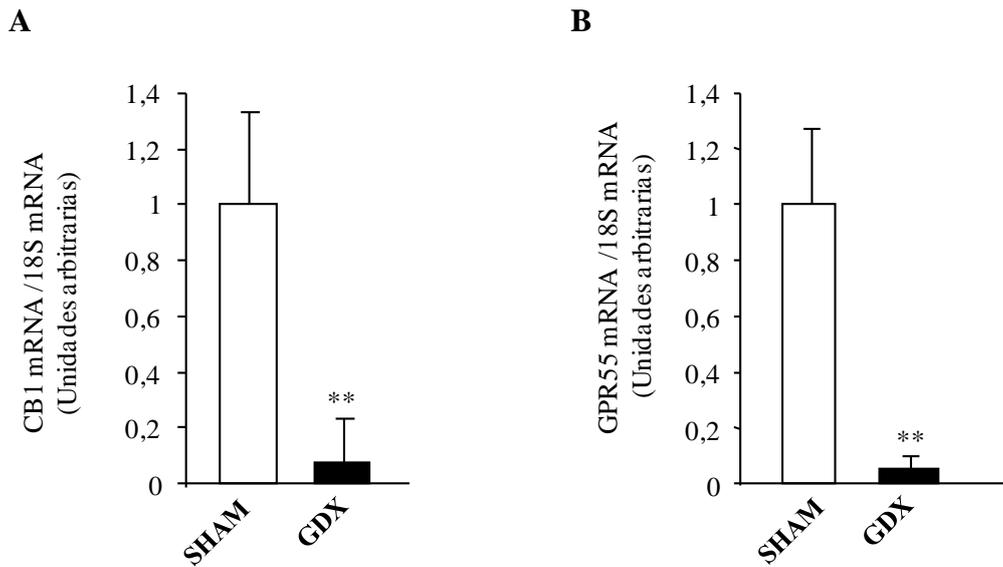
6. Efecto de las gonadectomías sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT

Para caracterizar el efecto de las hormonas gonadales sobre la expresión de CB1 y GPR55, se midió la expresión del mensajero de estos dos genes en machos orquidectomizados y sus controles y en hembras ovariectomizadas y en sus controles, después de 2 semanas de la cirugía.

Observamos una disminución muy marcada tanto en los niveles de expresión de CB1 como de GPR55 en machos orquidectomizados (Figura 14A y 14B).

En las hembras, encontramos una disminución significativa en la expresión del receptor CB1 (Figura 14C) en las ratas ovariectomizadas. Por el contrario, la expresión de GPR55 (Figura 14D) en ratas ovariectomizadas aumenta levemente con respecto a sus controles sin llegar a ser significativo.

MACHOS



HEMBRAS

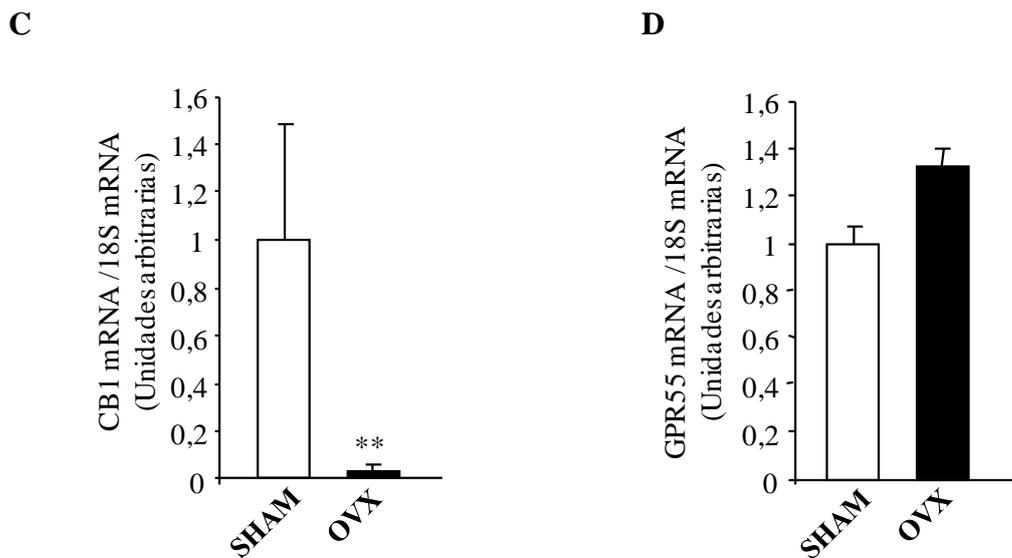


Figura 14. Análisis del efecto de las gonadectomías (GDX) sobre los niveles de expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT. A y B. Niveles de expresión de CB1 y GPR55 en ratas macho orquidectomizados. **C.** Niveles bajos en la expresión de CB1 en ratas hembra ovariectomizadas ($P < 0,01$). **D.** Expresión del mensajero para GRP55 en ratas hembra ovariectomizadas. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. $**P < 0,01$.

II. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN HIGADO

1. Efecto del estado nutricional sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado: ayuno y administración de leptina

En muestras de hígado de ratas, encontramos una disminución significativa en los niveles de expresión de mRNA de CB1 y GPR55 que además es dependiente de la administración de leptina; adicionalmente tanto en estados de ayuno, como en episodios de restricción alimenticia, se observa incremento en la expresión de los dos genes (Figura 15).

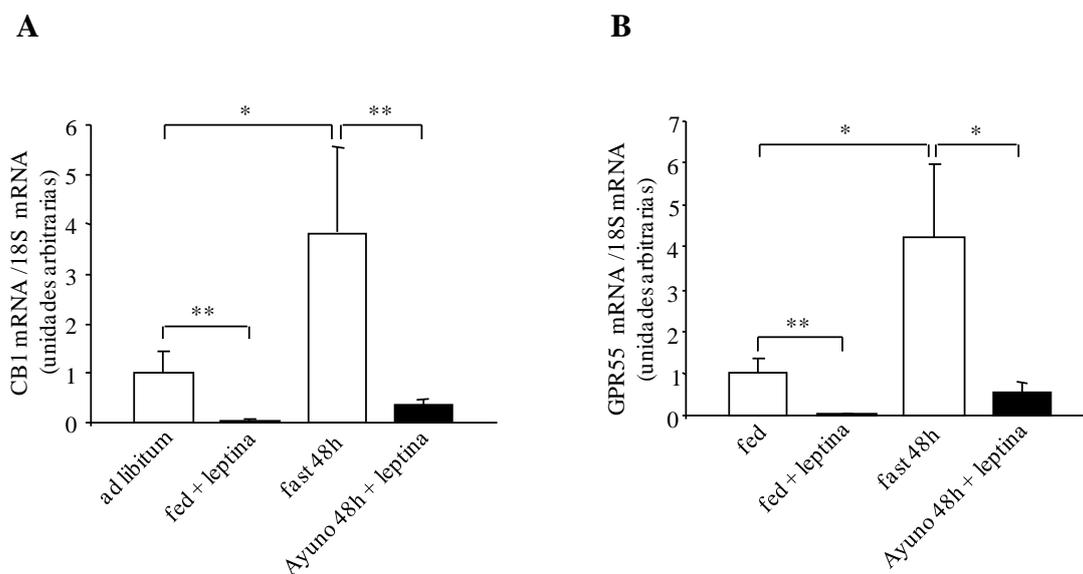


Figura 15. Expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado: ayuno y administración de leptina en hígado. A y B. Niveles de ARNm de CB1 y GPR55 dependiente de la administración de leptina e incremento de la expresión de los genes en estados de ayuno. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

2. Efecto de la restricción alimenticia sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado

Animales con restricción calórica crónica (se les alimenta con el 30% de lo que comen las *ad libitum*) a distintos tiempos, mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm tanto de CB1 (8 y 12 días) como de GPR55 (12 y 21 días) (Figura 16).

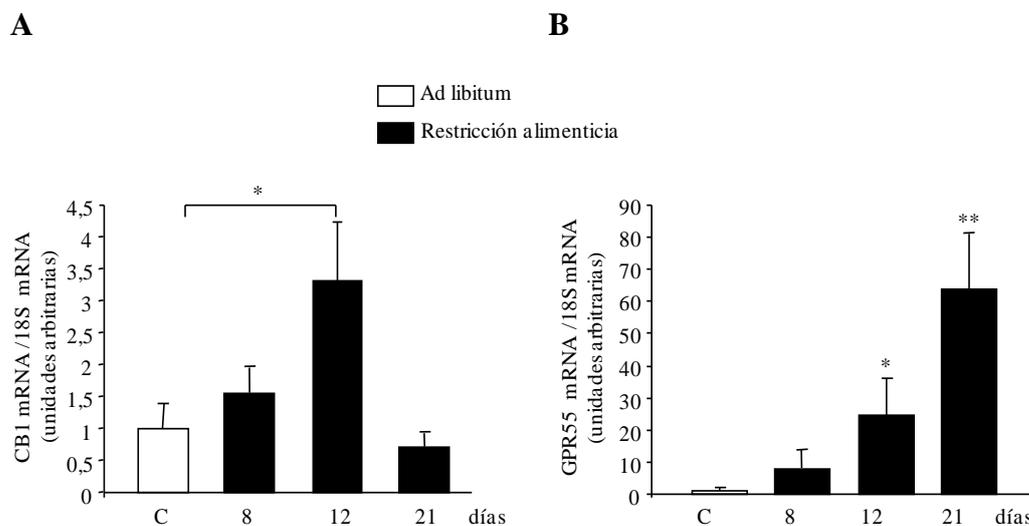


Figura 16. Expresión del ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de ratas macho sometidas a restricción alimenticia. A. Niveles de expresión de ARNm de CB1 a los 12 días de restricción alimenticia. B. Expresión de ARNm de GPR55 con incremento significativo a los 12 y 21 días de restricción alimenticia. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3. Efecto de la dieta sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado

De manera contraria a lo observado en WAT, cuando los animales fueron sometidos a dos tipos de dieta (baja y alta en grasas), no encontramos cambios significativos en los niveles de expresión de CB1 y GPR55 en muestras de hígado de ratas alimentadas con dieta alta en grasa (Figura 17).

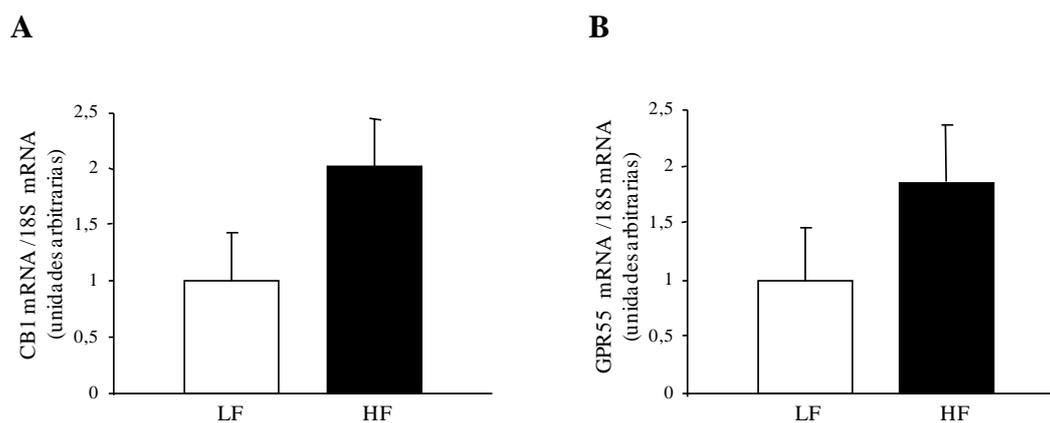


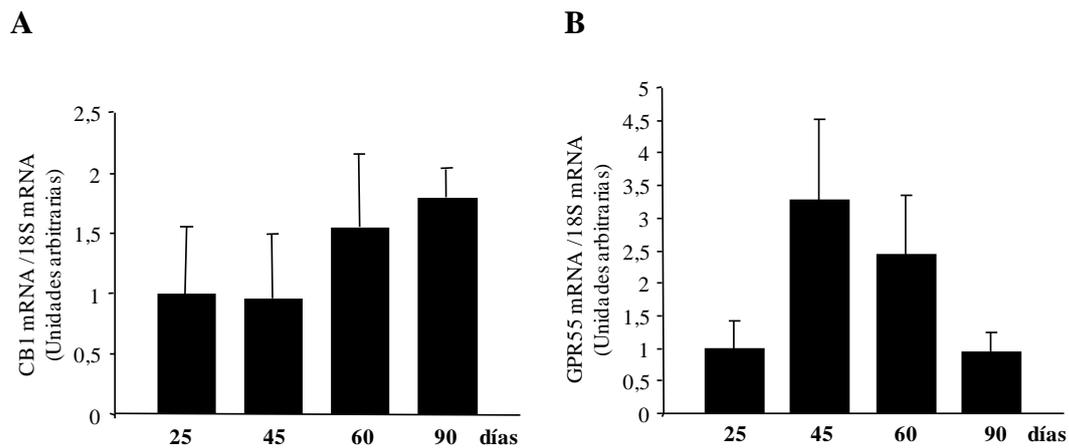
Figura 17. Expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de ratas macho, alimentadas con dieta baja y alta en grasa. A y B. Niveles de expresión de los mensajeros en animales alimentados con dos tipos de dieta; HF (Dieta alta en grasas o *High Fat Diet*) y LF (Dieta baja en grasas o *Low Fat Diet*). Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo.

4. Efecto del desarrollo postnatal sobre la expresión de CB1 y GPR55 en hígado

Aunque se observa un aumento en los niveles de ARNm de CB1 a los 60 y 90 días de desarrollo postnatal de machos, este incremento no llegó a ser significativo, con respecto a la expresión de GPR55, encontramos un aumento de los niveles de expresión a los 45 días, aumento que se revierte a los 60 y 90 días (Figura 18).

Al igual que ocurre con el WAT donde se observan diferencias en la expresión de los dos genes dependiendo del género, en las muestras de hígado también se encontraron diferencias entre machos y hembras. En las hembras se da un aumento secuencial en los niveles del ARNm tanto de CB1 como de GPR55 y se da un incremento significativo a los 90 días (Figura 18C y 18D).

MACHOS



HEMBRAS

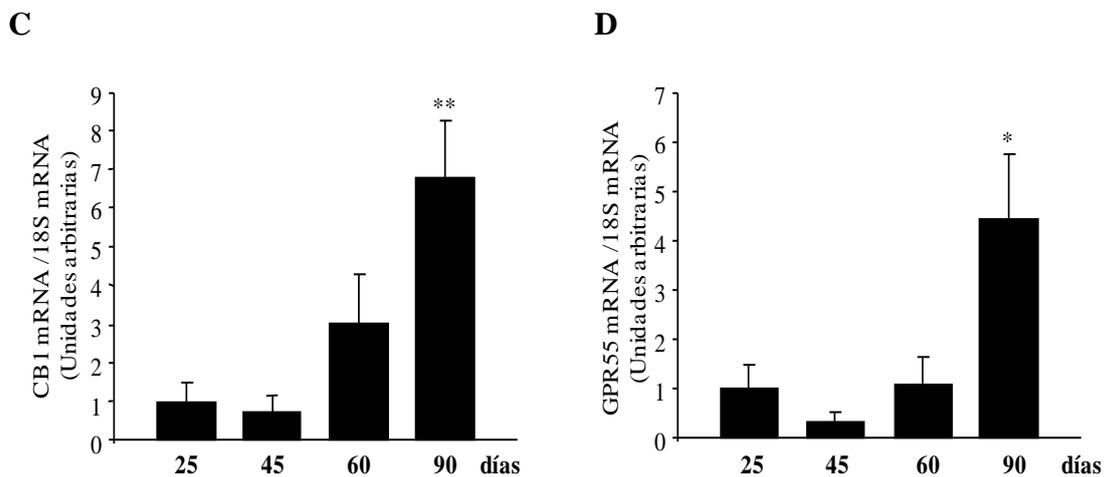


Figura 18. Análisis de los niveles de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de machos y hembras de 24, 45, 60 y 90 días. **A y B.** Niveles de CB1 y GRP55 de ratas macho durante el desarrollo postnatal. **C y D.** Niveles del mensajero a los 90 días de desarrollo postnatal en ratas hembra. Los datos fueron normalizados por los niveles de 18S, como control interno y los resultados se expresan en unidades arbitrarias. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5. Efecto de alteraciones en la función hipofisaria sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado

En animales que poseen una mutación genética en el gen de GH que los hace deficientes en esta hormona, los niveles en la expresión de ARNm de los receptores cannabinoides CB1 y GPR55 son inferiores a sus controles (Figura 19A y 19B).

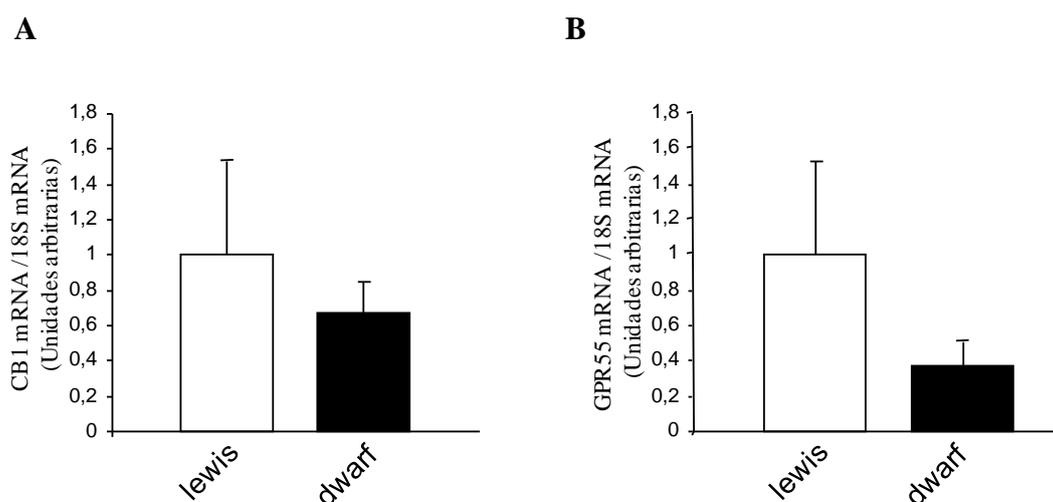


Figura 19. Efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre los niveles de expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de ratas macho. Niveles de expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en ratas enanas o dwarf (deficientes en GH) respecto a sus controles (Lewis). Los niveles de expresión han sido normalizados por el control interno 18S. Los resultados están expresados en unidades arbitrarias.

III.EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACION DE LIGANDOS DEL RECEPTOR GPR55: O-1602 vs LPI

1. Efectos de la administración aguda de O-1602

1.1. Administración aguda i.c.v., dosis y tiempo respuesta

Tras la administración central aguda de O-1602 mediante una inyección i.c.v a dosis de 0.02 μ g, 0.1 μ g y 0.5 μ g/rata, encontramos que el O-1602 incrementa la ingesta a las dosis de 0.1 y 0.5 μ g/rata (Figura 20).

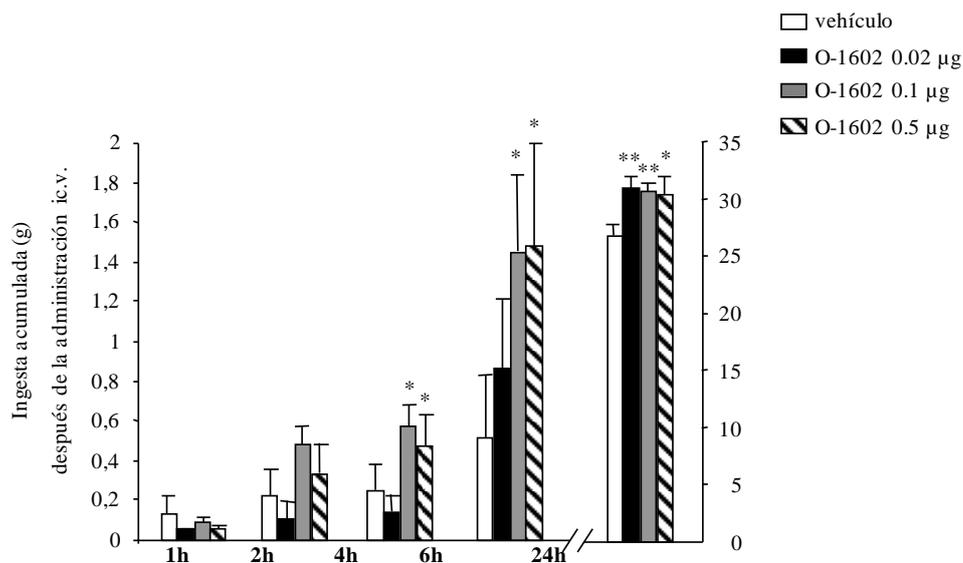


Figura 20. Resultados sobre la ingesta de la administración aguda de O-1602. Efecto de una sola inyección intracerebroventricular de O-1602 (0.02, 0.1 y 0,5 μ g/rata) sobre la ingesta acumulada. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo. *P<0,05 **P<0,01 comparados con el grupo control.

1.2. Administración aguda i.p. dosis y tiempo respuesta

Por otra parte, al administrar una sola inyección i.p. de O-1602, las ratas mostraron un aumento temporal de la ingesta a dosis de 200 μ g/kg (Figura 21).

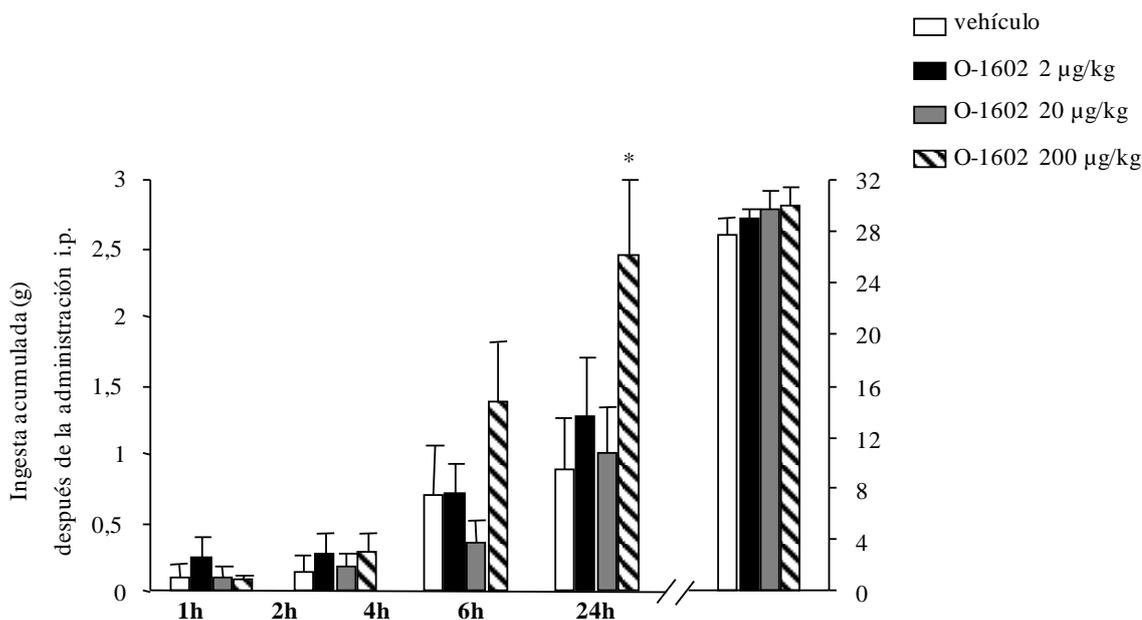


Figura 21. Efectos de la administración aguda i.p. de O-1602 sobre la ingesta. Efecto de una sola inyección intraperitoneal de O-1602 (2, 20 y 200 µg/rata) sobre la ingesta acumulada. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo. *P<0,05 comparados con el grupo control.

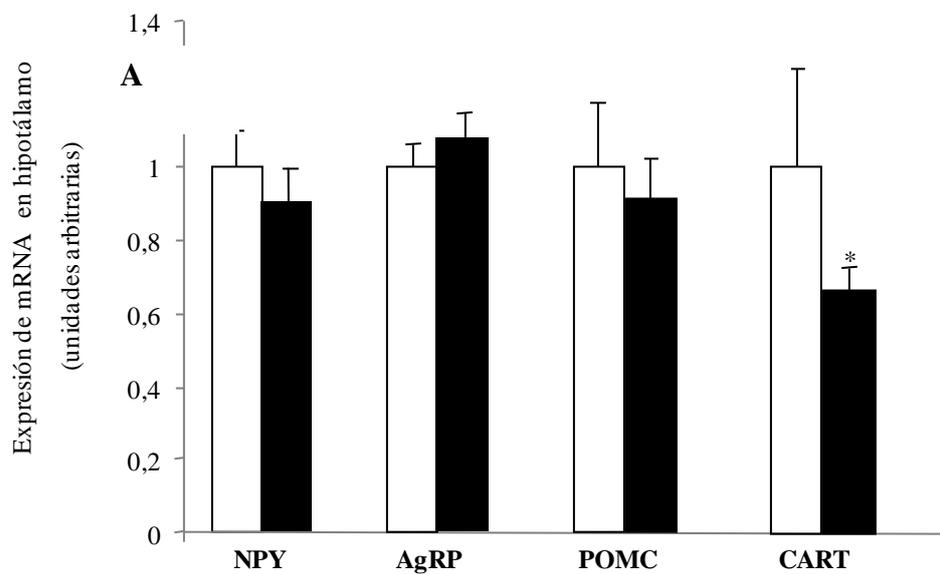
1.3. Efectos de la administración aguda central del O-1602 sobre neuropéptidos hipotalámicos

La observación de que el O-1602 aumenta la ingesta, sobre todo cuando es administrado a nivel central (i.c.v.), nos condujo a investigar la expresión de neuropéptidos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta, utilizando PCR a tiempo real (figura 22A). En concordancia con la elevada ingesta de alimentos, el tratamiento i.c.v. con O-1602 disminuyó los niveles de ARNm del neuropéptido anorexigénico CART a las 6 h (figura 22B).

Compatible con la expresión génica, los niveles de proteína de CART en el hipotálamo también disminuyeron en ratas tratadas con O-1602 después de 6 horas de la inyección, en comparación con las ratas tratadas con vehículo (grupo control) (figura 22B). Como se describió previamente (Dey *et al.*, 2003), nos encontramos con una

banda que detecta proCART y dos bandas inferiores que detectan tanto CARTI como CARTII. De manera contraria, la expresión de pro-opiomelanocortina y los neuropéptidos orexigénicos péptido relacionado con agouti (AgRP) y neuropéptido Y (NPY) se mantuvieron sin cambios después de la administración de O-1602 (figura 22A).

A pesar de que existen otros neuropéptidos hipotalámicos y mediadores químicos involucrados en el control de la ingesta de alimentos y el peso corporal, nuestros hallazgos demuestran que la hiperfagia inducida por O-1602 puede ser causada por la disminución de los niveles hipotalámicos de CART.



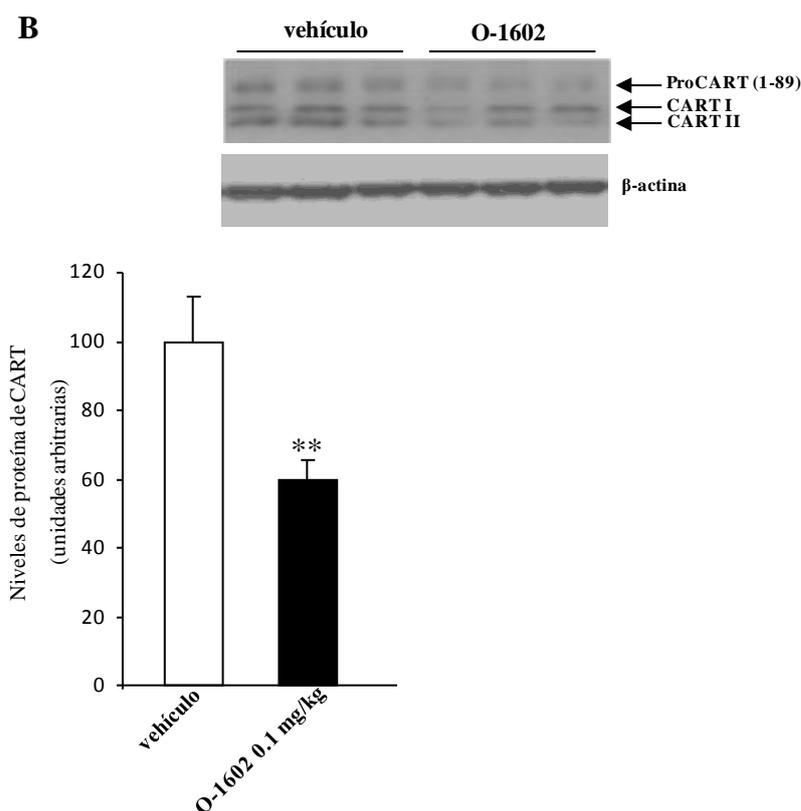


Figura 22: Efectos de la administración aguda de O-1602 sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos. **A:** Efecto de la administración intracerebroventricular (i.c.v) de O-1602 (0.5µg/rata) sobre la expresión de ARNm del neuropéptido Y, péptido relacionado con Agouti, Pro-opiomelanocortina y transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART). **B:** Efecto de la administración i.c.v de O-1602 (0.1mg/kg) sobre los niveles de proteína de CART. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo. *P<0,05 comparados con el grupo control.

1.4. Administración aguda i.p. de O-1602 sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55

Los receptores que median las acciones de O-1602 sigue siendo motivo de controversia. Aunque algunos estudios sugieren que los efectos del O-1602 no están mediados por GPR55 (Johns *et al.*, 2007; Schicho *et al.*, 2010), otros han sugerido que el O-1602 es un supuesto ligando de GPR55 (Johns *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2007; Ross, 2009).

Para explicar si la acción orexigénica del O-1602 estaba mediada por el receptor GPR55, utilizamos ratones deficientes para este receptor.

Encontramos que la administración i.p. del O-1602 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fue capaz de estimular la ingesta de los ratones que carecían de GPR55 (figura 23), indicando que O-1602 incrementó el comportamiento alimenticio de una manera independiente de GPR55.

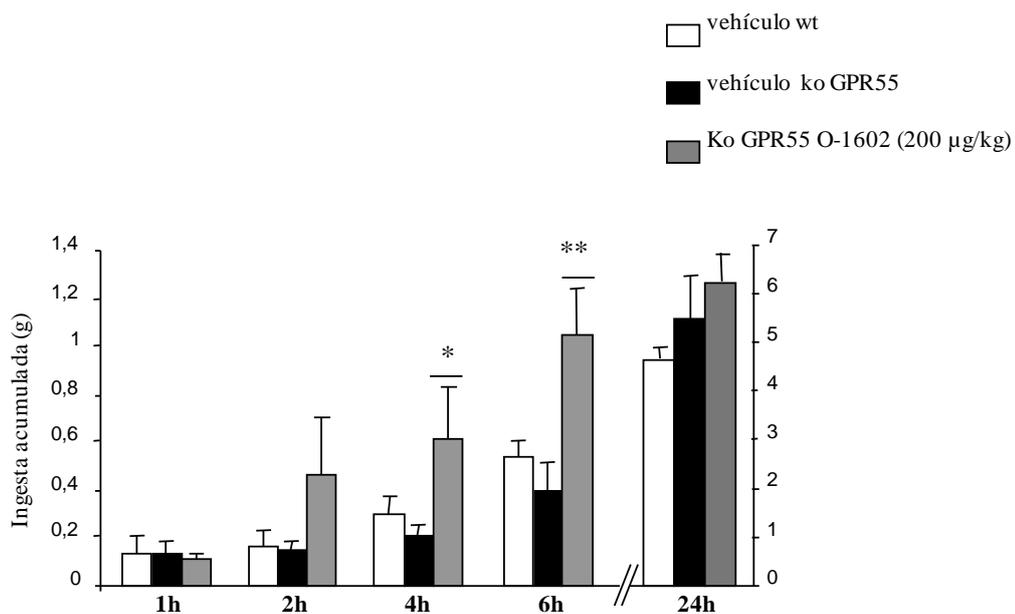


Figura 23. Efectos de la administración aguda de O-1602 sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55. La administración aguda i.p. del O-1602 a dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ estimula la ingesta en ratones *knockout* para el gen GPR55. Los valores representan la media, obtenida a partir de 8 animales por grupo, \pm sem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2. Efectos de la administración crónica de O-1602

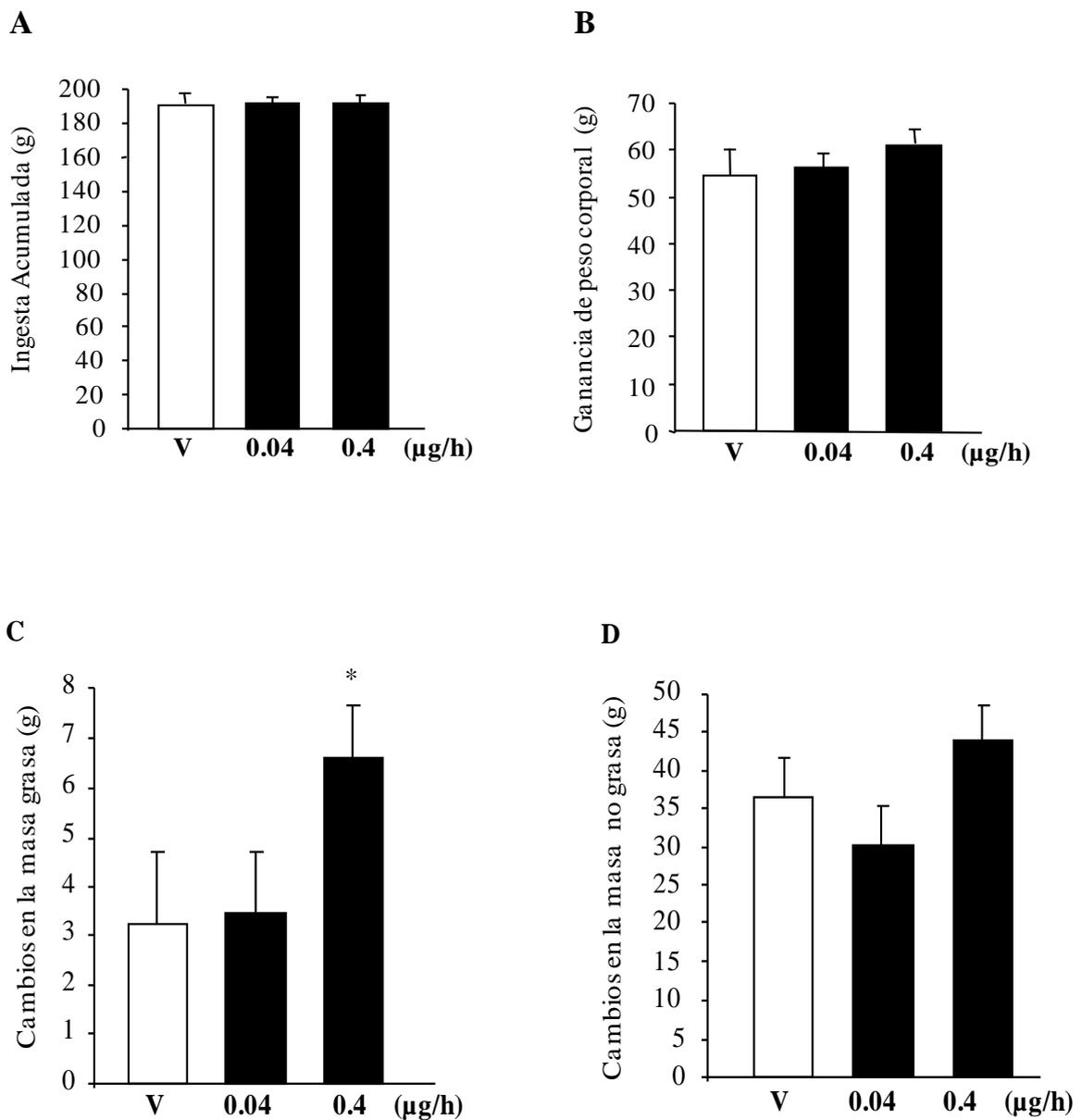
2.1. Administración i.c.v crónica (7 días) de O-1602: Efectos sobre la ingesta, la composición corporal y el tejido adiposo blanco.

Después de la administración central (i.c.v) de O-1602 a las ratas, utilizando dosis de 0.04 y; 0.4 $\mu\text{g}/\text{rata}$ o vehículo para el grupo control durante 7 días, encontramos que el O-1602 no modificó la ingesta (figura 24A) ni tampoco el peso corporal (figura 24B).

Sin embargo, sí observamos un incremento en la cantidad de masa grasa (figura 24C), sin encontrar cambios en la masa no grasa (figura 24D).

El hecho de observar cambios en la masa grasa, nos condujo a medir varias enzimas clave involucradas en el metabolismo de lípidos, transportadores de glucosa y adipoquinas implicadas en acciones inflamatorias.

Encontramos que el tratamiento con O-1602 disminuye de forma específica los niveles de ARNm de la hormona sensible de lipasa (HSL) y los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 al ser comparados con las ratas control (vehículo) (Figura 24E).



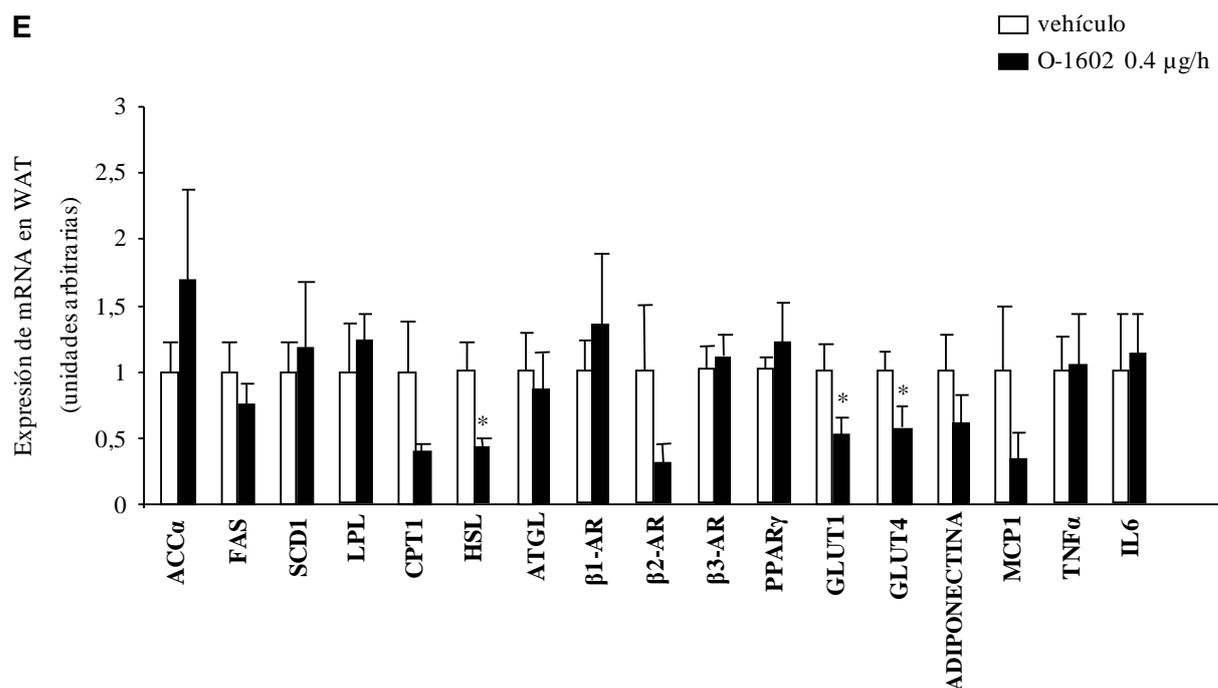


Figura 24. Efectos de la administración i.c.v del O-1602. **A.** Efectos sobre la ingesta, de la administración i.c.v de O-1602 a dosis de 0.04 y 0.4 µg/h/rata, durante 7 días. **B.** Efectos sobre el peso corporal de la administración i.c.v de O-1602 a dosis de 0.04 y 0.4 µg/h/rata, durante 7 días. **C.** Efectos sobre la masa grasa de la administración i.c.v de O-1602 a dosis de 0.04 y 0.4 µg/h/rata, durante 7 días. **D.** Efectos sobre la masa magra de la administración i.c.v de O-1602 a dosis de 0.04 y 0.4 µg/h/rata, durante 7 días. **E.** Efectos de la administración i.c.v de O-1602 (0.4 µg/h/rata), durante 7 días sobre la expresión de ARNm en tejido adiposo blanco gonadal de acetyl coenzima-A carboxylasa-α, fatty acid synthasa, SCD-1, LPL, CPT-1, hormona sensible de lipasa, adipose tryglyceride lipase, receptores adrenérgicos β1, Adr-β2, Adr-β3, peroxisoma proliferador-activado por receptor-γ, GLUT1, GLUT4, adiponectina, MCP1, factor de necrosis tumoral- α, e interluquina-6. Los valores han sido normalizados con 18S, el cual es usado como gen control (*housekeeping*). Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo. *P<0,05 comparados con el grupo control.

2.2. Administración i.p crónica (7 días) de O-1602: Efectos sobre la ingesta, la composición corporal, parámetros metabólicos y el tejido adiposo blanco.

El objetivo de este experimento fue evaluar si la administración i.p. continua de O-1602 podría inducir alteraciones en la ingesta de alimentos o en el peso corporal en ratas.

Para ello, el O-1602 fue inyectado periféricamente a dosis de 0,1, 0,5 y 1 mg/kg cada día durante 1 semana. Encontramos que después de este período, el O-1602 no modificó ni la ingesta (figura 25A) ni el peso corporal (figura 25B).

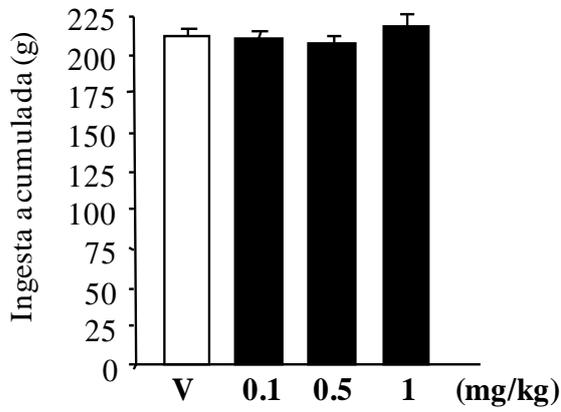
Sin embargo, si hubo un incremento en la masa grasa después del tratamiento con el O-1602 a dosis de 0.1mg/kg (figura 25C), sin cambios en la masa no grasa (figura 25D).

Debido al aumento encontrado en la masa grasa, después de 1 semana de tratamiento se pesaron los depósitos de grasa retroperitoneal y visceral (figura 25E), encontrando un ligero pero no significativo aumento de peso en las ratas tratadas con el O-1602.

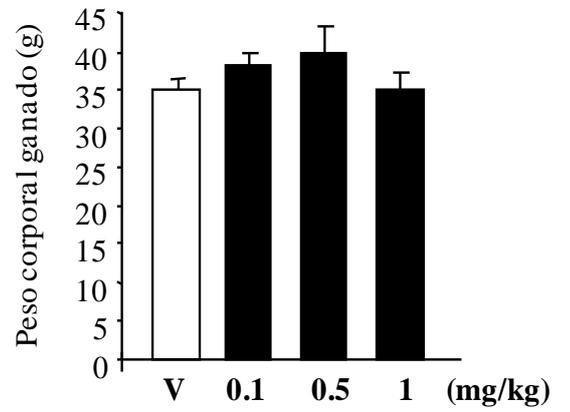
Adicionalmente, medimos la expresión génica en WATg de varias enzimas clave involucradas en el metabolismo de lípidos, así como también, transportadores de glucosa y adipoquinas implicadas en acciones inflamatorias. Observamos que el tratamiento periférico con el O-1602 disminuye específicamente los niveles de la lipasa ATGL (*adipose triglyceride lipase*) e incrementa los niveles de interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (*TNF*)- α , al compararlas con las ratas control tratadas con vehículo (figura 25F).

Por otra parte, usando calorimetría indirecta, no encontramos ninguna alteración en el gasto de energía total (figura 25G), ni en la actividad locomotora espontánea (figura 25 H). Sin embargo, es interesante señalar que la administración periférica crónica del O-1602 dio lugar a un incremento del RQ (Cociente respiratorio) durante la fase nocturna (figura 25J), lo que sugiere una disminución en el porcentaje de grasa utilizada como sustrato energético.

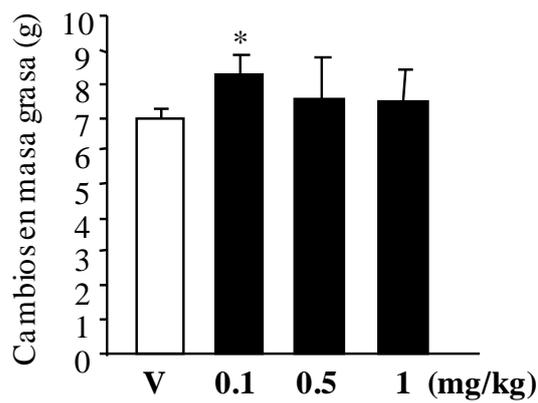
A



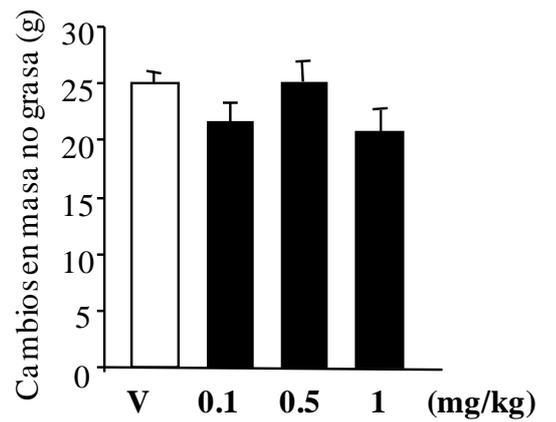
B



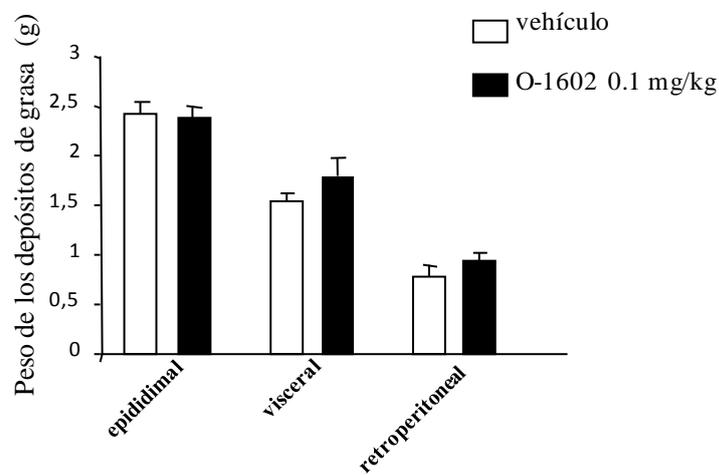
C



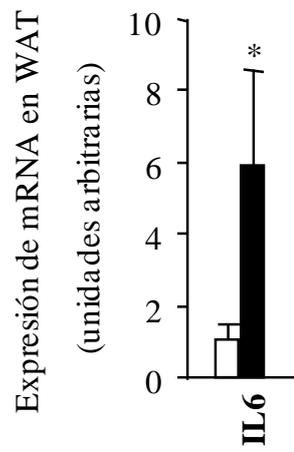
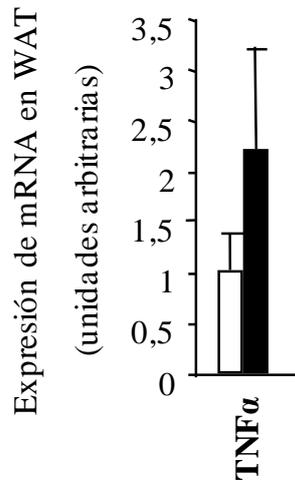
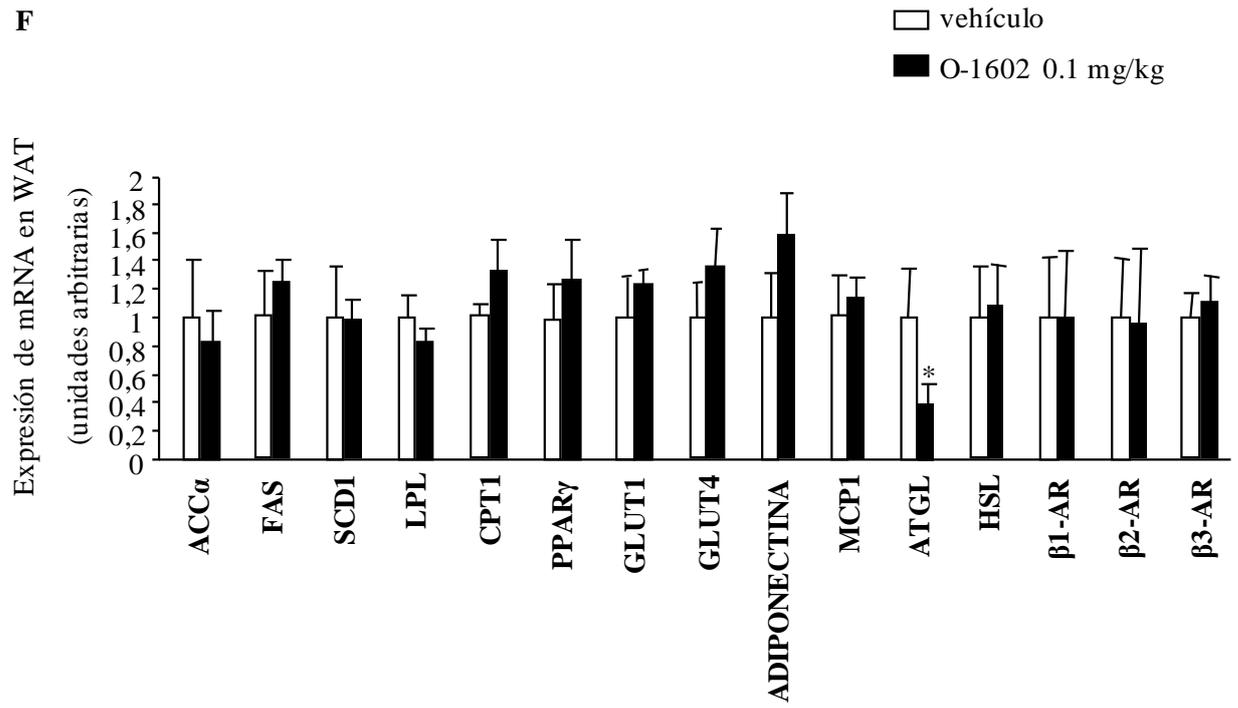
D



E



F



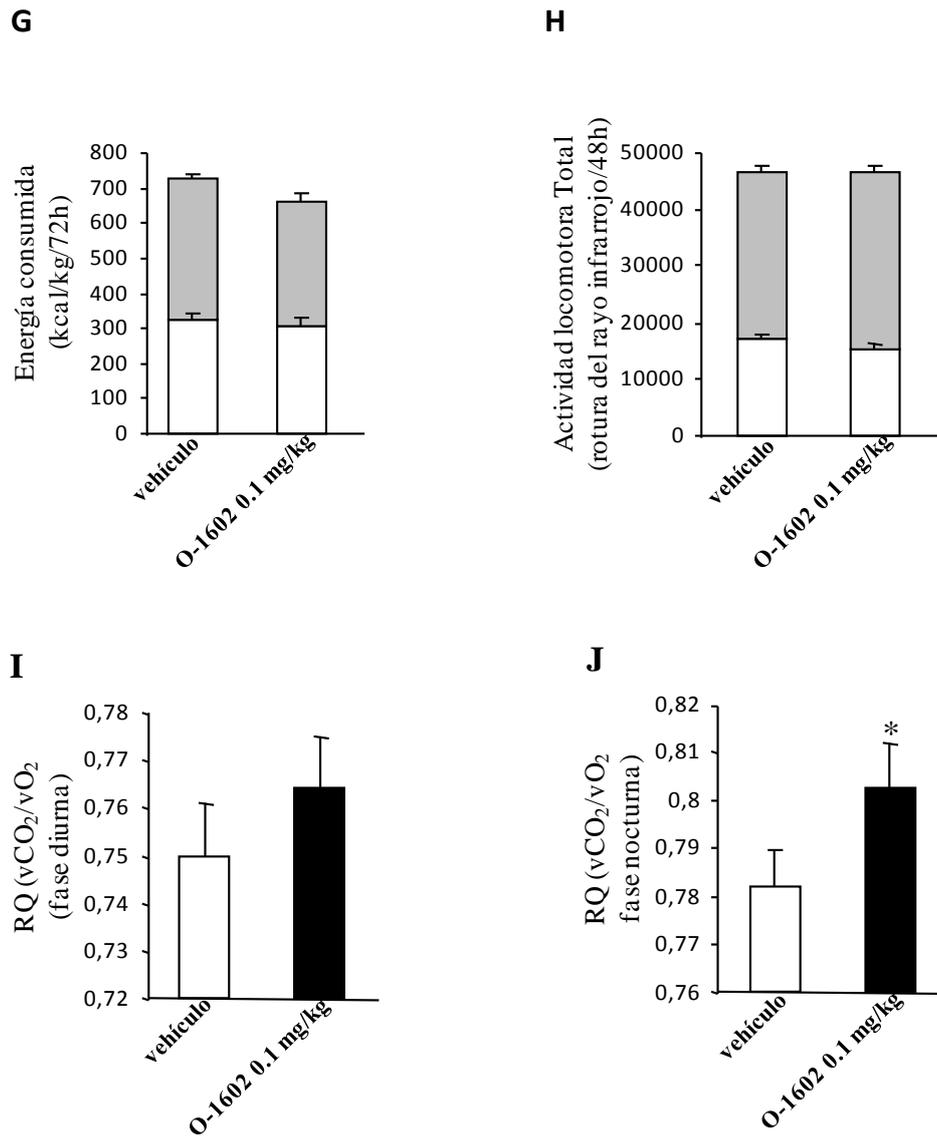


Figura 25: Efectos de la administración intraperitoneal crónica de O-1602 durante 7 días. A: Efectos sobre la ingesta acumulada de la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1, 0,5 y 1 mg/kg). **B:** Resultados sobre el peso corporal de la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1, 0,5 y 1 mg/kg). **C:** Cambios en la masa grasa producidos por la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1, 0,5 y 1 mg/kg). **D:** Cambios en la masa no grasa producidos por la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1, 0,5 y 1 mg/kg). **E:** Diferencias en depósitos grasos derivados de la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1 mg/kg). **F:** Efectos de la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1 mg/kg) sobre los niveles de expresión de ARNm de ACC- α (*acetyl coenzima-A carboxylasa- α*), FAS (*fatty acid synthasa*), SCD-1, LPL, CPT-1, HSL (*hormone sensitive lipase*), ATGL (*adipose tryglyceride lipase*), Adrenérgico β 1, Adr- β 2, Adr- β 3, PPAR- γ (*peroxisoma proliferador-activated receptor- γ*), GLUT1, GLUT4, adiponectina, MCP1, TNF- α (tumour necrosis factor- α), e IL-6 (interlukin-6). Los valores han sido normalizados con 18S, el cual es usado como gen control (*housekeeping*). **G:** Efectos de la administración i.p. crónica de O-1602 durante 7 días (0,1 mg/Kg/día) sobre el consumo de energía. **H:** Efectos de la administración i.p. crónica de O-1602 (0,1 mg/Kg/día) sobre distintos parámetros metabólicos; actividad locomotora espontánea. **I:** Cociente respiratorio durante la fase diurna. **J:** Cociente respiratorio durante la fase nocturna. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo. *P<0,05 comparados con el grupo control.

3. Efectos de O-1602 sobre adipocitos *in vitro*

Después de demostrar que la administración crónica del O-1602 favorece el incremento de tejido adiposo *in vivo*, quisimos evaluar sus efectos directos sobre adipocitos.

En primer lugar, analizamos si el O-1602 (10 y 100 μM) es capaz de movilizar calcio intracelular en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1, en la medida en que los niveles intracelulares de calcio se han asociado con lipogénesis en estas células (Gericke *et al.*, 2009). Para este fin, los adipocitos fueron cargados con una sonda sensible al calcio, Fura-2, y después de la manipulación farmacológica con O-1602 se monitorizó el calcio intracelular.

Encontramos que el O-1602 no movilizó $(\text{Ca}^{2+})_i$ a la dosis menor estudiada (10 μM) (figura 26A), pero provocó un importante y continuo aumento en el $(\text{Ca}^{2+})_i$ a 100 μM , (figura 26B). $n = 34$ células sensibles de tres experimentos independientes.

Este ascenso en el $(\text{Ca}^{2+})_i$ podría estar relacionado con un aumento de actividad lipogénica (Gericke *et al.*, 2009). Por consiguiente, para comprender este fenómeno, analizamos el efecto del tratamiento con O-1602 durante 10 días en cultivos de células 3T3-L1 durante la diferenciación en adipocitos. Como se muestra en las imágenes de la figura 26C, este tratamiento indujo un incremento en la acumulación de lípidos en comparación con las células no tratadas.

La cuantificación de la incorporación del aceite rojo por fluorimetría, confirma esta observación, las células tratadas con O-1602 exhibieron 2,8 veces más contenido de tinte que las células no tratadas (figura 26D).

Por otra parte, hemos medido la expresión génica de tres marcadores de diferenciación adipocitaria como PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*), CEBP- α y CEBP- β (*enhancer-binding protein alpha & beta*). Encontramos que los niveles de expresión de ARNm de CEBP- α se incrementaron en las células tratadas con O-1602 (figura 26E), mientras que CEBP- β (figura 26F) y PPAR- γ (figura 26G) se mantuvieron sin cambios al compararlas con sus controles.

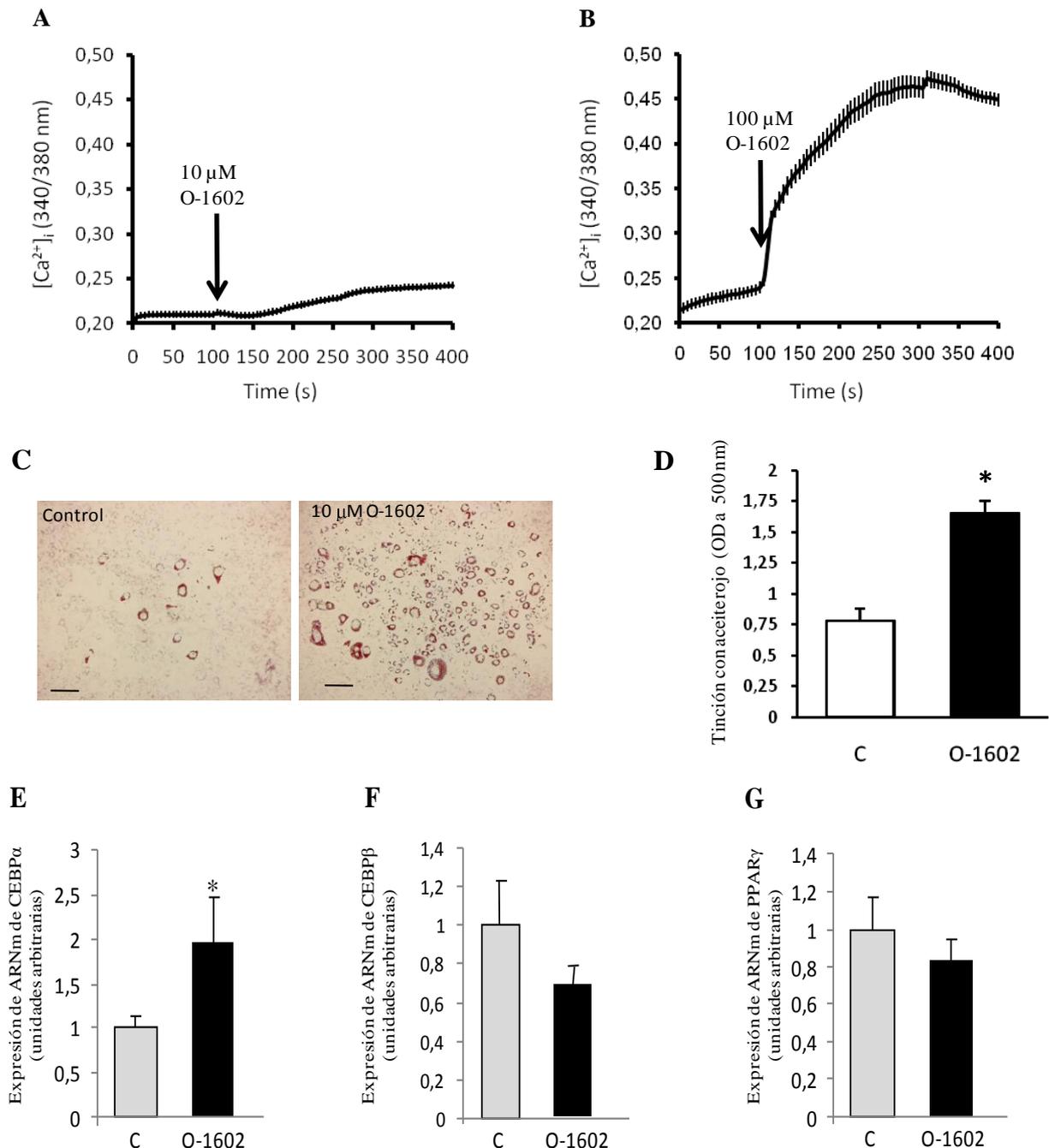


Figura 26. Efectos de O-1602 sobre la movilización de $(Ca^{2+})_i$ en adipocitos diferenciados en células 3T3-L1. **A y B.** Lapso de tiempo de grabación de $(Ca^{2+})_i$ en adipocitos de células 3T3-L1, en ausencia y presencia de O-1602 a 10 μM (Fig. A) y 100 μM (Fig. B). Los datos se presentan como el índice promedio de la emisión de fluorescencia a 340 y 380 nm \pm el error estándar de un promedio de 34 adipocitos de tres experimentos independientes. **C.** Representación de las imágenes fotografiadas de los adipocitos diferenciados en células 3T3-L1 durante 10 días en ausencia (panel izquierdo) y presencia de O-1602 a 10 μM (panel derecho), las imágenes son teñidas con aceite rojo (Oil Red O). Barra de escala, 100 μM . **D.** Cuantificación fluorimétrica de la tinción en aceite rojo de la diferenciación de adipocitos en células 3T3-L1 al cumplirse el día 10 de tratamiento en ausencia o presencia de O-1602 (10 μM). **E, F y G.** Expresión de ARNm de CEBP- α , CEBP- β y PPAR- γ en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1 durante 10 días, en ausencia y presencia de 10 μM de O-1602. Los valores se representan como el promedio \pm del error estándar de los tres experimentos independientes. *P < 0,05.

IV. EFECTOS METABÓLICOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPI

1. Efectos de la administración aguda de LPI

1.1. Administración central i.c.v de LPI

Al igual que con O-1602, las ratas fueron tratadas con LPI a dosis de 0.02, 0.1 y 0.5 μg /rata (figura 27) y se administró de manera aguda a nivel central i.c.v.

Encontramos que la administración de LPI no alteró el comportamiento alimenticio (figura 27).

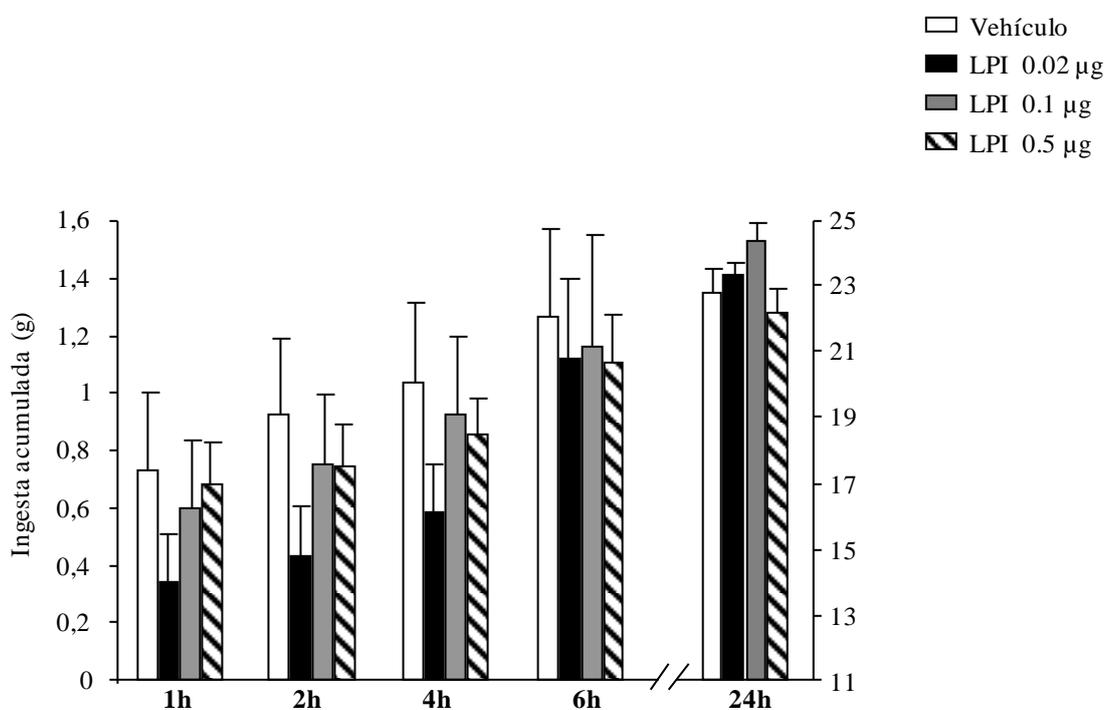


Figura 27. Efecto de la administración central aguda i.c.v de LPI sobre la ingesta acumulada. Ingesta en ratas tratadas con LPI (0.2, 0.1, 0.5 μg). Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo.

1.2. Administración i.p. aguda de LPI

Al administrar LPI periféricamente encontramos que la dosis más baja utilizada 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 28) estimula la ingesta, aunque no de manera significativa; mientras que cuando las ratas son tratadas con dosis más elevadas de LPI i.p. (20 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$); no se observa ningún cambio sobre la ingesta.

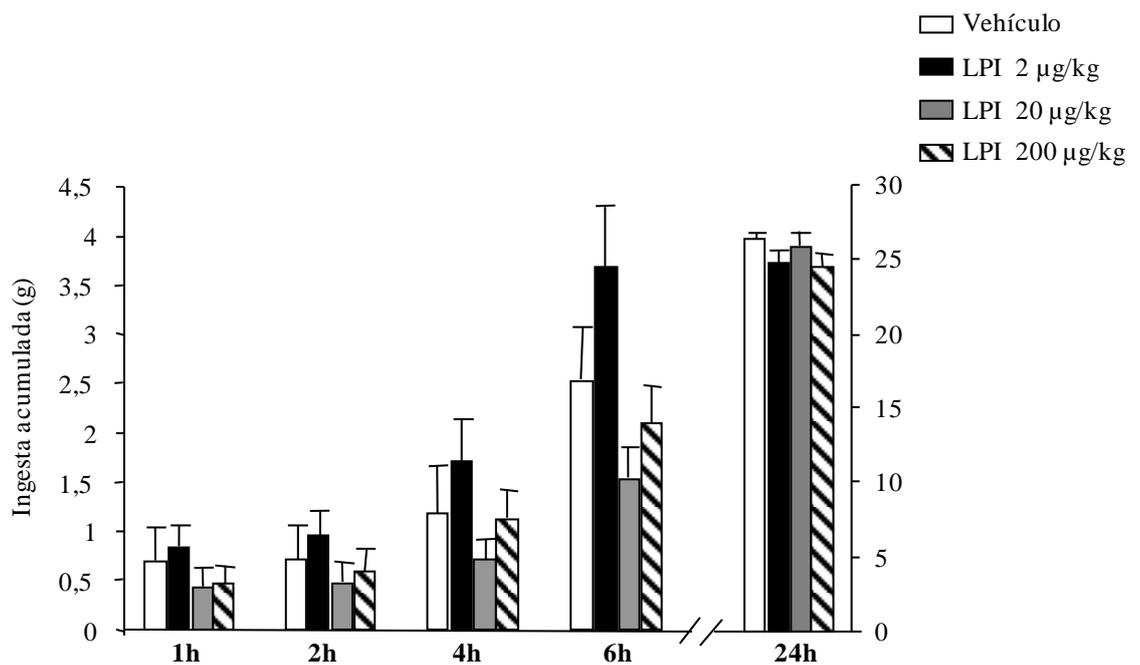


Figura 28. Efecto de la administración periférica aguda de LPI sobre la ingesta acumulada. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo.

2. Administración i.p. crónica (7 días) de LPI. Efectos sobre la ingesta, la composición corporal y el tejido adiposo blanco

De la misma forma como analizamos los cambios producidos por la administración i.p. crónica de O-1602 sobre la ingesta y el peso corporal, quisimos evaluar los efectos del otro ligando de GPR55, LPI, usando las mismas dosis (0.1, 0.5 and 1 mg/kg). El LPI se administró a las ratas intraperitonealmente cada día durante 1 semana. Al finalizar

este período, no encontramos ningún cambio sobre la ingesta (figura 29A), el peso corporal (figura 29B), la masa grasa (figura 29C) y la masa no grasa (figura 29D).

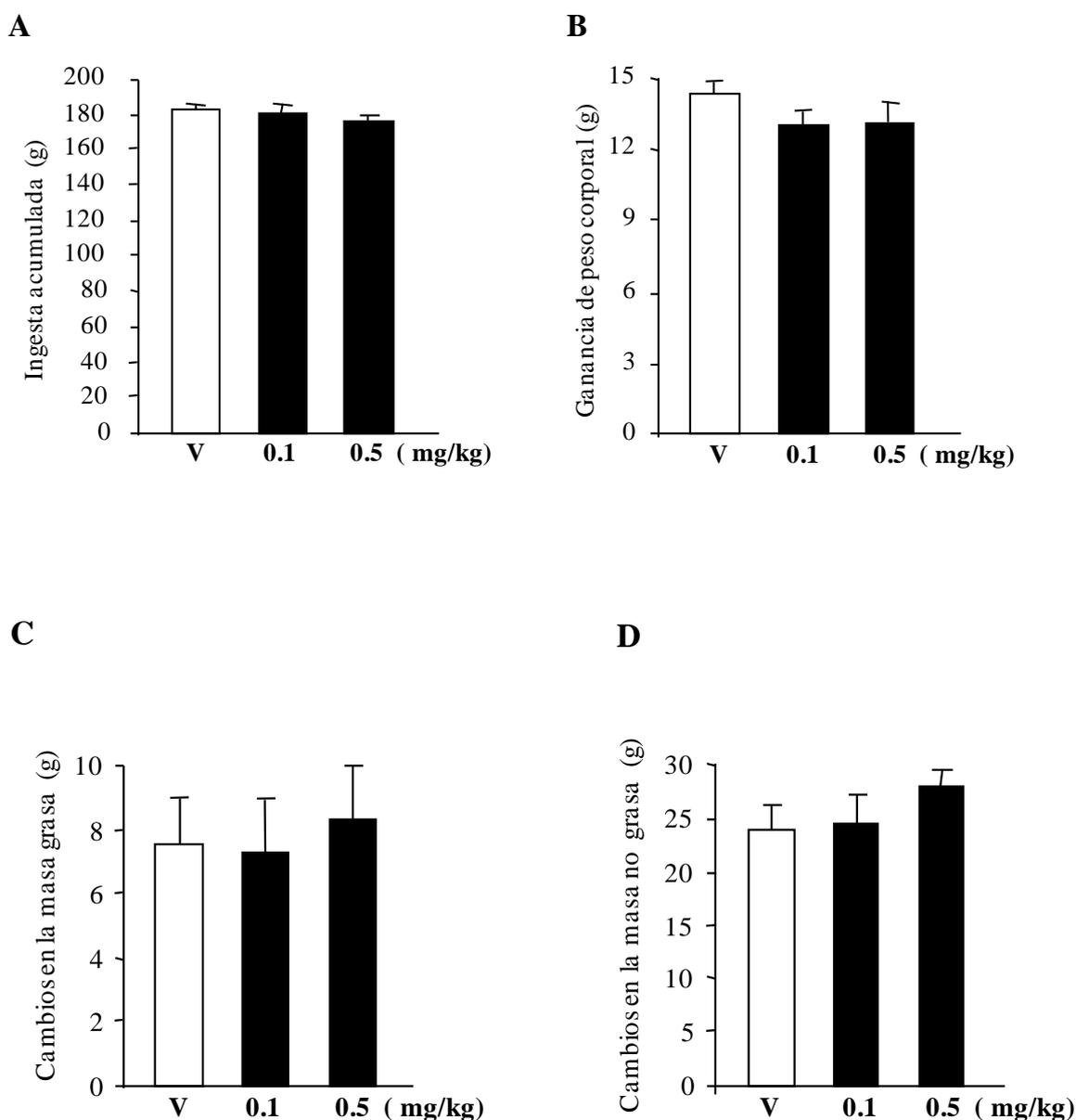


Figura 29. Efectos de la administración periférica crónica (7 días) de LPI (0.1, 0.5 y 1 mg/kg). A. Ingesta acumulada. B. Peso corporal. C. Cambios sobre las masas grasa D. Cambios sobre la masa no grasa. Los valores representan la media obtenida a partir de 6 - 8 animales por grupo.

3. Efectos de LPI sobre células 3T3-L1 in vitro

Para valorar los efectos del LPI sobre adipocitos in vitro, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito previamente en el análisis de los efectos de O-1602. De esta

manera, adipocitos de células 3T3-L1 fueron cargados con una sonda sensible al calcio, Fura-2; y después de la manipulación farmacológica con el LPI durante 10 días, se monitorizó el calcio intracelular.

De acuerdo con los datos obtenidos en los experimentos *in vivo* que indican que el LPI no afecta la masa grasa, en los adipocitos de células 3T3-L1, el LPI (1 y 10 $\mu\text{mol/L}$) no modificó el número de gotas lipídicas por célula (figura 30).

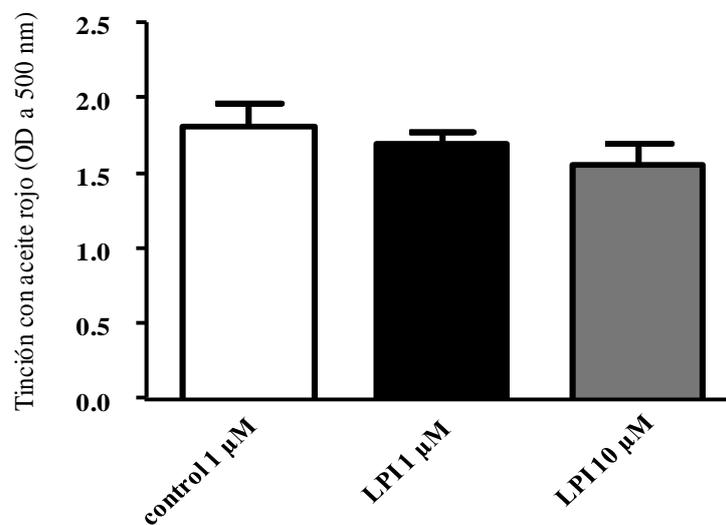


Figura 30. Efectos de LPI sobre adipocitos *in vitro*. Análisis por fluorimetría de la tinción en aceite rojo de adipocitos en células 3T3-L1 tratadas con LPI (1 y 10 μM), después de 10 días.

4. Efectos de la administración aguda i.p. de LPI sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55

Cuando se administró el LPI i.p. (2 $\mu\text{g/kg}$) no se observaron cambios sobre la ingesta de ratones deficientes del gen GPR55 (figura 31A), ni en los ratones *wild type* (figura 31B); a ninguno de los tiempos estudiados.

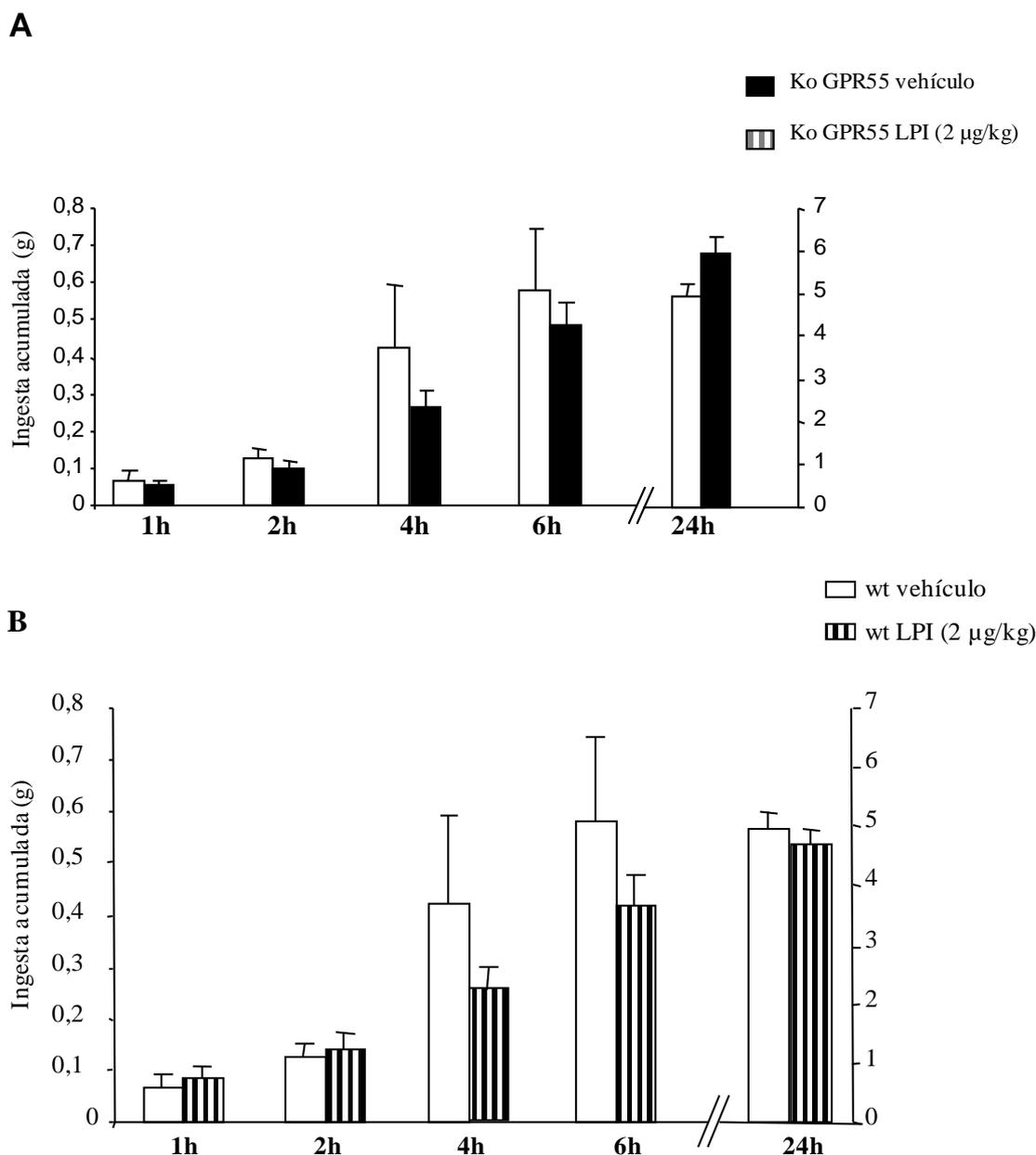


Figura 31. Efectos de la administración aguda i.p. de LPI; (2 µg/kg) sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55. A. Ingesta tras la administración farmacológica de LPI en ratones deficientes de GPR55. **B.** Análisis de la ingesta en ratones *wild type* tras el tratamiento con LPI.

V. REGULACION DE GPR55, CB1 Y CB2 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE HUMANOS

Las principales características antropométricas y bioquímicas de las dos cohortes se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características antropométricas y analíticas de los sujetos de la cohorte 1 y 2

<i>Cohorte 1</i>					
	Delgados	Obesos NG	Obesos IG	Obesos DMT2	P
n (hombres/mujeres)	5 (2/3)	34 (13/21)	27 (14/13)	29 (13/16)	
Edad (años)	38 ± 4	38 ± 2	42 ± 2	47 ± 2 ^{††}	<0.001
IMC (kg/m ²)	21.3 ± 1.1	42.7 ± 1.1 ^{**}	46.0 ± 1.2 ^{**}	47.6 ± 1.8 ^{**}	<0.001
Porcentaje de grasa (%)	26.5 ± 2.8	48.3 ± 1.6 ^{**}	53.3 ± 1.0 ^{**}	50.6 ± 1.5 ^{**}	<0.001
Glucosa en ayunas (mg/dL)	86.8 ± 3.5	89.0 ± 1.7	105.2 ± 2.2	139.9 ± 10.9 ^{**,††,##}	<0.001
Insulina en ayunas (μU/mL)	8.2 ± 1.7	17.4 ± 1.6 [*]	18.0 ± 2.3 [*]	20.2 ± 2.6 [*]	0.012
Triglicéridos (mg/dL)	68 ± 11	103 ± 8	139 ± 24	191 ± 42	0.066
Colesterol (mg/dL)	192 ± 10	181 ± 8	208 ± 8	205 ± 8	0.066
Colesterol - LDL (mg/dL)	118 ± 10	119 ± 6	130 ± 7	133 ± 8	0.443
Colesterol- HDL (mg/dL)	58 ± 2	41 ± 2 [*]	49 ± 2 [†]	42 ± 2 [*]	<0.001
Leptina (ng/mL)	7.8 ± 1.5	48.0 ± 5.4 [*]	60.8 ± 6.4 ^{**}	61.9 ± 8.5 ^{**}	0.003
CRP (mg/L)	1.8 ± 0.3	6.6 ± 1.3	12.8 ± 2.3 ^{*,†}	9.0 ± 1.5	0.011
Glucosa AUC		15.7 ± 0.6	20.3 ± 0.6 ^{†††}	26.2 ± 1.5 ^{†††}	0.001
Insulina AUC		13.0 ± 1.4	11.8 ± 1.2	7.6 ± 1.3	0.055
Glucosa 2h (OGTT)		108.5 ± 2.6	168.2 ± 3.7 ^{†††}	247.7 ± 24.1 ^{†††}	<0.001
HOMA-IR	1.7 ± 0.3	4.8 ± 0.7	4.7 ± 0.6	7.1 ± 1.3 [†]	<0.05
<i>Cohorte 2</i>					
	Obesos NG	Obesos IG	Obesos DMT2	P	
n (hombres/mujeres)	35 (14/21)	17 (5/12)	12 (4/8)		
Edad (años)	48.4 ± 11.6	47 ± 14.2	44 ± 11.1		0.7
IMC (kg/m ²)	39.0 ± 1.6	40.2 ± 1.9	41.2 ± 1.6		0.7
Porcentaje de grasa (%)	40.2 ± 1.02	50.3 ± 1.5	52.1 ± 2.5		0.4
Glucosa en ayunas (mg/dL)	86.6 ± 1.3	110.2 ± 2.1	213.1 ± 19.8		<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	114.7 ± 15.4	149 ± 17.2	200.7 ± 45.2		0.049
Colesterol - HDL (mg/dL)	56.9 ± 3.8	54.2 ± 4.2	47.2 ± 3.5		0.28
Colesterol - LDL (mg/dL)	106.1 ± 34.1	114 ± 8.8	124.9 ± 15.1		0.4
Insulina ayunas (μU/mL)	12.3 ± 3.1	29.1 ± 4.7	30.2 ± 7.6		0.2 †
HOMA-IR	2.6 ± 0.7	8.2 ± 1.2	9.7 ± 1.3		0.09 †

Tabla 8. Características antropométricas y analíticas de los sujetos de la cohorte 1 y 2. Índice de masa corporal (IMC), proteína C-reactiva (CRP). Los datos están representados por la media estándar. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante ANOVA siguiendo el test

post hoc Tukey. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ al compararlos con el grupo control (delgados). † $P < 0.05$ y †† $P < 0.01$ vs obesos normoglucémicos (NG). ††† $P < 0.01$ vs obesos con intolerancia a la glucosa (IGT). † Estos valores representan solo 13 sujetos de los 64 individuos utilizados en la valoración de otros parámetros.

1. Influencia de la obesidad sobre los niveles de expresión de ARNm de GPR55, CB1 y CB2 en tejido adiposo visceral y subcutáneo

Los niveles de expresión de ARNm de GPR55 (Figura 32A), CB1 (Figura 32B) y CB2 (Figura 32C) fueron mayores en el tejido adiposo visceral de pacientes obesos, en comparación con los sujetos delgados de la cohorte 1.

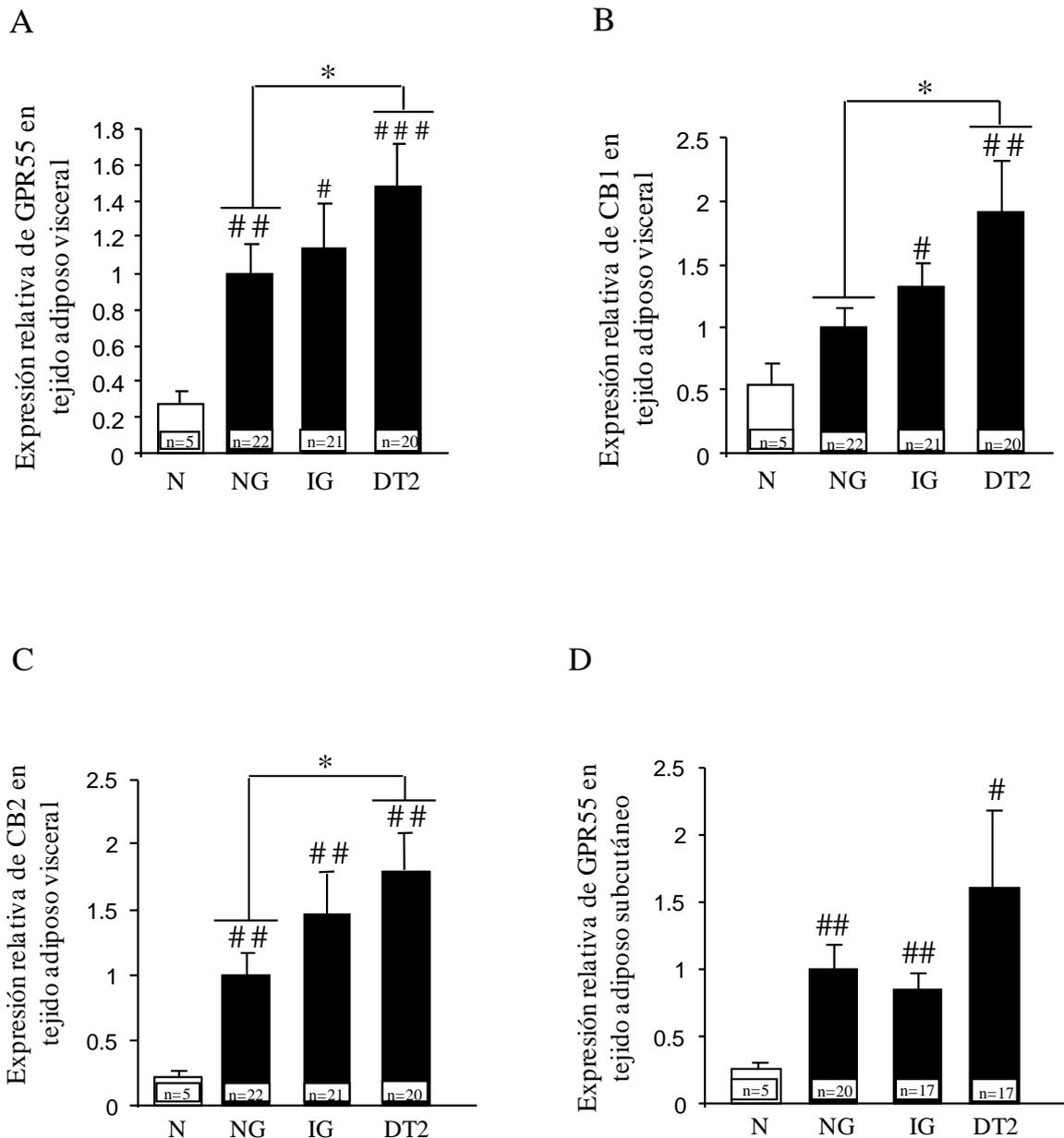
En las muestras de tejido adiposo visceral de los pacientes obesos, encontramos que los niveles de expresión de los tres receptores se incrementa significativamente en los sujetos obesos con diabetes tipo 2, en comparación con los normoglucémicos (NG) y los intolerantes a la glucosa (IG) (figura 32A y C).

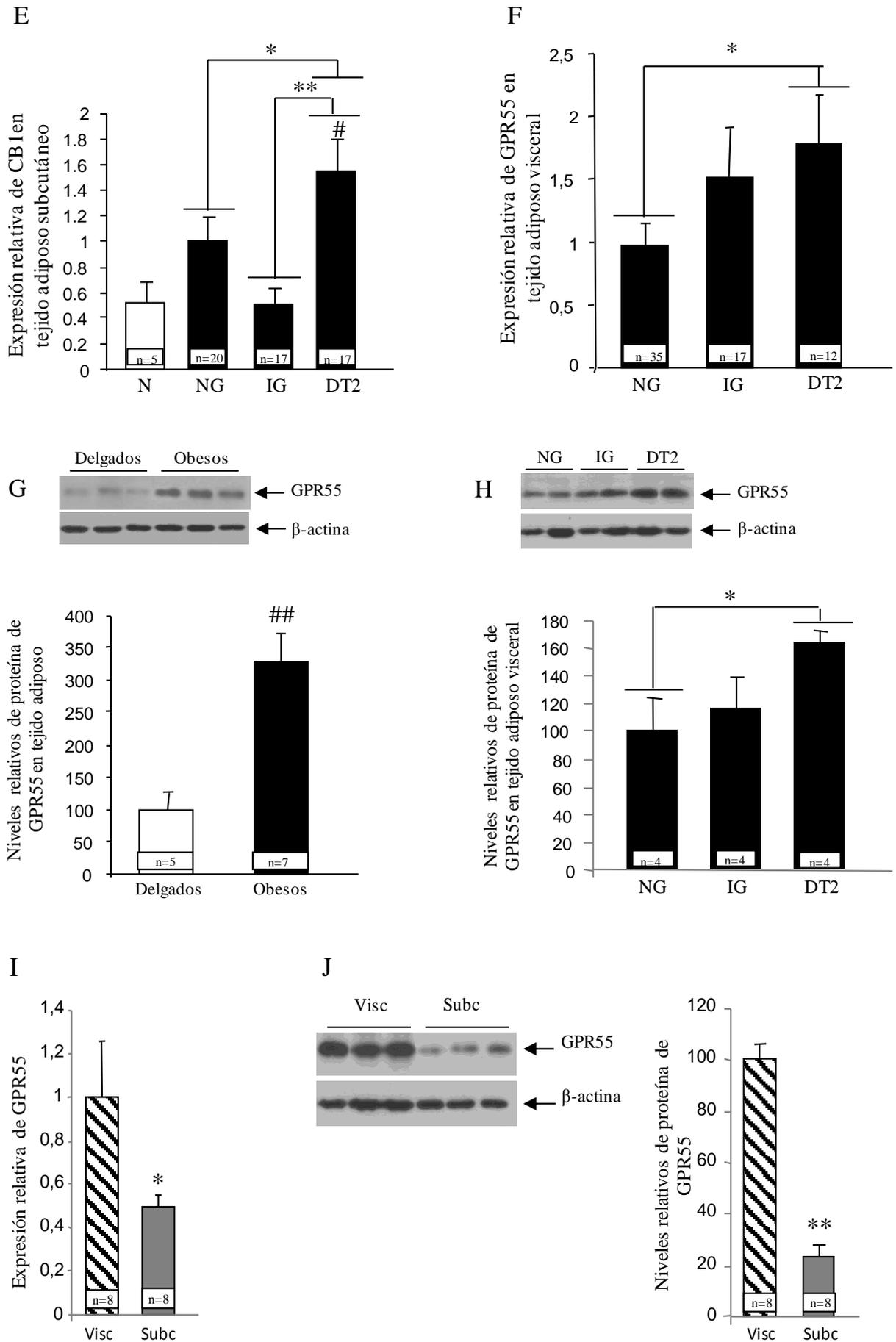
Adicionalmente, también medimos la expresión de GPR55, CB1 y CB2 en tejido adiposo subcutáneo, donde no fue posible detectar la expresión de CB2. En este caso, la expresión de GPR55 y CB1 fue muy similar a lo observado en tejido adiposo visceral. Tanto la expresión de GPR55 (figura 32D), como de CB1 (figura 32E) fue mayor en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos diabéticos comparados con pacientes obesos NG e IG de los sujetos de la cohorte 1.

De acuerdo con estos resultados obtenidos en la cohorte 1, la expresión génica de GPR55 se incrementó en el tejido adiposo visceral de pacientes obesos diabéticos comparados con pacientes obesos NG e IGT de los sujetos de la cohorte 2 (figura 32F).

De acuerdo con los datos observados en la expresión de ARNm de GPR55, los niveles de proteína se incrementaron significativamente en el tejido adiposo visceral de los pacientes obesos, en comparación con los sujetos delgados (figura 32G). De manera similar a lo observado con la expresión del receptor GPR55, los niveles de proteína de este receptor se incrementaron más en los pacientes obesos con diabetes tipo 2 al ser comparados con los pacientes NG (figura 32H).

Adicionalmente, comparamos la expresión de ARNm de GPR55 (figura 32I) y proteína (figura 32J), de tejido adiposo visceral y subcutáneo de los mismos individuos y encontramos que los niveles de GPR55 fueron significativamente menores en el tejido adiposo subcutáneo. Finalmente, la expresión de ARNm de CB1 fue también mayor en tejido adiposo visceral al compararlo con el tejido adiposo subcutáneo (figura 32K).





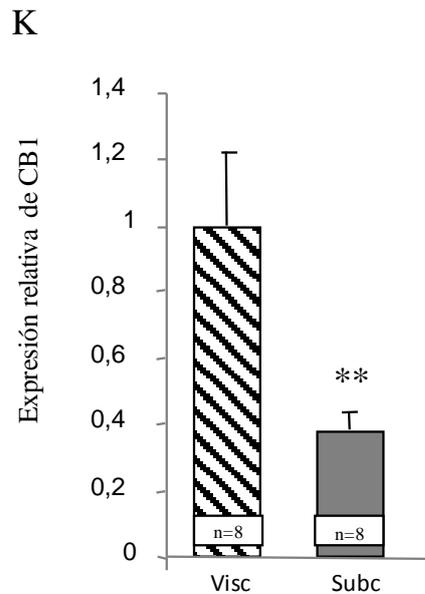


Figura 32. Regulación de GPR55, CB1 y CB2 en tejido adiposo blanco de humanos. **A.** Niveles de expresión de ARNm de GPR55, **B.** CB1 y **C.** CB2 en tejido adiposo visceral obtenido de sujetos delgados y obesos en la cohorte 1. **D.** Niveles de expresión de ARNm de GPR55 y **E.** CB1 en tejido adiposo subcutáneo obtenido de sujetos delgados y obesos en la cohorte 1. **F.** Niveles de expresión de ARNm de GPR55 en tejido adiposo visceral obtenido de sujetos delgados y obesos en la cohorte 2. **G.** Niveles de proteína de GPR55 en tejido adiposo visceral de sujetos delgados y obesos en la cohorte 2. **H.** Niveles de proteína de GPR55 en tejido adiposo visceral de pacientes obesos NG, IG y con diabetes tipo 2 en la cohorte 1. **I.** Niveles de expresión de ARNm de GPR55 en grasa visceral y subcutánea obtenido de sujetos obesos. **J.** Niveles de proteína de GPR55 en grasa visceral y subcutánea obtenido de sujetos obesos. **K.** Niveles de expresión de ARNm de CB1 en grasa visceral y subcutánea obtenido de sujetos obesos. Los sujetos obesos fueron subclasificados en normoglicémicos (NG), intolerantes a la glucosa (IG) y diabéticos tipo 2 (DT2). Los valores de ARNm relativo fueron normalizados con los valores de los grupos (normoglicémicos NG), DT2; Visc, visceral; Subc, subcutáneo. #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs. Sujetos delgados; *P < 0.05, **P < 0.01 vs. NG.

2. Correlaciones para GPR55 y CB1 en tejido adiposo blanco con diferentes factores metabólicos

En un análisis de regresión lineal multivariante, el IMC surgió como un predictor significativo de la expresión de GPR55, excepto en hombres de la cohorte 2 (Tabla 9).

La expresión de GPR55 en el tejido adiposo visceral de los sujetos de la cohorte 1, guarda una correlación positiva con el peso corporal (figura 33A), el índice de masa

corporal (figura 33B), los niveles circulantes de LPI (figura 33C) y el porcentaje de grasa (tabla 10).

Adicionalmente, teniendo en cuenta la variabilidad de género en los grupos, se realizó un análisis para verificar si las diferencias observadas se explican con esta variable. La correlación fue hecha considerando solo hombres o mujeres. Los resultados mostraron una correlación positiva entre la expresión de GPR55 en el tejido adiposo visceral y el IMC en ambos sexos (tabla 10).

Por otra parte, no encontramos correlación entre los niveles de ARNm de GPR55 en tejido adiposo subcutáneo y las variables estudiadas (tabla 10).

De manera contraria a GPR55, la expresión de CB1 en tejido adiposo visceral no se correlaciona con el IMC (tabla 11), aunque en tejido adiposo subcutáneo, la expresión de CB1 sí se correlaciona con este parámetro pero solamente en mujeres (tabla 11).

Paralelamente a la cohorte 1, los niveles de ARNm de GPR55 en tejido adiposo visceral están asociados positivamente con el peso corporal (figura 33D), el IMC (figura 33E), y el porcentaje de grasa (Tabla 12) en los sujetos de la cohorte 2. La correlación de la expresión de GPR55 con el peso corporal, el índice de masa corporal y el porcentaje de grasa fue especialmente significativa en las mujeres de ambas cohortes (Tablas 10 y 12).

Tabla 9. Análisis de regresión lineal multivariante para la expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral como variable dependiente

Cohorte 1				
Niveles de mRNA de GPR55 en hombres				
	<i>Tejido adiposo Visceral</i> $r^2=0.358; P=0.043$		<i>Tejido adiposo Subcutáneo</i> $r^2=-0.049; P=0.549$	
	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>
Edad	-0.07	0.778	0.37	0.70
IMC	0.50	0.020	0.35	0.42
Triglicéridos	1.07	0.025	1.02	0.37
Colesterol - Total	-0.34	0.188	-0.12	0.89
HOMA	-0.71	0.114	-0.98	0.26

Niveles de mRNA de GPR55 en mujeres				
	<i>Tejido adiposo Visceral</i> $r^2=0.207; P=0.026$		<i>Tejido adiposo Subcutáneo</i> $r^2=-0.098; P=0.771$	
	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>
Edad	0.03	0.856	0.19	0.459
IMC	0.42	0.018	0.10	0.698
HOMA	2.58	0.134	0.20	0.411

Cohorte 2				
Niveles de mRNA de GPR55 en hombres				
	<i>Tejido adiposo Visceral</i> $r^2=-0.018; P=0.46$		<i>Tejido adiposo Subcutáneo</i> $r^2=0.084; P=0.28$	
	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>
Edad	0.12	0.653	0.18	0.566
IMC	0.32	0.277	0.63	0.077
Diabetes Tipo 2	0.19	0.445	-0.28	0.325

Niveles de mRNA de GPR55 en mujeres				
	<i>Tejido adiposo Visceral</i> $r^2=0.054; P=0.16$		<i>Tejido adiposo Subcutáneo</i> $r^2=0.066 P=0.089$	
	β	<i>P</i>	β	<i>P</i>
Edad	0.009	0.951	-0.078	0.563
IMC	0.331	0.032	0.292	0.036
Diabetes Tipo 2	0.080	0.599	-0.183	0.184

Beta es el coeficiente de regresión estándar. r^2 representa el ajuste de R cuadrada. Diabetes tipo 2 es una variable (diabetes = 0 vs no diabetes = 1) y se la diagnosticó a partir de la medición de glicemia en ayunas.

Tabla 10. Correlaciones entre la expresión de GPR55 en tejido visceral y subcutáneo y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 1

GPR55 en tejido adiposo visceral				
	Hombres (n=25)		Mujeres (n=30)	
	Pearson	p	Pearson	p
Peso	0.33	0.052	0.49	0.0024**
Índice de Masa Corporal	0.34	0.046*	0.42	0.0095**
Porcentaje de grasa	0.15	0.242	0.33	0.035*
Glucosa	0.25	0.158	0.10	0.297
Insulina	0.42	0.045*	0.27	0.095
TGs	0.60	0.004**	-0.02	0.539
Col. Total	-0.29	0.870	-0.10	0.694
Col. LDL.	-0.55	0.987	-0.08	0.671
Col. HDL.	-0.35	0.912	-0.04	0.588
Leptina	0.34	0.107	0.32	0.100
LPI	0.39	0.028*	0.20	0.130
HOMA-IR	0.28	0.11	0.35	0.02*
GPR55 en tejido adiposo subcutáneo				
	Hombres (n=25)		Mujeres (n=30)	
	Pearson	p	Pearson	p
Peso	0.27	0.118	-0.09	0.684
Índice de Masa Corporal	-0.06	0.61	-0.05	0.600
Porcentaje de grasa Fat %	0.35	0.062	-0.20	0.846
Glucosa	0.17	0.257	0.31	0.080
Insulina	-0.34	0.869	0.04	0.419
TGs	0.003	0.496	-0.07	0.622
Col. Total	0.31	0.147	-0.14	0.728
Col. LDL.	0.36	0.128	-0.07	0.622
Col. HDL.	-0.07	0.595	-0.31	0.906
Leptina	-0.13	0.68	-0.10	0.661
LPI	-0.21	0.792	-0.21	0.846
HOMA-IR	-0.19	0.73	0.08	0.35

Tabla 11. Correlaciones entre la expresión de CB1 en tejido visceral y subcutáneo y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 1

	CB1 en tejido adiposo visceral			
	Hombres (n=25)		Mujeres (n=30)	
	Pearson	p	Pearson	p
Weight	0.13	0.269	0.22	0.112
BMI	0.24	0.116	0.17	0.179
Fat %	0.18	0.200	0.36	0.022*
Glucose	0.51	0.014*	0.06	0.372
Insulin	0.21	0.215	-0.13	0.743
TGs	0.29	0.128	0.02	0.448
Total Chol.	-0.37	0.931	0.07	0.361
LDL Chol.	-0.27	0.849	0.03	0.432
HDL Chol.	-0.17	0.740	0.18	0.173
Leptin	0.55	0.014*	0.13	0.309

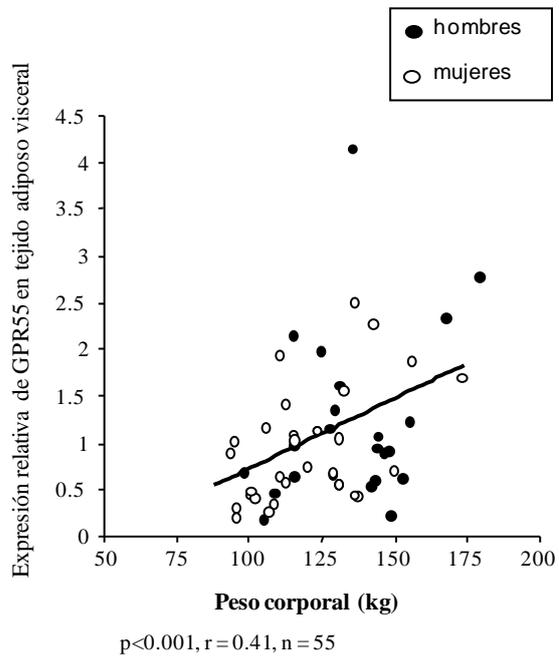
	CB1 en tejido adiposo subcutáneo			
	Hombres (n=25)		Mujeres (n=30)	
	Pearson	p	Pearson	p
Weight	-0.13	0.723	0.40	0.017*
BMI	-0.23	0.852	0.46	0.007**
Fat %	-0.05	0.587	0.06	0.381
Glucose	0.05	0.420	0.31	0.083
Insulin	0.42	0.067	-0.14	0.725
TGs	-0.02	0.530	0.34	0.066
Total Chol.	0.27	0.190	-0.10	0.666
LDL Chol.	0.34	0.141	-0.03	0.562
HDL Chol.	-0.09	0.619	-0.62	0.998
Leptin	-0.17	0.725	0.48	0.017*

Tabla 12. Correlaciones entre la expresión de GPR55 en tejido visceral y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 2.

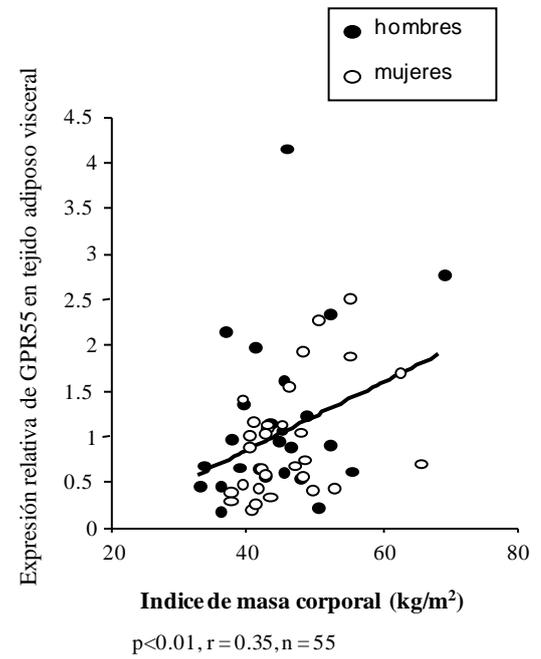
	Hombres (n=20)		Mujeres (n=44)	
	Pearson	p	Pearson	p
Peso	0,26	0.27	0.39	0.01*
IMC	0.29	0.21	0.31	0.03*
% Grasa	0.3	0.19	0.32	0.03*
Glucosa	0.32	0.17	0.07	0.64
Insulina	0.46	0.3	-0.03	0.9
TGs	0.15	0.5	-0.03	0.86
Col. Total	-0.06	0.82	-0.07	0.64
Col. LDL	-0.09	0.75	-0.27	0.057
HOMA-IR	0.43	0.33	-0.03	0.85

Cohorte 1

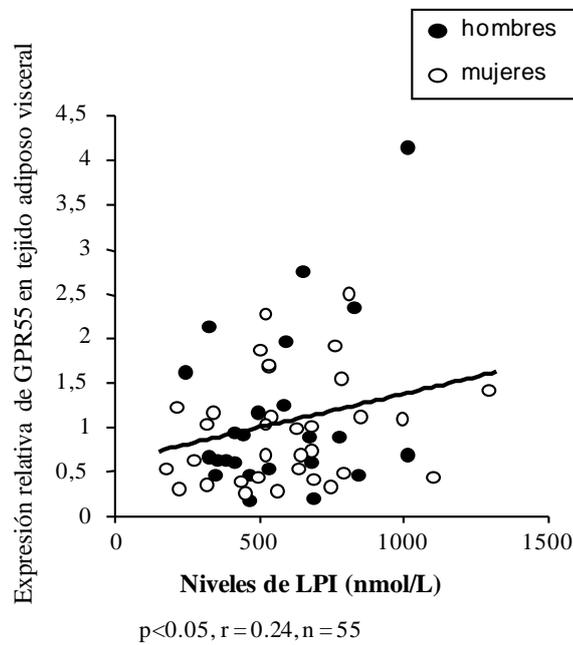
A



B



C



Cohorte 2

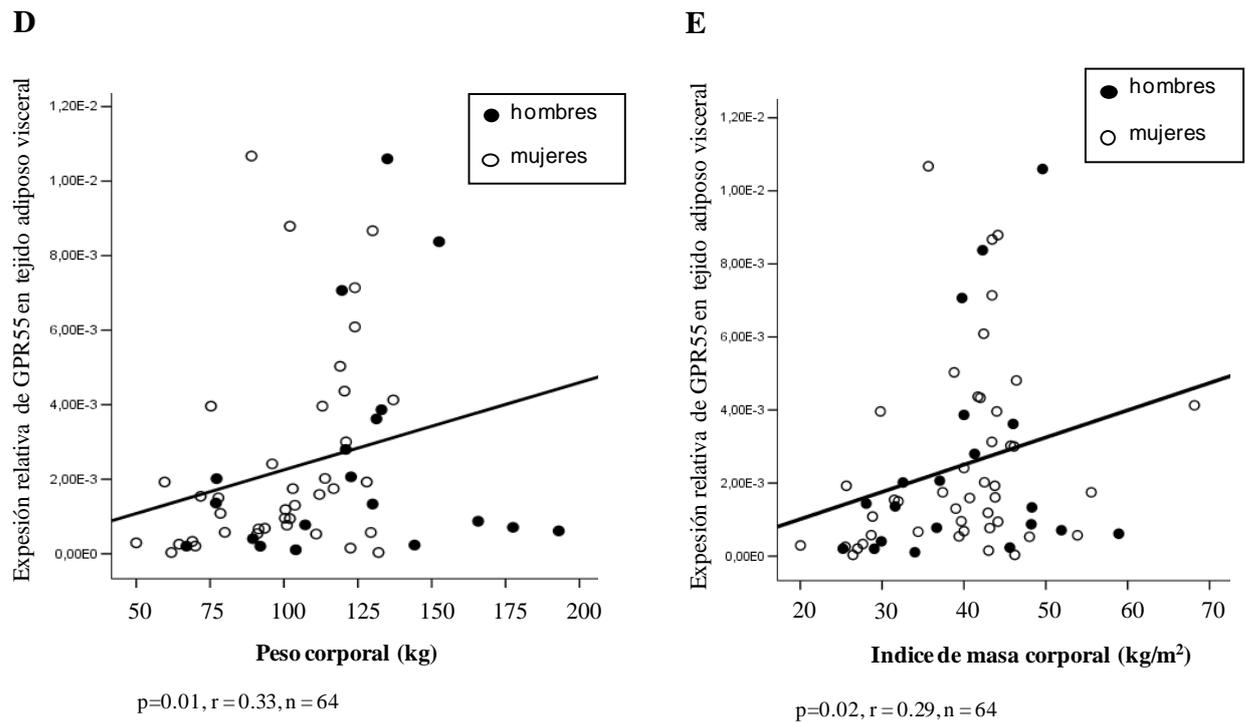
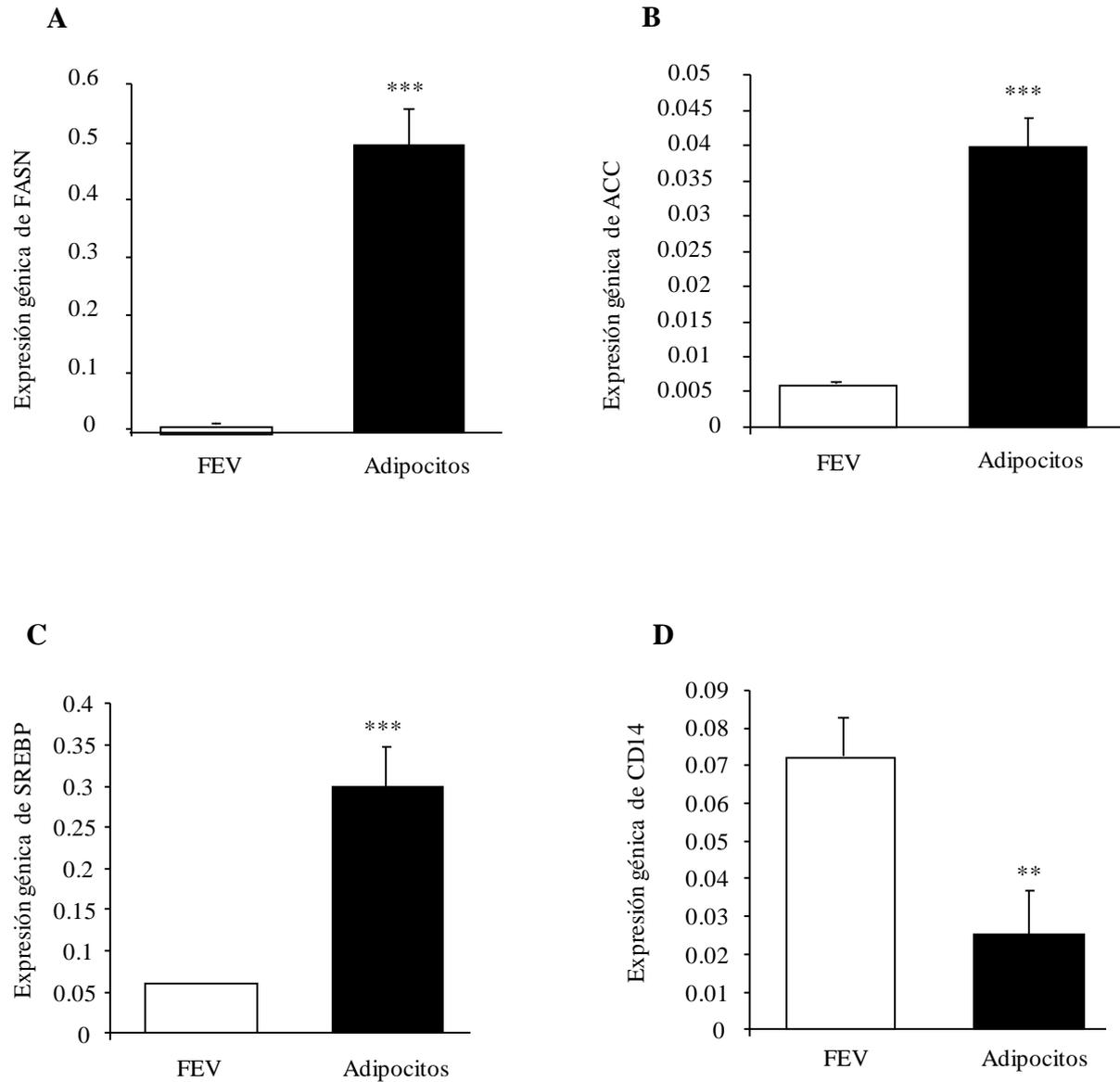


Figura 33. Correlación de GPR55 en tejido adiposo visceral con diferentes factores metabólicos en los sujetos de la cohorte 1. A. Correlación de la expresión de ARNm de GPR55 en tejido adiposo visceral con el peso corporal. **B.** Correlación del índice de masa corporal con la expresión de ARNm de GPR55. **C.** Correlación de la expresión de ARNm de GPR55 con los niveles circulantes de LPI. Las correlaciones usadas en la cohorte 1 se realizaron teniendo en cuenta solo los individuos obesos y el valor usado como parámetro para el diagnóstico de la obesidad fue un índice de masa corporal (IMC) $> 30 \text{ Kg/m}^2$. **D.** Correlación entre GPR55 en tejido adiposo visceral y peso corporal. **E.** Correlación entre el índice de masa corporal y la expresión de GPR55.

3. Expresión relativa de ARNm de GPR55 en adipocitos versus fracción vascular estromal

Quisimos estudiar adicionalmente donde se expresaba el GPR55. Para este fin, hemos utilizado grasa visceral de humanos y hemos separado la fracción vascular estromal de los adipocitos. Para corroborar la eficiencia de esta separación, comprobamos que los niveles de expresión de los genes adipogénicos (*FASN*, *ACC* y *SREBP*) son más elevados en los adipocitos que en la FEV (Fig. 34A, 34B y 34C

respectivamente). Por el contrario, la expresión del gen *CD14* (*Monocyte differentiation antigen*) fue significativamente mayor en la fracción vascular estromal (Fig. 34D). El GPR55 se localiza de forma similar tanto en adipocitos como en la FEV (Fig. 34E).



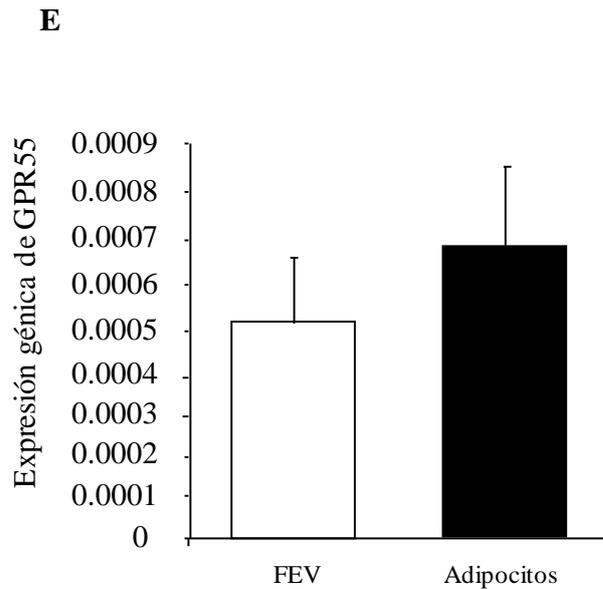


Figura 34. Expresión relativa de ARNm en adipocitos versus fracción vascular estromal de humanos. **A.** Niveles de expresión de ARNm de FASN en adipocitos humanos. **B.** Niveles de ARNm de ACC en la fracción vascular estromal y adipocitos de humanos. **C.** Incremento significativo de la expresión génica de SREBP en adipocitos de humanos con respecto a la fracción vascular estromal. **D.** Niveles de expresión de ARNm de CD14 en fracción del estroma vascular y adipocitos. **E.** Expresión de GPR55 en fracción del estroma vascular y adipocitos. ** P<0.01, *** P<0.001.

4. Niveles circulantes de LPI total

4.1. Niveles circulantes de LPI en sujetos delgados y obesos

Al evaluar los niveles circulantes en plasma de LPI, el único ligando endógeno conocido de GPR55, en sujetos delgados y obesos de la cohorte 1; encontramos que los niveles de LPI total fueron significativamente mayores en los pacientes obesos en comparación con los sujetos delgados (Figura 35A).

Del mismo modo, que los niveles plasmáticos de LPI total, se observa que en las tres formas circulantes de LPI medidas – LPI 16.0 (Figura 35B), LPI 18.0 (Figura 35C) y LPI 20.4 (Figura 35D), también se incrementaron en los tres grupos de pacientes obesos cuando son comparados con los sujetos delgados.

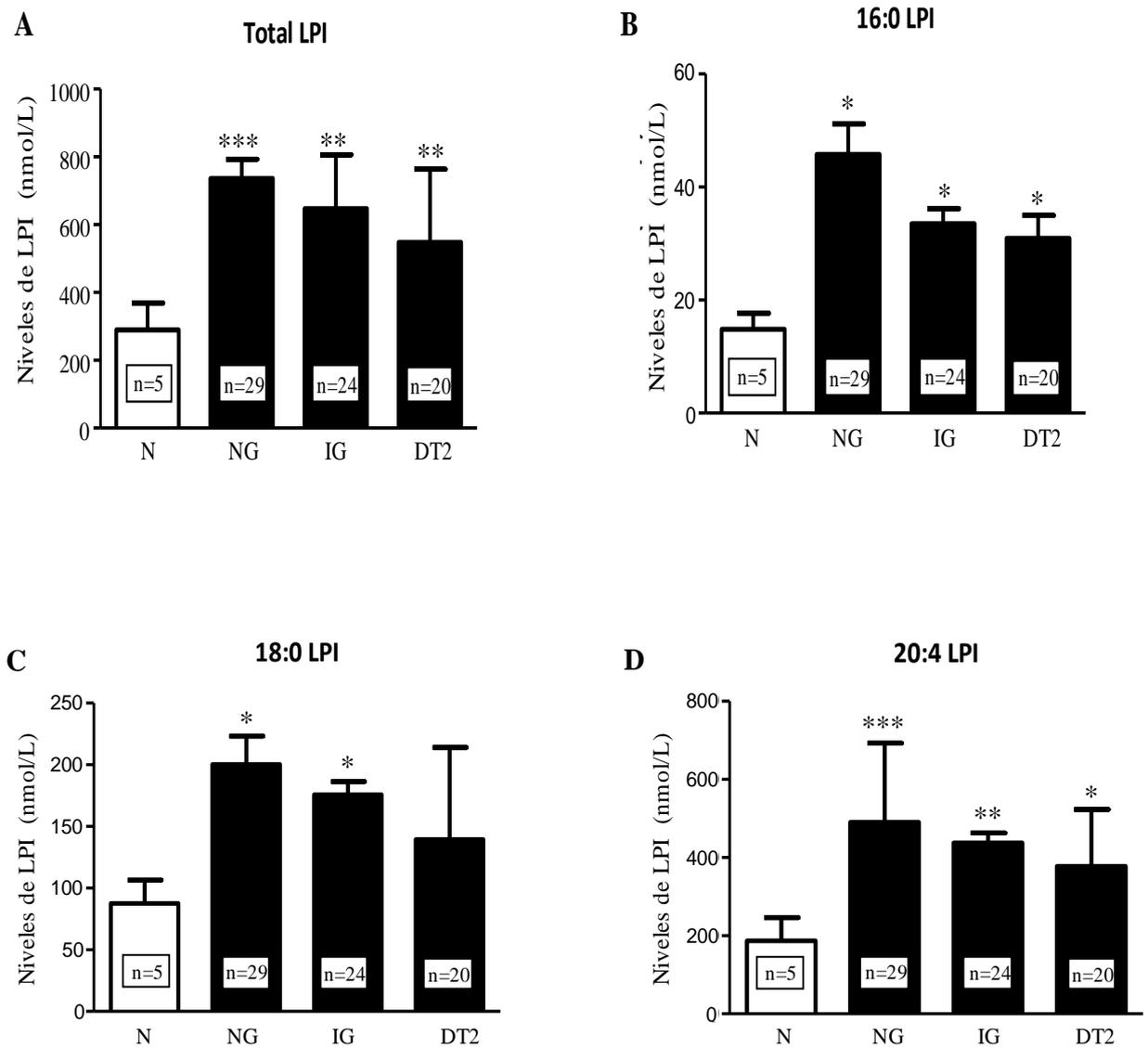
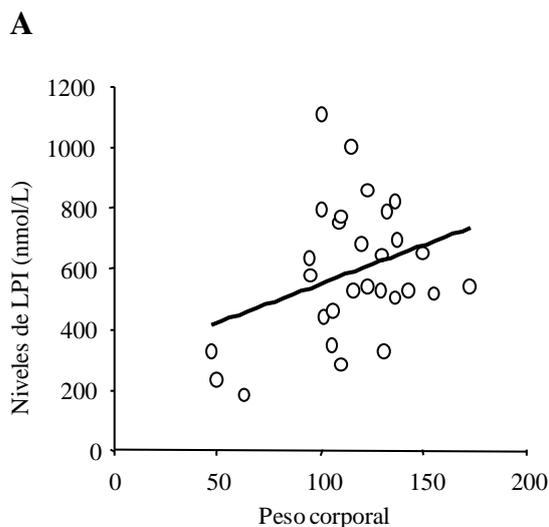


Figura 35. Niveles circulantes de LPI total medido en plasma de sujetos delgados y obesos de la cohorte 1. A. Niveles circulantes de LPI total. **B.** Niveles circulantes de LPI 16:0. **C.** Niveles circulantes de LPI 18:0. **D.** Niveles circulantes de 20:4. Incremento significativo de los niveles circulantes de LPI total en pacientes obesos comparados con sujetos delgados. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

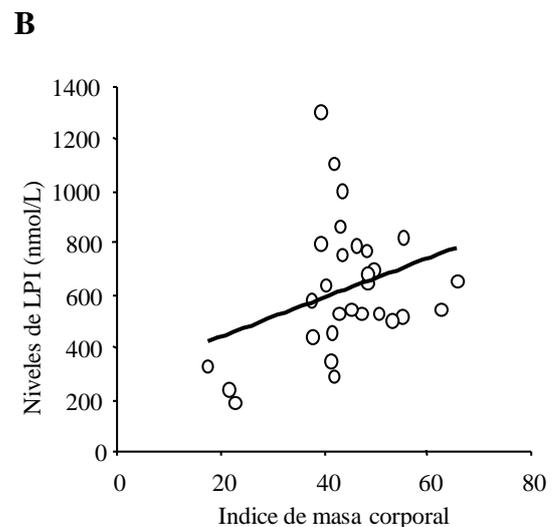
4.2. Correlación de niveles circulantes de LPI en hombres y mujeres y diferentes factores metabólicos

Los niveles de LPI plasmático no están correlacionados con el peso corporal, ni con el IMC en hombres y mujeres de la cohorte 1, cuando se analizaron conjuntamente (datos no mostrados).

Sin embargo, al realizar la correlación por separado en hombres y mujeres, los resultados mostraron que los niveles de LPI se correlacionan positivamente con el peso corporal (figura 36A), el IMC (figura 36B) y el porcentaje de grasa (figura 36C) en mujeres pero no en hombres (Tabla 13). Finalmente, encontramos que los niveles de LPI en plasma se correlacionan con los niveles de LDL (Lipoproteínas de baja densidad) solo en mujeres (Tabla 13). Es importante anotar que no se observan diferencias en los niveles circulantes de LPI total (figura 37D), LPI 16.0 (figura 37E), LPI 18.0 (figura 37F) y LPI 20.4 (figura 37G) entre hombres y mujeres.



$P < 0.05$, $r = 0.32$, $n = 28$



$P < 0.05$, $r = 0.31$, $n = 29$

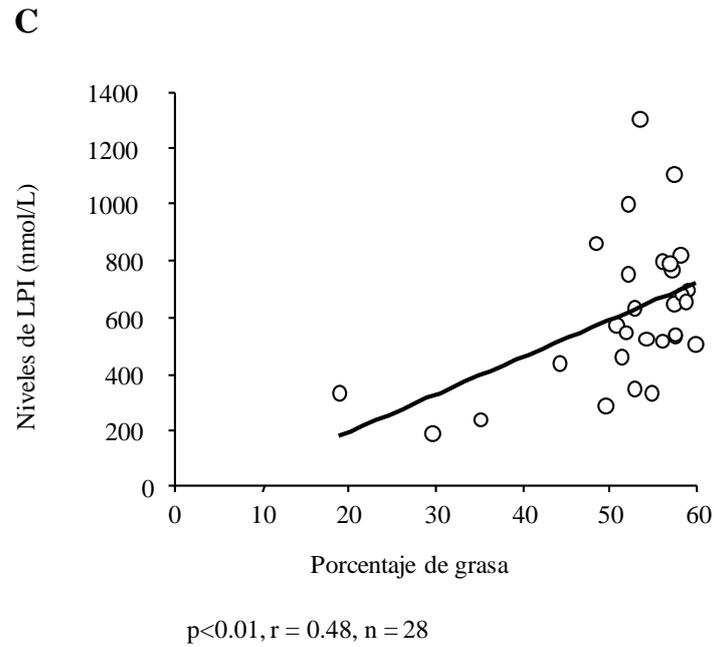
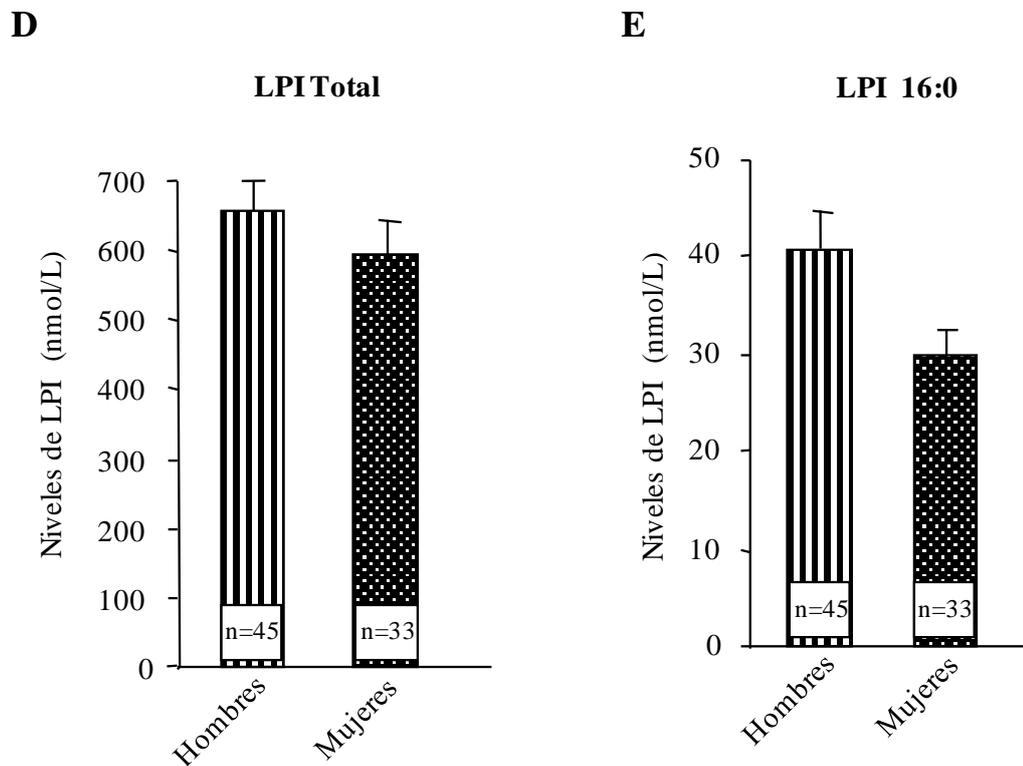


Figura 36. Correlación entre los niveles circulantes de LPI total en plasma y diferentes factores metabólicos en mujeres. A. Niveles plasmáticos de LPI y Peso corporal. **B.** Correlación de LPI circulante en plasma e índice de masa corporal. **C.** Porcentaje de grasa correlacionado con niveles de LPI plasmático.



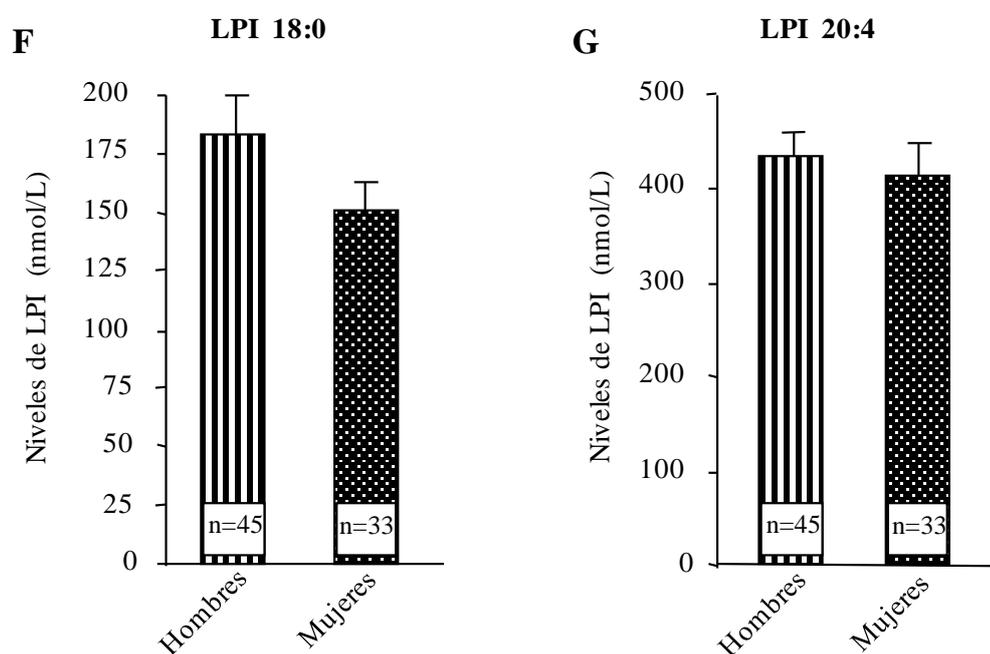


Figura 37. Correlación de los niveles circulantes de LPI total en plasma y diferentes factores metabólicos en hombres y mujeres de la cohorte 1. D. Niveles de LPI total E. Niveles de LPI 16.0 F. Niveles de LPI 18.0 G. Niveles de LPI 20.4.

Tabla 13. Correlaciones entre los niveles circulantes de LPI y parámetros metabólicos seleccionados de los sujetos de la cohorte 1

	Hombres (n=48)		Mujeres (n=30)	
	Pearson	p	Pearson	p
Peso	-0.08	0.72	0.32	0.039*
IMC	-0.02	0.57	0.31	0.048*
% Grasa	0.10	0.29	0.48	0.0037**
Glucosa	-0.34	0.97	-0.032	0.56
Insulina	-0.12	0.76	0.09	0.33
TGs	-0.15	0.77	0.12	0.26
Col. Total	-0.03	0.56	0.22	0.13
Col. LDL	-0.14	0.75	0.34	0.042*
Col. HDL	0.19	0.14	0.06	0.67
Leptina	0.02	0.44	0.24	0.14

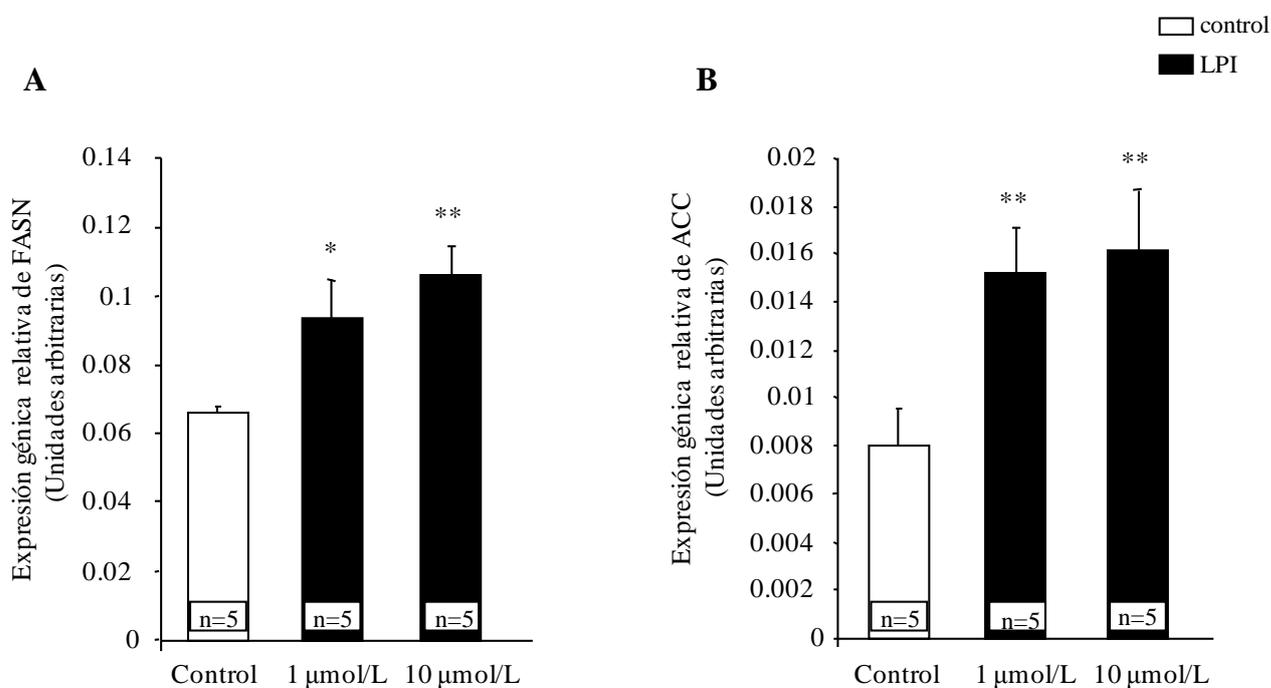
5. Efectos de LPI sobre explantes de tejido adiposo de humanos: tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo

5.1. Tejido adiposo visceral

El LPI a dosis de 1 y 10 $\mu\text{mol/L}$, incrementó la expresión de genes promotores de síntesis de ácidos grasos, incluyendo FAS (fatty acid synthase) (Fig. 38A) y ACC (acetyl CoA carboxylase) (figura 38B), en explantes de tejido adiposo visceral. Las dos dosis también inducen la expresión de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (figura 38C), el cual juega un rol importante en la diferenciación adipocitaria.

Otras adipoquinas, tales como la leptina (figura 38D) y la adiponectina (figura 38E), tienden a mostrar un ligero incremento en su expresión, pero las diferencias no son estadísticamente significativas.

Adicionalmente, las dos dosis de LPI incrementan significativamente la expresión de GPR55 en adipocitos de tejido adiposo visceral (figura 38F).



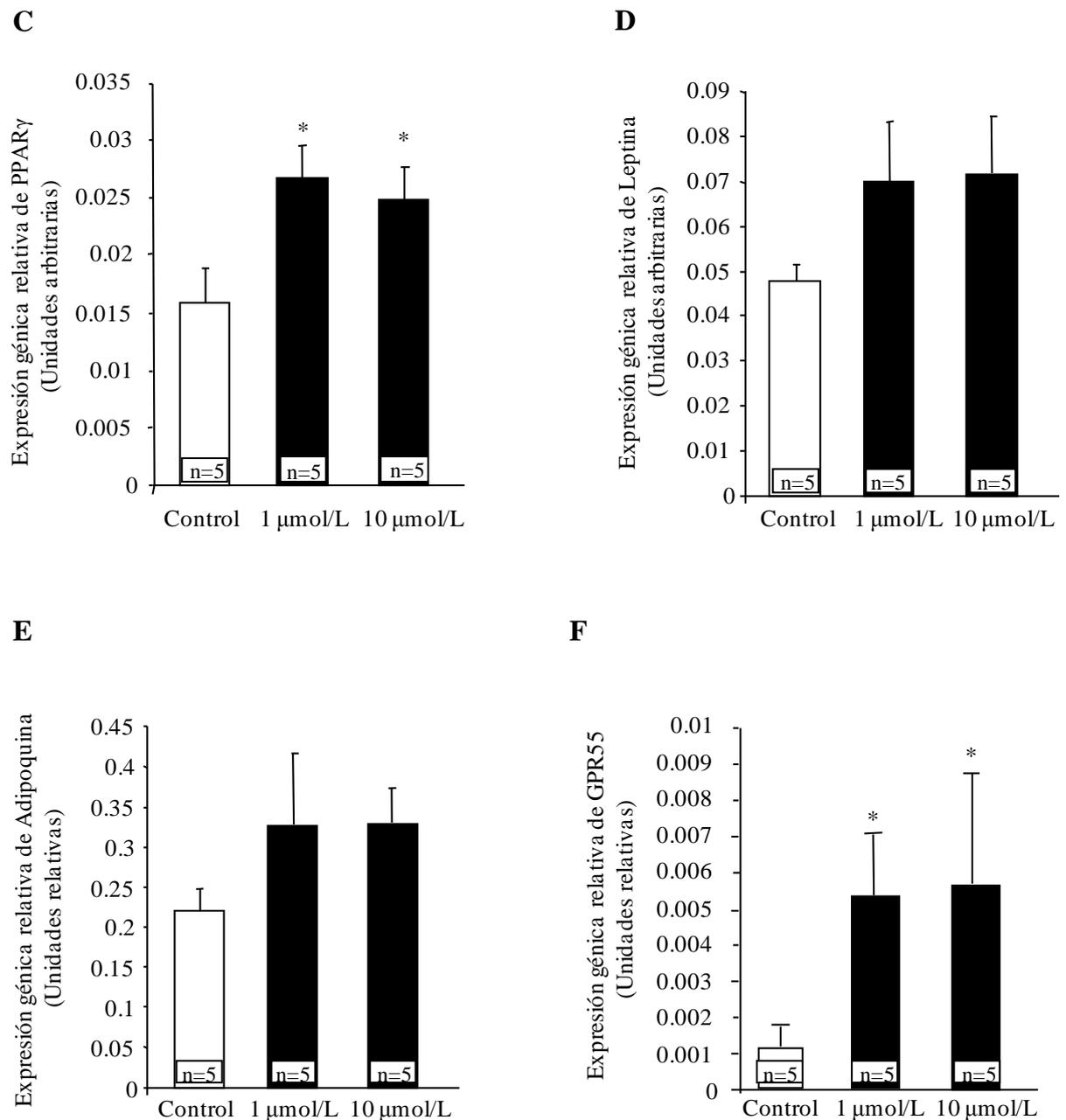
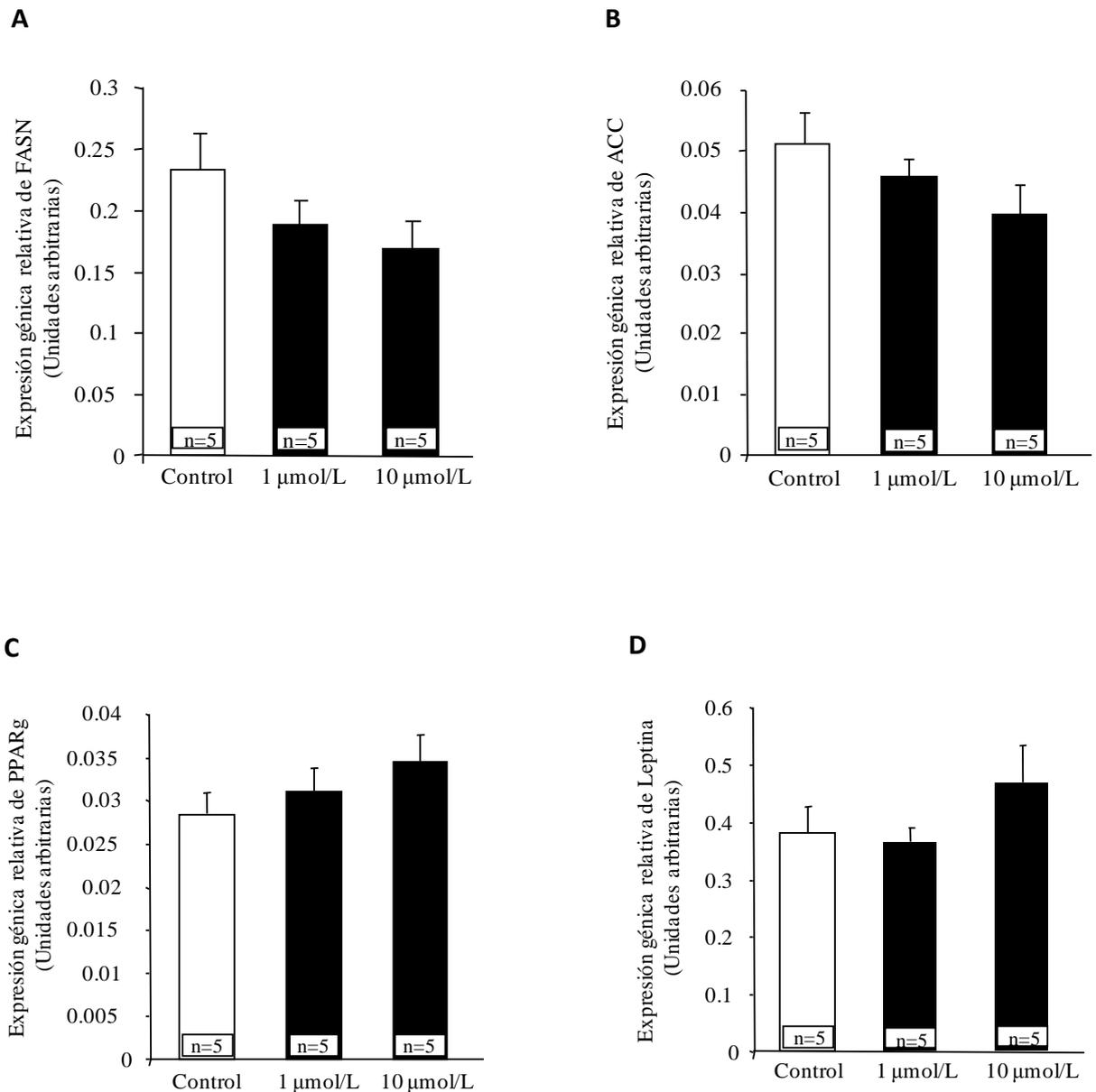


Figura 38. Efectos de LPI (1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 μmol) sobre los niveles de expresión de ARNm, en explantes de tejido adiposo visceral de humanos. A. Efectos ex vivo de LPI sobre FASN. B. Efectos de LPI los niveles de expresión de ARNm de ACC. C. Efectos de LPI sobre la expresión génica de PPAR γ D. Niveles de ARNm de LPI E. Efectos de LPI sobre adipoquina F. Efectos de LPI sobre la expresión de ARNm de GPR55. *P<0.05, **P<0.01.

5.2. Tejido adiposo subcutáneo

En contraste con los resultados observados anteriormente en explantes de tejido adiposo visceral, el LPI no modificó la expresión de ninguno de los genes estudiados en los explantes de tejido adiposo subcutáneo (figura 39A-F).



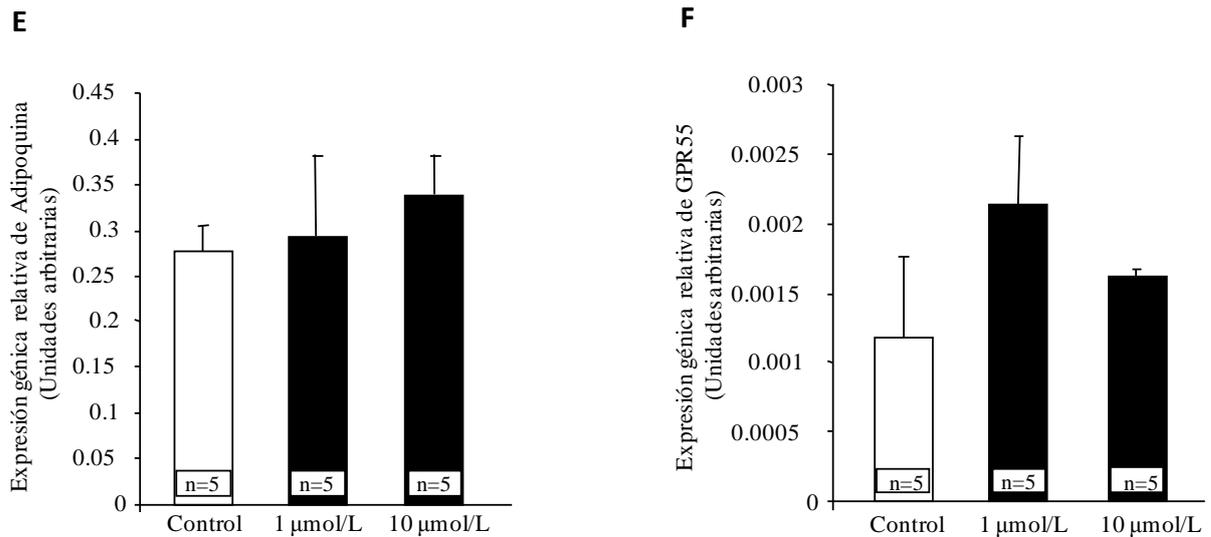


Figura 39. Efectos de LPI sobre los niveles de expresión de ARNm, en explantes de tejido adiposo subcutáneo de humanos. A. Efectos ex vivo de LPI sobre FASN **B.** Efectos de LPI los niveles de expresión de ARNm de ACC. **C.** Efectos de LPI sobre la expresión génica de PPAR γ . **D.** Efectos de LPI sobre la leptina. **E.** Niveles de expresión de ARNm de adiponectina. **F.** Efectos de LPI sobre la expresión génica de GPR55. Los valores se expresan en unidades arbitrarias.

6. Efectos de LPI sobre la movilización de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados de humanos

Se ha demostrado anteriormente que el LPI aumenta los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en células HEK293 que expresan GPR55 (Oka, *et al.* 2007; Henstridge, *et al.* 2009), así como células PC12 en rata (Ma MT, *et al.* 2010).

Dado que el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ se ha asociado con la lipogénesis en adipocitos (Gerike, *et al.* 2010), se analizó si el LPI era capaz de aumentar la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados obtenidos a partir de tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes obesos. Para este propósito, después de 9 días de diferenciación, los adipocitos del tejido adiposo visceral y subcutáneo fueron cargados con Fura 2-AM, y se monitorizó el $[Ca^{2+}]_i$ cada 8 o 10 minutos en ausencia y presencia de LPI.

Se encontró que la exposición de las células a $5\mu\text{mol/L}$ de LPI indujo un aumento sustancial de $[Ca^{2+}]_i$ en un 48.4% de adipocitos diferenciados en tejido adiposo visceral

(46 de 95 células; $n = 3$ experimentos distintos) y un 24.4% de células diferenciadas en tejido adiposo subcutáneo (29 de 119 células; $n = 3$ experimentos distintos) (Fig 40A y C respectivamente).

En términos de intensidad de respuesta, los adipocitos diferenciados en tejido adiposo visceral tratados con 5 $\mu\text{mol/L}$ de LPI, mostraron un incremento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ significativamente mayor a lo observado en los adipocitos diferenciados de tejido adiposo subcutáneo ($43.18 \pm 2.77\%$ vs. $19.69 \pm 1.93\%$ por encima de los niveles basales en tejido visceral y subcutáneo, respectivamente; $P < 0.001$) (figura 40B y D, respectivamente).

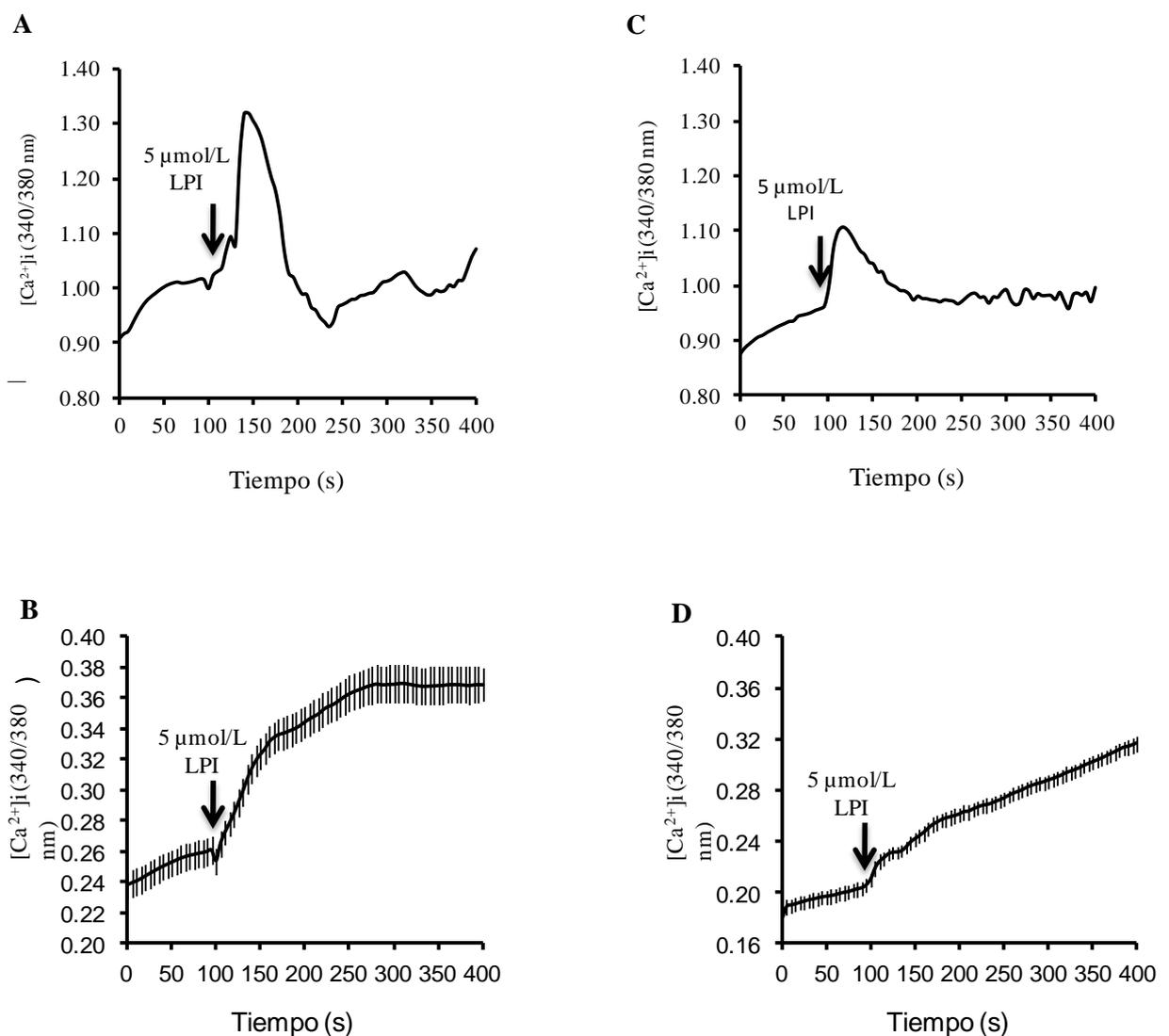
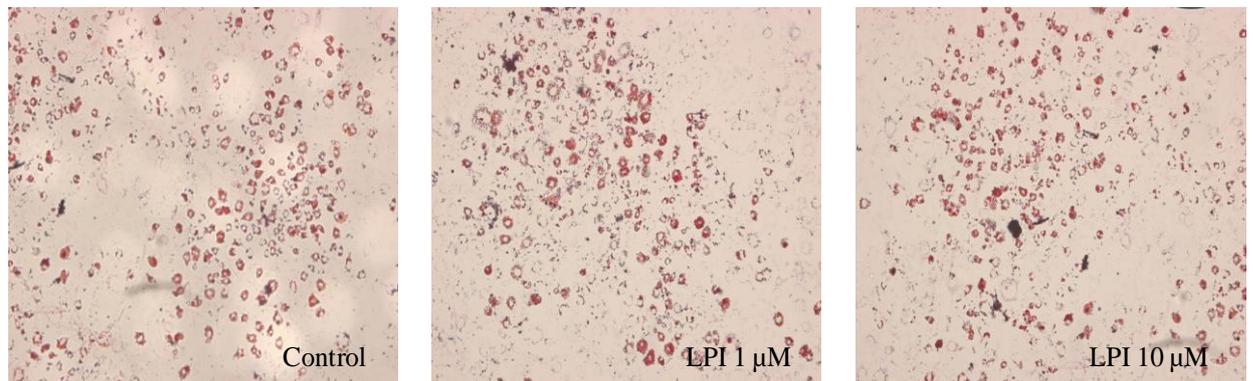


Figura 40. Efectos de LPI sobre la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados de humanos. **A.** Representación de los efectos de LPI (5 $\mu\text{mol/L}$) sobre la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en grasa visceral. **B.** Cuantificación de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos diferenciados de tejido adiposo visceral. **C.** Representación de los efectos de LPI (5 $\mu\text{mol/L}$) sobre la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en grasa subcutánea en cultivos de adipocitos diferenciados de humanos. **D.** Cuantificación de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos diferenciados de tejido adiposo subcutáneo.

7. Efecto de LPI sobre adipocitos diferenciados de células 3T3-L1

Durante la tinción con aceite rojo, no encontramos alteración en las células 3T3-L1 de ratón tratadas con LPI a dosis de 1 y 10 $\mu\text{mol/L}$ durante 10 días, al compararlas con las células control (Fig. 41). Estos resultados nos indican que LPI actúa de forma diferencial en adipocitos de humanos y de roedores.

A



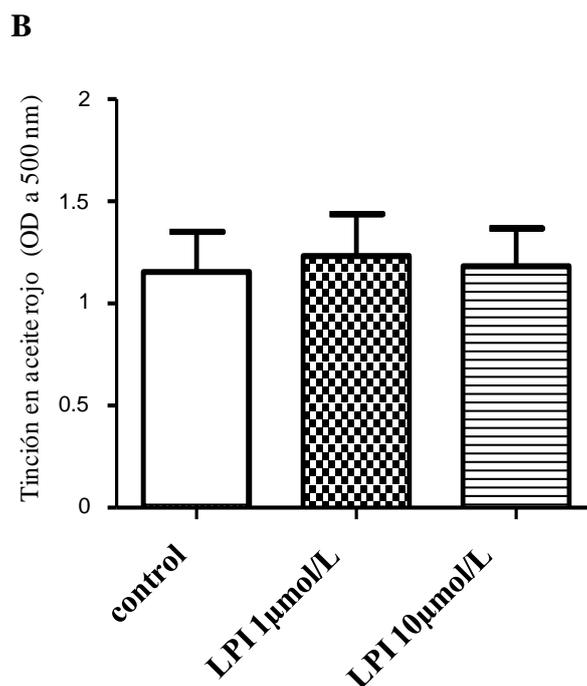


Figura 41. Efecto del tratamiento con LPI (1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 $\mu\text{mol/L}$) durante 10 días sobre adipocitos diferenciados de células 3T3-L1 de ratón. A. Tinción en aceite rojo y representación de las imágenes capturadas de los adipocitos diferenciados en células 3T3-L1, en ausencia (panel izquierdo) y presencia (paneles derechos) de LPI, 1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 $\mu\text{mol/L}$. **B.** Cuantificación fluorimétrica de la tinción en aceite rojo en células 3T3-L1 a día 10 de diferenciación de adipocitos, en ausencia y presencia de LPI 1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 $\mu\text{mol/L}$. Los valores representan la media \pm de 3 experimentos independientes.

VI. REGULACION DE GPR55 EN HIGADO DE HUMANOS

Adicionalmente a la expresión en tejido adiposo, encontramos que GPR55 se expresa también en el hígado.

Sin embargo, entre los pacientes obesos estudiados; normoglicémicos (NG), intolerantes a la glucosa (IG) y diabéticos tipo 2 (DT2), no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión génica de GPR55 a nivel hepático.

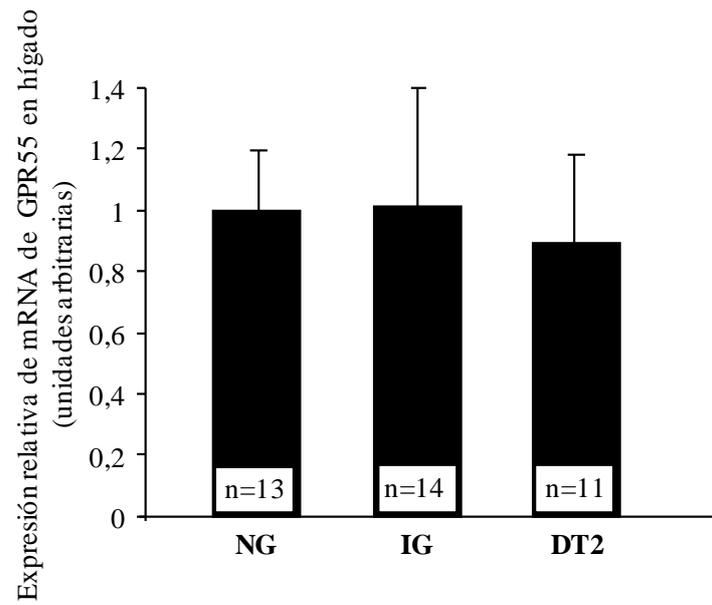


Figura 42. Expresión de ARNm de GPR55 en muestras de hígado obtenidas de sujetos obesos de la cohorte 1. Los sujetos obesos fueron subclasificados como normoglicémicos (NG), intolerantes a la glucosa (IG) y diabéticos tipo 2 (D

DISCUSION

I. ESTADO NUTRICIONAL Y EXPRESION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA

Los procesos fisiológicos y patológicos regulados por GPR55 son desconocidos. Se ha propuesto un papel para este receptor en la regulación del dolor y el metabolismo óseo (Whyte *et al.*, 2009) (Staton *et al.*, 2008).

Sin embargo, no hay información acerca de la posible función de GPR55 sobre la ingesta de alimentos y el metabolismo energético, a pesar de un gran número de datos que demuestran que el receptor cannabinoide CB1 se expresa en el tejido adiposo blanco (Cota D. *et al.*, 2003) y que su expresión está marcadamente regulada por alteraciones del peso corporal y la homeostasis de la glucosa (Di Marzo, 2008).

Esto nos llevó a investigar la influencia de diferentes condiciones fisiológicas y patológicas que se sabe están involucrados en la regulación del balance energético y/o en el metabolismo de la glucosa, en la regulación del GPR55 en el gWAT y lo comparamos con la expresión de CB1.

En primer lugar, evaluamos el efecto del estado nutricional encontrando un marcado aumento en la expresión de mRNA de GPR55 y CB1, en los animales sometidos a ayuno y restricción alimenticia crónica en comparación con los animales alimentados ad libitum. Dado que el ayuno y la restricción alimenticia son estados hipoleptinémicos (Stejskal D. *et al.*, 1998), a continuación investigamos los efectos de la leptina sobre la expresión del GPR55 y CB1. El tratamiento con leptina a ratas en ayuno fue capaz de revertir los niveles de GPR55 y CB1 en gWAT. De acuerdo con la hipótesis de que los niveles de leptina podrían regular la expresión de estos receptores, observamos que en estados de hiperleptinemia, tales como la obesidad inducida por la dieta y la gestación, los niveles de ARNm de ambos receptores mostraron una clara reducción en gWAT.

En conjunto, estos resultados indican que la leptina puede ser una señal nutricional de modulación de la expresión de los dos receptores, GPR55 y CB1 en gWAT.

La correlación de los cambios de expresión génica en tejido adiposo y las propiedades dependientes de los cannabinoides reportadas previamente de ambos receptores, sugieren que GPR55 y CB1 podrían trabajar de manera coordinada para mediar el control endocannabinoide de la fisiología del tejido adiposo.

Adicionalmente, estudiamos la influencia de cambios en el eje hipofiso-adrenal dado que este eje ACTH-glucocorticoides (*adrenocorticotropic hormone – ACTH*) influye de forma muy marcada en la homeostasis energética y metabólica, como se objetiva tras la eliminación de los glucocorticoides por adrenalectomía (ADX) que conlleva una reducción de la ingesta y el peso corporal en roedores (Andrews RC. & Walker BR., 1999). Encontramos que la expresión del receptor CB1 y del GPR55 no fue modificada después de la ADX; esto nos indica que la glándula adrenal no es importante en la regulación de estos dos receptores en WAT.

En cuanto al eje hipofiso-tiroideo sabemos que las hormonas tiroideas (T4,T3) son potentes moduladores de la homeostasis energética y donde se conoce que la ingesta de alimentos es menor en el hipotiroidismo aunque asociado a un incremento en la masa adiposa, siendo esto indicativo de que influyen de forma marcada en el gasto energético. Por el contrario, y en contraste, el estado hipertiroideo está asociado con hiperfagia y marcada disminución del peso corporal (López *et al.*, 2010; Varela *et al.*, 2012; Krotkiewski M., 2002).

Nuestros resultados mostraron una disminución de la expresión del ARNm del receptor CB1 en la grasa de ratas hipertiroideas, sin cambios significativos en el grupo de hipotiroidismo. En el caso de GPR55, también observamos una menor expresión del receptor en la grasa de ratas hipertiroideas, aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos, mientras que en ratas hipotiroideas no hay ninguna variación.

En conjunto, estos resultados nos indican que el hipertiroidismo desempeña un importante papel inhibitor en la regulación del receptor CB1 y tal vez en el de

GPR55 en WAT, aunque en este último caso los datos no son estadísticamente significativos. Aunque se requieren nuevos estudios nuestros datos no apoyan que la regulación de la expresión de estos receptores por las hormonas tiroideas desempeñe un papel especialmente relevante en sus efectos sobre la homeostasis energética y/o metabolismo lipídico.

Por su parte, sabemos que la GH tiene efectos sobre el tejido adiposo y la composición corporal (Casanueva & Diéguez, 1998) y que en estados de deficiencia de esta hormona tanto en humanos como en roedores se observa un descenso en la masa magra acompañado por un incremento en el tejido adiposo (Perrini et al., 2008). Nuestros datos en ratas deficientes de GH (Dwarf) no mostraron diferencias en la expresión de CB1 ni de GPR55 lo que sugiere que la carencia de GH no es relevante para estos dos receptores en WAT.

Por otra parte y debido a que una de las características fisiológicas de la leptina, es la existencia de una importante diferencia relacionada con el género (Pinilla *et al.*, 1999; Zengin *et al.*, 2010), evaluamos la influencia de la función gonadal sobre la expresión de CB1 y GPR55.

La deficiencia de estrógenos, está asociada con hiperfagia, incremento del peso corporal y adiposidad, mientras que la sustitución con estrógenos exógenos reduce la ganancia de peso y previene la acumulación de grasa (Clegg *et al.*, 2006). Además, los niveles de testosterona en suero están también inversamente asociados con toda la masa grasa corporal (Haffner *et al.*, 1993).

Nuestros datos indican que la expresión génica de GPR55 y de CB1 se incrementa a lo largo del desarrollo postnatal en ratas machos y hembras. Para comprobar la hipótesis de que el aumento en los niveles de estos dos receptores CB1 y GPR55, se relaciona con los niveles de esteroides sexuales, se llevaron a cabo experimentos adicionales en ratas gonadectomizadas.

Encontramos que los niveles de ARNm de CB1 disminuyeron en ratas macho y hembras gonadectomizadas, mientras que los niveles de expresión de GPR55

disminuyeron en animales orquidectomizados, pero permanecieron sin cambios en ratas ovariectomizadas.

De este modo, nuestros estudios sugieren que la expresión génica de CB1 en gWAT está regulada tanto por la testosterona como por los estrógenos, pero por otra parte, la expresión de GPR55 en gWAT está específicamente modulada por la testosterona. Hasta que punto estos efectos pueden explicar en alguna medida los efectos de las hormonas gonadales sobre la homeostasis energética y/o metabolismo lipídico requiere de nuevos estudios.

II. REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN HIGADO

Como sabemos, el mantenimiento de la homeóstasis energética y del peso corporal involucra la regulación coordinada de la conducta alimenticia y del metabolismo energético periférico, como ocurre con la capacidad de la leptina para reducir el apetito y para regular el metabolismo de grasas en el hígado (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005).

Se sabe que el sistema endocannabinoide está implicado en la patogénesis de la disfunción vascular que se produce en la enfermedad hepática avanzada y desempeña un papel importante en la patogénesis de la hipertensión portal y de la fibrosis hepática (Reichenbach *et al.*, 2009, Izzo *et al.*, 2008).

Así se ha demostrado que las alteraciones en la síntesis, en la degradación o en las vías de señalización de los endocannabinoides forman parte de los mecanismos relacionados con las alteraciones hemodinámicas, los procesos fibroproliferativos, la obesidad y la esteatosis hepática (Reichenbach *et al.*, 2009).

Osei-Hyiaman *et al.* investigaron la participación de los endocannabinoides en la lipogénesis hepática y observaron que la activación del receptor CB1 incrementa la síntesis de ácidos grasos hepáticos en ratones y en hepatocitos aislados (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005), contribuyendo así a la esteatosis, la dislipidemia, la resistencia a la insulina y al aumento de los niveles de leptina observados cuando se suministra una dieta con alto contenido en grasa (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

Esta implicación del receptor cannabinoide CB1 en importantes procesos fisiopatológicos a nivel hepático, nos llevó a estudiar los niveles de CB1 y GPR55 en el hígado en distintos estados metabólicos.

Nuestros análisis en hígado de ratas, muestran un marcado incremento en la expresión de los dos genes durante estados de ayuno o de restricción alimenticia. De acuerdo con estos datos, la administración de leptina provocó una clara disminución en los niveles de expresión de mRNA de CB1 y GPR55 en el hígado.

Por otra parte, estudios previos han demostrado el incremento en la expresión del receptor CB1 en tejido de hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasa (high-fat-diet) al ser comparados con su grupo control (Osei-Hyiaman *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, nuestros datos mostraron que la dieta alta en grasa promueve un aumento de los niveles del receptor cannabinoide CB1 y de GPR55 en el hígado, sin embargo estos cambios no llegaron a ser significativos. Es posible que esta falta de significación sea debida a que estos animales exhiben con frecuencia una gran variabilidad individual tanto en la ganancia de peso como en otros parámetros metabólicos. De hecho algunos autores cuando estudian el efecto de la dieta alta en grasa solo analizan aquellos animales que exhiben un marcado incremento en el peso corporal. En nuestro caso no hicimos una “selección previa” en este sentido al considerar que la variabilidad es un valor en sí mismo cuando tratamos de extrapolar estos datos a humanos. En cualquier caso son necesarios estudios futuros ampliando el número de animales a analizar.

Mientras que la expresión génica de GPR55 y de CB1 en el gWAT se incrementaba a lo largo del desarrollo postnatal en ratas de ambos sexos, la expresión de CB1 y GPR55 en el hígado de ratas macho mostró un patrón muy diferente. En el caso de los machos parece claro que exhiben variaciones relevantes en función de las edades estudiadas, mientras que en el caso de GPR55 parece haber un incremento, aunque no significativo, a los 45 días. La razón de esta falta de significación puede ser debida al hecho de que en esta franja de edad es cuando se produce el inicio de la pubertad en estos animales y hay una gran variabilidad individual en cuanto al día exacto que este evento ocurre en roedores normales. Es por ello que es necesario realizar un segundo

estudio con monitorización diaria de inicio de pubertad en estos animales para poder explorar esta hipótesis. Sin embargo, en el hígado de hembras adultas de 90 días, sí encontramos un incremento en la expresión de CB1 y GPR55. Por tanto, estos datos indican que los estrógenos, pero no la testosterona, podrían estar controlando la expresión hepática de estos receptores. Para mayor clarificación de esta posibilidad es necesario el estudiar la expresión de estos receptores en hígado de animales gonadectomizados.

Por otra parte, uno de los ejes endocrinos más ampliamente relacionados con la homeóstasis energética, es el eje somatotropo cuyos principales componentes son la hormona del crecimiento (GH), junto con el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina).

La hormona de crecimiento desempeña un papel importante en la modulación de la homeostasis energética y el metabolismo (Casanueva & Diéguez, 1998, Pasquali *et al.*, 2002). Así altos niveles de GH circulantes incrementan la concentración de glucosa en sangre, resistencia a insulina, estimulan la lipólisis e inhiben el transporte de glucosa (Perrini *et al.*, 2008).

A este respecto, se ha encontrado que el Δ^9 -THC y cannabinoides sintéticos inhiben la secreción de GH en roedores cuando se administran periféricamente (Al-Massadi *et al.*, 2010).

Rettori *et al.* (1988) observaron que sólo la administración i.c.v. de Δ^9 -THC era capaz de reducir la secreción de GH, mientras que no se observó efecto alguno en cultivo de células de hipófisis de rata.

En nuestros análisis encontramos que en roedores deficientes de la hormona GH (dwarf), los niveles de expresión de mRNA del receptor cannabinoide CB1 y del GPR55 a nivel hepático no son diferentes respecto a su grupo control. Por tanto, este resultado sugiere que la GH no regula la expresión de ambos receptores en hígado.

III. EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACION DE LIGANDOS PUTATIVOS DEL RECEPTOR GPR55: O-1602 vs LPI

Los endocannabinoides son moduladores clave de la conducta alimentaria, el peso corporal y el metabolismo de glucosa a través de la activación del receptor CB1 (Williams & Kirkham, 1999; Di Marzo *et al.*, 2001).

El GPR55 puede ser estimulado por endocannabinoides y mensajeros lipídicos no cannabinoides (Lauckner *et al.*, 2008; Oka *et al.*, 2007), y en este trabajo nos hemos centrado en el posible papel de este receptor como modulador de la ingesta y el control metabólico.

Estudios recientes indican que los actuales ligandos cannabinoides utilizados en estudios experimentales y clínicos pueden dirigirse también a GPR55. Así, recientes artículos han identificado a AM251 y Rimonabant (antagonistas clásicos de CB1 o agonistas inversos) como agonistas para GPR55 (Brown, 2007; Ross, 2009), lo que sugiere que la activación de GPR55 podría ser, al menos parcialmente, responsable de los beneficios metabólicos periféricos y/o de los efectos centrales encontrados después de la administración de Rimonabant.

En este estudio hemos mostrado que el O-1602 regula la conducta alimentaria y el metabolismo del tejido adiposo. Más específicamente, encontramos que tanto la administración central como periférica aguda de O-1602 induce la ingesta de alimentos.

Cuando se administra el O-1602 en la periferia, el efecto hiperfágico es transitorio, pero estos efectos son más marcados después de la administración central.

El mecanismo por el cual se incrementa la ingesta de alimentos, implica la inhibición de niveles de mRNA y proteína de CART hipotalámico, un neuropéptido que también está involucrado en el efecto orexigénico de endocannabinoides, tales como la anandamida (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005). Nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento central con el O-1602 disminuye los niveles de ARNm del neuropéptido anorexigénico CART. De acuerdo con datos previos (Dey A. *et al.*, 2003), encontramos una banda de detección de porCART y dos bandas inferiores que detectaron tanto

CARTI como CARTII. De manera contraria, la expresión de pro-opiomelanocortina y los neuropéptidos orexigénicos NPY y AgRP permanecieron sin cambios.

Aunque no se sabe si este ligando del GPR55, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, sus rápidos efectos orexigénicos después de la inyección periférica, sugieren que puede ser capaz de cruzar y llegar a áreas metabólicamente relevantes del cerebro. Alternativamente, también es posible que sus efectos orexigénicos se ejerzan a través de las áreas hipotalámicas desprovistas de barrera hematoencefálica. De hecho, el GPR55 se expresa en regiones metabólicamente relevantes del SNC, tales como el hipotálamo (Sawzdargo *et al.*, 1999). Por ello, la forma en que este receptor contribuye al control de la ingesta de alimentos y el balance energético en condiciones fisiológicas merece mayor investigación.

Los endocannabinoides aumentan la ingesta y la ganancia de peso corporal (Matias & Di Marzo, 2007) y adicionalmente, el bloqueo del receptor CB1 causa efectos benéficos sobre el metabolismo que son independientes de su respuesta anorexigénica (Cota *et al.*, 2003) (Kunos, 2007; Nogueiras *et al.*, 2008). Por ejemplo, el tratamiento con el antagonista de CB1, SR141716, causó solamente una supresión transitoria de la ingesta de alimentos, pero produjo una reducción mantenida en el peso corporal de roedores obesos (Ravinet *et al.*, 2003; Bensaid *et al.*, 2003). Por lo tanto, el siguiente aspecto a evaluar fueron las acciones a nivel central y periférico sobre la adiposidad después de la administración crónica de O-1602.

Nuestros resultados indican que la administración crónica central y periférica de O-1602, incrementa la masa grasa de manera independiente de la ingesta.

Debido a este incremento en la masa grasa, al medir la expresión génica de varias enzimas claves involucradas en el metabolismo de lípidos, transportadores de glucosa y adipoquinas implicadas en acciones inflamatorias, encontramos que la administración central crónica del O-1602 disminuyó específicamente la expresión de HSL (*hormone sensitive lipase*), GLUT1 y GLUT4 (*Glucose transporter 1 - 4*) en tejido adiposo blanco, en comparación con el grupo control (ratas inyectadas con vehículo). Estos datos sugieren que el aumento en la cantidad de grasa en ratas tratadas con O-

1602, puede ser causado por la disminución de la expresión de enzimas que favorecen la oxidación de lípidos.

Por otra parte, la administración periférica subcrónica de O-1602 inhibió los niveles en la expresión de ATGL (*adipose triglyceride lipase*) en WAT, y esto se acompañó de un incremento en los niveles de genes relacionados con inflamación tales como, factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleukina-6 (IL-6).

La administración subcrónica periférica del O-1602 no causó alteraciones en la energía consumida ni en la actividad locomotora espontánea, sin embargo, si se incrementó el RQ durante la fase nocturna. Este hallazgo sugiere que una disminución en el porcentaje de la grasa utilizada sobre el consumo total de energía, el cual es independiente de la hiperfagia y del gasto energético.

Adicionalmente, estos resultados nos sugieren que el O-1602 altera la distribución de nutrientes originando elevadas tasas en los depósitos de grasa.

Estos resultados indican que el tratamiento crónico con O-1602, tanto a nivel central como periférico, actúa directamente sobre el metabolismo de adipocitos, disminuyendo la movilización de ácidos grasos y por lo tanto, favoreciendo el almacenamiento de lípidos.

De acuerdo con estos hallazgos farmacológicos, los datos *in vitro* también indican que el O-1602 favorece la acumulación de lípidos en adipocitos. Más concretamente, se sabe que el aumento de Ca²⁺ en adipocitos ejerce acciones antilipolíticas, favoreciendo la lipogénesis (Gericke *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2001).

Nuestros experimentos indican que O-1602 aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelular en células 3T3-L1, lo cual es coherente con el mayor contenido de lípidos.

Además, la expresión en los niveles de ARNm de uno de los principales reguladores en la diferenciación de adipocitos, CEBP α (Ron D. *et al.*, 1992), también se incrementa en células 3T3-L1 tratadas con O-1602. Así, tanto experimentos *in vivo* como *in vitro*, muestran que el O-1602 moduló el metabolismo de adipocitos, favoreciendo el almacenamiento de lípidos.

Debido a que varios estudios han demostrado que el O-1602 se une y activa GPR55 (Johns *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2007; Ross, 2009), y que el GPR55 ha sido detectado en regiones metabólicamente relevantes del sistema nervioso central, incluyendo el hipotálamo (Sawzdargo *et al.*, 1999 16), hemos realizado experimentos en ratones carentes de GPR55.

Encontramos que la inyección central de O-1602 incrementa la ingesta tanto en ratones normales como en ratones carentes de GPR55. Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que las acciones metabólicas desencadenadas por el O-1602 son independientes de GPR55 y podrían ser moduladas por otro receptor aún desconocido.

La farmacología de GPR55 sigue siendo polémica (Ryberg *et al.*, 2007; Ross, 2009; Pertwee, 2007; Brown, 2007), y nuestros resultados son similares a otros en los cuales el O-1602 causa vasodilatación (Johns *et al.*, 2007) y protege contra la colitis experimental (Shicho *et al.*, 2011), de manera independiente de GPR55.

En general, parece que algunas acciones *in vivo* de O-1602 como las que ejerce sobre el metabolismo óseo, están moduladas por GPR55 (Whyte *et al.*, 2009), mientras que otras como, la vasodilatación (Johns *et al.*, 2007), colitis (Schicho *et al.*, 2011) y el metabolismo energético son mediados de manera independiente a GPR55.

IV. EFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPI

Contrariamente a la administración de O-1602, la administración de LPI no afectó a ningún parámetro de la modulación de la homeóstasis energética. De manera más concreta, la administración aguda a nivel central y periférico de LPI, no provocó cambios en la ingesta de alimentos.

Adicionalmente, la administración central y periférica subcrónica de LPI tampoco provocó variaciones en la masa grasa, y en consecuencia, no se observaron cambios en la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de adipocitos, como sí ocurrió con la administración subcrónica central y periférica del O-1602.

Por otra parte y de acuerdo con los datos *in vivo* donde LPI no afectó a la masa grasa, los datos *in vitro* indican que en adipocitos de células 3T3-L1, LPI no modifica la cantidad de lípidos en células 3T3-L1.

Finalmente y acorde a los datos obtenidos en ratas, la administración intraperitoneal de LPI, tampoco provocó cambios sobre la ingesta en ratones carentes del gen GPR55, ni en sus controles *wild type*.

La explicación a estos resultados podría deberse a las siguientes razones:

a). De manera distinta a O-1602, quizá se necesitan dosis muy altas de LPI para observar algún efecto metabólico, esto podría llevar a la unión de otros receptores con menor especificidad.

b). que el O-1602 y LPI estén actuando a través de diferentes vías moleculares.

V. REGULACION DE GPR55, CB1 Y CB2 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE HUMANOS

El sistema endocannabinoide se encuentra sobreactivado en el tejido adiposo blanco de pacientes obesos; este hecho contribuye a que se acumule de manera excesiva grasa visceral, dando origen a complicaciones asociadas a la obesidad (Pagotto *et al.*, 2006; Di Marzo, 2008; Engeli *et al.*, 2005).

Por su parte, el GPR55 ha sido descrito como un receptor huérfano para cannabinoides atípicos (Ross, 2009; Brown, 2007; Johns *et al.*, 2007). Sin embargo, sus implicaciones clínicas aún se desconocen.

Nuestros resultados demuestran que el GPR55 se expresa en el tejido adiposo subcutáneo y visceral y también en hígado de humanos. Nuestros datos, obtenidos a partir de dos cohortes independientes, indican que los niveles de mRNA de GPR55, están incrementados en tejido adiposo visceral y subcutáneo de los sujetos obesos en comparación con los sujetos delgados.

Además, la expresión del GPR55 en tejido adiposo visceral está asociada positivamente con la diabetes tipo 2, pero no sucede lo mismo con el tejido adiposo

subcutáneo. Los niveles del gen GPR55 en tejido adiposo visceral, guardan una mayor correlación con el peso, IMC y el porcentaje de grasa en mujeres que en hombres.

Adicionalmente y de acuerdo con lo anterior, también en mujeres, los niveles de LPI en plasma están aumentados en pacientes obesas y se correlacionan positivamente con el peso, el IMC y el porcentaje de grasa corporal.

Finalmente, mostramos que en explantes obtenidos a partir de tejido adiposo visceral, el LPI estimula los niveles de ARNm de genes que promueven la lipogénesis, tales como ACC y FAS y en cultivos de adipocitos diferenciados obtenidos de tejido adiposo visceral, el LPI eleva los niveles de $[Ca^{2+}]_i$.

Sin embargo, hemos encontrado que el LPI provoca respuestas menores en explantes de tejido adiposo o en cultivos de adipocitos diferenciados obtenidos a partir de tejido adiposo subcutáneo, sugiriendo que el sistema LPI/GPR55 es particularmente importante en el tejido adiposo visceral.

Nuestros datos muestran que el ARNm de GPR55 se expresa en tejidos humanos y que su regulación es tejido específica, ya que la expresión de GPR55 en tejido adiposo blanco, pero no en hígado, es particularmente alta en pacientes diabéticos cuando se comparan con individuos obesos normoglicémicos.

Aunque los niveles de endocannabinoides aumentan en la obesidad (Engeli *et al.*, 2005), los datos sobre la expresión del gen CB1 en tejido adiposo blanco es objeto de controversia porque se ha encontrado reducción (Engeli *et al.*, 2005), incremento (Bensaid *et al.*, 2003) o no cambio (Löfgren *et al.*, 2007) en su expresión al comparar sujetos obesos con sujetos delgados.

En el presente trabajo, encontramos mayores niveles de expresión de mRNA de CB1 en el tejido adiposo de pacientes obesos. Aunque se desconocen las discrepancias para estas diferencias, una posible explicación podría ser las diferentes poblaciones usadas para estos estudios.

De manera similar al CB1, los niveles de mRNA de CB2 y GPR55 en tejido adiposo visceral de sujetos obesos, también fueron incrementados, indicando la falta de un

circuito de retroalimentación negativa entre los endocannabinoides circulantes y estos tres receptores de cannabinoides.

El patrón similar de expresión de los tres receptores en los pacientes obesos y diabéticos también sugiere que algunas de sus funciones metabólicas podrían estar solapadas o compensadas.

Este es un tema importante porque drogas supuestamente específicas para cada receptor, podrían actuar a través de los otros dos receptores cuando la droga es administrada a dosis altas o durante tratamientos a largo plazo.

De hecho, un estudio farmacológico sugiere que las concentraciones bajas de Rimonabant bloquean de manera específica los receptores CB1, pero que a dosis más altas o con un tratamiento a largo plazo podría tener como objetivo el GPR55 (Henstridge *et al.*, 2010).

Otros estudios llevados a cabo en células HEK, muestran que los endocannabinoides, anandamida y 2-araquidonoilglicerol, tienen una baja afinidad por el GPR55 (Henstridge *et al.*, 2009; Ryberg *et al.*, 2007; Lauckner *et al.*, 2008). Por tanto, es posible que en situaciones en las que los niveles de endocannabinoides aumentan notablemente, éstos ejerzan parte de sus acciones biológicas a través de la activación de GPR55.

Pese a que el GPR55 es activado por cannabinoides, se ha aceptado que el LPI es su ligando endógeno más potente conocido hasta la fecha (Oka *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2010).

Previamente se ha descrito que los niveles de LPI en plasma se incrementan en pacientes con cáncer de ovario, este hecho hace que se considere a LPI como un biomarcador para esta enfermedad (Sutphen *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2001). Sin embargo, se desconoce por completo la posible interacción entre los niveles del LPI y el metabolismo.

De manera similar a la expresión del GPR55, encontramos que los niveles de LPI en plasma están incrementados en los pacientes obesos, sugiriendo que el sistema GPR55/LPI está sobreactivado en estados obesos.

En este sentido, se conoce que la acumulación de grasa visceral juega un papel clave en los mecanismos patofisiológicos de enfermedades asociadas a la obesidad, tales como la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Després, 2006). Dado que hemos encontrado que la expresión del GPR55 está incrementada en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes obesos diabéticos, y que además la expresión del GPR55 en tejido adiposo visceral se correlacionó positivamente con varios parámetros antropométricos, tales como el peso corporal y el índice de masa corporal, es posible que este receptor juegue un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina y en la patogénesis de la diabetes tipo 2.

Es interesante mencionar que cuando hombres y mujeres son analizados separadamente, el GPR55 en tejido adiposo visceral, muestra una marcada correlación con el peso, el IMC y el porcentaje de grasa en mujeres. De manera similar, la correlación de los niveles de LPI en plasma con el peso, el IMC y el porcentaje de grasa corporal fue también positiva en mujeres pero no en hombres.

Se sabe que existen marcadas diferencias entre ambos sexos con respecto a los grados de resistencia a la insulina, la composición corporal y el balance energético (Shi *et al.*, 2009). La correlación del LPI circulante y del GPR55 en tejido adiposo visceral con diferentes parámetros metabólicos sugiere que los estrógenos podrían ser relevantes para la vía de señalización de GPR55. En este contexto hemos de recordar que nuestros experimentos en animales con estudios de expresión de GPR55 indicaban asimismo un claro efecto dimórfico, mientras en hembras los niveles no eran afectados por la gonadectomía, en machos disminuían de forma marcada.

Este dimorfismo sexual en la expresión del gen y los niveles circulantes, ha sido observado previamente en otras hormonas con importantes implicaciones metabólicas, tales como la expresión del gen de leptina (Perica *et al.*, 2001) o las concentraciones de leptina circulante (Rosenbaum *et al.*, 2001).

Debido a que tanto LPI como GPR55 en tejido adiposo visceral mostraron una clara sobre regulación en pacientes obesos, y esta regulación se correlacionó con importantes parámetros metabólicos, el siguiente punto que investigamos fue las

acciones directas de este sistema sobre explantes de tejido adiposo y adipocitos aislados.

Nuestros hallazgos indican que en explantes obtenidos de tejido adiposo visceral, el LPI induce el almacenamiento de lípidos incrementando la expresión de genes lipogénicos y promueve la diferenciación de los adipocitos debido al incremento en la expresión de PPAR γ .

Aunque el GPR55 también está presente en tejido adiposo subcutáneo, el tratamiento con LPI en explantes obtenidos del mismo tejido, no modificó la expresión de ninguno de los genes estudiados. De acuerdo con los estudios de expresión génica y la acción lipogénica de $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos (Gericke *et al.*, 2009), el LPI provocó un incremento mucho mayor en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados de tejido adiposo visceral que en los de tejido adiposo subcutáneo, tanto en términos de porcentaje de células sensibles como en la magnitud del aumento de $[Ca^{2+}]_i$.

De hecho, aunque las dosis de LPI utilizadas en este estudio son similares a otras usadas en anteriores trabajos (Bondarenko *et al.*, 2010; Kapur *et al.*, 2009), éstas son más altas que las concentraciones plasmáticas observadas en los pacientes obesos, pero en general, estos resultados indican que el LPI favorece directamente el depósito de lípidos en adipocitos de tejido adiposo visceral.

Teniendo en cuenta las correlaciones específicas entre GPR55/LPI y varios parámetros metabólicos en mujeres, será necesario realizar estudios adicionales para determinar si los estrógenos pueden interferir en las acciones biológicas de LPI.

En este sentido es importante señalar que la grasa corporal se distribuye diferencialmente en hombres y mujeres, presentando los hombres más grasa visceral que las mujeres, en quienes predomina la grasa subcutánea (Shi *et al.*, 2009).

La diferencia en la distribución de grasa entre ambos sexos, podría tener claras implicaciones en las acciones metabólicas del sistema GPR55/LPI. En este sentido es importante señalar que el LPI es esterificado por la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferasa 3 (AGPAT3), la cual se expresa de manera ubicua en todos los tejidos humanos (Prasad *et al.*, 2011).

Esta razón, da lugar a la hipótesis de que las acciones tejido-específicas de LPI, podrían ser explicadas por los distintos grados de actividad de esta enzima en los depósitos de grasa.

También se debe señalar que la función del sistema GPR55/LPI en la obesidad parece ser dependiente de la especie, debido a que LPI no modifica la adipogénesis en células 3T3-L1 y la expresión de mRNA y proteína de GPR55, se redujo en modelos de roedores obesos en comparación con sus controles delgados.

VI. . REGULACION DE GPR55 EN HIGADO DE HUMANOS

Además de en tejido adiposo, estudiamos también la expresión de GPR55 en hígado. Sin embargo, entre los diversos subgrupos de pacientes obesos, no hemos encontrado cambios significativos en la expresión de este gen.

Aunque estudios adicionales podrían esclarecer la expresión de este receptor en otros tejidos con funciones metabólicas, incluyendo las vías del tracto gastrointestinal, el músculo esquelético, o el páncreas, nuestros actuales resultados sugieren que la expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral puede ser uno de los más importantes en relación con la homeostasis energética.

CONCLUSIONES

1. La expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado y WAT de roedores está regulada por el estado nutricional, el desarrollo postnatal, los esteroides sexuales y las hormonas tiroideas de manera tejido-específica.
2. El O-1602 regula la conducta alimentaria y el metabolismo del tejido adiposo. De manera incrementa la ingesta, mientras que la administración crónica incrementa la masa grasa. Estos efectos son independientes del GPR55. Además in vitro, el O-1602 incrementa los niveles de Ca²⁺ intracelular y el contenido de lípidos en adipocitos de células 3T3-L1.
3. La expresión del GPR55 en tejido adiposo visceral y los niveles circulantes del LPI se correlacionan positivamente con el peso corporal, el IMC y el porcentaje de grasa corporal, particularmente en mujeres.
4. El LPI incrementa los niveles de [Ca²⁺]_i en adipocitos diferenciados de tejido adiposo visceral y la expresión de enzimas lipogénicas en explantes de tejido adiposo visceral.

BIBLIOGRAFIA

- Adams MD, Earnhardt JT, Martin BR, Harris LS, Dewey WL, Razdan RK (1977). A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. *Experientia*. 33(9):1204-5.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382(6588):250-2.
- Al-Massadi O, Gabellieri E, Trujillo ML, Señaris R, Pagotto U, Pasquali R, Casanueva FF, Seoane LM (2010). Peripheral endocannabinoid system-mediated actions of rimonabant on growth hormone secretion are ghrelin-dependent. *J Neuroendocrinol*. 22(11):1127-36.
- Alonso M, Serrano A, Vida M, Crespillo A, Hernandez-Folgado L, Jagerovic N, Goya P, Reyes-Cabello C, Perez-Valero V, Decara J, Macías-González M, Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Pavón FJ (2012). Anti-obesity efficacy of LH-21, a cannabinoid CB(1) receptor antagonist with poor brain penetration, in diet-induced obese rats. *Br J Pharmacol*. 165(7):2274-91.
- Anand BK, Brobeck JR (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 77(2):323-4.
- Anand SS, Yusuf S (2011). Stemming the global tsunami of cardiovascular disease. *Lancet*. 377(9765):529-32.
- Andrews RC, Walker BR (1999). Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci (Lond)*. 96(5):513-23.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 257(1):79-83.
- Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Niiijima A, Meguid MM, Kasuga M (2003). Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*. 124(5):1325-36.

- Avraham Y, Ben-Shushan D, Breuer A, Zolotarev O, Okon A, Fink N, Katz V, Berry EM (2004). Very low doses of delta 8-THC increase food consumption and alter neurotransmitter levels following weight loss. *Pharmacol Biochem Behav.* 77(4):675-84.
- Bado A, LévassEUR S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature.* 394(6695):790-3.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 27(1):1-4.
- Ballinger A, McLoughlin L, Medbak S, Clark M (1995). Cholecystokinin is a satiety hormone in humans at physiological post-prandial plasma concentrations. *Clin Sci (Lond).* 89(4):375-81.
- Barreiro ML, Gaytán F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M (2002). Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod.* 67(6):1768-76.
- Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW (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.
- Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 418(6898):650-4.
- Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther.* 106(2):133-45.
- Bellinger LL, Bernardis LL (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav.* 76(3):431-42.
- Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U (2008). The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol.* 20(6):850-7.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 277(5329):1094-7.
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 63(4):908-14.
- Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 7(8):947-53.

- Bermudez-Silva FJ, Sanchez-Vera I, Suárez J, Serrano A, Fuentes E, Juan-Pico P, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F (2007). Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur J Pharmacol.* 565(1-3):207-11.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning?. *Pharmacol Biochem Behav.* 95(4):375-82.
- Berry EM, Mechoulam R (2002). Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther.* 95(2):185-90.
- Blüher M, Engeli S, Klötting N, Berndt J, Fasshauer M, Bátkai S, Pacher P, Schön MR, Jordan J, Stumvoll M (2006). Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes.* 55(11):3053-60.
- Bondarenko A, Waldeck-Weiermair M, Naghdi S, Poteser M, Malli R, Graier WF (2010). GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 161(2):308-20.
- Broadwell RD, Brightman MW (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol.* 166(3):257-83.
- Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T (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.
- Brown AJ (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 152(5):567-75.
- Brown AJ, Wise A (2001). Identification of modulators of GPR55 activity Patent number. WO/2001/086305.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 289(5487):2122-5.
- C, Jansson JO (2002b). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.* 8(1):75-9.
- Caminos JE, Nogueiras R, Blanco M, Seoane LM, Bravo S, Alvarez CV, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C (2003). Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology.* 144(11):5089-97.
- Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(7):4276-86.

- Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C (2003). Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. 144(4):1594-602.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269(5223):546-9.
- Casanueva FF, Dieguez C (1998). Interaction between body composition, leptin and growth hormone status. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 12(2):297-314.
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Ramirez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, Rodríguez A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Frühbeck G (2007). Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes Surg*. 17(11):1464-74.
- Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Rodríguez A, Salvador J, Gil MJ, Cienfuegos JA, Frühbeck G (2007). Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 39(7):495-500.
- Challis BG, Pinnock SB, Coll AP, Carter RN, Dickson SL, O'Rahilly S (2003). Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 311(4):915-9.
- Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*. 23(33):10691-702.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 115(1):427-9.
- Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*. 55(4):978-87. Erratum in: *Diabetes*. 2007. 56(10):2649.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 25 Suppl 5:S63-7.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 25 Suppl 5:S63-7.
- Conlon JM (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides*. 23(2):269-78.
- Corp ES, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett*. 70(1):17-22.

- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 112(3):423-31.
- Cota D, Sandoval DA, Olivieri M, Prodi E, D'Alessio DA, Woods SC, Seeley RJ, Obici S (2009). Food intake-independent effects of CB1 antagonism on glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)*. 17(8):1641-5.
- Côté M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Alméras N, Després JP, Di Marzo V (2007). Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)*. 31(4):692-9.
- Couet C, Delarue J, Constans T, Lamise F (1992). Age-related insulin resistance: a review. *Horm Res*. 38(1-2):46-50.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 37(4):649-61.
- Cummings DE, Overduin J (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 117(1):13-23.
- Danaei G, Finucane MM, Lin JK, Singh GM, Paciorek CJ, Cowan MJ, Farzadfar F, Stevens GA, Lim SS, Riley LM, Ezzati M (2011). Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Pressure). National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. *Lancet*. 377(9765):568-77.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 141(11):4255-61.
- D'Eon TM, Pierce KA, Roix JJ, Tyler A, Chen H, Teixeira SR (2008). The role of adipocyte insulin resistance in the pathogenesis of obesity-related elevations in endocannabinoids. *Diabetes*. 57(5):1262-8.
- DePaula AL, Macedo AL, Schraibman V, Mota BR, Vencio S (2009). Hormonal evaluation following laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 20-34. *Surg Endosc*. 23(8):1724-32.

- Després JP (2006). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med.* 38(1):52-63.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258(5090):1946-9.
- Dewey WL (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev.* 38(2):151-78.
- Dey A, Xhu X, Carroll R, Turck CW, Stein J, Steiner DF (2003). Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem.* 278(17):15007-14.
- Di Marzo V (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci.* 27(3):134-40.
- Di Marzo V (2008). The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 51(8):1356-67.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3(9):771-84.
- Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L (1998). Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett.* 436(3):449-54.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372(6507):686-91.
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 410(6830):822-5.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21(12):521-8. Erratum in: *Trends Neurosci* 1999. 22(2):80.
- Diéguez C, da Boit K, Novelle MG, Martínez de Morentin PB, Nogueiras R, López M (2010). New insights in ghrelin orexigenic effect. *Front Horm Res.* 38:196-205.
- Drmeta T, Greasley P, Groblewski T (2004). Screening assays for cannabinoid-ligand type modulators of GPR55 Patent number. WO/2004/074844.
- Drucker DJ (2005). Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 1(1):22-31.
- Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J (2005). Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes.* 54(10):2838-43.

- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 145(5):2273-82.
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 341(12):879-84.
- Farzadfar F, Finucane MM, Danaei G, Pelizzari PM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Singh GM, Lin JK, Stevens GA, Riley LM, Ezzati M (2011). Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Cholesterol). National, regional, and global trends in serum total cholesterol since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 321 country-years and 3.0 million participants. *Lancet*. 377(9765):578-86
- Fekete C, Lechan RM (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol*. 28(2-3):97-114.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*. 48(3):443-50.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*. 393(2-3):231-5.
- Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*; DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62035-5.
- Fowler CJ, Holt S, Nilsson O, Jonsson KO, Tiger G, Jacobsson SO (2005). The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 81(2):248-62.
- Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents (1995). Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*. 96(3):1658-63.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(4): 2005-10.

- Fujimoto S, Inui A, Kiyota N, Seki W, Koide K, Takamiya S, Uemoto M, Nakajima Y, Baba S, Kasuga M (1997). Increased cholecystokinin and pancreatic polypeptide responses to a fat-rich meal in patients with restrictive but not bulimic anorexia nervosa. *Biol Psychiatry*. 41(10):1068-70.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 232(1):54-61.
- Gao Q, Horvath TL (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett*. 582(1):132-41.
- García MC, Wernstedt I, Berndtsson A, Enge M, Bell M, Hultgren O, Horn M, Ahrén B, Enerback S, Ohlsson C, Wallenius V, Jansson JO (2006). Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes*. 55(5):1205-13.
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruccioli N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M (2007). Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology*. 46(1):122-9.
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M (2006). The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol*. 69(2):471-8.
- Gericke MT, Kosacka J, Koch D, Nowicki M, Schröder T, Ricken AM, Nieber K, Spänel-Borowski K (2009). Receptors for NPY and PACAP differ in expression and activity during adipogenesis in the murine 3T3-L1 fibroblast cell line. *Br J Pharmacol*. 157(4):620-32.
- Ginde SR, Geliebter A, Rubiano F, Silva AM, Wang J, Heshka S, Heymsfield SB (2005). Air displacement plethysmography: validation in overweight and obese subjects. *Obes Res*. 13(7):1232-7.
- Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ramírez B, Rodríguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G (2007). Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(9):3719-27.
- Gómez-Ambrosi J, Salvador J, Rotellar F, Silva C, Catalán V, Rodríguez A, Jesús Gil M, Frühbeck G (2006). Increased serum amyloid A concentrations in morbid obesity decrease after gastric bypass. *Obes Surg*. 16(3):262-9.

- González CR, Caminos JE, Gallego R, Tovar S, Vázquez MJ, Garcés MF, Lopez M, García-Caballero T, Tena-Sempere M, Nogueiras R, Diéguez C (2010). Adiponectin receptor 2 is regulated by nutritional status, leptin and pregnancy in a tissue-specific manner. *Physiol Behav.* 99(1):91-9.
- Gooley JJ, Schomer A, Saper CB (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci.* 9(3):398-407.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology.* 142(2):788-94.
- Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, Seeley RJ (1999). Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci.* 19(6):2362-7.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269(5223):543-6.
- Halimi S (2010). Towards new recommendations for the treatment of type 2 diabetes? An expert's point of view. *Rev Prat.* 60(4):504-9.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J.* 23(1):183-93.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, Penman J, Whistler JL, Kostenis E, Waldhoer M, Irving AJ (2010). GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol.* 160(3):604-14.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(5):1932-6.
- Herling AW, Gossel M, Haschke G, Stengelin S, Kuhlmann J, Müller G, Schmoll D, Kramer W (2007). CB1 receptor antagonist AVE1625 affects primarily metabolic parameters independently of reduced food intake in Wistar rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293(3):E826-32.
- Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlostky JM, Lotersztajn S, Mallat A (2008). Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 134(2):432-9.

- Hildebrandt AL, Kelly-Sullivan DM, Black SC (2003). Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol.* 462(1-3):125-32.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem.* 69(2):631-8.
- Hodge J, Bow JP, Plyler KS, Vemuri VK, Wisniecki A, Salamone JD, Makriyannis A, McLaughlin PJ (2008). The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM 251 and antagonist AM 4113 produce similar effects on the behavioral satiety sequence in rats. *Behav Brain Res.* 193(2):298-305.
- Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschöp M (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology.* 142(10):4163-9.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* 50(5):1126-33.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271(18):10697-703.
- Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, Gallego R, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F (2004). Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 62(3):481-8.
- Irani BG, Le Foll C, Dunn-Meynell A, Levin BE (2008). Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology.* 149(10):5146-54.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol.* 118(8):2023-8.
- Izzo AA, Camilleri M (2008). Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut.* 57(8):1140-55.
- Jamshidi N, Taylor DA (2001). Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol.* 134(6):1151-4.
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(24):14136-41.

- Jayanthi S, Buie S, Moore S, Herning RI, Better W, Wilson NM, Contoreggi C, Cadet JL (2010). Heavy marijuana users show increased serum apolipoprotein C-III levels: evidence from proteomic analyses. *Mol Psychiatry*. 15(1):101-12.
- Johns DG, Behm DJ, Walker DJ, Ao Z, Shapland EM, Daniels DA, Riddick M, Dowell S, Staton PC, Green P, Shabon U, Bao W, Aiyar N, Yue TL, Brown AJ, Morrison AD, Douglas SA (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol*. 152(5):825-31.
- Kaminski NE (1998). Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol*. 83(1-2):124-32.
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem*. 284(43):29817-27.
- Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav*. 86(5):773-95.
- Kershaw EE, Flier JS (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 89, 2548-2556.
- Kirkham TC (2008). Taranabant cuts the fat: new hope for cannabinoid-based obesity therapies? *Cell Metab*. 7(1):1-2.
- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol*. 136(4):550-7.
- Kishi T, Elmquist JK (2005). Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Mol Psychiatry*. 10(2):132-46.
- Kissileff HR, Carretta JC, Geliebter A, Pi-Sunyer FX (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(5):R992-8.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402(6762):656-60.
- Kunos G (2007). Understanding metabolic homeostasis and imbalance: what is the role of the endocannabinoid system? *Am J Med*. 120(9 Suppl 1):S18-24; discussion S24.
- Lampinen M, Rönblom A, Amin K, Kristjansson G, Rorsman F, Sangfelt P, Säfsen B, Wagner M, Wanders A, Winqvist O, Carlson M (2005). Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut*. 54(12):1714-20.

- Lassmann V, Vague P, Vialettes B, Simon MC (1980). Low plasma levels of pancreatic polypeptide in obesity. *Diabetes*. 29(6):428-30.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(7):2699-704.
- Liu Y, Michael MD, Kash S, Bensch WR, Monia BP, Murray SF, Otto KA, Syed SK, Bhanot S, Sloop KW, Sullivan JM, Reifel-Miller A (2007). Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes. *Endocrinology*. 148(2):683-92.
- Löfgren P, Sjölin E, Wåhlen K, Hoffstedt J (2007). Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(4):1555-9.
- López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. 7(5):389-99.
- López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. 7(5):389-99.
- López M, Tovar S, Vázquez MJ, Williams LM, Diéguez C (2007). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc*. 66(1):131-55.
- López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martínez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Diéguez C, Vidal-Puig A (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med*. 16(9):1001-8.
- Mackie K, Stella N (2006). Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J*. 8(2):E298-306.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1(11):1155-61.

- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 48(3):655-68.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem*. 275(14):10128-33.
- Malaisse-Lagae F, Carpentier JL, Patel YC, Malaisse WJ, Orci L (1977). Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse. Hypothesis. *Experientia*. 33(7):915-7.
- Malecka-Tendera E, Mazur A (2006). Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes (Lond)*. 30 Suppl 2:S1-3.
- Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL, Baskin DG (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 127(6):3234-6.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. 302(5642):84-8.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem*. 80(3):448-56.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 418(6897):530-4.
- Martínez de Morentin PB, Whittle AJ, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 61(4):807-17.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 276(3):905-8.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 3(9):1029-33.
- Matias I, Di Marzo V (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab*. 18(1):27-37.

- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(8):3171-80.
- Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo AA, Di Marzo V (2008). Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: Effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol.* 286(1-2 Suppl 1):S66-78.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346(6284):561-4.
- McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA (2008). Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol.* 73(2):441-50.
- Mechoulam R (1999). Recent advantages in cannabinoid research. *Forsch Komplementarmed.* 6 Suppl 3:16-20.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50(1):83-90.
- Mendieta-Zerón H, López M, Diéguez C (2008). Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. *Gen Comp Endocrinol.* 155(3):481-95.
- Mike SL, Edward HK (1999) LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews.* 18: 187-279.
- Miller CC, Murray TF, Freeman KG, Edwards GL (2004). Cannabinoid agonist, CP 55,940, facilitates intake of palatable foods when injected into the hindbrain. *Physiol Behav.* 80(5):611-6.
- Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V (2005). Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology.* 30(6):1216-21.
- Moran TH, Kinzig KP (2004). Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286(2):G183-8.
- Moran TH, Smedh U, Kinzig KP, Scott KA, Knipp S, Ladenheim EE (2005). Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(2):R384-8.

- Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, Guzmán R, Gómez-Ambrosi J, Pulido MR, Russell WR, Imbernón M, Ross RA, Malagón MM, Dieguez C, Fernández-Real JM, Frühbeck G, Nogueiras R (2012). The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes*. 61(2):281-91.
- Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Rodríguez-Hermosa JI, Sabater M, Pardo G, Ricart W, Fernández-Real JM (2010). OCT1 Expression in adipocytes could contribute to increased metformin action in obese subjects. *Diabetes*. 60(1):168-76.
- Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A (2010). GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Curr Med Chem*. 17(14):1411-29.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443(7109):289-95.
- Motaghedi R, McGraw TE (2008). The CB1 endocannabinoid system modulates adipocyte insulin sensitivity. *Obesity* (Silver Spring). 16(8):1727-34.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365(6441):61-5.
- Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR (2004). Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 60(2):153-60.
- Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M (2004a). Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci*. 117(Pt 15):3247-57.
- Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C (2003a). Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett*. 548(1-3):21-7.
- Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C (2003b). Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res*. 11(3):408-14.
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM (2004). Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes*. 53(10):2552-8.
- Nogueiras R, Veyrat-Durebex C, Suchanek PM, Klein M, Tschöp J, Caldwell C, Woods SC, Wittmann G, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C, Reizes O, Rohner-Jeanrenaud F, Tschöp MH (2008). Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes*. 57(11):2977-91.

- Offertáler L, Mo FM, Bátakai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G (2003). Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol*. 63(3):699-705.
- Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T (2010). Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem*. 147(5):671-8.
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 362(4):928-34.
- Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF (2008). Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)*. 114(10):611-24.
- Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, Bannon AW, Cravatt BF, Kuhar MJ, Mackie K, Palkovits M, Kunos G (2005). Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide. *Neuroendocrinology*. 81(4):273-82.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátakai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 115(5):1298-305.
- Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátakai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest*. 118(9):3160-9.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*. 3(3):167-75.
- Pacher P, Bátakai S, Kunos G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 58(3):389-462.
- Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R (2007). The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(12):4810-9.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*. 27(1):73-100.

- Pasquali R, Vicennati V, Gambineri A (2002). Adrenal and gonadal function in obesity. *J Endocrinol Invest.* 25(10):893-8.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 269(5223):540-3.
- Perica's J, Oliver P, Guitard R, Pico C, Palou A (2001). Sexual dimorphism in age-related changes in UCP2 and leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue in humans. *J Nutr Biochem.* 12(8):444-449.
- Perrini S, Carreira MC, Conserva A, Laviola L, Giorgino F (2008). Metabolic implications of growth hormone therapy. *J Endocrinol Invest.* 31(9 Suppl):79-84.
- Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74(2):129-80.
- Pertwee RG (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* 168:1-51.
- Pertwee RG (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol.* 152(7):984-6.
- Pétevári E, Szabad AO, Soós S, Garami A, Székely M, Balaskó M (2011). Central alpha-MSH infusion in rats: disparate anorexic vs. metabolic changes with aging. *Regul Pept.* 166(1-3):105-11.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 18(23):9996-10015.
- Pinilla L, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology.* 143(2):717-25.
- Pinilla L, Seoane LM, Gonzalez L, Carro E, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C (1999). Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *Eur J Endocrinol.* 140(5):468-73.
- Piomelli D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4(11):873-84.
- Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM (2005). The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab.* 7(1):65-72.
- Prasad SS, Garg A, Agarwal AK (2011). Enzymatic activities of the human AGPAT isoform 3 and isoform 5: localization of AGPAT5 to mitochondria. *J Lipid Res.* 52(3):451-62.

- Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA (2009). Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest.* 119(3):531-9.
- Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* 10(5):524-9. Erratum in: *Nat Med.* 10(6):649.
- Quarta C, Bellocchio L, Mancini G, Mazza R, Cervino C, Brulke LJ, Fekete C, Latorre R, Nanni C, Bucci M, Clemens LE, Heldmaier G, Watanabe M, Leste-Lassere T, Maitre M, Tedesco L, Fanelli F, Reuss S, Klaus S, Srivastava RK, Monory K, Valerio A, Grandis A, De Giorgio R, Pasquali R, Nisoli E, Cota D, Lutz B, Marsicano G, Pagotto U (2010). CB(1) signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metab.* 11(4):273-85.
- Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrhian A, Hillard CJ (2008). Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology.* 54(1):108-16.
- Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(2):R345-53.
- Reichenbach V, Ros J, Jiménez W (2010). Endogenous cannabinoids in liver disease: Many darts for a single target. *Gastroenterol Hepatol.* 33(4):323-9.
- Rettori V, Wenger T, Snyder G, Dalterio S, McCann SM (1988). Hypothalamic action of delta-9-tetrahydrocannabinol to inhibit the release of prolactin and growth hormone in the rat. *Neuroendocrinology.* 47(6):498-503.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350(2-3):240-4.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, Portier M, Shire D, Brelière JC, Le Fur GL (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 284(2):644-50.
- Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Gil MJ, Becerril S, Sáinz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Frühbeck G (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond).* 33(5):541-52.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 40(1):2-14.

- Rolls ET (2006). Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1471):1123-36.
- Ron D, Brasier AR, McGehee RE Jr, Habener JF (1992). Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest.* 89(1):223-33.
- Rosenbaum M, Pietrobelli A, Vasselli JR, Heymsfield SB, Leibel RL (2001). Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25(9):1365-71.
- Ross RA (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci.* 30(3):156-63.
- Ross RA (2011). L- α -lysophosphatidylinositol meets GPR55: a deadly relationship. *Trends Pharmacol Sci.* 32(5):265-9.
- Ruan H, Lodish HF (2003). Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(5):447-55.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 152(7):1092-101.
- Salamone JD, McLaughlin PJ, Sink K, Makriyannis A, Parker LA (2007). Cannabinoid CB1 receptor inverse agonists and neutral antagonists: effects on food intake, food-reinforced behavior and food aversions. *Physiol Behav.* 91(4):383-8.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes.* 50(10):2199-202.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol.* 64(2):193-8.
- Schicho R, Bashashati M, Bawa M, McHugh D, Saur D, Hu HM, Zimmer A, Lutz B, Mackie K, Bradshaw HB, McCafferty DM, Sharkey KA, Storr M (2011). The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm Bowel Dis.* 17(8):1651-64.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr (1992a). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 13(3):387-414.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404(6778):661-71.

- Señarís R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta (1997). *Endocrinology*. 138(10):4501-4.
- Seoane LM, Tovar S, Baldelli R, Arvat E, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C (2000). Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *Eur J Endocrinol*. 143(5):R7-9.
- Shen Z, Wu M, Elson P, Kennedy AW, Belinson J, Casey G, Xu Y (2001). Fatty acid composition of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylinositol in plasma from patients with ovarian cancer and other gynecological diseases. *Gynecol Oncol*. 83(1):25-30.
- Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ (2009). Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol*. 30(3):396-404.
- Small CJ, Bloom SR (2004). Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab*. 15(6):259-63.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol*. 129(2):227-30.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S (2005). Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 85(4):1131-58.
- Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 139(1):225-36.
- Stejskal D, Jedelský L, Bartek J, Růžicka V (1998). Leptin, insulin and proinsulin--their relationship. *Vnitr Lek*. 44(6):361-5.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 388(6644):773-8.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001a). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 409(6818):307-12.
- Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA (2001b). A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(2):502-6.
- Steppan CM, Lazar MA (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 13(1):18-23.

- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215(1):89-97.
- Sutphen R, Xu Y, Wilbanks GD, Fiorica J, Grendys EC Jr, LaPolla JP, Arango H, Hoffman MS, Martino M, Wakeley K, Griffin D, Blanco RW, Cantor AB, Xiao YJ, Krischer JP (2004). Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(7):1185-91.
- Swartz TD, Duca FA, Covasa M (2010). Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Res.* 1308:79-86.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytán F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology.* 143(2):717-25.
- Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castañeda TR, Vázquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Diéguez C (2005). Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol.* 153(3):R1-5.
- Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castañeda TR, Vázquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Diéguez C (2005). Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol.* 153(3):R1-5.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 407(6806):908-13.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83(2):393-411.
- Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG (1980). Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *J Nat Prod.* 43(2):169-234.
- Ugur T, Bartels M, Kis B, Scherbaum N (2008). Psychosis following anti-obesity treatment with rimonabant. *Obes Facts.* 1(2):103-5.
- Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y (2006). Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science.* 312(5780):1656-9.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 389(6651):610-4.

- Valsamakis G, McTernan PG, Chetty R, Al Daghri N, Field A, Hanif W, Barnett AH, Kumar S (2004). Modest weight loss and reduction in waist circumference after medical treatment are associated with favorable changes in serum adipocytokines. *Metabolism*. 53(4):430-4.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S (2005). RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 365(9468):1389-97. Erratum in: *Lancet*. 2005. 366(9483):370.
- Varela L, Martínez-Sánchez N, Gallego R, Vázquez MJ, Roa J, Gándara M, Schoenmakers E, Nogueiras R, Chatterjee K, Tena-Sempere M, Diéguez C, López M (2012). Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *J Pathol*. 227(2):209-22.
- Vázquez MJ, González CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-Puig A, Nogueiras R, López M, Diéguez C (2008). Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology*. 149(9):4534-43.
- Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Resistin: a new link between obesity and insulin resistance? (2001) *Clin Endocrinol (Oxf)*. 55(4):437-8.
- Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 8(1):75-9.
- Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes*. 50(12):2786-91.
- Welsch U (2009). Tejido Adiposo. In *Sobotta Histología* pp. 147-151. Editorial Médica Panamericana.
- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(38):16511-6.
- Williams CM, Kirkham TC (1999). Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 143(3):315-7.
- Williams CM, Kirkham TC (2002). Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav*. 76(2):241-50.
- Winzell MS, Nogueiras R, Dieguez C, Ahrén B (2004). Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 321(1):154-60.

- Wittmann G, Deli L, Kalló I, Hrabovszky E, Watanabe M, Liposits Z, Fekete C. (2007). Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 503(2):270-9.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature.* 282(5738):503-5.
- Xiao Y, Chen Y, Kennedy AW, Belinson J, Xu Y (2000). Evaluation of plasma lysophospholipids for diagnostic significance using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses. *Ann N Y Acad Sci.* 905:242-59.
- Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB (2001). Mechanism of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J.* 15(13):2527-9.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423(6941):762-9. Erratum in: *Nature.* 28;431(7012):1123.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med.* 7(8):941-6.
- Zengin A, Zhang L, Herzog H, Baldock PA, Sainsbury A (2010). Neuropeptide Y and sex hormone interactions in humoral and neuronal regulation of bone and fat. *Trends Endocrinol Metab.* 21(7):411-8.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372, 425-432.
- Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, Starlinger M, Eichner M, Raybould HE, Becker HD, Jehle EC (1999). C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res.* 846(1):1-11.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sjørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400(6743):452-7.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION

- FIGURA 1.** Modelo para la regulación de retroalimentación negativa de la ingesta de alimentos en respuesta a cambios en el contenido de grasa corporal19
- FIGURA 2.** Control del sistema nervioso central y periférico en el balance de la homeóstasis energética 22
- FIGURA 3.** Principales receptores y vías de señalización del sistema endocannabinoide 41
- FIGURA 4.** Análisis filogenético de los receptores no-sensoriales humanos acoplados a la familia de receptores acoplados a proteínas G 43
- FIGURA 5.** Efectos metabólicos del bloqueo del receptor cannabinoide CB1 49
- FIGURA 6.** Rol del sistema endocannabinoide en la regulación de la adipogénesis y la lipogénesis..... 52
- FIGURA 7.** Vía de señalización para la interacción entre GPR55 y el receptor CB1 propuesto por Waldeck-Weiermair et al. 58
- FIGURA 8.** GPR55 demuestra actividad cannabinoide 63

RESULTADOS

REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN GRASA BLANCA

- FIGURA 9.** Efecto del ayuno sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT de ratas macho medidos por RT-PCR en tiempo real 107
- FIGURA 10.** Efecto del estado nutricional sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 y sobre los niveles de proteína en WAT gonadal de ratas macho y ratones ob/ob 111
- FIGURA 11.** Efecto del estado gestacional sobre la expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT 112

FIGURA 12. Efecto del desarrollo postnatal de ratas macho sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT.....	113
FIGURA 13. Efecto de los factores pituitarios sobre la expresión de CB1 y GPR55 en WAT.....	116
FIGURA 14. Análisis del efecto de las gonadectomías (GDX) sobre los niveles de expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en WAT.....	117
REGULACION DE CB1 Y GPR55 EN HIGADO	
FIGURA 15. Expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado: ayuno y administración de leptina en hígado.....	118
FIGURA 16. Expresión del ARNm de CB1 y GPR55 en hígado ratas macho sometidas a restricción alimenticia.....	119
FIGURA 17. Expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de ratas macho, alimentadas con dieta baja y alta en grasa.....	120
FIGURA 18. Análisis de los niveles de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de machos y hembras de 24, 45, 60 y 90 días.....	121
FIGURA 19. Efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre los niveles de expresión de ARNm de CB1 y GPR55 en hígado de ratas macho.....	122
EFFECTOS METABOLICOS DE LA ADMINISTRACION DE O-1602	
FIGURA 20. Resultados sobre la ingesta de la administración aguda de O-1602.....	123
FIGURA 21. Efectos de la administración aguda i.p. de O-1602 sobre la ingesta.....	124
FIGURA 22. Efectos de la administración aguda de O-1602 sobre la expresión de neuropéptidos hipotalámicos.....	126
FIGURA 23. Efectos de la administración aguda de O-1602 sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55.....	127
FIGURA 24. Efectos de la administración i.c.v del O-1602.....	129

FIGURA 25. Efectos de la administración intraperitoneal crónica de O-1602 durante 7 días	133
FIGURA 26. Efectos de O-1602 sobre la movilización de (Ca ²⁺), en adipocitos diferenciados en células 3T3-L1	135
<i>EFFECTOS METABÓLICOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LPI</i>	
FIGURA 27. Efecto de la administración central intracerebroventricular aguda de LPI sobre la ingesta acumulada.....	136
FIGURA 28. Efecto de la administración periférica aguda de LPI sobre la ingesta acumulada.....	137
FIGURA 29. Efectos de la administración periférica crónica (7 días) de LPI	138
FIGURA 30. Efectos de LPI sobre adipocitos in vitro	139
FIGURA 31. Efectos de la administración aguda i.p. de LPI; (2 µg/kg) sobre la ingesta en ratones deficientes de GPR55.....	140
<i>REGULACION DE GPR55, CB1 Y CB2 EN TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE HUMANOS</i>	
FIGURA 32. Regulación de GPR55, CB1 y CB2 en tejido adiposo blanco de humanos	145
FIGURA 33. Correlación de GPR55 en tejido adiposo visceral con diferentes factores metabólicos en los sujetos de la cohorte 1.....	151
FIGURA 34. Expresión relativa de ARNm en adipocitos versus fracción vascular estromal de humanos.	153
FIGURA 35. Niveles circulantes de LPI total medido en plasma de sujetos delgados y obesos de la cohorte 1	154
FIGURA 36. Correlación entre los niveles circulantes de LPI total en plasma y diferentes factores metabólicos en mujeres	156

FIGURA 37. Correlación de los niveles circulantes de LPI total en plasma y diferentes factores metabólicos en hombres y mujeres de la cohorte 1	157
FIGURA 38. Efectos de LPI (1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 μmol) sobre los niveles de expresión de ARNm, en explantes de tejido adiposo visceral de humanos	159
FIGURA 39. Efectos de LPI sobre los niveles de expresión de ARNm, en explantes de tejido adiposo subcutáneo de humanos.....	161
FIGURA 40. Efectos de LPI sobre la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en cultivos de adipocitos diferenciados de humanos	163
FIGURA 41. Efecto del tratamiento con LPI (1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 $\mu\text{mol/L}$) durante 10 días sobre adipocitos diferenciados de células 3T3-L1 de ratón.....	164
 REGULACION DE GPR55 EN HIGADO DE HUMANOS	
FIGURA 42. Expresión de ARNm de GPR55 en muestras de hígado obtenidas de sujetos obesos de la cohorte 1.....	165

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y METODOS

Tabla 1.	Composición de macronutrientes de las dietas empleadas.	75
Tabla 2.	Perfil de ácidos grasos de las dietas LFD y HFD	75
Tabla 3.	Características antropométricas y analíticas de los sujetos de la cohorte 1 usadas para la determinación de los niveles circulantes de LPI.....	87
Tabla 4.	Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en humanos	90
Tabla 5.	Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en rata.....	96
Tabla 6.	Secuencias de las sondas usadas para PCR a tiempo real en ratón	99
Tabla 7.	Relación de anticuerpos primarios y secundarios usados y sus correspondientes diluciones.....	104
Tabla 8.	Características antropométricas y analíticas de los sujetos de la cohorte 1 y 2	141
Tabla 9.	Análisis de regresión lineal multivariante para la expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral como variable dependiente.....	147
Tabla 10.	Correlaciones entre la expresión de GPR55 en tejido visceral y subcutáneo y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 1	148
Tabla 11.	Correlaciones entre la expresión de CB1 en tejido visceral y subcutáneo y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 1	149
Tabla 12.	Correlaciones entre la expresión de GPR55 en tejido visceral y parámetros metabólicos seleccionados, para los sujetos de la cohorte 2.....	149
Tabla 13.	Correlaciones entre los niveles circulantes de LPI y parámetros metabólicos seleccionados de los sujetos de la cohorte 1.....	157