



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

EFFECTOS DE LA NICOTINA EN EL BALANCE ENERGÉTICO Y POSIBLE PAPEL DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK).

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Enero 2019

Autor: Bogdan Grygoriv

Modalidad: Artículos científicos SCI.

Tutor/es: Juan Antonio Reig Macia



Índice:

Resumen y objetivos:	4
Introducción:.....	5
PARTE 1: HOMEOSTASIS DE LA AMPK:.....	5
PARTE 2: LA NICOTINA. EFECTO EN EL METABOLISMO Y RELACIÓN CON LA AMPK:.....	13
PARTE 3: SUSTANCIAS NATURALES Y SINTÉTICAS COMO MODULADORES DE LA ACTIVIDAD AMPK:.....	23
Discusión:.....	27
Fuentes bibliográficas:	31



Resumen y objetivos:

Este trabajo trata de explicar, a partir de dos artículos concretos y de una manera divulgativa, el posible papel que puede tener la AMPK sobre los efectos de la nicotina y el balance energético, y por lo tanto las derivadas farmacológicas que conllevaría para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo-2 en el futuro. La primera publicación, de Science, (2011), realiza experimentos neurofisiológicos y de biología molecular en ratones, concluyendo que la nicotina actúa específicamente a través de receptores $\alpha 3\beta 4$ promoviendo señales anorexigénicas en el hipotálamo y la consecuente pérdida de peso. El segundo trabajo, Diabetes (2012), de una mayor índole bioquímica, analiza el efecto de la nicotina desde una perspectiva más general, demostrando que dicho efecto puede parcialmente ser mediado por la defosforilación e inhibición de la AMPK que paralelamente activaría la expresión de péptidos anorexigénicos inhibiendo a la vez la expresión de péptidos orexigénicos en hipotálamo. Estos efectos de la nicotina son antagonizados por un activador no específico de la AMPK, el AICAR, o la sobreexpresión de la AMPK, demostrando la relación entre nicotina y AMPK. La nicotina puede actuar además en el cerebro, de forma directa o indirecta vía AMPK, a nivel del sistema nervioso simpático, promoviendo liberación de noradrenalina y activación en tejido adiposo marrón de la lipólisis y expresión de la UNC-1, derivando en gasto energético por termogénesis inducida. Estos estudios permiten suponer la existencia de dianas moleculares farmacológicas que modifiquen el balance energético y por tanto representen utilidad en el tratamiento de la obesidad y diabetes tipo-2. Se nombran algunas sustancias naturales que tienen efectos sobre la AMPK como una base de partida de investigaciones futuras junto a compuestos como el A-769662, que actúa como un potente activador de la enzima. De mismo modo se menciona el uso del antagonista nicotínico $\alpha 4\beta 2$ vareniclina, utilizado como soporte hacia los que desean dejar de fumar, cuya modificación podría resultar en antagonistas más selectivos capaces de representar una alternativa a las moléculas con acción directa sobre la AMPK dentro de estas posibles dianas moleculares farmacológicas en el abordaje de patologías metabólicas como la obesidad.

Introducción:

Actualmente, las patologías de índole metabólica como la obesidad o la diabetes tipo II suponen un problema cada vez mayor en el mundo desarrollado. Por ello, todo esfuerzo encaminado a la investigación de los mecanismos implicados en este tipo de alteraciones con el objetivo de obtener unos conocimientos a partir de los que poder diseñar nuevas posibles terapias se hace cada vez más crucial.

Uno de los elementos que toman parte en la regulación del metabolismo energético es la AMPK. Este trabajo pretende presentar a modo de divulgación algunos de los datos y conclusiones de mayor relevancia que se han obtenido a partir de una serie de estudios sobre esta enzima. En concreto, se tratará la información relativa a su papel en la homeostasis del organismo, el efecto de la nicotina en el apetito y peso junto a la posible relación que estos guardan con la AMPK y las sustancias y compuestos capaces de influir en su actividad desde el punto de vista de la obesidad.

PARTE 1: HOMEOSTASIS DE LA AMPK:

Esta primera parte está destinada a dar una visión de los aspectos más generales de esta enzima como son su estructura, su función general, los mecanismos implicados en su regulación, su función como mediador tanto a nivel de tejidos periféricos como hipotalámico y su posible relevancia como diana farmacológica.

Estructura y regulación de la AMPK:

Así pues, en cuanto a la estructura de la enzima, se trata de un heterotrímero formado por una subunidad catalítica alfa y dos subunidades beta y gamma reguladoras, cuyo complejo resultante forma una quinasa con dominio serina/treonina. Cada subunidad tiene genes que codifican para 2 versiones en caso de alfa y beta y 3 versiones para gamma. De este modo, hay 12 combinaciones resultantes que forman la enzima. Además, alfa cuenta con dominios N-terminal y C-terminal que fijan la unión con beta y gamma, mientras

que beta solo cuenta con C-terminales para la unión con las otras dos. La figura mostrada a continuación presenta visualmente la estructura de la enzima:

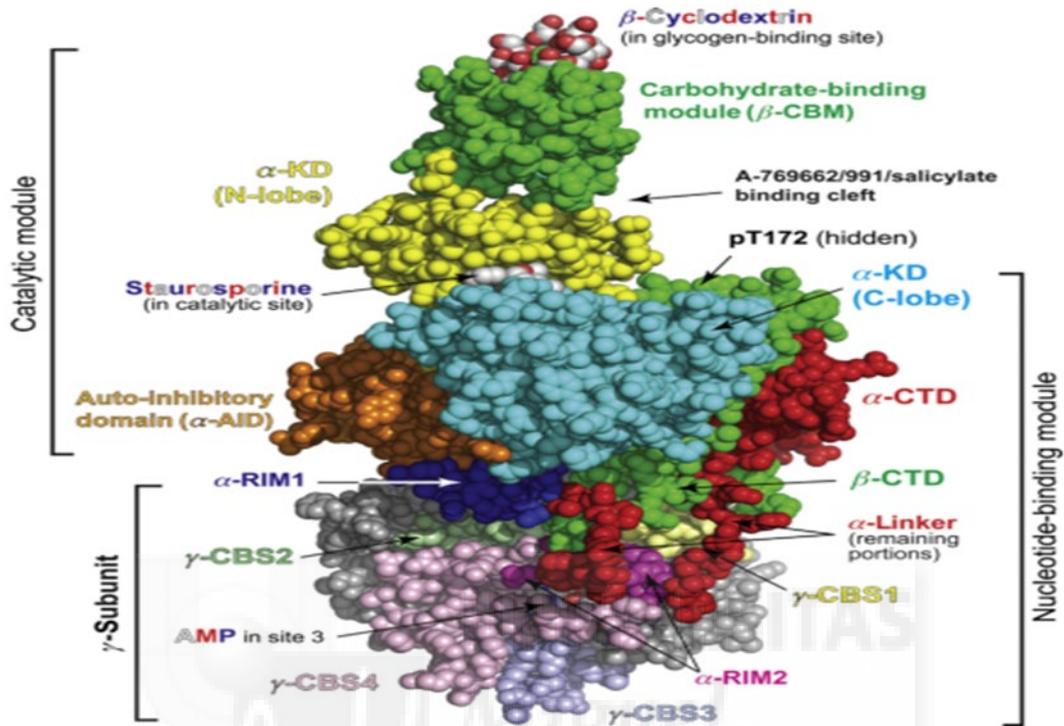


Figura 1: Representación molecular de la estructura de la AMPK, concretamente de un heterotrímero $\alpha1\beta2\gamma1$.

Una vez vista su estructura, hay que entender su papel general en la homeostasis, que no es otro que la regulación del balance energético celular, y como se ha demostrado en últimas evidencias, también corporal. La relevancia fisiológica de este nuevo papel de AMPK se demuestra por el hecho de que el deterioro de su función está asociado con alteraciones metabólicas tales como resistencia a la insulina, obesidad o trastornos hormonales y cardiovasculares, patologías cuya alta presencia mundial son un impulso hacia la investigación de nuevos posibles tratamientos. Entrando en detalle, la AMPK hipotalámica se activa en condiciones de falta de energía como mecanismo compensatorio para su balance. Esto supone un ahorro por medio del aumento de la ingesta y la disminución del gasto ya sea desactivando rutas anabólicas o por mediación del sistema nervioso autónomo simpático disminuyendo la termogénesis en el

tejido adiposo marrón. Debido a esto se puede establecer que es un indicador maestro de energía del organismo.

Su regulación comprende varios mecanismos que median su activación o inhibición, suponiendo los efectos comentados anteriormente. Estos mecanismos se rigen por los ratios AMP/ATP y ADP/ATP, cuyos aumentos suponen desequilibrio energético en forma de disminución de la energía y con ello, la activación de la AMPK para preservarla, disminuyendo el anabolismo y aumentando los procesos catabólicos. La adenilato quinasa participa en el restablecimiento de este equilibrio ($2ADP \leftrightarrow ATP + AMP$).

Más en profundidad, atendiendo a los mecanismos en sí, la proteína es activada por fosforilación por cascada de quinasas superiores como LKB1, la CaMKK α/β o el AMP principalmente, y por otros como TAK1. Mecanismos adicionales participan en su inactivación, como la proteína fosfatasa 2C alfa (PP2C α) encargada de desfosforilar la quinasa. La enzima está activa tras la fosforilación dentro del bucle del dominio de quinasa de la subunidad α , concretamente en el residuo Thr172 (treonina). En cuanto a los mecanismos de cada uno, el activador primario es la quinasa supresora de tumores hepática (LKB1), que forma un complejo con el adaptador relacionado con la pseudoquinasa STE20 "STRAD" y la proteína matricial de ratón 25 "MO25", donde la unión de AMP puede desencadenar tanto la fosforilación como la desfosforilación mediadas por este complejo. Otro mecanismo es la quinasa dependiente de calmodulina CaMKK β , que actúa promoviendo la liberación de Ca²⁺ intracelular vía inositol-trifosfato (IP3) como respuesta a hormonas y mediadores. La quinasa transformante del factor de crecimiento beta activado (TAK1) también es otro mecanismo de activación, aunque no está muy estudiado. Por último, el AMP actúa a tres niveles a la hora de activar la enzima: la activa alostéricamente al unirse al sitio de unión de nucleótidos con gran afinidad por AMP, promueve la fosforilación en Thr172 por LKB1 y protege de la desfosforilación por fosfatasas, siendo estos últimos dos también impulsados por ADP, aunque de forma menos potente comparada con AMP. La figura 2 recapitula los mecanismos implicados en la activación de la AMPK expuestos:

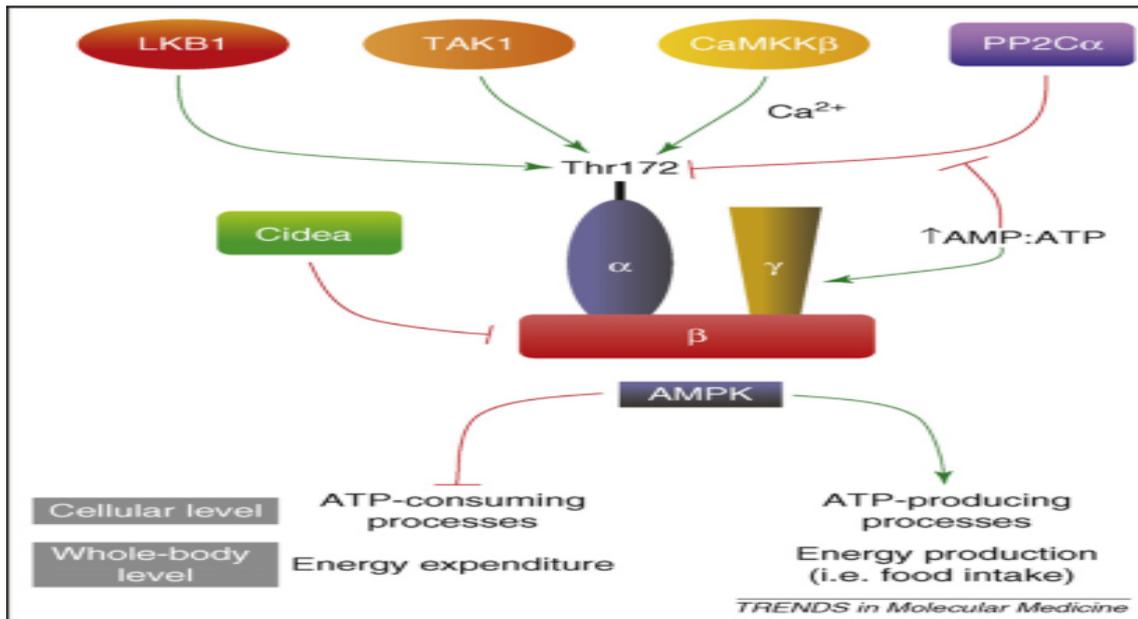


Figura 2: Vías de regulación de la actividad AMPK. LKB1, TAK1 y CaMKK β fosforilan el residuo de treonina 172 en la subunidad α . PP2C α bloquea la fosforilación. AMP se une al sitio de unión en la subunidad β además de bloquear la desfosforilación. La activación de AMPK supone producción de ATP celular y producción de energía a nivel del organismo.

Efectos generales sobre la homeostasis:

Tras quedar expuestos los mecanismos de regulación sobre la AMPK y las condiciones en las que se produce cada uno, hay que prestar atención a sus funciones como mediador metabólico, tanto a nivel periférico como a nivel del sistema nervioso central en el hipotálamo:

A nivel de los tejidos periféricos la AMPK basa su función en la máxima de corregir el desequilibrio energético, resultando en un aumento del catabolismo para producir ATP y la disminución de su consumo. Algunos de sus efectos más estudiados ocurren a nivel hepático, donde ejerce su influencia sobre el metabolismo de lípidos y glucosa.

Metabolismo lipídico: Activa la malonilCoA descarboxilasa e inhibe la acetil-CoA Carboxilasa (ACC) por fosforilación reduciendo los niveles de malonilCoA y favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos respectivamente al tiempo que disminuye la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS), inhibiendo así su

síntesis. Además, inhibe la síntesis de colesterol en los hepatocitos inactivando simultáneamente la ACC y la HMG-CoA.

Metabolismo de la glucosa: La contracción muscular supone una translocación del GLUT4 mediada por AMPK que conlleva la entrada de glucosa a la célula, además de contribuir a la oxidación de ácidos grasos. De un modo similar regula la gluconeogénesis hepática inhibiendo la transcripción de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6asa), observándose en roedores LKB1KD intolerancia a la glucosa e hiperglicemia rápidamente inducida debido a la incapacidad de la AMPK de cesar la actividad de las enzimas antes nombradas. Por último, la AMPK fosforila la glucógeno sintetasa (GS) reduciendo así la formación de glucógeno.

La AMPK no solo regula estas rutas metabólicas sino que también actúa como mediador de los efectos de distintas hormonas y sustratos producto de tejidos periféricos que son también destinados a la regulación metabólica. Algunas de estas a modo de ejemplo pueden ser la leptina, adipocina que participa en el control de la ingesta y el gasto energético: la AMPK α 2 del músculo esquelético es estimulada por la administración de leptina periférica, lo que conlleva a los efectos en el músculo esquelético antes nombrados. La adiponectina (Adpn) es una molécula sensibilizadora de glucosa secretada por el adipocito. Supone la fosforilación de la AMPK hepática y muscular, produciendo efectos caracterizados por el aumento de captación de glucosa y de la sensibilidad a la insulina, oxidación de ácidos grasos y reducción de la producción hepática de glucosa. Además, otro efecto es la inhibición de las señales hipertróficas cardíacas también mediada por la AMPK. La resistina (RSTN) por su parte, es una hormona adipocitaria con efecto contrario a la Adpn. Disminuye la activación de la AMPK hepática, lo que explicaría los efectos de hiperglicemia y resistencia a la insulina sobre el metabolismo de la glucosa. Algunos de los efectos más relevantes a nivel periférico se muestran en la figura 3.

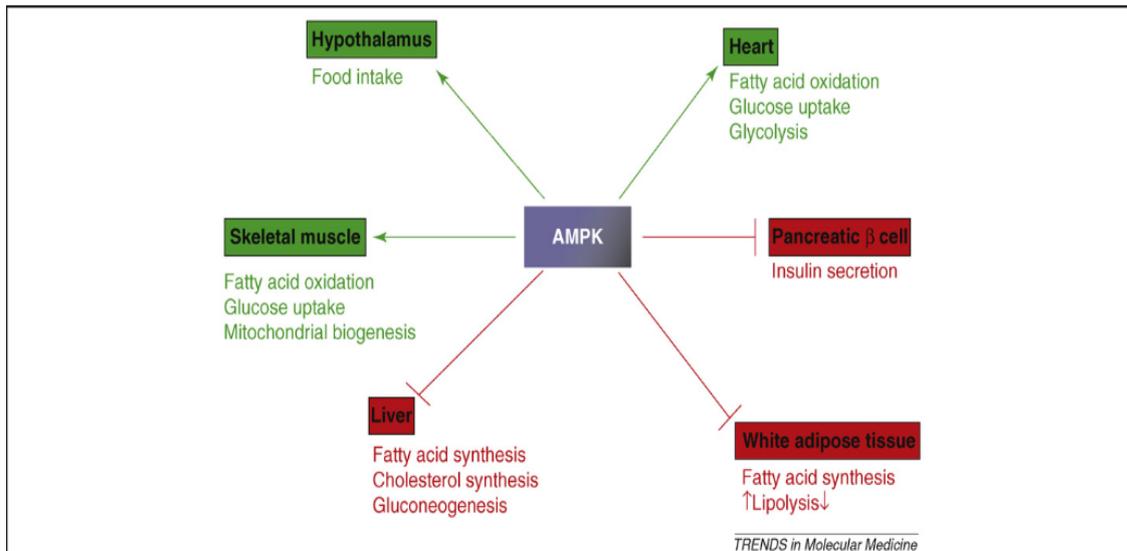


Figura 3: Efectos mediados por la AMPK en diferentes tejidos periféricos. Las flechas rojas representan la inhibición del consumo de ATP mientras que las flechas verdes indican un estímulo en su producción.

El hipotálamo como centro regulador del balance energético:

Una vez presentado el protagonismo de la AMPK como mediador de efectos a nivel periférico, es conveniente exponer su relevancia en los efectos a nivel del sistema nervioso central. Para poder entender la relación de los efectos de la AMPK central es necesario conocer el funcionamiento del hipotálamo, estructura en la que la AMPK ejerce su acción, en la regulación del balance energético.

Los núcleos hipotalámicos responden a los nutrientes y hormonas modificando la expresión de neurotransmisores específicos y neuromoduladores, lo que resulta en cambios en la ingesta y el gasto energético. El núcleo arqueado (ARC) es considerado como el "maestro" para el control de la alimentación. Dos estirpes neuronales distintas integran las señales periféricas de nutrición y alimentación en el ARC. Un conjunto de neuronas expresa señales orexigénicas propulsando la alimentación, como son los neuropéptidos relacionados con la proteína aglutinadora (AgRP) o el neuropéptido Y (NPY). Una segunda población de neuronas en el ARC expresa las señales anorexigénicas que acarrear inhibición de la alimentación: productos de proopiomelanocortina (POMC), el precursor de la hormona estimulante de

melanocitos (α -MSH) y el transcrito regulador de anfetamina y cocaína (CART). Estas poblaciones neuronales proyectan sus terminales axónicos en regiones del SNC que terminan originando las sensaciones de apetito o saciedad que influyen en definitiva el peso y el balance energético. Las neuronas hipotalámicas responden a señales periféricas, como glucosa, leptina, grelina, adiponectina, resistina e insulina, modificando la síntesis de estos neuropéptidos. Cuando la ingesta de energía supera el gasto, la expresión de neuropéptidos orexigénicos, como AgRP y NPY disminuye. A la inversa, la expresión de neuropéptidos anorexígenos, como CART y POMC, aumenta. La figura 4 representa estos conceptos:

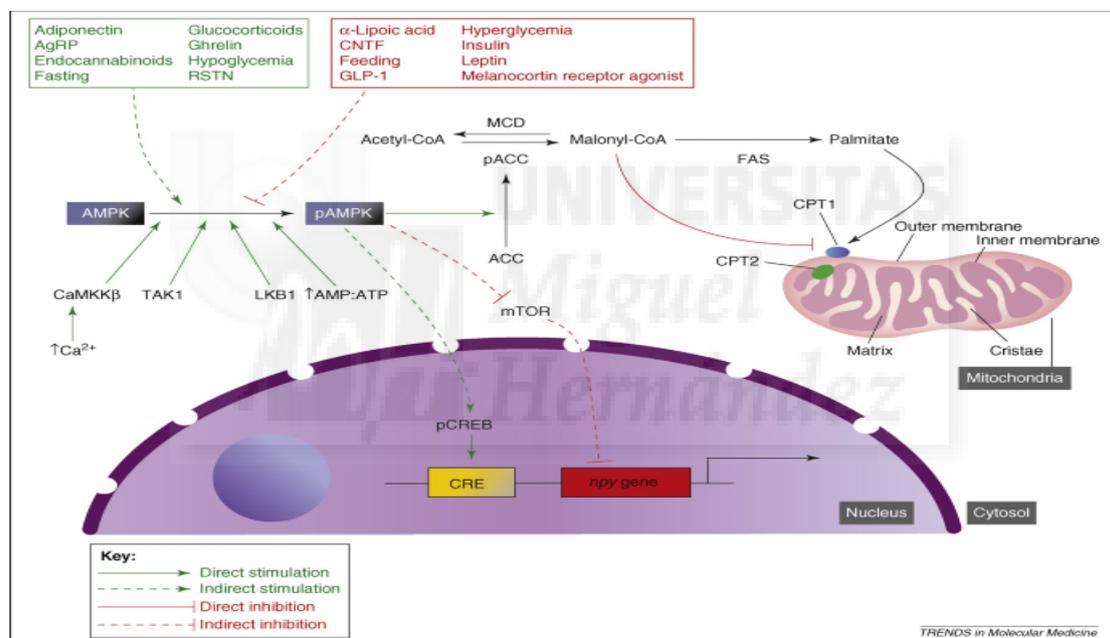


Figura 4: Papel de la AMPK en el hipotálamo. Señales positivas de balance energético (cuadro rojo) representan abundancia de energía e inhiben la fosforilación de la AMPK mientras que las señales negativas (cuadro verde) que suponen falta de energía la activan mediante la modulación de los componentes de la vía de su regulación. Estas señales son procesadas derivando en eventos metabólicos o la transcripción génica de los neuromoduladores orexigénicos o anorexígenos, lo que finalmente desemboca en estimulación o inhibición de la ingesta alimentaria.

El hipotálamo en la homeostasis de la AMPK:

Vista la estructura hipotalámica y sus mecanismos en el balance energético es posible introducir el rol de la AMPK a nivel central por medio del hipotálamo: AMPK actúa en las neuronas hipotalámicas, vinculando el estado metabólico a sistemas clásicos de neuropéptidos y neurotransmisores, que en última instancia regulan la alimentación a través de la modulación del apetito. La activación hipotalámica supone aumento de la ingesta y ganancia de peso mientras que su inhibición conduce a los efectos inversos. La AMPK es capaz de inhibir la ACC (por fosforilación) y disminuir la expresión de la FAS, que suponen una disminución de malonil-CoA, desembocando en un aumento de la ingesta al estimular la carnitina-palmitoil transferasa (CPT1). Este eje media las señales de regulación de ingesta tanto periféricas como centrales. Las señales anoréxicas inhiben la AMPK hipotalámica aumentando la actividad ACC. Por el contrario, señales orexígenas activan la AMPK. También es regulada por nutrientes y metabolitos intermedios, como sucede por ejemplo con su supresión al administrar glucosa vía central. Está demostrado que estas alteraciones hormonales/nutricionales se correlacionan con cambios en los neuropéptidos y mediadores presentes en los núcleos hipotalámicos.

Como breve introducción a la implicación de la AMPK hipotalámica que se desarrolla más adelante en el siguiente apartado del trabajo, las neuronas anorexigénicas son inhibidoras del apetito y producen POMC y α -MSH y las orexigénicas que promueven el apetito expresan los neuropéptidos AgRP y NPY.

Homeostasis de la AMPK. Conclusiones:

Vista la implicación de la AMPK en la homeostasis, es lógico pensar que representa un campo de estudio para el desarrollo de moduladores que supongan la posibilidad de adaptar sus funciones a las necesidades de determinadas alteraciones. Un ejemplo es la metformina, antidiabético oral capaz de fosforilar la AMPK en el Thr172. Las tiazolidionas también modulan la AMPK para promover su efecto de aumento de sensibilidad a la insulina. En resumen, los datos fisiológicos, farmacológicos y genéticos claramente

demuestran que manipulando la actividad de AMPK y sus quinasas de la cascada superior LKB1 y CaMKK β en diferentes tejidos se tiene un profundo impacto en la alimentación, el peso corporal, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en roedores y humanos. Esto unido a que la reducción de la actividad AMPK ha dado lugar a trastornos hace pensar que la AMPK tiene un papel crítico en la regulación del balance energético a nivel de todo el cuerpo, abriendo vías para futuras intervenciones terapéuticas no solo para la resistencia a la insulina, obesidad y trastornos relacionados, sino también para alteraciones de la alimentación y metabólicas asociadas a enfermedad.

PARTE 2: LA NICOTINA. EFECTO EN EL METABOLISMO Y RELACIÓN CON LA AMPK:

Esta segunda parte del trabajo trata de presentar el impacto de la nicotina en el balance energético del organismo. El tabaquismo representa un hábito nocivo cuyo mantenimiento o instauración es a menudo justificada por los fumadores con razones inherentes al control o la pérdida de peso. Dado que se ha visto una relación entre fumar y disminución del apetito y peso por la inducción de un balance energético negativo por parte de la nicotina, es importante indagar en la naturaleza de los mecanismos bioquímicos que acarrearán estos efectos para establecer unas bases que permitan en un futuro desarrollar terapias innovadoras para el tratamiento de la obesidad y otros trastornos metabólicos o incluso el cese tabáquico. A continuación se describen los fundamentos moleculares por los que se rige el efecto de la nicotina en el balance energético.

Efectos de la nicotina:

En primera instancia, hay que aclarar que estos efectos ocurren en el hipotálamo, que a través del núcleo arqueado y otros de sus núcleos regula procesos de ingesta, el gasto energético por termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) y el metabolismo de glucosa y lípidos en tejidos periféricos. La AMPK es un mediador de estos procesos. Como se ha postulado en el punto

anterior, la quinasa toma partido en las rutas de señales que generan en el hipotálamo la transcripción de neuropéptidos de carácter orexigénico o anorexigénico que conllevan en última instancia el efecto de saciedad o apetito. Una de las vías es la ruta anorexigénica de las POMC, donde se categorizó la capacidad de la nicotina de ejercer los efectos que se le atribuyen de reducción de peso por disminución de la ingesta a través de la modulación de la activación del receptor $\alpha 3\beta 4$. Los experimentos con los que se confirmaron estos hechos fueron los siguientes:

1.- Reducción del peso en presencia de nicotina

En el primer experimento se estudió la evolución del peso en ratones control tratados con suero salino y con agonistas nicotínicos: nicotina y citisina, un agonista puro del receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 3\beta 4$, presentes en las figuras 5 y 6:

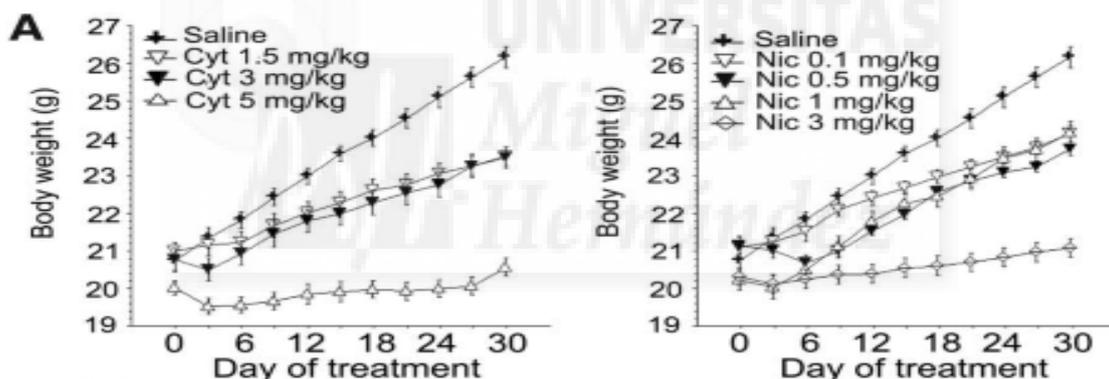


Figura 5: Gráfico comparativo entre la ganancia de peso tras administración de suero salino y citisina (izquierda) o nicotina (derecha) a distintas dosis. Se observa claramente una disminución del aumento de peso en el tiempo mayor en los sujetos que recibieron la sustancia activa, siendo más pronunciado este descenso a la mayor dosis administrada.

2.- Efecto en ratones control y Knockdown para el receptor $\alpha 3\beta 4$

En este experimento se utilizó un adenovirus para introducir en las cepas un RNA de silenciamiento que suprimiese la expresión del gen codificante de la subunidad $\beta 4$ del receptor hipotalámico nicotínico de acetilcolina $\alpha 3\beta 4$ para producir sujetos $\beta 4$ KD, con el objetivo de medir la variación de la ingesta tras la

posterior administración de agonista. El resultado es reflejado en la próxima figura:

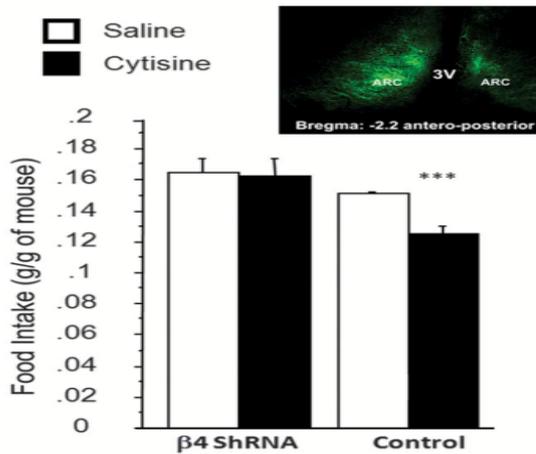


Figura 6: Gráfico que compara la variación en la ingesta tras administración de suero salino y citisina en el grupo control (receptor $\beta 4$ nativo) y en el grupo $\beta 4$ KD, donde se observa la incapacidad de la citisina de ejercer su efecto, derivando en un hábito de ingesta invariable respecto del grupo tratado con suero salino.

Efectos de la nicotina. Conclusiones:

La conclusión de estos dos experimentos significativos fue en primer lugar que el descenso del peso provocado por agonistas del receptor $\alpha 3\beta 4$ hipotalámico como la nicotina era real y en segundo lugar que el receptor de acetilcolina nicotínico hipotalámico $\alpha 3\beta 4$ es crucial para la activación de las POMC y con ello la liberación de melanocortinas, prohormonas que producen un estímulo de saciedad al actuar en los receptores paraventriculares hipotalámicos, derivando en disminución de la ingesta.

Para terminar de entender el mecanismo, la siguiente figura expone visualmente la activación de las POMC mediada por la nicotina:

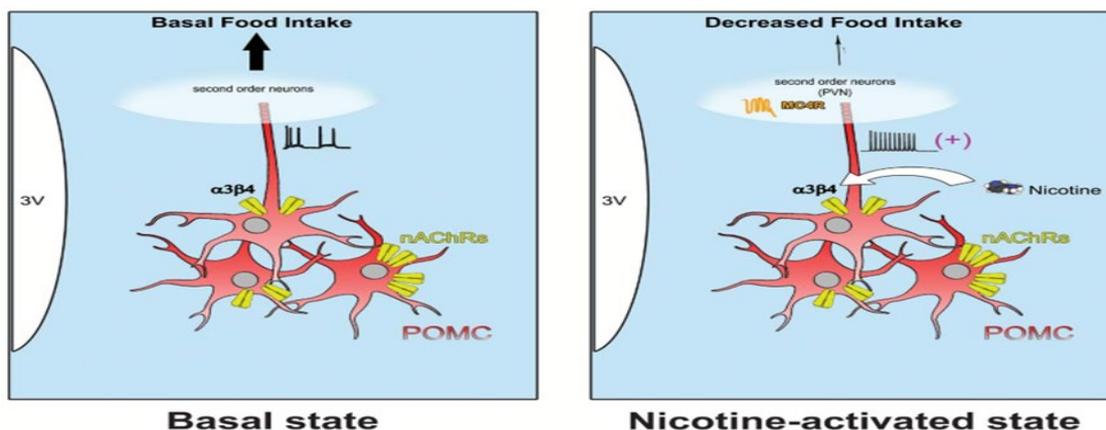


Figura 7: Activación de las neuronas POMC. Estado basal y estado activado por nicotina, en el que la interacción con el receptor $\alpha3\beta4$ supone eferencias hacia neuronas de segundo orden que finalizan en la liberación de melanocortinas, promoviendo estas en última instancia al unirse a sus receptores, el efecto de saciedad y su consiguiente reducción de la ingesta.

Papel de la AMPK en el efecto de la nicotina:

Visto el efecto hipotalámico por el que la nicotina lleva a cabo su acción en el balance energético, es importante aclarar la posible relación entre estos efectos y la AMPK. Se postula que el efecto de la nicotina se debe a la pérdida de peso por disminución de la fosforilación y por consiguiente inactivación de la AMPK hipotalámica, representando esto un descenso de las señales orexígenas como AgRP o NPY y aumento de las anorexígenas, como son la activación de las POMC comentada anteriormente, y además suponiendo un mayor gasto energético por aumento de actividad física y termogénesis del tejido adiposo pardo. Para confirmar esta teoría e indagar en los mecanismos que la integran se llevaron a cabo un conjunto de experimentos que se detallan en este apartado a partir de los que se pudo recabar evidencia acerca de esta relación.

1.-Evolución del peso y el balance energético en ratones alimentados en presencia de nicotina

En primer lugar se pudo ver una relación entre la variación del peso (en gramos) a las 24 y 48 horas, de los cambios en la ingesta (en gramos de

alimento) y del gasto energético basal (medido por un sistema de calorimetría que analiza la producción de CO₂ y el consumo de O₂) en roedores tratados con nicotina (por vía subcutánea) en comparación a los tratados con placebo en las siguientes figuras:

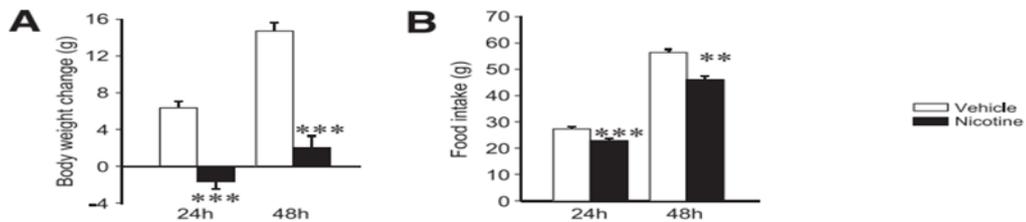


Figura 8: Diferencias en el peso corporal (A) e ingesta (B) entre el grupo control (barras blancas) y el grupo tratado con nicotina (barras negras). Se aprecia una disminución del peso y de la ingesta a las 24 y 48 horas de administrar nicotina.

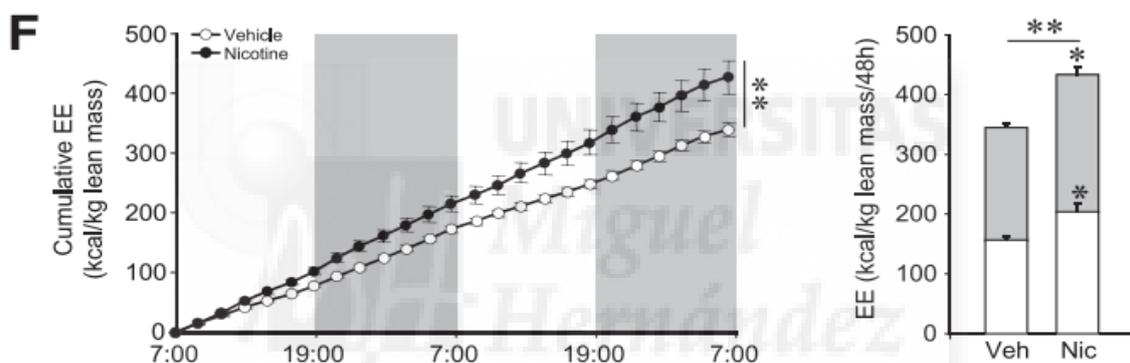


Figura 9: Gasto energético acumulado a lo largo del tiempo (izquierda) y a las 48 horas (derecha) en grupo control y grupo tratado con nicotina. Se observa un mayor gasto energético en el grupo de la nicotina.

2.-Expresión de neuropéptidos hipotalámicos en presencia de nicotina

Otro experimento consistió en medir la variación de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos inducida por el efecto de la nicotina para comprobar la forma en la que esta sustancia contribuía a la regulación de sus niveles. Se utilizaron oligonucleótidos específicos en la técnica de la hibridación in situ para detectar la presencia así como las secuencias mRNA de los neuropéptidos implicados en las secciones hipotalámicas en las que se hallan de manera natural. Los resultados fueron:

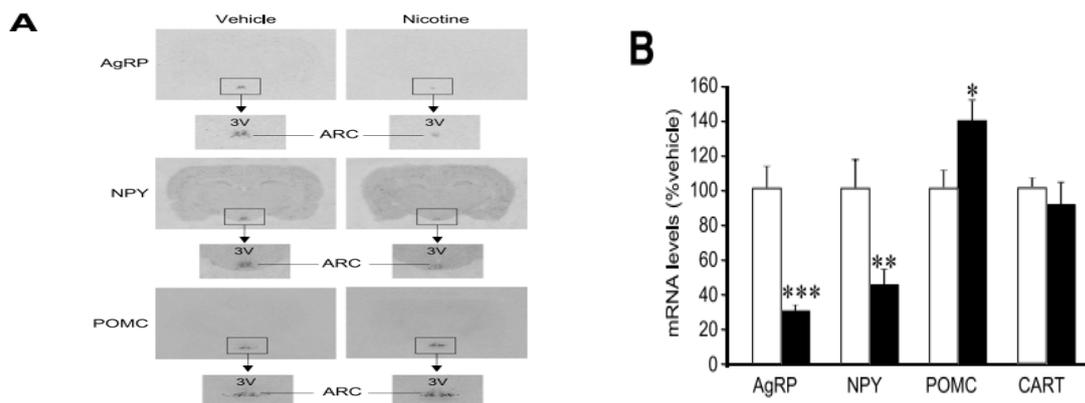


Figura 10: Expresión de neuropéptidos AgRP, NPY y POMC (A) y sus niveles de RNA mensajero (B) en sujetos tratados con vehículo (barras blancas) y nicotina (barras negras). Se puede denotar menor presencia de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY junto a una mayor presencia del anorexigénico POMC en el grupo al que se administró nicotina respecto del grupo control, tanto en A como en B.

3.-Efecto de la nicotina sobre la regulación de la AMPK

Aparte de los anteriores, se realizó otro experimento destinado a evaluar mediante *Western blot* el efecto de la nicotina sobre la fosforilación de AMPK y otras enzimas de su ruta:

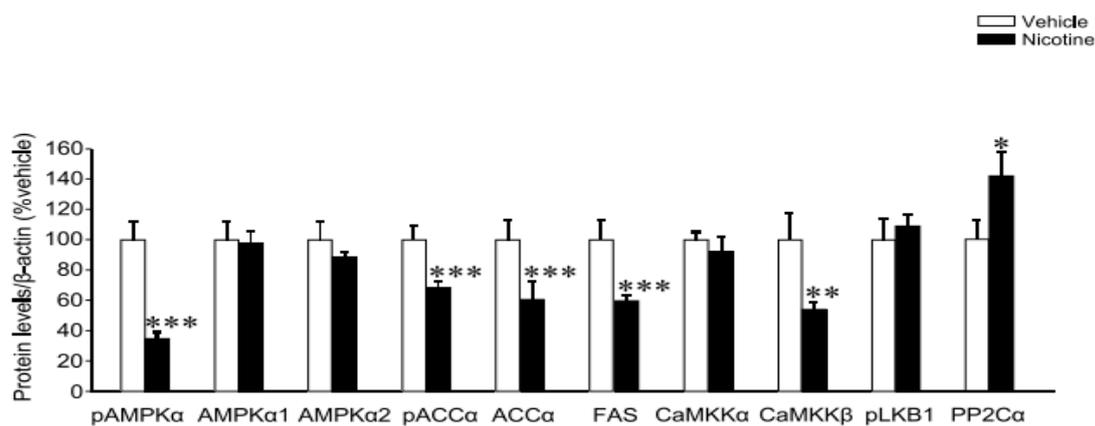


Figura 11: Niveles en la expresión de diferentes proteínas de la regulación de la AMPK al administrar vehículo (barra blanca) y nicotina (barra negra). Se aprecian menores niveles de AMPK α fosforilada, mayores niveles de PP2C α y menores niveles de enzimas fosforiladas sobre las que la AMPK efectúa su acción como FAS o ACC, por lo que se extrae que la administración de nicotina representa una disminución de la actividad de AMPK.

4.-Cambios en la temperatura corporal tras la administración de nicotina

También se pudo sacar a la luz, por imagen térmica, el efecto de la nicotina sobre la termogénesis del tejido adiposo pardo (BAT):

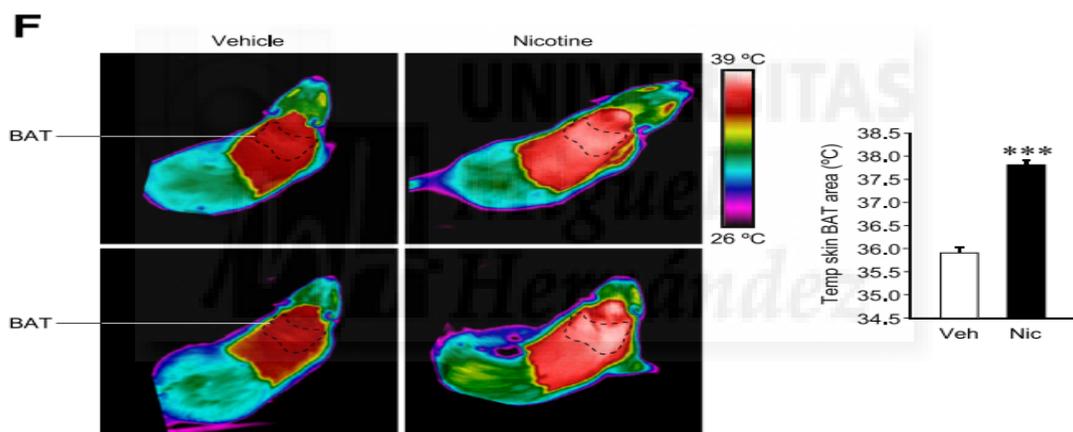


Figura 12: Comparación de la termogénesis en BAT tras administrar vehículo y nicotina en termografía y gráfico. Se observa una mayor temperatura (°C) del BAT tras administrar nicotina en comparación con el vehículo

5.-Efecto del antagonista mecamilamina sobre los receptores $\alpha 3\beta 4$

Para continuar con la investigación se planteó un experimento en el que se utilizó el antagonista específico nicotínico no competitivo mecamilamina para determinar si los efectos promovidos por la nicotina a través de la inhibición de la AMPK eran reversibles y por tanto, dependientes del receptor. Se hizo un seguimiento de los cambios en peso e ingesta a lo largo del tiempo en ratones

tratados con combinaciones vehículo-vehículo, vehículo-mecamilamina, nicotina-vehículo y nicotina-vehículo:

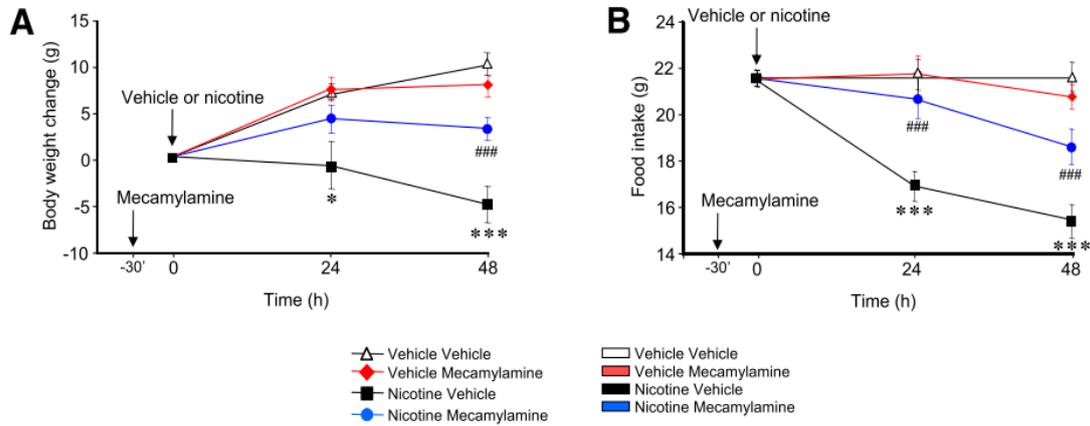


Figura 13: Cambio en el peso corporal (A) y la ingesta (B) en el tiempo en las combinaciones entre vehículo, nicotina y mecamilamina. Se demuestra que el efecto de la nicotina de disminución de la ingesta y consecuente aumento de peso es menos pronunciado tras el uso del antagonista, indicando que el efecto está mediado sobre la AMPK por los receptores hipotalámicos $\alpha3\beta4$ nicotínicos de acetilcolina.

6.-Efecto en la ingesta tras la reactivación de la AMPK con AICAR

Un experimento adicional fue dirigido hacia el uso del activador de la AMPK AICAR promoviendo la activación de la AMPK para comprobar si la hipofagia y la pérdida de peso inducidas por la nicotina estaban mediados por su inactivación. Primero se observó el efecto del AICAR aislado en vehículos y después se administró nicotina seguida de AICAR (por vía intraventricular) a los sujetos para evaluar la consecuencia del activador:

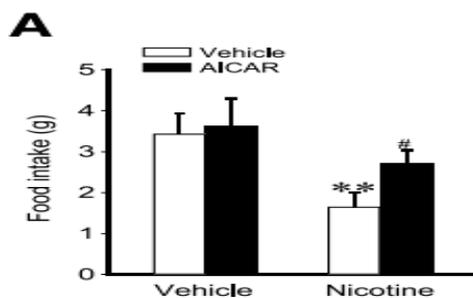
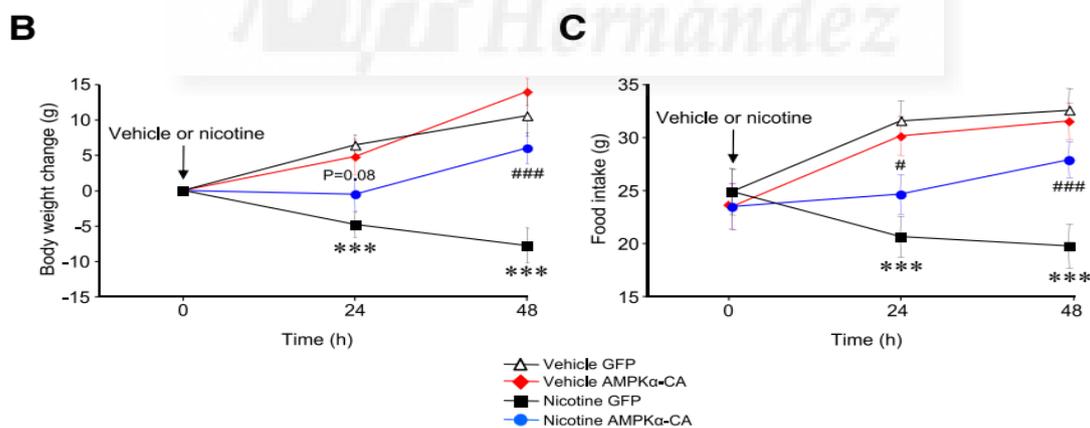


Figura 14: Variación de la ingesta tras administración de AICAR. Se observa aumento de la ingesta (en gramos) tras administrar el activador de AMPK en sujetos previamente tratados con el inhibidor nicotina, demostrando que la hipofagia es debida a la inactivación vía nicotina de la AMPK hipotalámica.

7.Resultados de la sobreexpresión de AMPK sobre los efectos inducidos por nicotina

Con el objetivo de terminar de establecer la evidencia que sitúe a la AMPK como integrante fundamental intermediario de los efectos de la nicotina, se realizó un último experimento destinado a medir los cambios en los efectos provocados por la nicotina al reactivar la quinasa. Para ello, se introdujeron a los ratones adenovirus cuyo contenido codificaba para una AMPK α constitutivamente activa con proteína fluorescente (GFP) (para la obtención de datos) o solamente la GFP en el caso de los controles. Se evaluó la evolución en los niveles de ingesta, peso, expresión de péptidos hipotalámicos y de marcadores de la termogénesis. Los resultados están plasmados en esta figura:



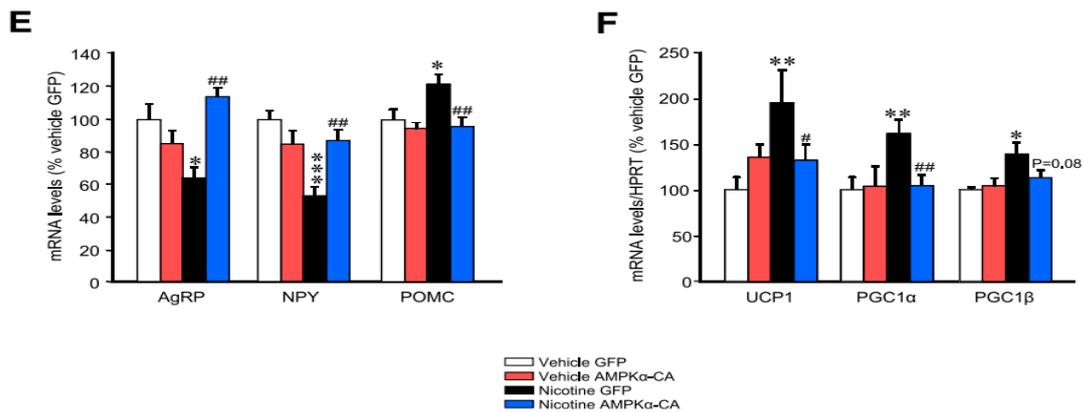


Figura 15: Cambio en el peso (en gramos) a lo largo del tiempo (A), de la ingesta (en gramos) (B), en los niveles de mRNA de los péptidos AgRP, NPY y POMC (E) y en los niveles de mRNA de los marcadores de la termogénesis (F) en los ratones control, con sobreexpresión de AMPKalfa, tratados con nicotina y tratados con nicotina a los que se indujo también la sobreexpresión de la quinasa. Entre los sujetos sin tratar y con sobreexpresión de la AMPKalfa no hay diferencias significativas en ninguno de los gráficos. La nicotina, como bien se demostró en otros experimentos, disminuye la ingesta, la ganancia de peso, los péptidos orexigénicos AgRP y NPY al tiempo que aumenta el anorexígeno POMC y eleva la expresión de marcadores termogénicos. Por último, la sobreexpresión AMPK tras administrar nicotina corrige significativamente los niveles que esta altera, haciendo su efecto sea más suave y tienda a recuperar su estado basal en el caso del aumento de ingesta y peso, revirtiendo los niveles de expresión de marcadores termogénicos hacia niveles similares a los basales y ejerciendo el efecto contrario producido por la nicotina sobre los neuropéptidos hipotalámicos. Estos resultados indican que la actividad de la AMPK es esencial a la hora de poder producirse los efectos de la nicotina, y que se deben a su acción antagonista sobre AMPK, ya que son revertidos con un aumento de la actividad enzimática lograda mediante su sobreexpresión.

Papel de la AMPK en el efecto de la nicotina. Conclusiones:

En definitiva, tras las investigaciones realizadas sobre la relación de los efectos a nivel central de la nicotina sobre el metabolismo corporal se pudo concluir que la nicotina perjudica la función de la AMPK hipotalámica suponiendo efectos de hipofagia, pérdida de peso y aumento de la termogénesis por el eje AMPK-BAT, y que los agonistas $\alpha 3\beta 4$ podrían ser eficaces para limitar la ganancia de peso tras cese tabáquico del mismo modo que los fármacos nicotínicos quizá sean capaces de presentar utilidad clínica para terapias de trastornos metabólicos en un futuro. Pese a ello, es necesaria una investigación continua sobre estos aspectos para descubrir si finalmente llegan a tener una relevancia en el ámbito terapéutico.

PARTE 3: SUSTANCIAS NATURALES Y SINTÉTICAS COMO MODULADORES DE LA ACTIVIDAD AMPK:

En la primera parte del trabajo se introdujeron algunas de las implicaciones de la AMPK a nivel de tejidos periféricos que resultan interesantes a la hora de plantear un posible desarrollo o uso de activadores de esta enzima con el objetivo de promover unos efectos de carácter terapéutico para algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes o la obesidad. En el punto anterior se ha visto como el desarrollo de fármacos cuya diana es la modulación inhibitoria del eje AMPK-BAT podría suponer un avance en el tratamiento tanto de la obesidad como del cese tabáquico. Esta última parte consiste en introducir brevemente algunas de las sustancias y compuestos con capacidad de modular la actividad AMPK y poner en evidencia las posibles aplicaciones que tiene o pueda tener el desarrollo o uso de estas moléculas activas en la clínica para el tratamiento de la obesidad.

Moduladores de la AMPK. Expectativas farmacológicas:

Con intención de complementar el trabajo con una visión práctica de la información aportada, se realizó una búsqueda en la base de datos *Medline* a través de *PubMed* sobre los posibles compuestos que muestran un posible

perfil terapéutico en el trastorno de la obesidad relacionado con la actividad AMPK. Esta búsqueda consistió en la combinación de los términos *AMPK*, *Obesity* y *Inhibitor* en los campos de "título/resumen". De los primeros 50 artículos ordenados por fecha más reciente de publicación obtenidos como resultado de la búsqueda, se extrajeron 5 a modo de ejemplo, a los que se añadió un compuesto sintético activador de la AMPK, el A-769662, y el principio activo vareniclina como sustancia comercializada cuyo mecanismo de acción está íntimamente relacionado con la AMPK. Los compuestos tratados así como las conclusiones de los artículos seleccionados se introducen a continuación:

En términos generales, la mayoría son compuestos naturales que se encuentran en plantas medicinales, presentes una buena parte de ellos en el herbolario asiático, mientras que los compuestos sintéticos, cuya síntesis es más compleja, no son tan abundantes.

Astilbe chinensis¹: *Astilbe chinensis* Franch. et savat. (AC) es una planta que forma parte de la medicina tradicional. Los extractos de CA disminuyeron drásticamente el contenido de lípidos de las células 3T3-L1 de una manera dependiente de la concentración sin citotoxicidad.

El extracto de AC aumentó la fosforilación mitocondrial de la AMPK y con ello de la ACC, la biogénesis mitocondrial y los factores relacionados con la lipólisis. En el modelo de la obesidad inducida por la dieta alta en grasa, los ratones a los que se les administró extracto de AC experimentaron una disminución significativa del 64% en el aumento de peso, 55% en el índice de resistencia a la insulina, 22% en los triglicéridos plasmáticos (TG), 56% en el colesterol total, y 21% en los niveles de ácido graso no esterificado en comparación con los de los ratones control alimentados con dieta alta en grasa. Estos resultados indicaron que el extracto de AC ejerció actividad antiobesogénica a través de la modulación de la vía de señalización de AMPK, la inhibición de la adipogénesis, la disminución del contenido de lípidos y la reducción del tamaño de los adipocitos. En la figura 16 se observa su acción a distintos ejes, siendo uno de ellos la activación de la AMPK.

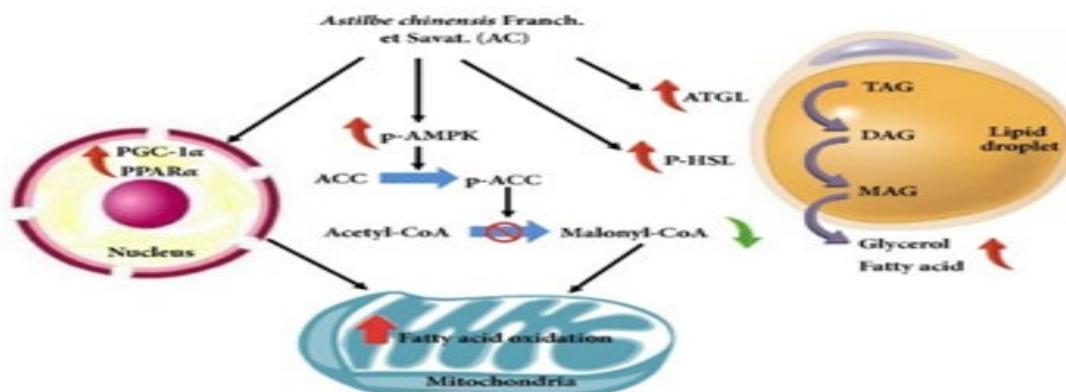


Figura 16: AC promueve la oxidación de ácidos grasos mediante un aumento de la fosforilación de la AMPK periférica.

Moringa oleífera²: El extracto de éter de petróleo de la hoja Moringa oleífera (MOPEE) inhibe la acumulación de grasa al inhibir la adipogénesis y promover la lipólisis, y este proceso está relacionado con la activación de AMPK. MOPEE suprime la adipogénesis en adipocitos 3T3-L1 de manera dosis dependiente. Además de disminuir la expresión de las proteínas asociadas a la adipogénesis, uno de los mecanismos fue el incremento significativo del grado de fosforilación de la AMPK α y la ACC. Entre otros efectos, en ratones con dieta alta en grasa, MOPEE disminuyó efectivamente el peso corporal; masa grasa del epidídimo, perirrenal y mesentérico y acumulación de grasa hepática. La figura 17 muestra sus efectos sobre la AMPK:

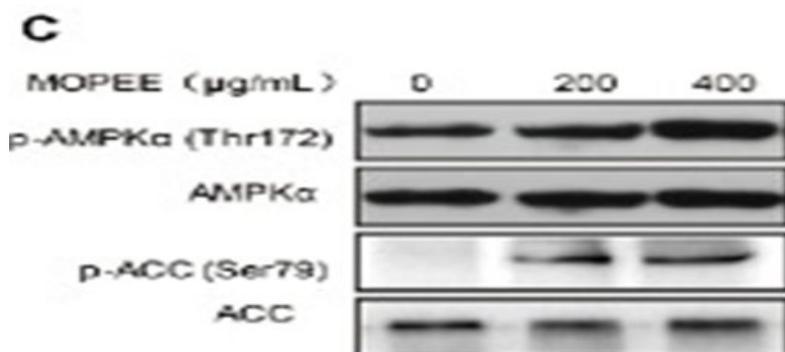


Figura 17: Efecto de MOPEE sobre la fosforilación de la AMPK. MOPEE denota una mayor fosforilación de AMPK y ACC a mayores dosis.

Xantohumol³: Otro compuesto, el chalcone prenilado, xantohumol (XN), induce la formación de adipocitos blancos “beige” (células especializadas en quemar grasa y disipar la energía en forma de calor), estimula la lipólisis e inhibe la adipogénesis de los adipocitos 3T3-L1 de murina y los preadipocitos subcutáneos humanos primarios, un conjunto de efectos mediados en parte por la activación de la vía de señalización de la AMPK.

Albiflorina⁴: La albiflorina (AF), un compuesto natural, podría contribuir a reducir el alto riesgo de obesidad con BAT y preadipocitos primarios pardos in vivo e in vitro.

En ratones obesos HFD, el tratamiento con AF redujo significativamente el aumento de peso corporal, así como el peso del tejido adiposo blanco, hígado y bazo. Además, en los adipocitos marrones primarios la AF estimuló eficazmente la expresión de los genes termogénicos y reguló notablemente la vía de señalización de la AMPK. Este estudio muestra que la AF evita el desarrollo de la obesidad en los ratones con dieta alta en grasas y que también es capaz de estimular la diferenciación de adipocitos marrones a través de la modulación de genes termogénicos por medio de la AMPK.

Narciclasina⁵: Otro compuesto natural, narciclasina (ncls), atenúa la obesidad inducida por la dieta (DIO) en ratones al promover el gasto de energía.

Ncls activa fuertemente la señalización AMPK específicamente en el músculo esquelético. Ncls aumenta la concentración de cAMP celular y la relación ADP / ATP, lo que conduce a la activación de la señalización AMPK, promoviendo un cambio de metabolismo glucolítico a oxidativo en las fibras musculares de los ratones DIO, resultando en respiración mitocondrial y oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético.

A-769662: Este compuesto representa un ejemplo sintético capaz de ejercer una acción agonista sobre la AMPK mediante unión alostérica a un sitio de unión distinto al del AMP. El compuesto ha demostrado tener efectos favorables en el metabolismo de un roedor con resistencia a la insulina una vez administrado como inyectable, dada su baja biodisponibilidad oral. Esta molécula podría suponer utilidad terapéutica pero el hecho de presentar efectos independientes no relacionados con la acción sobre AMPK y su pobre disponibilidad oral no se han realizado ensayos clínicos al respecto. A pesar de ello, representa un diferente mecanismo de acción para la modulación de la enzima sobre el que nuevas investigaciones hacia el diseño de análogos más perfeccionados sin efectos independientes a la AMPK puedan acarrear la aparición de moléculas terapéuticas en el campo de las patologías metabólicas susceptibles de tratamiento mediante regulación de la AMPK, como la diabetes o la obesidad.

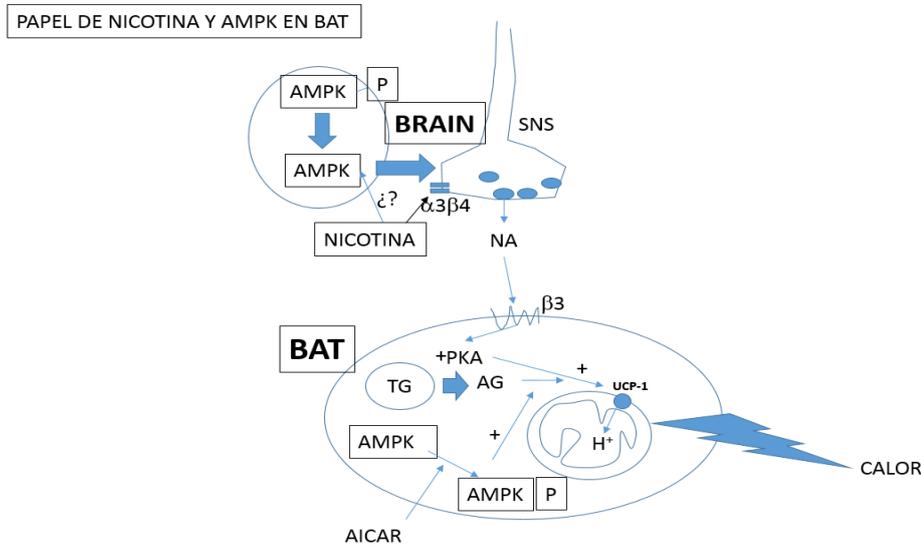
Vareniclina: Este principio activo cuya comercialización está aprobada bajo la indicación de cese tabáquico es un análogo de la nicotina agonista $\alpha 3\beta 4$, aunque más potente en $\alpha 4\beta 2$ y más eficiente en $\alpha 7$. A pesar de poseer solamente la indicación del tratamiento dirigido al cese del hábito tabáquico, la propuesta de sustancias como esta o análogos nicotínicos más selectivos hacia el receptor $\alpha 3\beta 4$ para un posible tratamiento de la obesidad por medio de la instauración de una ingesta alimentaria disminuida es intrigante. Se realizó una búsqueda en *Medline* vía *PubMed* similar a la de los compuestos anteriores con los términos “obesity” y “varenicline”, pero no se obtuvieron resultados de relevancia. Sin embargo, evidencias como las expuestas a lo largo de este trabajo sugieren que la investigación futura de la vareniclina como posible fármaco diana del tratamiento de la obesidad estaría justificada y podría conllevar un gran éxito.

Discusión:

Este apartado tiene como meta ofrecer una visión global de los aspectos más relevantes que se han sacado en claro a partir de los experimentos, datos y

en su estado activado y contribuyendo a la expresión de los anorexígenos en su estado inactivo, como sucede en el caso de las POMC. Esto se pudo probar al demostrar cómo los compuestos agonistas nicotínicos tales como la nicotina o la citisina se unen al receptor $\alpha 3\beta 4$ de acetilcolina hipotalámico mediante el que bloquean la actividad de la AMPK, derivando en señales de carácter anorexígeno como la activación de las POMC y con ello la posterior liberación de las melacortinas, que producen en última medida el estímulo de saciedad al unirse a sus debidos receptores. Se pudo relacionar el descenso de la ingesta alimentaria y consiguiente disminución de peso producto de los efectos de los neuropéptidos anorexígenos hipotalámicos, cuya expresión es inducida por un descenso de la actividad AMPK, con la unión de la nicotina al receptor. Aparte de esto, se consiguió confirmar el papel crucial de la quinasa como intermediario de la ruta al verse revertido el efecto de la nicotina en la ingesta tras la administración de un activador de la AMPK que aumentó su actividad, el AICAR, y al mismo tiempo, se reforzó este descubrimiento al inducir una sobreexpresión de la AMPK α hipotalámica constitutivamente funcional, produciendo una elevación de actividad enzimática que llevó a la corrección de los niveles de ingesta, al aumento de peso y al predominio de los neuropéptidos orexígenos sobre los anorexígenos, variables previamente alteradas por el definitivamente efecto inhibitor de la nicotina sobre la AMPK hipotalámica.

B. Papel de nicotina en BAT:



Este segundo esquema se detalla el proceso por el que la nicotina induce la termogénesis en el BAT y la implicación de la AMPK en ello.

La AMPK, como enzima reguladora del balance energético, responde a señales negativas de balance energético activándose para compensar la falta de energía a nivel corporal, promoviendo formación de energía y suprimiendo en la medida de lo posible su consumo, como sucede al disminuir la disipación de energía en forma de calor en el BAT.

La nicotina realiza su acción a dos niveles: bloquea la activación de la AMPK en el cerebro evitando de esta manera su acción supresora sobre la termogénesis, y por otro lado toma protagonismo desencadenando el proceso de termogénesis al actuar como agonista en el receptor $\alpha 3\beta 4$ de los nervios eferentes del sistema nervioso autónomo, provocando así la liberación de noradrenalina, que se une a su receptor de membrana celular suponiendo la activación de la UCP-1 y paralelamente la activación de la PKA, lo que conduce a la lipólisis de triglicéridos a ácidos grasos que finalmente promueve la entrada de electrones H^+ a la mitocondria, generando como efecto final energía disipada en forma de calor. La AMPK participa regulando el proceso tanto a nivel de BAT como hipotalámico. Al contrario que en hipotálamo, la AMPK en BAT contribuye a la generación de calor por termogénesis en su estado activo, algo que se visualizó al aumentar su actividad con el activador AICAR,

derivando en elevación de la lipólisis, un efecto característico de la AMPK en el tejido periférico. De forma paralela, la vinculación de la dependencia en este proceso de la AMPK hipotalámica fue demostrada al forzar la sobreexpresión de la enzima tras previa administración de nicotina, que condujo al restablecimiento de la alteración vía nicotina de los marcadores de termogénesis, concluyendo que el efecto está íntimamente relacionado con la inactivación de AMPK hipotalámica.

C.Conclusiones acerca de los compuestos moduladores de la actividad AMPK como posibles moléculas terapéuticas en el tratamiento de la obesidad:

Partiendo de los ejemplos nombrados en la tercera parte de este trabajo se puede llegar a la conclusión de que la AMPK representa una posible diana farmacológica para el tratamiento de una alteración metabólica en constante aumento en el mundo globalizado como es la obesidad. No obstante, salvo algunas excepciones puntuales como el precedente terapéutico de la vareniclina, la investigación destinada a los compuestos con capacidad de modular la AMPK no está lo suficientemente desarrollada como para aplicar estas sustancias con un fin clínico, siendo un campo de estudio que se encuentra en sus inicios en la actualidad en el que futuros descubrimientos deberán arrojar más claridad sobre las posibles aplicaciones terapéuticas de las sustancias tanto naturales como sintéticas que efectúen su acción sobre la actividad AMPK.

Fuentes bibliográficas:

La información utilizada para la confección de este manuscrito ha sido extraída de los 9 artículos siguientes:

Artículos base:

- Pablo B. Martínez de Morentin et al. Nicotine Induces Negative Energy Balance Through Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* 2012;61:807–17
- Yann S. Mineur et al. Nicotine Decreases Food Intake Through Activation of POMC Neurons. *Science* 2011;332:1330-2

Artículos extra. Información complementaria:

- David Grahame Hardie. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B* 2016;6(1):1–19
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.06.002>
- Ricardo Lage, Carlos Diéguez, Antonio Vidal-Puig, Miguel López. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*. 2008;14:12
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.007>

Referencias búsqueda bibliográfica:

1. Zhang XH, et al. Antiobesity Effect of *Astilbe chinensis* Franch. et Savet. Extract through Regulation of Adipogenesis and AMP-Activated Protein Kinase Pathways in 3T3-L1 Adipocyte and High-Fat Diet-Induced C57BL/6N Obese Mice. *eCAM* 2018;2018:1347612
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30622587>
2. Xie J et al. *Moringa oleifera* Leaf Petroleum Ether Extract Inhibits Lipogenesis by Activating the AMPK Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2018;9:1447
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30618744>
3. Samuels JS, Shashidharamurthy R, Rayalam S. Novel anti-obesity effects of beer hops compound xanthohumol: role of AMPK signaling pathway. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:42
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29946343>
4. Jeong MY et al. Albiflorin ameliorates obesity by inducing thermogenic genes via AMPK and PI3K/AKT in vivo and in vitro. *Metabolism*. 2017;73:85-99
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28732574>
5. Julien SG et al. Narciclasine attenuates diet-induced obesity by promoting oxidative metabolism in skeletal muscle. *PLoS Biol*. 2017;15:e1002597
Disponibile en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28207742>