

### Eje cerebro-intestinal: orexinas \*

ANA MARÍA PASCUAL-LEONE PASCUAL Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

### **RESUMEN**

El control de la conducta de comer o, lo que es lo mismo, el cierre o apertura del apetito, se realiza a nivel cerebral, y parece producirse por dos vías. Una de ellas permite la estabilidad del tejido graso periférico a largo plazo, ya que establece un equilibrio entre calorías ingeridas y energía gastada. En este proceso la hormona leptina, secretada por los adipocitos del tejido graso, o la insulina del páncreas, las cuales llegan al cerebro desde la periferia, tienen un papel fundamental. La otra vía regula la apertura del apetito a corto plazo en la iniciación y terminación de la ingesta, y el recientemente establecido eje peptinérgico cerebro-intestinal tiene un papel central.

Las orexinas, descubiertas en 1998 y secretadas en el hipotálamo lateral, así como en neuronas y células secretoras del intestino, estómago y páncreas, parecen tener un papel integrador de ambas vías, ya que están implicadas en el transporte al cerebro de las respuestas intestinales.

Palabras clave: Balance energético.— Eje cerebro-intestinal.— Orexinas.

### **ABSTRACT**

### Brain-intestines axis: orexins

The control of feeding behaviour or, in other words, onset and ending of appetite, takes place at brain level in two different pathways. One of the pathways ensures a long term stability of the peripheric adipose tissue throughout a balance between caloric intake and energy expenditure. There are two hormones that may

<sup>\*</sup> Conferencia impartida el 13 de mayo de 2004.

access brain tissue from blood and play a crucial role in this process, leptin, secreted by adipocytes from the white adipose tissue, and insulin, secreted by the endocrine pancreas. The other pathway regulates the short term onset of appetite and end of food intake and, on this pathway, the recently reported peptinergic brain-intestines axis plays a central role.

Orexins, first reported in 1998 and secreted by the lateral hypothalamus, neurons and secretory cells from intestines, stomach and pancreas, seem to play a role in the integration of both pathway since they are involved in transferring the intestinal responses to the brain.

**Keys words:** Energy balance.— Brain-intestines axis.— Orexins.

### **EXTENSIVE ABSTRACT**

The control of feeding behaviour or, in other words, onset and ending of appetite, takes place at brain level in two different pathways. One of the pathways ensures a long term stability of the peripheric adipose tissue throughout a balance between caloric intake and energy expenditure. There are two hormones that may access brain tissue from blood and play a crucial role in this process, leptin, secreted by adipocytes from the white adipose tissue, and insulin, secreted by the endocrine pancreas. The other pathway regulates the short term onset of appetite and end of food intake and, on this pathway, the recently reported peptinergic brain-intestines axis plays a central role.

Orexins, first reported in 1998 and secreted by the lateral hypothalamus, neurons and secretory cells from intestines, stomach and páncreas, seem to play a role in the integration of both pathways since they are involved in transferring the intestinal responses to the brain. These responses, both hormonal and mechanical, are generated by the enteric nervous system to face changes in pH, peristaltism and composition of the digestive mass. Furthermore, brain orexins seem to regulate important homeostatic processes such as the sleep/awake rhythm and energy homeostasis. Orexins may exert these actions because, although they are secreted in restricted brain areas (perifornical, lateral and dorsal hypothalamus) the proyections of the nervous axons are very extended to very different parts of the neuroaxis, such as olfatory bulbs, cerebral cortex, anterior and posterior hypothalamus, brainstem and all levels of the spinal cord. Short term control of appetite seems to be the most primitive system conserved through evolution; orexin structure is similar in amphibian than in mammals. However, its high degree of conservation seems the result of their fundamental role in the integration of important homeostatic processes for the organic balance.

### 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la regulación en los mamíferos del balance energético ha conducido en los últimos años al establecimiento, a nivel cerebral, de un sistema adispostático, a largo plazo, el cual permite conservar estable, durante largos períodos de tiempo, la materia grasa periférica y el peso corporal. El estudio de la regulación de la homeostasis energética, que ha estado siempre unido al estudio de la obesidad patológica, llevó a descubrir la existencia de los núcleos hipotalámicos implicados en la apertura y cierre del apetito, así como al descubrimiento de redes neuronales secretoras de sustancias orexigénicas que abren el apetito de forma dosis-respuesta una vez invectadas, o sustancias anorexigénicas, que cierran el apetito. Estas sustancias son, fundamentalmente, secretadas en el núcleo arcuato hipotalámico. Y, finalmente, estos estudios condujeron, en 1994, al descubrimiento de una hormona, la leptina, que es el producto del gen ob de los adipocitos del tejido graso. Sus receptores específicos, así como los de la insulina, están ampliamente distribuidos en el núcleo arcuato hipotalámico al cual llega la leptina, o la insulina, desde la periferia, por transcitosis o por líquido cefalorraquídeo.

La leptina y la insulina tienen una gran correlación positiva, y ambas ocupan un lugar central en las regulaciones cerebrales del balance energético a largo plazo. La leptina guarda, a su vez, una alta correlación positiva con la materia grasa periférica, así que su llegada en cantidad alta al cerebro le comunica un estado de saciedad, anorexigénico, estimulando mecanismos y rutas cerebrales que cierran el apetito. De todo ello hablamos el año pasado (1). También expusimos que, en principio, se pensó que la leptina era la hormona antiobesidad, pero actualmente es conocido que no puede ser utilizada como tal por sus muchas acciones, las cuales han sido descubiertas los últimos años. Dichas acciones están sintetizadas en la Tabla 1. Además, también es conocido el hecho de que los obesos que tienen mucha leptina circulante, porque tienen mucha materia grasa, presentan resistencia a ella.

Sin embargo, el descubrimiento de la leptina ha venido a aclarar cómo llega el cerebro a tener conocimiento de la situación periférica, y según ello abre o cierra el apetito en colaboración con sustancias orexigénicas o anorexigénicas secretadas en el hipotálamo (1).

Pero en dicha exposición anterior obviamos hablar de todos los neuropéptidos intestinales que también se habían descubierto, segregados en el intestino y regulados por la ingesta. Dicho más sintéticamente, no nos referimos al que ha sido bautizado en los últimos años (1999-2000), como el *eje peptinérgico cerebro-intestinal*. Movidos por razones de no alargar la exposición y, en parte, por querer esperar a las últimas publicaciones producidas en su mayor parte a partir del año 2000.

### 2. EJE CEREBRO-INTESTINAL

TABLA 1. Resumen de las acciones de la leptina sobre hipotálamo hipofisotropo (neuroendocrinas), músculo esquelético, crecimiento en etapas inmaduras, balance energético y acciones en el desarrollo regulando proteínas cerebrales

## Acciones de la leptina:

- Neuroendocrinas
- Músculo esquelético
- Crecimiento
- Balance energético
- Acciones cerebrales

Por espacio de cuarenta años hemos venido encontrando neuropéptidos que se encuentran en el hipotálamo, y que también son secretados por el intestino, como la galanina, la colecistoquinina, el péptido Y (NPY), las β-endorfinas o, incluso, algunos neurotransmisores cerebrales, como el glutamato. Se comenzó a saber que muchos de ellos parecían implicados en la regulación del balance energético. Estos descubrimientos, junto a los estudios realizados por la necesidad clínica de poseer tratamientos eficaces para tratar la obesidad patológica, han llevado al establecimiento del eje peptinérgico cerebro-intestinal.

La obesidad patológica es un factor de riesgo para la diabetes, alteraciones cardiovasculares o incluso neoplasias, pero los tratamientos específicos son, muchas veces, bastante ineficaces. Descubiertos los neuropéptidos orexigénicos, que abren el apetito, se pensó en que su bloqueo podría utilizarse como terapéutica eficaz para la obesidad, pero pronto se vio que no era posible. Los péptidos orexigénicos son muchos y trabajan colaborativamente; bloqueado uno siempre hay otra secreción orexigénica para suplirle abriendo el apetito porque existe una verdadera protección biológica para que los organismos no dejen de comer y puedan mantener sus reservas grasas. Los ratones que no expresan neuropéptido Y (NPY), el más fisiológico y potente orexigénico (ratones NPY knockout), comen menos, pero comen, porque segregan más galanina. Lo contrario sucede con los anorexigénicos cuya abolición, o falta de expresión, conduce irremisiblemente a la apertura descontrolada del apetito y a la obesidad (1).

Así pues, el bloqueo de neuropéptidos orexigénicos no puede ser utilizado para controlar la obesidad. Las dietas estrictas controlan el peso, pero al reducirse la materia grasa se reduce también la leptina circulante, y entonces se abre desmedidamente el apetito; con lo cual estos enfermos recuperan rápidamente el peso perdido. No obstante, la clínica denuncia éxitos de tratamiento con operaciones quirúrgicas en las cuales se reduce el estómago, o se hacen determinadas estrategias para reducir la absorción y toma de alimentos. Estas operaciones, que tienen un elevado riesgo de mortalidad, sí que permiten a los enfermos, cuando sobreviven a ellas, mantener, bajo el peso durante largos períodos de tiempo. Ello hizo pensar que quizá se producía en el intestino operado alguna alteración que propiciaba la hipersecreción de péptidos anorexigénicos. Con esta idea se comenzaron a estudiar atentamente las secreciones intestinales implicadas en el balance energético, de las cuales se conocían muchas ya, como la colecistoquinina, anoréxico, o la ghrelina estomacal, orexigénico. Estos estudios han llevado estos últimos años al estudio de un neuropéptido, el llamado YY3-36 o PYY (2), que es secretado postprandialmente por células llamadas L que se encuentran en el intestino distal y el colon. Este péptido es un poderoso anorexigénico (3) que, además, aumenta su secreción intestinal en pacientes obesos operados (4) (5).

Recientemente, en 2003, se ha publicado un trabajo realizado en humano, en una población de personas gruesas, y otra de delgadas, en los cuales se infunde durante 90 minutos PYY o salino a la población que actúa de control (6). Al cabo de 2 o de 24 horas se les da comida en igual calidad y cantidad a todos, y se miden las calorías ingeridas. Y tanto las poblaciones obesas como los delgados reducen su ingesta en un 30 por 100 aproximadamente con respecto a la población control y, además, ello se produce en ambas poblaciones, tanto después de dos horas de infusión como después de 24 horas, lo cual señala, por una parte, la eficacia del PYY como anorexigénico en obesos y delgados, y también que ambas poblaciones no parecen presentar resistencia al péptido, va que el efecto se mantiene a las 24 horas (Fig. 1). También se vio que los picos de secreción de PYY en los obesos, después de comer, eran siempre más reducidos que los correspondientes a la población delgada, y, además, los obesos tenían reducida la secreción de PYY basal (Fig. 2). Lo cual apunta a que la mala secreción de PYY pueda ser una de las causas de la tendencia a la obesidad, pero, sobre todo, aunque sean experimentos incipientes que habrá que ratificar, parece abrirse una esperanza a un tratamiento conveniente y poco invasivo para la obesidad patológica. Aunque para su utilización habrá también que conocer si, con más tiempo de tratamiento, produce el PYY resistencias.

En el mismo trabajo se estudia la posibilidad de que el PYY produzca sus efectos de cierre del apetito, inhibiendo la secreción de otros péptidos gástricos como la ghrelina, que es conocida como poderoso orexigénico (7) (8). Y encontraron que, en efecto, existe una regulación a la baja de dicho péptido, aunque posteriormente (9) se ha encontrado el PYY en cerebro, y se cree que actúa inhibiendo el neuropéptido Y, es decir, que ejerce su acción cerebral por la misma ruta que la leptina inhibe, en cerebro, el apetito (1) (9).

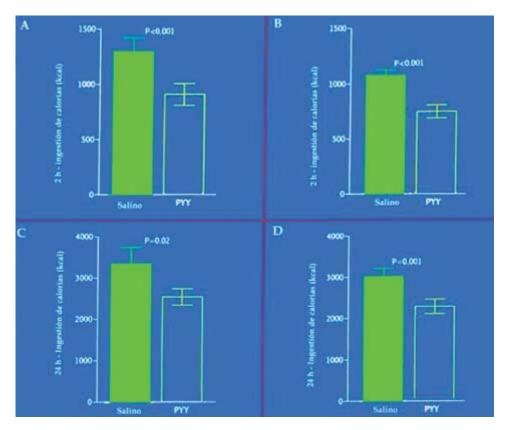


FIGURA 1. Gráfica extractada del trabajo de Batterham RI et al. (6) A, C, población obesa; B, D, población delgada. Poblaciones humanas infundidas con PYY o con salino «A 2 h. (A, B) y A 24 h. (C, D)». En ordenadas calorías ingeridas (ver texto).

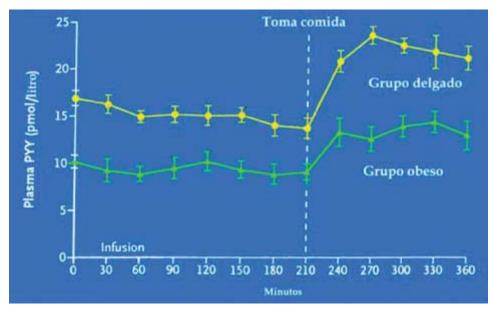


FIGURA 2. Gráfica extractada del trabajo de Batterham RI et al. (6). Infusión de PYY a poblaciones humanas obesas y delgadas. Los obesos presentan siempre niveles plasmáticos de PYY disminuidos frente a los delgados (ver texto).

La primera pregunta que surge es ¿cómo llega este péptido PYY a nivel cerebral? (3) Para comprender cómo el intestino «habla» al cerebro, que se han preguntado muchos investigadores, hay que analizar las características especiales del sistema nervioso del tracto gastrointestinal, o, mejor dicho, del sistema nervioso entérico. El sistema nervioso entérico es el único sistema nervioso periférico capaz de elaborar y mediar repuestas y reflejos propios. Estos reflejos intestinales pueden ser secretores o peristálticos. Embebidos en las fibras musculares lisas y glandulares del sistema gastrointestinal existen microcircuitos de neuronas aferentes vagales, interneuronas, o neuronas motoras, capaces de elaborar respuestas humorales o mecánicas, respondiendo a cambios de pH, tonicidad o, también, a la propia composición del bolo alimenticio. Las paredes del intestino están tapizadas de microvilli que «gusta» el bolo alimenticio y analiza la composición de éste en glucosa, aminoácidos o lípidos. Las células secretoras del intestino son glucosensibles y reaccionan a la falta de glucosa ingerida. Y estas fibras aferentes vagales proyectan las sensaciones intestinales al complejo vagal posterior del cerebro (10).

Podemos establecer que existe un control del apetito que, a largo plazo, está estabilizando, en los mamíferos, la masa grasa y el peso corporal, y que es liderado por la insulina y por la hormona lipostática leptina que llegan de la periferia al cerebro (1). Pero a corto plazo, y con mayor rapidez, existe un eje cerebro-intestinal que está respondiendo a necesidades inmediatas, denunciadas en el intestino, y que provocan respuestas cerebrales en el inicio y el fin de la conducta de comer.

En 1998 se descubrieron las orexinas, neuropéptidos que dosisrespuesta abren el apetito (ορεξις apetito) y, que como vamos a exponer, parecen tener un papel integrador muy importante en este eje o axis cerebro-intestinal del cual hemos estado hablando.

### 3. OREXINAS

### 3.1. Descubrimiento y estructura

En 1998, Sakurai extractó las orexinas de los picos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en extractos cerebrales (11) (12). Obtuvo dos péptidos, la orexina A y la orexina B. La primera tiene 33 aminoácidos y la B 29. Y tienen una similitud entre ellos del 46 por 100. La A tiene 3.562 Da (daltons) y la B 2.937 Da. Ambas presentan residuos N-piroglutamil-C amida, y la orexina A tiene dos intracadenas unidas por puentes disulfuro que no se encuentran en la B. Actualmente se han clonado en un anfibio el Xenopus Laevis, y se sabe que su estructura se ha conservado a través de la evolución. En todas las especies existe una gran similitud estructural en sus orexinas. Un solo gen, con dos exones y un intron, codifica la pre-proorexina con 130 ó 131 residuos que luego se degradan a orexina A y B. También en 1998, Lecea (13), partiendo de extractos de hipotálamo, y con otra metodología, llegó a dos péptidos que llamó hipocretina A y B y que actualmente están identificados a las orexinas A v B.

Sakurai identificó también sus receptores específicos que los llamó OX1R y OX2R. Pronto se localizó la secreción de orexinas cerebrales en el hipotálamo lateral, cuya destrucción era conocido que provocaba anorexia y por ello había sido llamado «centro del hambre». Por ello, Sakurai imaginó que dichos péptidos estarían implicados en el balance energético y los inyectó intracerebralmente a roedores. Viendo que provocaban apertura del apetito, les llamó orexinas (apetito en griego). Lecea pensó que sus hipocretinas solamente eran secretados en el hipotálamo y que su estructura se parecía a la secretina del estómago, por ello les llamo así. El receptor OX1 es selectivo para la orexina A y, como veremos, está implicado en el control del balance energético, en la apertura del apetito, mientras que no parece estarlo el OX2. Este OX2 no parece selectivo para ninguna de las dos orexinas, aunque podría estar implicado en el control sueño/vigilia, puesto que perros con mutación de este receptor son narcolépticos aunque comen normalmente (14).

### 3.2. Secreción de orexinas

Por métodos de inmunoradiactividad o inmunohistoguímicos utilizando anticuerpos marcados con isótopos radiactivos, se han identificado los lugares cerebrales en donde están ubicadas las neuronas que secretan orexinas, y se ha visto que son áreas cerebrales muy restrictivas y muy pequeñas, fundamentalmente son el hipotálamo lateral y áreas perifornicales y dorsales del hipotálamo. Sin embargo, se ha comprobado que dichas neuronas se provectan a zonas muy extensas y muy funcionales del cerebro. Sus proyecciones se extienden por prácticamente todo el neuroaxis (Fig. 3) (3): bulbos olfatorios, amigdala, septum, tálamo, hipotálamo anterior y posterior, mesencéfalo y tronco cerebral, así como a cualquier nivel de la médula espinal. Concretamente se proyectan, pues, a núcleos cerebrales muy importantes en la regulación de la nutrición, del control sueño/vigilia, de la homeostasis neuroendocrina o del sistema nervioso autónomo (Fig. 4) (3) (15). Estas proyecciones están favorecidas por la situación del hipotálamo lateral, que es donde más extensamente se encuentran ubicadas las neuronas orexigénicas. Todo ello se ha establecido utilizando marcadores neuronales inmunohistoquímicos de actividad neuronal como el Fos que se expresa en neuronas excitadas, lo cual ha permitido mostrar la expresión del marcador en situaciones en que se están expresando orexinas en dichos núcleos cerebrales.

Tabla 2. Sitios de secreción de orexinas y ramificaciones en cerebro

# Sitios de secreción de orexinas y ramificaciones en cerebro

Periféricos:

Neuronas del sistema entérico, estómago y páncreas Neuronas del tracto solitario

Cerebrales:

Áreas : perifornical hipotálamo lateral y dorsal

 Ramificaciones en cerebro: En bulbos olfatorios , corteza cerebral , tálamo, hipotálamo , tronco cerebral y todos los niveles de la médula espinal

Con estas estrategias, se han encontrado también neuronas orexigénicas en la periferia (10), concretamente en el estómago, en el intestino y en el páncreas (16), si bien en este último lo que se encuentran son proyecciones de neuronas ubicadas en el estómago y en el intestino (Tabla 2). Todo ello ha hecho plantearse el estudio de la función de las orexinas y sus acciones a nivel periférico y cerebral.

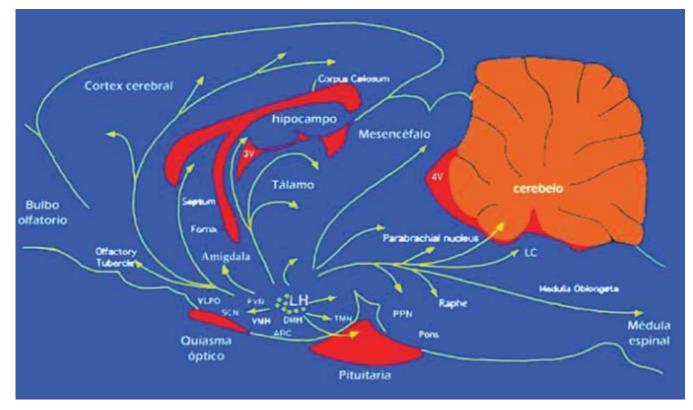


FIGURA 3. Gráfica inspirada en el trabajo de Korner J. y Leibel RI (3). Las flechas indican la gran proyección de las fibras nerviosas de las neuronas orexigénicas (puntos en gráfica) desde el hipotálamo lateral LH a prácticamente en todo el neuroaxis.

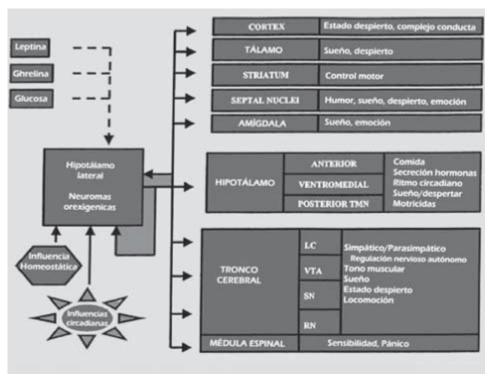


Figura 4. Esquema sintetizado según Taheri S. et al. (15). En la parte derecha de las flechas se indican las proyecciones de las neuronas orexigénicas a la corteza cerebral, hipotálamo, tronco y médula cerebrales; áreas responsables de las funciones que se señalan a su derecha. En la parte izquierda se esquematizan con flechas dirigidas al hipotálamo lateral (LH) las secreciones, metabolitos e influencias que regulan en LH la secreción de orexinas SN = sustancia negra, LC = locus caeruleus, VTA = área ventral tegmental.

### 3.3. Acciones de las orexinas

### 3.3.1. Acciones periféricas

Aunque el descubrimiento de neuronas orexigénicas a nivel periférico intestinal se ha producido después de su hallazgo cerebral, vamos a comenzar por relatar lo que se conoce de sus acciones periféricas, puesto que ello aclara cuestiones importantes del eje cerebro-intestinal del que venimos hablando. Las acciones conocidas de las orexinas están resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Acciones de las orexinas

# Acciones de las orexinas - Periféricas: A)Transmisión al complejo dorso vagal del cerebro las excitaciones mecánicas y humorales del intestino b) Modulación insulina en páncreas - Cerebrales: (en situación de hipoglucemia) a) Activan el estado de vigilia con excitación motora b) Apertura del apetito

Cuando hablábamos del eje cerebro-intestinal, hemos dicho que, debido a sus características, el sistema nervioso entérico elabora respuestas humorales o peristálticas a cambios de pH, tonicidad o por la propia composición del bolo alimenticio (17), y que estas respuestas parecen llegar al cerebro integrándose en las mismas rutas

cerebrales por las cuales la leptina abre o cierra el apetito) (1). Para ello dichas sensaciones son transportadas a través de neuronas aferentes vagales al núcleo dorsal vagal posterior del cerebro (18). Pues bien, las fibras nerviosas de los núcleos del tracto solitario, que nacen en el hipotálamo lateral, juegan un papel importante en dicho transporte (19) y en dichos núcleos del tracto solitario, en esas neuronas, se ha encontrado expresión de orexinas, concretamente inmunoreactividad de orexina A (3) (20).

Con lo cual tenemos unos neuropéptidos, las orexinas, que se secretan en el intestino y en el estómago y además hallamos que las áreas con mayor actividad citoquímica en cerebro para orexina A, B y sus receptores OX1 y 2 son: núcleo arcuato, paraventricular, tálamo, locus caeruleus, así como núcleos del tracto solitario, núcleo dorsal motor del vago y supraquiásmico (20) (Figs. 3 y 4), áreas muchas de ellas, como el núcleo arcuato, implicadas en el control del balance energético a largo plazo (1). Pero, además, neuronas aferentes vagales y primarias de la médula espinal, neuronas entéricas y células endocrinas del intestino y páncreas muestran inmunoreactividad para orexinas y sus receptores (10). Y se ha visto que las orexinas excitan a neuronas secretoras en el intestino del cobaya y son capaces de modular la motilidad gastrica y modular en el páncreas la secreción de hormonas, por todo ello se cree que tienen un papel integrador en la regulación del balance energético que efectúa este eje cerebro-intestinal. Las orexinas parecen ser las encargadas de transportar al cerebro las sensaciones intestinales a través de los núcleos del tracto solitario (10).

El hallazgo de las orexinas está siendo muy importante para aclarar el papel jugado por este eje cerebro-intestinal que modula la apertura y cierre del apetito a corto plazo. En dicho axis las orexinas parecen mostrar una función integradora de la regulación del balance energético a nivel cerebral de ambos procesos; a largo plazo, descubierto antes y protagonizado por la leptina, y a corto plazo, efectuado por neuropéptidos intestinales, cuyas rutas cerebrales confluyen y son similares en el hipotálamo (9).

### 3.1.1.2. Acciones de las orexinas en el páncreas

Hay que destacar entre las acciones periféricas de las orexinas, que se han encontrado orexinas inmunoreactivas en las células  $\beta$  del páncreas (17) y que perfundiendo el páncreas de rata con orexina A y B la primera provoca secreción de insulina (21). También hay experimentos incipientes que indican que se expresan las orexinas en células  $\alpha$  del páncreas y que en situación de hipoglucemia parecen secretar glucagon. Estos primeros hallazgos aclaran por qué las orexinas se han encontrado implicadas en trastornos metabólicos.

Si resumimos lo concerniente al eje cerebro-intestinal diremos que neuronas aferentes vagales de la médula espinal, neuronas entéricas y células endocrinas del intestino y páncreas tienen inmunoradiactividad para orexinas y sus receptores. Ello explica su papel integrador de respuestas intestinales, modulando y estimulando corrientes eléctricas en las sinapsis de neuronas secretoras intestinales, y siendo capaces de estimular la motilidad del colon. En el ayuno aumentan las orexinas en el intestino, mostrando una respuesta funcional al estado nutritivo en las células intestinales. En el axis cerebro-intestinal las orexinas parecen actuar de mediadoras dando cuenta al cerebro de la situación alimenticia en el intestino a través de las neuronas aferentes vagales del núcleo solitario (10) (3).

### 3.3.2. Acciones cerebrales de las orexinas

En el cerebro la gran proyección que existe de las neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral a tan variadas áreas del neuroaxis (Fig. 3), que ya hemos mencionado, indica que las orexinas pueden modular una gran variedad de sistemas, incluidos, por supuesto, los referentes, en el núcleo arcuato, a la toma de alimentos (1). Pero, además, pronto se vio que las lesiones en el hipotálamo lateral provocaban, además de anorexia, alteraciones graves en la proporción sueño/vigilia de los animales. Las acciones fundamentales de las orexinas a nivel cerebral son, pues, la regulación sueño/vigilia y la apertura del apetito. En el hipotálamo lateral se segregan orexinas en situación de ayuno; sus neuronas responden rápidamente, secretando orexinas, a situaciones de hipoglucemia (10) (3).

Antes de pasar a explicar las acciones de las orexinas a nivel cerebral (Tabla 3) conviene aclarar que ambas acciones, mantenimiento del balance energético y de la proporción sueño/vigilia, son acciones complementaras en los mamíferos. Ambas cuestiones son procesos autónomos, pero los dos están implicados en el mantenimiento global de la homeostasis orgánica y además son interdependientes. El acto de comer requiere vigilia y se realiza siempre en estado de vigilia.

Las orexinas en el cerebro regulan ambos apetito y vigilia, como vamos a ver, y ello ya señala que dichos peptidos pueden tener un papel integrador cerebral de estos dos procesos homeostáticos (3). Se puede decir que la regulación sueño/vigilia es crítico para un eficiente mantenimiento de la homeostasis energética.

### 3.3.2.1. Regulación de la proporción sueño/vigilia

Los estudios de sueño en mamíferos han caracterizado el estado de vigilia por la no aparición del movimiento rápido de los ojos y de las ondas REM, así como el sueño está caracterizado por la aparición del rápido movimiento de ojos y de las ondas REM en el electroencefalograma.

Los primeros experimentos mostraron que la excitación eléctrica del hipotálamo lateral (LHA) producía vigilia, y la destrucción de sus neuronas, soñoliencia y falta de atención (22) (23) (24). El Fos es un marcador inmunocitoquímico de actividad neuronal, como hemos dicho, por tanto se expresa en neuronas excitadas. Y en estudios de sueño se vio, en las neuronas orexigenicas del hipotálamo lateral (LHA), inmunoreactinidad de Fos en estado de vigilia, y no en estado de sueño. En el primer caso con no aparición de ondas REM, y con aparición de ellas en estado de sueño (25). En estos estudios también se mostró que las neuronas orexigénicas, en cuanto a la regulación de la vigilia, están bajo control circadiano, guardando una relación temporal en el día aun cuando se sitúen los animales en completa oscuridad. Además, la expresión de Fos es también incrementada en el LHA cuando la vigilia se fuerza con drogas como anfetaminas o cuando se produce una reducción de sueño moderado (25) (26). La administración de orexina A en roedores incrementa

la vigilia de forma dosis-dependiente, promoviendo la no aparición de ondas REM en el electroencefalograma (27), lo cual muestra un papel causal de las orexinas en la regulación del sueño/vigilia.

El ratón que no expresa orexinas (*raton knockout orexins*) muestra un fenotipo igual a la narcolepsia humana y también lo presentan perros que tienen una mutación en el receptor OX2 (14).

La narcolepsia es una debilitante enfermedad neurológica que se prolonga durante toda la vida, y que se caracteriza por repentinos y súbitos ataques de sueño durante el período de vigilia. La base fisiologica de la sintomatología es la irrupción de ondas REM en períodos de vigilia (15). En la narcolepsia se producen ataques de cataplegia con debilitamiento muscular total o parcial, con caídas al suelo por debilitamiento del músculo esquelético bilateral, y sin perder la conciencia (28). En humano, la narcolepsia no es familiar, y envuelve factores ambientales incidiendo sobre una base genética susceptible a la enfermedad (29). En esta dolencia existen alteraciones en las señales que emiten los receptores de las orexinas cuando son activados en el cerebro y las orexinas, a veces, no se detectan en el líquido cefalorraquídeo (30). También algunos autores han encontrado una ausencia de orexinas cerebrales en narcolépticos humanos (31).

Los ataques de cataplegia se producen muchas veces en los narcolépticos por emociones como la risa, y ello llevó al conocimiento de que las neuronas orexigénicas están implicadas en las respuestas fisiológicas asociadas a las emociones. En efecto, se han encontrado provecciones de neuronas orexigénicas en centros como el sistema límbico, área dopaminérgica ventral, y centros colinérgicos del telencéfalo. Todos ellos son áreas implicadas en la respuesta a las emociones, y muchas de ellas están englobadas en el sistema activador cortical ascendente (ACAS), que comprende núcleos histamínicos como el tuberomamilar (TMN), noradrenérgicos como el locus caeruleus (LC), o serotoninérgicos y colinérgicos (Fig. 3 y Fig. 4). Por ello, las proyecciones de neuronas orexigénicas a estas áreas (20) facilita la compresión de cómo las orexinas pueden estar implicadas en promover el estado de vigilia y modular las repuestas a las emociones. Pero, además. las conexiones de las neuronas orexigénicas con el área ventrolateral preóptica (VLPQ), que se cree es la responsable en el cerebro de regular la transición de ondas no-REM a REM ratifica la causa por la cual las orexinas provocan el estado de vigilia.

Los roedores que comen por la noche muestran también una gran actividad motora unida a su estado de vigilia y, muchas veces, emiten un gruñido que es síntoma de estress, no de ansiedad. Las invecciones de orexinas estimulan dicho gruñido, pero si se les ha dado previamente a los animales antagonistas del CRH (hormona hipotalámica del axis corticosuprarenal) no lo estimulan, lo cual muestra la asociación que existe entre las rutas orexigénicas y el hipotálamo neuroendocrino (Fig. 4) y, además, que las orexinas al provocar estrés están actuando de forma clásica, a través del axis corticosuprarrenal. La hiperactividad se suprime en los roedores dando antagonistas dopaminérgicos, que bloquean la secreción de dopamina, la cual, sin duda, se secreta, en caso de hiperactividad provocada por dosis de orexinas, por las conexiones que tienen las neuronas orexigénicas con el centro dopaminérgico ventral, que es clásicamente responsable de la excitación motora (3). Por tanto, todas estas acciones interrrelacionadas con el estrés, con las emociones, o con la regulación de la proporción sueño/vigilia las realizan las orexinas por las proyecciones de sus neuronas a los centros corticales del cerebro encargados de regularlas, y en el caso del estrés a través de sus conexiones con el hipotálamo hipofisótropo (Fig. 4). También se ha encontrado que neuronas que controlan las respuestas cardiovasculares a la emoción se encuentran en el hipotálamo lateral donde se hallan las neuronas orexigénicas cerebrales (3).

### 3.3.2.2. Regulación por las orexinas de la homeostasis energética

Sakurai, después del descubrimiento de las orexinas, ensayó y demostró que inyecciones intracerebroventriculares de orexina A o B producen aumento de ingesta (32), y que la A es mucho más potente en dicha acción. Esta mayor potencia de acción de la orexina A puede ser debida a varias razones. Quizá a que se une a ambos receptores OX1 y 2, o a que su puente disulfuro la proteja de la proteolisis o también porque la B está menos extendida en núcleo arcuato y paraventricular hipotalámicos que la A. Yamada (33) inyectó anticuerpos antiorexina a ratas ayunadas y vio que no se producía la apertura del apetito, y lo mismo sucedía si inyectaba anticuerpos antireceptor OX1. Estos resultados mostraron que la orexina A y el receptor de OX1 están implicados en la regulación

fisiológica de la comida normal. No ocurre lo mismo con el receptor OX2, ya que perros narcolépticos, los cuales presentan mutación de dicho receptor 2, no tienen alterada la toma de alimentos (14).

La apertura del apetito, que se produce en roedores en período de vigilia, no aumenta, durante la vigilia, si se inyectan dosis supletorias de orexina, va que cuando la acción de las orexinas en la conducta de comer está ejerciéndose al máximo, como sucede en período de vigilia, el apetito no aumenta más por nuevas dosis. Consecuentemente, la administración crónica de orexinas no provoca obesidad, ya que a partir de un dintel en la acción de las orexinas sobre el apetito, éstas no actúan. Contrariamente a lo que sucede con la administración de neuropéptido Y (NPY), cuya administración crónica conduce a la obesidad. Pero, sin embargo, otros dos orexigénicos: la hormona concentradora de melanina (MCH) secretada también en el hipotálamo lateral, y la galanina, procedente del núcleo arcuato, no producen obesidad invectados crónicamente. Y ello parece mostrar que estos dos últimos péptidos orexigénicos, como las orexinas, están implicados en el control del apetito a corto plazo, mientras que el NPY, el más poderoso y fisiológico orexigénico cerebral, está implicado en el control de la conducta de comer a largo plazo (1).

Las inyecciones de orexina provocan secreción de ácido gástrico, pero solamente si se dan por vía cerebral, y si el vago de los animales está intacto, debido a que se han hallado proyecciones de las neuronas orexigénicas en los centros vagales. Ello implica un papel de las orexinas en el control de la fase encefálica de la digestión (34).

Una cuestión no clara, en este momento, es la posible interrelación que existe entre la acción de las orexinas provocando vigilia y su acción estimuladora del apetito; las orexinas producen vigilia, pero no sabemos cómo y en qué forma influye dicho estado en la toma de comida. La crónica administración de orexina produce más vigilia permanente, pero no más peso, ni más calorías totales ingeridas.

La destrucción de las neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral reduce la comida y la bebida en un 75-80 por 100. Pero no se conoce si el decrecimiento de comida se produce por alterar en cerebro las rutas del apetito, las del estado de vigilia, o ambas (3).

Las lesiones en el LHA producen un estado hipermetabólico y los ratones que no expresan orexina (knockout), que son narcolépticos e hipofágicos, no comen, pero tienen igual peso, debido a que presentan hipocatabolismo. Los mutantes obesos *ob* y *db* (1), que no poseen leptina circulante biológicamente activa, tienen aumentados orexigénicos como el neuropéptido. Y por ello son hiperfágicos, sin embargo, tienen inhibidas las oreximas probablemente como consecuencia de sus alteraciones metábolicas (10). Todo ello sugiere una modulación recíproca entre las orexinas y el metabolismo todavía no bien conocida.

La hipoglucemia y la no existencia de alimento en el intestino, estimulan poderosamente la secreción de orexinas en el hipotálamo lateral (LHA) y ello ya sugiere que las orexinas están implicadas en la apertura del apetito a corto plazo (35).

La inyección de leptina bloquea la secreción de orexinas que provoca la hipoglucemia (36), pero no totalmente como ocurre con el NPY (3). Las causas que explican el no bloqueo total de las orexinas por la leptina no se conocen aún bien.

En el hipotálamo lateral existen aproximadamente un 25 por 100 de neuronas glucosensibles que se activan por la falta de glucosa (37). Estas neuronas glucosensibles se excitan por la hipoglucemia que se produce al dar insulina, pero solamente si no se invecta la insulina paralelamente a la glucosa, mostrando que no es una acción específica de la insulina sino de la hipoglucemia que produce (38). Curiosamente se ha visto que invecciones de orexinas bloquean la respuesta a la glucosa de las células que responden a ella en el hipotálamo ventromedial. Así que parece que las orexinas se secretan por la hipoglucemia en el LHA y su secreción deprime a su vez a las células que se excitan por la presencia de la glucosa en el núcleo ventromedial, que es clásicamente llamado «centro de la saciedad». Con ello las orexinas, a la vez que abren el apetito, actuando como orexigénicos, están bloqueando señales anorexigénicas de saciedad en el cerebro, lo cual concuerda con el papel sugerido para las orexinas de abrir el apetito a corto y rápido plazo (10).

### 4. CONCLUSIONES

# 4.1. Acciones integradoras de las orexinas a nivel periférico y cerebral

Tabla 4. Resumen de las acciones integradoras de las orexinas tanto a nivel periférico, intestinal, como a nivel cerebral

# Acciones Integradoras de las Orexinas Acción integradora del eje cerebro-intestinal con el control cerebral del apetito a largo plazo por leptina e

insulina

Cerebrales: Acción integradora del equilibrio sueño/vigilia y la homeostásis energética

El descubrimiento de las orexinas ha tenido lugar después de haberse establecido la existencia de redes de neuronas hipotálamicas que secretan neuropépticos orexigénicos, que abren el apetito, o anorexigánicos, que cierran el apetito, y los cuales, a largo plazo, liderados por la hormona lipostática leptina y por la insulina periféricas consiguen mantener estable, en los mamíferos, la reserva grasa, y por tanto el peso, durante largos períodos (1). Pero el descubrimiento de las orexinas ha venido a aclarar que también existe una respuesta al ayuno a corto plazo, protagonizada por neuropéptidos que se habían venido descubriendo durante el espacio de cuarenta años,

secretados por el intestino, y que, además, son muchas veces idénticos en estructura a los neuropéptidos cerebrales implicados en la conducta de comer. Pues bien, la orexina secretada en el intestino, en el estómago y también en neuronas hipotalámicas laterales, tiene un papel integrador de estas redes peptinérgicas intestinales, trasmitiendo al cerebro los reflejos intestinales motores o humorales por las fibras aferentes vagales de los núcleos del tracto solitario cuyas neuronas nacen en el hipotálamo lateral. Además, en el cerebro, neuronas orexigénicas del hipotálamo lateral glucosensibles se excitan, en situación de hipoglucemia o cuando llegan reflejos intestinales que muestran la disminución de alimento en el intestino, y, entonces, secretan orexinas que abren el apetito.

En el cerebro las orexinas tienen, sin duda, un papel integrador de esos dos procesos homeostáticos fundamentales para la supervivencia de los mamíferos que son el control de la proporción sueño/vigilia y la apertura del apetito, que es el primer escalón para la regulación del balance energético. Y el estudio de cómo se articula la integración de estos dos procesos y el papel en él de las orexinas es hoy uno de los retos importantes planteado a la investigación.

Pero, además, y como se ha sugerido a lo largo de esta exposición, en el cerebro, las orexinas parecen modular, además de la homeotasis energética y la proporción sueño/vigilia, funciones neuroendocrinas, motoras, emociones, y las dependientes del sistema nervioso autónomo sugiriendo también una acción integradora de ellas. Toda esta variedad de funciones las pueden realizar por la gran proyección de las neuronas orexigénicas desde el hipotálamo lateral a áreas de la corteza cerebral responsables de ellas; fundamentalmente hipotálamo (anterior, ventromedial y posterior), tronco cerebral y médula espinal (Fig. 4).

Se ha encontrado expresión de orexinas en axones terminales de las fibras nerviosas de dichas áreas cerebrales que están modulando la secreción de neurotransmisores, inhibidores o excitadores, como el  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) o el glutamato (3).

A su vez, las neuronas orexigénicas cerebrales están moduladas en su secreción por influencias homeostáticas, principalmente energéticas y circadianas (Fig. 4), es decir, alteraciones en la homeostasis energética, por exceso o falta de alimento, o por cambios importantes en la proporción sueño/vigilia, pueden repercutir en la secreción orexigénica del hipotálamo lateral. También las neuronas orexigénicas cerebrales, de forma aún no bien conocida, están bajo la regulación de la leptina y de la glucosa, inhibiendo ambas el aumento de la secreción de orexinas (Fig. 4). Las grandes lagunas de conocimiento actuales son el conocimiento de cómo se interrelacionan la proporción sueño/vigilia y la apertura del apetito, y también el conocimiento de las causas por las cuales la leptina no bloquea totalmente la apertura del apetito que provocan las orexinas como lo hace con la acción de otros orexigénicos (1).

Podría pensarse que el sistema peptinérgico cerebro-intestinal es un sistema del control del balance energético más primitivo e inmediato que el regido por la leptina (1), y que se ha conservado a través de la evolución, pero no como un residuo evolutivo sino porque es un sistema absolutamente integrador de funciones. Por último, hay que remarcar que las orexinas son otro ejemplo relevante de coordinación celular por neuropéptidos (39).

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pascual-Leone, A. M. (2003) Balance enegético: leptina, Anal. Real Acad. Nac. Farm. 89(2), 257-87.
- (2) Batterham, R. I.; Cowley, M. A.; Small, C. J. et al. (2002) Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake, *Nature* 418: 650-4.
- (3) Korner, J. and Leibel, R. I. (2003) To eat or not to eat, How the gut talks to the brain *N. Engl. J. Med.* 349 (10): 926-28.
- (4) Adrian, T. E.; Savage, A. F.; Fuessl, H. S. et al. (1987) Release of peptide YY (PYY) after resection of small bowell, colon, or pancreas in man *Surgery* 101: 715-9
- (5) Adrian, T. E.; Ferri, G. I.; Bacarese-Hamilton, A. I. et al. (1985) Human distribution and release of a putative new gut hormone peptide YY. *Gastroenterology* 89: 1070-7.
- (6) BATTERHAM, R. L.; MARK, M. B.; COHEN, M. B. et al. (2003) Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY 3-36. N. Engl. J. Med. 349 (10): 941-48.
- (7) Cummings, D. E.; Purnell, J. G.; Frayo, R. S. et al. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggest a role in meal iniciation in humam *Diabetes* 50: 1714-9.
- (8) WREN, A. M.; SEAL, I. J.; COHEN, M. A. et al. (2001) Ghrelin enhances appetite and increase food intake in human, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 59-99.

- (9) ELLACOTT, K. I. J. AND CONE, R. D. (2004) The Central melanocortin system and the integration of short and long term regulators of energy homeostasis. *Recent Progr. Horm. Res.* 395-408.
- (10) Kirchgessner, A. I. Orexin in the brain.gut axis (2002), *Endocrin Rev.* 23 (1): 1-15.
- (11) SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I. et al. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour, *Cell* 92: 573-85.
- (12) SAKURAI, T.; ORIGUCHI, T.; FURUYA, K. et al. (1999) Structure and function of human prepro-orexin gene, *J. Biol Chem.* 274: 17771-76.
- (13) Lecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X-B.; Foye, P. E. et al. (1998) The hypocretins: Hypothalamus specific peptides with neuroexcitatory activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95*: 322-2.
- (14) Lin, L.; Faraco, J.; Li, R.; Kadotani, H. et al. (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene, *Cell* 98: 365-76.
- (15) Taheri, S.; Zeitzer, J. M.; Mignot, E. (2002) The role of hypocretins (orexins) in the sleep regulation and narcolepsy. *Annu. Rev. Neurosci.* 25: 283-313.
- (16) Kirchgessner, A. L. and Liu, M-T. (1999) Orexin synthesis and response in the gut, *Neuron* 24: 941-51.
- (17) GERSHON, M. D.; KIRCHGESSNER, A. L.; WADE, P. R. (1994) Functional anatomy of the enteric nervous system In: *Johnson LR ed Physiology of the gastrointestinal tract* 3 rd, ed. New York Raven Press: 381-422.
- (18) Bray, G. A. (2000) Afferent signals regulating food intake Proc. *Nutr.* 59: 373-84.
- (19) Schwartz, G. J. (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects, *Nutrition* 16: 866-73.
- (20) PEYRON, C.; TIGHE, D. K.; VAN DEN POL, A. N. et al. (1998) Neurons containing hypocretin (orexins) project to multiple neuronal systems, *J. Neurosci.* 18: 9996-10015.
- (21) Nowak, K. W.; Mackowiak, P.; Switonska, M. M. et al. (2000) Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: *in vivo* and *in vitro* studies, *Life Sci*. 66: 449-54.
- (22) Berbardis, L. L.; Bellinger, L. L. (1996) The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior, *Neurosci. Biobehav, Rev.* 20: 189-287.
- (23) LEVITT, D. R.; TEITELBAUM, P. (1975) Somnolence akinesia, and sensory activation of motivated behavior in the lateral hypothalamic syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72(7): 2819-23.
- (24) Danguir, J. and Nicolaidis, S. (1980) Cortical activity and sleep in the rat lateral hypothalamic syndrome *Brain Research* 185: 305-21.
- (25) ESTABROOKE, I. K.; McCarthy, M. T.; Ko, E.; Chou, T. et al. Orexin neuron activity varies with bahavioral state *J. Neurosci*. En prensa.
- (26) Chamelli, R. M.; Willie, J. T.; Sinton, C. M. et al. (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation, *Cell* 98: 437-51.

- (27) Hagan, J. J.; Leslie, R. A.; Patel, S. et al. (1999) Örexin A activates locus caeruleus cell firing and increases arousal in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10911-16.
- (28) Honda, T. (1988) Clinical features of narcolepsy Japonese experiences In HL. A in *Narcolepsy*, ed. T. Honda, T Juji pp. 24-27 Berlin, Springer-Verlag 208 pp.
- (29) Mignot, E. (1998) Genetic and familial aspects of narcolepsy, *Neurology* 50: S16-22 (Suppl).
- (30) NISHINO, S.; RIPLEY, B.; OVERSEN, S.; MIGNON, E. (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy, *Lancet* 355: 39-40.
- (31) Peyron, C.; Faraco, J.; Roger, W.; Ripley, B. et al. (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains, *Nat. Med* 6: 991-97.
- (32) SAKURAI, T. (1999) Orexins and orexin receptors: implication in feeding behaviour, *Regul. Pept.* 85 (1): 25-30.
- (33) Yamada, H.; Okumura, T.; Motomura, W.; Kobayashi, Y. et al. (2000) Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 267: 527-31.
- (34) Takahashi, N.; Okumura, T.; Yamada, H.; Kohgo. Y. (1999) Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 254: 623-27.
- (35) Ida, T.; Nakahara, K.; Katayama, T.; Murakani, N.; Nakazato, M. (1999) Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite –stimulating neuropeptides orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats, *Brain Research* 821: 526-29.
- (36) López, M.; Seoane, L.; García, M. C.; Lago, F. et al. (2000) Leptin regulation of prepro.- orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 258: 119-122.
- (37) Oomura, Y.; Ooyama, H.; Sugimori, M.; Nakamura, T.; Yamada, Y. (1974) Glucose inhibition of the glucose –sensitive neurons in the rat lateral hypothalamus, *Nature* 247: 284-86.
- (38) Moriguchi, T.; Sakurai, T.; Nambu, T.; Yanagisawa, M. et al. (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia, *Neurosci. Lett.* 264: 101-104 (2000).
- (39) PASCUAL-LEONE PASCUAL, A. M. (2001) Visión endocrina actual de las interconexiones celulares: la familia de la insulina. Discurso de entrada a Académica de Número, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia.

### **ABREVIATURAS**

NPY Neuropéptido Y

PYY Péptido intestinal secretado en intestino y colon

LHA Área del hipotálamo lateral ARC Núcleo hipotalámico arcuato VMN Núcleo ventromedial hipotalámico

CRH Hormona hipotalámica del axis corticosuprarenal

LC Locus caeruleus

TMN Núcleo tuberomamilar

SN Sustancia negra
RN Núcleo del Raphe
VTA Área ventral tegmental
VLPQ Área ventrolateral preóptica

ACAS Sistema activador cortical ascendente