
Metodología para el estudio de la regulación del peso corporal y/o de la etiología de la obesidad

Methodology for the study of the regulation of body weight and/or the aetiology of obesity

A. Martí, J.A. Martínez

RESUMEN

La obesidad, uno de los más graves problemas de salud de las sociedades desarrolladas, es el resultado de un balance energético positivo mantenido en el tiempo. La regulación del peso corporal y su mantenimiento parece estar regulado por un eje con tres componentes interdependientes: la ingesta dietética, el gasto energético y la adipogénesis, aunque es preciso profundizar en los procesos que intervienen tanto en la oxidación de nutrientes como en el balance energético. Los procesos metabólicos son múltiples y están interrelacionados, sin embargo conviene estudiarlos separadamente de manera que se pueda lograr un mejor conocimiento del sistema completo. En efecto, así se procede a numerosos diseños experimentales, ya sean en animales de laboratorio, cultivos celulares, o incluso en seres humanos cuando se examinan los mecanismos moleculares implicados en la regulación del peso corporal. Métodos tanto *in vitro* (modelos celulares y subcelulares) como *in vivo* han permitido aumentar los conocimientos sobre los mecanismos que controlan el peso corporal. Cabe destacar las nuevas estrategias que nos proporciona la era molecular, aunque también las técnicas que consideran el organismo humano como un todo podrán influir notablemente en el desarrollo de nuevos fármacos junto con el manejo terapéutico y la prevención de la obesidad.

Palabras clave: Genes de la obesidad. Tejido adiposo. Gasto energético. Composición corporal.

ABSTRACT

Obesity, one of the most serious health problems of developed societies, is the result of a positive energy balance maintained over time. The regulation of body weight and its maintenance seem to be regulated by an axis of three interdependent components: dietary intake, energy expenditure and adipogenesis, although it is necessary a deeper understanding of the processes involved in the oxidation of nutrients and in the energy balance. The metabolic processes are numerous and inter-related, it is however convenient to study them separately in such a way that it is possible to obtain a better knowledge of the complete system. Indeed, this is the procedure employed in the design of numerous experiments, be they on laboratory animals, cellular cultures, or even on human beings when the molecular mechanisms involved in the regulation of body weight are examined. Both *in vitro* methods (cellular and subcellular models) and *in vivo* ones have made it possible to increase knowledge of the mechanisms that control body weight. It is worth underlining the new strategies that the molecular era and provides us with, although the techniques that consider the human organism as a whole might have a notable influence on the development of new drugs, together with therapeutic management and the prevention of obesity.

Key words: Obesity genes. Adipose tissue. Energy expenditure. Body composition.

ANALES Sis San Navarra 2002; 25 (Supl. 1): 187-196.

Departamento de Fisiología y Nutrición. Universidad de Navarra

Correspondencia:
D. J. Alfredo Martínez
Departamento de Fisiología y Nutrición
Universidad de Navarra
31008 Pamplona
Fax 948 425649

ESTUDIOS DE BIOLOGÍA CELULAR/MOLECULAR Y GENÉTICA

La aplicación y desarrollo de los conceptos y técnicas de la biología molecular ha supuesto un gran avance en los últimos años en la comprensión de los mecanismos que intervienen tanto en la regulación del balance energético como en el desarrollo de la obesidad¹. Específicamente, se ha progresado gracias a la identificación de genes por estrategias como el clonaje posicional de genes mutados que participan en el desarrollo de la obesidad en modelos animales en los que la enfermedad obedece a causas genéticas. La localización de los genes mutados en estos animales ha conducido a la identificación de “nuevas proteínas” y ha sugerido su posible participación en sistemas de regulación fisiológica. Esto es especialmente evidente en el caso de la hormona leptina, una proteína de 16 kD, ya que cuando se produce una mutación en el gen correspondiente aparece obesidad en los ratones *ob/ob*². El gen *db* de ratón y el *fa* de rata codifican para la proteína receptora de leptina, y la mutación de estos genes es responsable de la obesidad de los ratones *db/db* y de las ratas *fa/fa*, respectivamente³. Otros modelos animales de obesidad, por una mutación puntual han permitido conocer la implicación de otras moléculas proteicas en la obesidad humana como es el caso de la enzima Carboxipeptidasa E (CPE) y de la proteína señalizadora agouti⁴.

Homólogos de los “genes de obesidad” en roedores se han encontrado en tejidos humanos. Además se ha iniciado la búsqueda de estas mutaciones en sujetos obesos también de polimorfismos específicos, que puedan estar relacionados con el aumento de masa grasa o la predisposición hacia su acumulación⁵. Al menos, tres estudios han encontrado mutaciones en la región codificadora del gen de la leptina y de su receptor en relación con obesidad mórbida⁶⁻⁸. El alcance de estos hallazgos va más allá de la mera detección de la mutación, lo que de alguna forma demuestran que el sistema leptina es fisiológicamente importante en la regulación de la grasa corporal y del balance energético tanto en humanos como en animales.

Las mutaciones y los polimorfismos se pueden identificar en genes que están o pueden estar asociados a la obesidad mediante *Southern blotting*. La expresión de un gen dado se puede determinar en muestras de tejidos *in vitro* mediante *Northern blotting* y por otras técnicas (RNasa protección, o la metodología de las enzimas de restricción). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se utiliza para determinar niveles de mRNAs^{9,10}.

Estos métodos proporcionan información sobre tejidos que expresan algún gen particular, lo cual es muy interesante para conocer la función fisiológica de la proteína que codifican y, además dan a conocer si determinados cambios en la expresión pueden ser la causa primaria o secundaria de la obesidad. Por otro lado, los factores nutricionales, hormonales y neuronales implicados en la regulación de genes específicos deben ser investigados como mediadores potenciales de algunos genotipos de obesidad.

Otros métodos para la detección de mutaciones son la electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE), la modificación de carbodiimida (CDI), el análisis conformacional de polimorfismos en una sola hebra (SSCP), el análisis de heterodúplex, los métodos de escisión química o mediante RNA-asas, los oligonucleótidos específicos de alelo, la ligación y la detección de polimorfismos mediante la introducción de sitios de restricción artificiales¹¹. Esos estudios se han completado con los ensayos de cuantificación de rasgos (QTL), con experimentos de cruzamiento y con estudios de asociación y ligamiento con genes candidatos de obesidad a través de estudios epidemiológicos y genéticos^{4,12}. El número de genes probablemente implicados en la obesidad ha crecido notoriamente y se acerca a los 200, incluyendo las UCP's, ADR2, y ADR3, PPAR, AP2, POMC, MC4R, MC5R, y otros que pueden estar relacionados con el control de la ingesta, adipogénesis o gasto energético.

Una parte importante del conocimiento sobre la célula grasa y su función proviene de estudios *in vitro* con tejido adiposo¹³. Los adipocitos aislados han sido

muy estudiados por sus rápidas respuestas metabólicas. Se trata de un sistema ideal para estudiar transporte de metabolitos, así como mecanismos de la acción hormonal y de la respuesta farmacológica. Sin embargo, algunos estudios pueden no ser representativos de tejido adiposo completo. La preservación de la integridad celular depende de la eficacia del proceso de aislamiento. La recuperación de la población celular total a partir de tejido adiposo requiere atención, ya que las células grasas son frágiles y las de menor tamaño pueden perderse durante el aislamiento. Además, la salida de adenosina desde las células aisladas puede alterar algunos parámetros metabólicos (lipólisis, transporte de glucosa...). El mantenimiento de adipocitos humanos aislados es muy difícil por la fragilidad de las células, la alteración de la transducción de las señales hormonales, y la marcada disminución de la expresión de genes. Los explantes de tejido adiposo, que podrían mantener parcialmente la estructura del tejido *in vivo* y permitir su cultivo a largo plazo –aunque menos adecuados que las células grasas aisladas para los estudios de transporte y farmacológicos–, parecen ser adecuados para examinar *in vitro* algunas funciones de los adipocitos así como la regulación de la expresión génica.

La disipación de la energía como calor mediante la termogénesis adaptativa de las mitocondrias podría jugar un papel en el control del peso corporal. La termogenina o proteína desacoplante 1 (UCP1) pertenece a una familia de proteínas de la membrana interna de las mitocondrias capaces de desacoplar la cadena respiratoria de la síntesis de ATP¹⁴. La reciente identificación de nuevas UCPs, principalmente UCP2 (ampliamente expresada) y UCP3 (de tejido muscular preferentemente), ha atraído la atención sobre su posible papel, particularmente en humanos aunque no está aclarado¹⁵⁻¹⁷. Las vitaminas liposolubles, los ácidos grasos, y en particular los retinoides parecen estar implicados en la regulación de la expresión de UCP1, lo que ha sido objeto de considerable esfuerzo investigador^{18,19}.

ESTUDIOS EN ANIMALES

Los animales pequeños (principalmente ratas o ratones) son muy útiles en los estudios nutricionales y relacionados con obesidad. La utilización de jaulas metabólicas para el registro individual de la comida y bebida así como la recogida de heces y orina permite la determinación del balance de nutrientes y la determinación de la influencia de la dieta sobre el crecimiento y la composición corporal²⁰. Los ensayos experimentales que se han realizado a través de intervenciones dietéticas con diferente contenido de energía y macronutrientes, incluyendo la utilización de dietas altamente palatables –dieta de cafetería– para inducir sobrepeso proporcionan un modelo adecuado para el estudio de la regulación del peso corporal.

Por otro lado, el uso de roedores en los estudios metabólicos ha expandido las aproximaciones metodológicas ya que los animales pueden ser canulados bajo anestesia y usados para la determinación de las diferencias arterio-venosas en órganos clave y para la medida del flujo sanguíneo. Las variaciones circadianas de la temperatura pueden ser también medidas en diferentes tejidos por la implantación de sondas con termómetros y otros procedimientos.

Además, el uso de modelos animales (ratas o ratones) con fenotipos obesos o delgados sean por mutaciones congénitas (ratones *db/db* y *ob/ob* y ratas *fa/fa*) o bien resultado de la manipulación genética (animales *knockout* y transgénicos) de genes relacionados con el control del peso corporal, puede facilitar el estudio de diversos parámetros nutricionales o bioquímicos por comparación entre los animales obesos y delgados^{21,22}.

Las determinaciones de gasto energético mediante la medida del intercambio de gases (CO₂ y oxígeno) en roedores y otros animales constituye una herramienta muy valiosa para investigar los cambios a corto y largo plazo en el metabolismo de órganos (incluido el tejido graso). La composición corporal puede medirse por diferentes métodos químicos, electromagnéticos, ultrasonidos, etc.

Por otro lado, la utilización de substratos y su destino así como las rutas metabólicas pueden ser estudiadas mediante la utilización de isótopos estables o de trazadores marcados radiactivamente, de manera que se puede determinar el metabolismo energético, junto con la cinética y el recambio de nutrientes.

Finalmente, el papel de neuropéptidos o moléculas tales como CART, serotonina, leptina, orexinas, NPY, etc. implicados en la regulación del apetito y del metabolismo energético puede ser investigados mediante una administración convencional o esterotáctica, con métodos y equipos farmacológicos^{23,24}. Este área que estudia la influencia de las señales simpáticas y neuroendocrinas o del hipotálamo se ha beneficiado del uso de modelos animales apropiados²⁵⁻²⁷.

Búsqueda de genes diferencialmente expresados en modelos animales

El RNA *Fingerprinting* o *Differential Display* es una de las herramientas de la biología molecular disponibles para detectar la expresión diferencial de genes entre individuos, con obesidad frente a individuos delgados. El desarrollo de un modelo animal en rata con obesidad inducida por la dieta permite la comparación de diferentes tejidos (músculo esquelético, tejido graso, hígado) con objeto de identificar genes que pueden tener un papel decisivo en la etiología de la obesidad. Esta alternativa es más directa que otras previamente descritas como el screening diferencial o la hibridación subtractiva, y presenta importantes ventajas como el menor tamaño de muestra a utilizar, además de permitir una comparación de muchas muestras junto con la identificación simultánea de genes que puedan estar sobreexpresados o reprimidos.

El principal escollo de la técnica estriba en la aparición de falsos positivos lo que supone que el escrutinio cuidadoso de los clones debe ser absolutamente necesario antes de la identificación de cualquier secuencia. Para simplificar la tarea de desechar los falsos positivos se han propuesto diversas alternativas, aunque se requiere la confirmación por *Northern blot*

de la expresión como respuesta definitiva²⁸.

El RNA "*Fingerprinting* o *Differential Display*" se ha venido aplicando con éxito y ha dado resultado en la identificación de nuevos genes o se ha demostrado la implicación de genes ya caracterizados en nuevos procesos. Entre otras aplicaciones está la detección de genes nuevos en: la diferenciación de adipocitos²⁹, el tejido muscular y el hipotálamo de ratones obesos (*ob/ob*)³⁰, e incluso en modelos de ratones (estirpes OM y S5B/PI) con obesidad inducida por la dieta³¹.

Una tecnología alternativa y muy prometedora la constituyen los microarrays de oligonucleótidos (DNA chips) basados en hibridación y análisis lo que potencialmente permite el barrido rápido y no muy caro de todas las posibles mutaciones en DNA genómico o en la identificación de múltiples perfiles de expresión génica^{32,33}. Los avances tecnológicos de la década anterior han hecho posible la aplicación de esta tecnología en el estudio genético de las enfermedades.

Estrategias de transferencia genética en modelos animales

La tecnología de la transferencia de genes presenta la mayor dificultad en el desarrollo de vectores apropiados para una correcta penetración del gen junto con la expresión de cantidades relevantes del producto en tejidos específicos. En general, el vector ideal debe ser inyectable, dirigible a tejidos específicos *in vivo*, no inmunogénico, regulable y capaz de mantener la expresión a largo plazo.

En un intento por investigar los procesos implicados en la obesidad, se ha realizado la transferencia del cDNA de la leptina mediante vectores virales y no virales en ratones delgados y genéticamente obesos (*ob/ob*). Una sola inyección del gen de la leptina en el músculo tibial anterior de la rata elevó al doble los niveles de leptina circulantes y provocó una modesta reducción de la ingesta y de la ganancia de peso en ratones³⁴.

Además, el tratamiento de estos animales con un adenovirus que contiene el

cDNA de la leptina de ratón (AdRSV-leptina) consigue una reducción rápida de la ingesta y una importante pérdida de peso, lo que supone una corrección transitoria de la obesidad y de la diabetes; los niveles de leptina cayeron tras 2-3 semanas³⁵. Cuando se compara la eficacia de la inyección de proteína recombinante con la liberación de leptina mediada por adenovirus en el tratamiento de la obesidad³⁶, encuentran que hay una secreción crónica de leptina mediada por los adenovirus mientras que se produce la llegada de cantidades importantes de proteína de forma intermitente con una tasa de degradación alta.

Además, los estudios *in vivo* sugieren que el efecto es mejor cuando los niveles son bajos, pero mantenidos, que cuando hay picos de concentración. Sin embargo, la transferencia de genes mediada por adenovirus y su posterior expresión están limitados por la respuesta del sistema inmune que pueden originar tanto las proteínas virales como el transgén. Para disminuir estos efectos indeseables, se han desarrollado vectores dependientes de ayudas (HD) en los que se han destruido las secuencias que codifican proteínas virales. Estos vectores HD tienen una capacidad de inserto de 37 kb, se propagan fácilmente en sistemas basados en la recombinación con elementos de respuesta al cAMP (Cre) y pueden ser obtenidos a alta concentración y pureza. En contraposición está lo que sucede con los adenovirus de primera generación (Ad), que causan toxicidad hepática e inflamación e infiltración celular, y con la transferencia de genes en HD vectores mejora lo relativo a la seguridad y toxicidad³⁶. Su mayor seguridad, capacidad de inserto (tamaño) y eficiencia hace que los vectores HD sean útiles en aplicaciones clínicas de terapia génica.

Por otro lado, también se han construido virus recombinantes adeno-asociados con el cDNA de la leptina (rAAV) y sus efectos se han manifestado después de la inyección intramuscular a ratones *ob/ob*. En oposición a lo que sucedía con la terapia génica con adenovirus, los efectos relacionados con la pérdida de peso duraron 6 meses y la expresión de leptina se mantuvo durante 3-5 meses³⁷. La expresión de un

gen mediante la inyección de vectores rAAV aumenta gradualmente durante un periodo de 4-6 semanas, mientras que tras la transferencia con adenovirus se producía un pico que se extingue a las dos semanas, probablemente debido a la respuesta inmune a las proteínas del adenovirus. Los animales tratados con rAAV-leptina mostraron normalización de las alteraciones metabólicas incluyendo la hiperglucemia, la resistencia insulina, la intolerancia a la glucosa y el letargo; en ratones (*ob/ob*) suponía la corrección de la diabetes y la obesidad. En resumen, aunque la transferencia de genes en modelos animales de obesidad (monogénica) está en marcha, queda aún un largo recorrido hasta que podamos empezar a tratar por transferencia genética la obesidad poligénica.

ESTUDIOS EN HUMANOS

La metodología para el estudio de la regulación del peso corporal se debe basar en hipótesis bien diseñadas y debe ser fiable y específica, capaz de garantizar resultados definitivos.

Determinación del gasto energético y de la lipogénesis mediante isótopos estables

Gracias a su precisión, los métodos no invasivos basados en la utilización de isótopos estables son apropiados para el estudio del metabolismo energético³⁸. La técnica del agua doblemente marcada se desarrolló hace 50 años, aunque han tenido que pasar casi 40 hasta que se ha convertido en una herramienta de primera categoría en la investigación sobre la nutrición humana. Este método se ha aplicado extensamente en el estudio de la obesidad para determinar el papel del gasto energético y de la actividad física en el control del peso corporal; además supone un nuevo método de validación de la ingesta dietética³⁹.

El gasto energético esta regulado por factores neuroendocrinos y nutricionales que afectan al balance de macronutrientes⁴⁰. Así, el destino metabólico (acumulación) de lípidos, carbohidratos y proteínas puede ser medido *in vivo* e *in vitro* por métodos que permiten conocer la velocidad de los diferentes procesos metabóli-

cos (aspectos dinámicos), así como el balance neto que puede conducir al alargamiento o pérdida de tejido (aspectos estáticos). La cuantificación de la síntesis y degradación de nutrientes se puede llevar a cabo utilizando diferentes isótopos estables o trazadores de moléculas precursores. Como ejemplo, la síntesis de ácidos grasos se puede medir a través de una infusión intravenosa de ^{13}C acetato y por la aplicación de la técnica del Análisis de Distribución de Masas de Isótopos (MIDA)⁴¹. Este método se basa en el análisis de probabilidad para medir la síntesis de polímeros biológicos, y depende del principio matemático de que el patrón de marcaje de un polímero de nueva síntesis a partir de un precursor marcado con un isótopo estable se realiza de forma predictiva, según una distribución binomial o multibinomial.

El enriquecimiento actual en isótopo se mide por espectrofotometría de masas mediante cromatografía de gases (GCMS). Este método supone que las moléculas de nueva síntesis (marcadas) y la ya sintetizadas (sin marcar) se mezclen en el hígado y pueden acceder a las lipoproteínas del plasma (VLDL) durante el periodo de infusión del isótopo. También se asume que la mayoría de ácidos grasos nuevos procede de otros existentes mediante procesos de elongación y/o desaturación. Finalmente, señalar que el acetato marcado con el isótopo infundido no debe tener efecto fisiológico alguno. Esta metodología puede utilizarse para estimar la lipogénesis en diferentes estados nutricionales o fisiopatológicos como diabetes, obesidad, etc.^{42,43}. Otras moléculas traza y diseños pueden ser muy adecuados para cuantificar el recambio de nutrientes (oxidación, depósito, etc.), la jerarquía de oxidación de nutrientes, el balance de macronutrientes, las interacciones de glucosa y ácidos grasos, o la conservación del peso corporal^{44,45}.

Medida de la composición corporal

En los últimos años hay un interés renovado por conocer los componentes individuales del peso corporal, lo que ha conducido al desarrollo de metodologías

apropiadas para estimar el destino de los nutrientes tanto en estudios epidemiológicos a gran escala como a nivel de medida de la distribución de los diferentes compartimentos del organismo, tejidos graso, muscular, etc. Estos métodos han sido ampliamente revisados⁴⁶.

Estudios precisos de composición corporal son esenciales en una serie de áreas para:

- Definir los patrones de referencia de composición corporal durante el crecimiento y desarrollo.
- Definir la relación entre composición corporal-distribución de grasa y expectativas de salud a largo plazo.
- Determinar las diferencias de composición corporal entre individuos o en respuesta a diferentes manipulaciones con vistas a descifrar los mecanismos que regulan la distribución corporal de nutrientes ("*nutrient partitioning*").
- Evaluar el impacto de intervenciones tanto agudas como crónicas sobre la masa grasa corporal tanto en estudios de experimentación como de comunidad.

Para estudios epidemiológicos el énfasis está en que los métodos sean capaces de clasificar a los individuos con precisión y reduciendo al mínimo el error del observador. Aquí los esfuerzos van encaminados a lograr métodos simples, baratos y más prácticos. Para los estudios metabólicos más detallados el problema está, no sólo en los métodos, sino en los modelos usados en el cálculo de la composición corporal. Las técnicas clásicas bi-compartamentales que dividen el cuerpo humano en tejido graso y tejido libre de grasa están siendo reemplazadas por modelos de 4 compartimentos en función de los componentes: agua, hueso, grasa y proteína, distinguiendo incluso sub-compartimentos⁴⁷.

Por desgracia, todavía incluso el método o modelo más adecuado no tiene suficiente sensibilidad o especificidad para alcanzar conclusiones definitivas en algunos estudios de investigación. Incluso los llamados "métodos de referencia" como la densitometría, la medida del agua corporal total o la absorptometría de rayos X son

incapaces de estimar la grasa corporal con un error de ± 1 kg y los "métodos de campo", como la medida del grosor de pliegues cutáneos, o la bioimpedancia eléctrica, pueden considerarse peores⁴⁸.

Sin embargo, los cambios en la composición corporal pueden medirse más adecuadamente mediante la determinación clásica del balance energético. Utilizando medidas continuas de balance de substratos con la ayuda de un calorímetro de cuerpo total, la ingesta y el gasto energético se pueden medir con una precisión de ± 9 g/d grasa y 20 g/d carbohidratos⁴⁹. De acuerdo con lo anterior es posible examinar con esos métodos el posible impacto de una variedad de intervenciones en periodos cortos y en grupos de sujetos pequeños⁵⁰. A pesar de las limitaciones, la aplicación cuidadosa de la metodología existente para medir la composición del peso corporal *in vivo*, y el desarrollo de nuevos métodos, incluidas las técnicas de imagen⁵¹ dirigidas a cuestiones específicas de investigación, serán un elemento crítico para la comprensión de la regulación del peso corporal.

Estrategias para investigar la función del tejido graso corporal

El tejido adiposo es un órgano metabólico heterogéneo⁵². Hay diferentes técnicas disponibles *in vivo* e *in vitro*, con distintas ventajas y limitaciones para investigar varios aspectos del metabolismo del tejido adiposo. Los métodos traza utilizando glicerol o ácidos grasos marcados con isótopos estables o radioactivos permiten la evaluación de la velocidad de las rutas metabólicas del organismo en general, aunque es necesario utilizar modelos compartimentales complejos, que reflejen mejor los acontecimientos fisiológicos, aun cuando no dan información sobre el metabolismo de las diversas localizaciones de tejido graso. La medida de las diferencias de concentración arterio-venosa en el tejido adiposo subcutáneo en combinación con la medida de flujo sanguíneo permiten calcular la entrada y salida de metabolitos o de cualquier otra sustancia exógena.

En sujetos humanos, una nueva técnica se ha desarrollado recientemente para cuantificar el recambio de substratos en tejido graso abdominal subcutáneo *in vivo* mediante la canulación de la vena superficial epigástrica izquierda y la obtención de muestras de la sangre venosa del tejido adiposo⁵³. Este método relativamente difícil y laborioso sólo puede utilizarse en los depósitos de grasa subcutánea del hombre. La técnica de microdiálisis es un método *in vivo* prometedor que posibilita la manipulación y toma continua de muestra de los espacios intersticiales del tejido graso sin modificar la funcionalidad del resto del organismo¹³. Se obtienen medidas de la concentración de una sustancia concreta en el espacio intersticial que permiten una información continuada gracias a la manipulación local de moléculas pequeñas solubles en agua que fácilmente atraviesan la membrana de diálisis (el valor medio de paso a través de la membrana es de 20.000 moléculas). Es posible estimar la concentración real de una sustancia en el espacio extracelular del tejido adiposo cuando se utiliza una técnica de calibración que determina la velocidad de recuperación de la sonda de diálisis (dependiendo de su longitud y velocidad de perfusión). También se puede estimar indirectamente el flujo sanguíneo local a través de la microdiálisis⁵⁴.

Regulación de la expresión *in vivo* de genes de músculo y tejido adiposo

A pesar de la existencia de sistemas de regulación del peso corporal y adaptación al entorno ambiental, ciertos factores relacionados con el estilo de vida como la alimentación, o con el estado fisiopatológico como la obesidad, pueden alterar la expresión génica⁵⁵. En algunos procesos patológicos como la obesidad o la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) aparecen deficiencias en la regulación de algunos genes que podrían explicar las variaciones en las respuestas inter-individuales a diversas dietas o la aparición incluso de la obesidad. Sin embargo, el estudio de la regulación de genes en humanos se ha visto limitado por la dificultad de

acceder a los distintos tejidos. El desarrollo de micro-métodos como el PCR competitivo proporciona la posibilidad de medir concentraciones de RNA en muestras de tejido muy pequeñas que pueden obtenerse de forma inocua⁵⁶. Así pues, se utilizan ensayos específicos para la cuantificación en los tejidos diana de diversos genes, relacionados con las vías de señalización de la insulina: receptor de la insulina (IR), el substrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) o la fosfoinositol quinasa 3 (PI3K); con el metabolismo de la glucosa: el transportador Glut 4, la glucógeno sintetasa, la hexoquinasa II; con el metabolismo de lípidos, la lipasa sensible a hormonas (HSL), la lipoproteín lipasa (LPL), la leptina u otras moléculas reguladoras: factor de necrosis tumoral α (TNF α), factor inhibidor del activador del plasminógeno I (PAI-1), proteína desacoplante 2 (UCP2), etc.

En este contexto, el efecto de la infusión de insulina, de la restricción energética y de la infusión de lípidos se ha estudiado en sujetos controles y en pacientes obesos o con NIIDM sometidos a biopsias musculares (vastus lateral 60-80 mg) o de tejido adiposo periumbilical antes y después de la intervención con objeto de cuantificar los cambios en la expresión génica. Se encontraron deficiencias en la regulación de los genes de la PI3 quinasa, HSL, UCP2, que pueden ayudar a explicar, en parte la patofisiología de la NIDDM^{57,58}.

Otros genes potencialmente implicados en la termogénesis en humanos: UCP's, receptores β 3 adrenérgicos (ADRB3), el coactivador del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ 1 (PPAR γ), Coactivador 1 (PGC-1) y en la diferenciación de adipocitos (PPAR γ) o la proteína de unión a ácidos grasos (aP2) han sido identificados recientemente y están siendo estudiados.

Nuevas estrategias se están desarrollando, combinando estudios en humanos *in vivo* con sistemas *in vitro*⁵⁹, para profundizar en el estudio de los mecanismos de regulación del peso corporal y de la obesidad^{60,61}, debido a la enorme importancia que revisten tanto en el campo de la nutrición clínica como en el ámbito de la salud pública, ya que la prevalencia del sobrepe-

so/obesidad está creciendo de forma alarmante en los distintos países⁶².

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado parcialmente por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra a través de un proyecto concedido y también con ayudas de la Universidad de Navarra (Línea Especial Nutrición-Obesidad). Se agradece el trabajo mecanográfico realizado por Dña. Maryluz Morcillo.

BIBLIOGRAFÍA

1. TRAYHURN P. Molecular biology and nutrition: the quest for integration. *Br J Nutr* 1998; 80: 305-306.
2. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN J M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
3. TRAYHURN P, HOGGARD N, MERCER JG, RAYNER DV. Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes* 1999; 23: 22-28.
4. PERUSSE L, CHAGNON YC, WEISNAGEL J, RANKINEN T, SNYDER E, SANDS J et al. The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res* 2001; 9: 135-165.
5. JAMES WPT, RALPH A. New understanding in obesity research. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 385-393.
6. MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD P, SOOS MA, RAU H, WAREHAMS NJ et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-908.
7. CLÉMENT K, VAISSE C, LAHLOU N, CABROL S, PELLOUX V, CASSUTO D et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401.
8. STROBEL A, ISSAD T, CAMOIN L, OZATA M, STROSBER AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Gen* 1998; 9: 213-215.
9. HESKETH JE, PARTRIDGE K. Gene cloning: studies of nutritional regulation of expression. *Proc Nutr Soc* 1996; 55: 575-581.
10. CLARKE SD, SOOJA KK. Molecular methodologies in nutrition research. *J Nutr* 1998; 128: 2036-2037.
11. BEAUDET AL. Genetics and Disease. En: *The Principles of Internal AS Fauci, E Braunwald, KJ Isselbacher, JD Wilson, JB Martin, SL*

- Hauser and DL Longo, editors. New York: McGraw-Hill 1998; 365-395.
12. WILLETT WC. Is dietary fat a major determinant of body fat? *J Physiol Biochem* 1999; 55: 123.
 13. LAFONTAN M, ARNER P. Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends-Pharmacol Sci* 1996; 17: 309-313.
 14. NICHOLLS DG, LOCKE RM. Thermogenic mechanism in brown fat. *Physiol Rev* 1984; 64: 1-64.
 15. SCHRAUWEN P, WALDER K, RAVUSSIN E. Human uncoupling proteins and obesity. *Obes Res* 1999; 7: 97-105.
 16. MARTI A, LARRARTE E, NOVO FJ, GARCIA M, MARTINEZ JA. UCP2 muscle gene transfer modifies mitochondrial membrane potential. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 68-74.
 17. MARGARETO J, MARTI A, MARTINEZ JA. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 130-137.
 18. PUIGSERVER P, VÁZQUEZ F, BONET ML, PICO C, PALOU A. *In vitro* and *in vivo* induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 1996; 317: 827-833.
 19. BONET ML, PUIGSERVER P, SERRA F, RIBOT J, VÁZQUEZ F, PICO C et al. Retinoic acid modulates retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels of cultured brown adipocytes. *FEBS Letters* 1997; 406: 196-200.
 20. ESTEVE M, RAFECAS I, REMESAR X, ALEMANY M. Nitrogen balance of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet. *Int J Obes* 1992; 16: 237-244.
 21. CLOSA D, ALEMANY M, REMESAR X. Effect of cold exposure on organ temperatures in Wistar and Zucker fa/fa rat. *J Therm Biol* 1992; 17: 83-88.
 22. DOCHERTY K. Transgenic animals. *Proc Nutr Soc* 1996; 55: 613-618.
 23. SCHWARTZ MW, BASKIN DG, KAYALE KS, WOODS SC. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous System. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 584-596.
 24. MARGARETO J, GÓMEZ-AMBROSI J, MARTI A, MARTÍNEZ JA. Time-dependent effects of a high-energy-yielding diet on the regulation of specific white adipose tissue genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 6-11.
 25. BRAY GA. Afferent signals regulating food intake. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 105.
 26. WEBBER J, MACDONALD I. Signalling in body weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 124.
 27. WILLIAMS G, HAROLD JA, JUN CAI X, CUTLER DJ. Hypothalamic control of energy balance. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 104.
 28. LIANG P, PARDEE AB. Differential display. A general protocol. *Mol Biotech* 1998; 10: 261-267.
 29. HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 71: 10697-10703.
 30. VICENT D, PIPER M, GAMMELTOFT S, MARATOS-FLIER E, KAHN CR. Alterations in skeletal muscle gene expression of ob/ob mice by mRNA differential display. *Diabetes* 1998; 47: 1451-1458.
 31. LIN X, BRAYMER HD, BRAY GA, YORK DA. Differential expression of insulin receptor tyrosine kinase inhibitor (fetuin) gene in a model of diet-induced obesity. *Life Sci* 1998; 63: 145-153.
 32. HACIA JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetics* 1999; 21: 42-47.
 33. MORENO-ALIAGA MJ, MARTI A, GARCÍA-FONCILLAS J, MARTÍNEZ JA. DNA hybridization arrays: a powerful technology for obesity research. *Br J Nutr* 2001; 86: 119-122.
 34. MARTI A, NOVO FJ, MARTINEZ-ANSO E, ZARATIEGUI M, AGUADO M, MARTINEZ JA. Leptin Gene Transfer into Muscle Increases Lipolysis and Oxygen Consumption in White Fat Tissue in *ob/ob* Mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 246: 859-862.
 35. MUZZIN P, EISENSMITH RC, COPELAND KC, WOO SL. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14804-14808.
 36. MORSY MA, GU MC, ZHAO JZ, HOLDER DJ, ROGERS IT, POUCH WJ et al. Leptin gene therapy and daily protein administration: a comparative study in the *ob/ob* mice. *Gene Therapy* 1998; 5: 8-18.
 37. MORSY MA, GU MC, MOTZEL S, ZHAO Z, LIN J, SU Q et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7866-7871.

38. DIAZ EO, MARQUES-LOPES I. Measurement of energy expenditure. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 102.
39. SCHOELLER DA. Recent advances from application of doubly labeled water to measurement of human energy expenditure. *J Nutr* 1999; 129: 1765-1768.
40. TAPPY L, SCHWARZ JM, SCHNEITER P, CAYEUX C, REVELLY JP, FAGERQUIST CK et al. Effects of isoenergetic glucose-based or lipid-based parenteral nutrition on glucose metabolism, de novo lipogenesis, and respiratory gas exchanges in critically ill patients. *Critical Care Med* 1998; 26: 860-867.
41. HELLERSTEIN MK, SCHWARTZ, JM, NEESE A. Regulation of hepatic *de novo* lipogenesis in humans. *Ann Rev Nutr* 1996; 16: 523-557.
42. MARTÍNEZ JA, MARTI A. Metabolismo lipídico y lipogénesis: aplicación de isótopos estables. *Rev Medicina* 1998; 42: 91-98.
43. HELLERSTEIN MK. De novo lipogenesis in human: and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 53-65.
44. JECQUIER E, TAPPY L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 1999; 79: 451-480.
45. SCHUTZ Y. Body weight balance and regulation: role of substrate utilization and thermogenesis. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 128.
46. JEBB SA. Measurement of body composition - from the laboratory to the clinic-. En: *Clinical Obesity* P Koppelman, M Stock, editors. London: Blackwell 1998; 18-49.
47. FULLER NJ, MURGATROYD D, GOLBERG GR, PRENTICE AM, COWARD WA. Four compartment model for the assesment of body composition in humans: comparison with alternative methods and evaluation of the density and hydration of fat free mass. *Clin Science* 1992; 82: 687-693.
48. JEBB SA, COLE TJ, DOMAN D, MURGATROYD PR, PRENTICE AM. Evaluation of the novel Tanita body-fat analyser to measure body composition by comparison with a four-compartment model. *Br J Nutr* 2000; 83:115-83122.
49. JEBB SA, MURGATROYD PR, GOLBERG GR, PRENTICE AM, COWARD WA. *In vivo* measurement of changes in body composition: description of methods and their validation against 12-d continuous whole-body calorimetry. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 455-462.
50. POPPIT SD, MURGATROYD PR, TANISH KR, PRENTICE AM. Effect of dexfenfluramine on energy and macronutrient balance on high-fat and low-fat diets. *Int J Obes* 1997; 21: 197.
51. SJOSTROM LA. A computer-tomography based multi-compartment body composition technique and anthropometric predictions of lean body mass, total and subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes* 1991; 15: 19-30.
52. HAVEL PJ. Signals from adipose tissue: regulation of leptin production and energy balance. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 106.
53. FRAYN KN, COPPACK SW, HUMPHREYS SM. Subcutaneous adipose tissue metabolism studied by local catheterization. *Int J Obes* 1993; 17: 18-21.
54. GALITZKY J, LAFONTAN M, NORDENSTROM J, ARNER P. Role of vascular alpha-2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J Clin Invest* 1993; 91: 1997-2003.
55. LEAN MEJ. The pathophysiology of obesity. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 114.
56. AUBOEUF D, RIEUSSET J, FAJAS L, VALLIER P, FRERING V, RIOU JP et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 48: 1319-1327.
57. LAVILLE M, AUBOEUF D, KHALFALLAH Y, VEGA N, RIOU JP, VIDAL H. Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J Clin Invest* 1996; 98: 43-49.
58. ANDREELLI F, LAVILLE M, DUCLUZEAU PH, VEGA N, VALLIER P, KHALFALLAH Y et al. Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 1999; 42: 358-364.
59. YANOVSKI JA, YANOVSKI SZ. Recent advances in basic obesity research. *J Am Med Ass* 1999; 282: 1054-1506.
60. MARTINEZ JA. Body weight regulation: causes of obesity. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 100.
61. MARTI A, MIGUEL C, JEBB SA, LAFONTAN M, LAVILLE M, PALOU A et al. Methodological approaches to assess body-weight regulation and aetiology of obesity. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 405-411.
62. PI-SUNYER FX. Obesity: Criteria and classification. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 121.