



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y METABÓLICA

LUIS VARELA FERNÁNDEZ

2010



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

Dr. Miguel A. López Pérez, Investigador del Programa Ramón y Cajal de la Universidad de Santiago de Compostela

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

Certifican que:

la presente Tesis Doctoral titulada “**Efecto de las Hormonas Tiroideas sobre la Homeostasis Energética y Metabólica**”, elaborada por **Luis Varela Fernández**, ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización,

Fdo.: **Dr. Miguel A. López Pérez**

Fdo.: **Dr. Carlos Diéguez González**

Fdo.: **Luis Varela Fernández**

Santiago de Compostela, 2010

cīberobn



A mis padres
y a mi hermano

INTRODUCCIÓN	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
<u>SEÑALES PERIFÉRICAS</u>	6
SEÑALES DE SACIEDAD. Señales procedentes del tracto gastrointestinal	7
SEÑALES DE ADIPOSIDAD. Tejido adiposo	10
<u>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</u>	12
HIPOTÁLAMO. Regulación hipotalámica de la ingesta	13
Núcleo Arcuato	14
Núcleo Ventromedial	17
Núcleo Paraventricular	19
Núcleo Dorsomedial	20
Hipotálamo lateral	21
Núcleo Supraquiasmático	21
<u>OTRAS ZONAS DEL SNC</u>	22
Tronco Cerebral	22
Cerebelo	22
Hipocampo	22
Área tegmenal ventral (VTA)	23
<u>GASTO ENERGÉTICO</u>	23
TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA. Tejido adiposo marrón	24
Regulación transcripcional de UCP-1	33
<u>METABOLISMO DE LÍPIDOS</u>	35
mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)	46
<u>HORMONAS TIROIDEAS</u>	48
Hormonas tiroideas y la regulación de la ingesta y de la masa corporal	51
Hormonas tiroideas y termogénesis adaptativa	54
Hormonas tiroideas y metabolismo lipídico	56
OBJETIVOS	59

MATERIALES Y MÉTODOS	63
<u>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</u>	<u>65</u>
<u>TÉCNICAS EXPERIEMENTALES <i>in vivo</i></u>	<u>65</u>
Canulación Intracerebroventricular (ICV)	65
Implantación de Minibombas Osmóticas	66
Administración de Vectores Adenovirales en el VMH	66
Conditioned Taste Aversion	67
Perfusión Intracardiaca	68
Registro de la Actividad del Sistema Nervioso Simpático	69
Medida de la Composición Corporal	70
<u>DISEÑOS EXPERIMENTALES</u>	<u>70</u>
Alteración del Estado Tiroideo	70
Tratamientos Intracerebroventriculares	70
Tratamientos Intraperitoneales (Ip)	73
Administracion en el VMH	74
Conditioned Taste Aversion	79
<u>TÉCNICAS EXPERIMENTALES</u>	<u>80</u>
Hibridación <i>In Situ</i>	80
Western Blot	83
RT-PCR	88
Ensayos Enzimáticos	92
Lipidómica	94
Inmunohistoquímica	95
Análisis Estadístico	96
RESULTADOS	97
<u>CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO</u>	<u>99</u>
Efecto del hipotiroidismo y del hipertiroidismo sobre la composición corporal y los niveles plasmáticos de distintas hormonas	99
Efecto del hipertiroidismo sobre la regulación de la ingesta y la masa corporal	100

Efecto del hipertiroidismo sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico _____	101
Efectos del hipertiroidismo sobre la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos _____	102
Estudio de la vía de señalización de AMPK durante el hipertiroidismo a nivel central y periférico _____	103
Efecto del hipotiroidismo sobre la regulación de la ingesta y la masa corporal ____	108
Efecto del hipotiroidismo sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico _____	109
Efecto del hipotiroidismo sobre la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos _____	110
Estudio de la vía de síntesis de lípidos durante el hipotiroidismo a nivel central y periférico _____	111
Estudio de la variación de las especies lipídicas complejas durante el hipertiroidismo _____	113
 <u>ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE HORMONAS</u>	
<u>TIROIDEAS</u> _____	116
Efectos sobre masa corporal e ingesta de la administración central de T3 _____	116
Efecto de la administración central de T3 sobre el metabolismo lipídico _____	117
Efecto de la administración central de T3 sobre la termogénesis adaptativa _____	118
 <u>ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE METABOLISMO</u>	
<u>LIPÍDICO EN HIPOTÁLAMO Y TERMOGÉNESIS DURANTE EL</u>	
<u>HIPERTIROIDISMO</u> _____	134
 <u>CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA VÍA DE</u>	
<u>SEÑALIZACIÓN DE mTOR DURANTE EL HIPERTIROIDISMO</u> _____	150
 DISCUSIÓN _____	155
 CONCLUSIONES _____	167
 BIBLIOGRAFÍA _____	171

ABREVIATURAS:

AICAR:	5-Aminoimidazola-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosido
AdR-α:	receptor adrenérgico α
AdR-β:	receptor adrenérgico β
ACC:	acetil-CoA carboxilasa
ACTH:	hormona adrenocorticotropina
AgRP:	proteína relacionada con agouti
AMP:	adenosin monofosfato
AMPc:	adenosin monofosfato cíclico
AMPK:	kinasa activada por AMP
AMPK-CA:	adenovirus AMPK activados constitutivamente
AMPK-DN:	adenovirus AMPK dominantes negativos
AMT:	aminotriazol
AP:	área postrema
ARC:	núcleo arcuato hipotalámico
ATGL:	<i>triglyceride lipase</i>
ATP:	adenosín trifosfato
BAT:	tejido adiposo marrón
BBB:	barrera hematoencefálica
BDNF:	factor neurotrófico derivado del cerebro
BSX:	<i>brain-specific homeobox transcription factor</i>
CART:	transcrito regulado por amfetamina y cocaína
CCK:	colecistoquinina
CCK1R:	receptor de colecistoquinina
CDIPT:	<i>phosphatidylinositol synthase</i>
CNTF:	factor neurotrófico ciliar
CPT-1:	carnitina-palmitoil transferasa-1
CRE:	elemento de respuesta a AMPc
CRH:	hormona liberadora de corticotropina
DAG:	diacilglicerol
DGAT1:	<i>diacylglycerol O-Acyl transferase 1</i>
DMH:	núcleo dorsomedial del hipotálamo
DMSO:	dimetil sulfóxido
DMV:	núcleo dorsal motor del vago
D1:	deiodinasa 1
D2:	deiodinasa 2
D3:	deiodinasa 3
FAS:	ácido graso sintasa
FABP3:	proteína de unión a ácidos grasos 3
FFAs:	ácidos grasos libres
FoxO1:	<i>Forkhead box O1</i>
GLP-1:	péptido similar al glucagón-1
GLP1R:	receptor de GLP-1
GOAT:	ghrelin o-aciltransferasa
HSL:	lipasa sensible a hormonas
ICV:	intracerebroventricular
IO:	núcleo inferior de la oliva
IP:	intraperitoneal
KO:	knockout
LCFAs:	ácidos grasos de cadena larga

LHA:	hipotálamo lateral
LPIN1:	<i>phosphatidate phosphatase</i>
LPL:	lipoprotein lipasa
Malonil-CoA:	malonil-coenzima A
MC-R:	receptor de las melanocortinas
MCD:	malonil-CoA decarboxilasa
MCH:	hormona concentradora de melanina
mTOR:	<i>mammalian Target of Rapamicyn</i>
NE:	norepinefrina
NPY:	neuropéptido y
NRF-1:	factor de respiración nuclear 1
NTS:	núcleo del tracto solitario
OB:	leptina
OB-R:	receptor de leptina (iOB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OBRe y OB Rf)
OX:	orexinas (hipocretinas)
OXM:	oxintomodulina
PCYT1A:	<i>phosphatidyl transferase 1, choline, alpha</i>
peiF4G:	<i>phospho eukaryotic initiation factor 4G</i>
PGC1:	coactivador tipo 1 del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PISD:	<i>phosphatidylserine decarboxilase</i>
PKA:	proteína-kinasa dependiente de AMPc
PLA2G4A:	<i>phospholipase A2</i>
POMC:	propiomelanocortina
PP:	polipéptido pancreático
PPAR:	receptor activado por el proliferador de peroxisomas
pSTAT3:	<i>phospho signal transducer and activator of transcription 3</i>
PTDSS1:	<i>phosphatidylserine synthase 1</i>
PVH:	núcleo paraventricular hipotalámico
RPa:	<i>raphe pallidus</i>
SCD-1:	estearil-CoA desaturasa
SCN:	núcleo supraquiasmático
SMPD2:	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral</i>
SGMS1:	<i>sphingomyelin synthase</i>
SNC:	sistema nervioso central
SNS:	sistema nervioso simpático
SPTLC1:	<i>serine palmitoyltransferase, long chain sbud.1</i>
SREBP:	proteína de unión a elementos regulados por esteroles
S6K1:	proteína ribosomal p70 S6 kinasa 1
S6:	proteína ribosomal S6
TNFα:	factor de necrosis tumoral α
TOFA:	Ácido 5-(Tetradeciloxi)-2-Furoico
TR:	receptor de hormonas tiroideas
TR-DN:	receptor de hormonas tiroideas domoninante negativo
TRH:	hormona secretora de tiotropina
TrkB:	Receptor BDNF
TSH:	hormona estimuladora del tiroides
T2:	3,5-L-diiodotironina
T3:	3,5,3'-triiodo-L-tironina
T4:	L-Tiroxina

UCP:	proteína desacopladora (-1, -2 y -3)
VMH:	núcleo ventromedial hipotalámico
VTA:	área tegmental ventral
WAT:	tejido adiposo blanco
Y-R:	receptor de NPY (Y1R, Y2R, Y3R, Y4R, Y5R, Y6R)
α-MSH:	hormona estimuladora de melanocitos α

El resto de las abreviaturas son de uso común o bien se detallan de un modo específico en el texto

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas de salud detectado en los últimos años ha sido la obesidad, tanto en las sociedades desarrolladas como en las que están en vías de desarrollo. Se entiende por obesidad un aumento de la masa corporal, sobre todo del tejido adiposo, que lleva asociadas consecuencias negativas en el estado de salud (1). Diferentes estudios sobre la prevalencia de la obesidad en las sociedades europeas han arrojado datos poco prometedores sobre la evolución de este problema: se estima que en Europa la obesidad afecta al 10-20% de los hombres y al 10-25% de las mujeres; además, en una década la prevalencia de la obesidad ha aumentado entre un 10-40 % en casi todos los países europeos, mientras que en el Reino Unido este dato se eleva hasta ver que desde 1980 su prevalencia se ha duplicado (2;3). Otros estudios han atribuido a la obesidad el 9,1% del total del gasto sanitario de un país como Estados Unidos. La evolución de este problema ha llevado a calcular que alrededor de 2030 el 90% de todos sus habitantes adultos padecerán sobrepeso y que el 51,1% de ellos serán obesos, con lo que se podría llegar a decir que la obesidad alcanzará proporciones pandémicas (3). Se ha estimado que en esa década el gasto debido a la obesidad y a los problemas que provoca, como hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus tipo II, problemas cardiovasculares o cáncer (conocidos en conjunto como Síndrome Metabólico), supondrán alrededor del 15,8-17,6% del gasto total en Sanidad en Estados Unidos; es decir, 1 de cada 6 dólares gastados (3). Con la evolución que lleva este problema, se piensa que en la próxima década la obesidad causará más muertos que la desnutrición.

La masa corporal y su composición, así como el almacenamiento de energía como triglicéridos en el tejido adiposo, están determinados por la interacción entre factores genéticos, medioambientales y psicosociales. Estos factores actúan a largo plazo variando el balance energético; es decir, modifican el balance entre ingesta y gasto energético. Estudios fisiológicos han sugerido que la masa corporal y las reservas de energía están reguladas homeostáticamente, cualquier cambio en la masa corporal produce cambios en la ingesta y en el gasto que se oponen a la perturbación inicial. Así, desde un punto de vista termodinámico, la obesidad y la delgadez son el resultado de una alteración en este balance (positivo o negativo) entre la ingesta y el gasto energético. La obesidad se produce cuando existe un balance energético positivo como resultado de un desequilibrio entre ingesta calórica y el gasto energético; es decir, aparece cuando el número de calorías ingeridas sobrepasa, de manera crónica, al

número de calorías consumidas (figura 1). Este desequilibrio es una de las consecuencias de la evolución del ser humano hacia sociedades industrializadas, en donde la disponibilidad y la composición de la comida, además del reducido (o nulo) ejercicio físico voluntario requerido para la vida cotidiana y la consecución de alimento, son factores críticos para la aparición y expansión de la obesidad. El cuerpo humano está diseñado evolutivamente para el almacenamiento de grasas en tiempos de disponibilidad nutricional, que son consumidas en los periodos en los que el acceso a comida está restringido. En la actualidad la disponibilidad de la comida es muy abundante, lo que hace que el consumo de esas reservas grasas no se lleve a cabo.

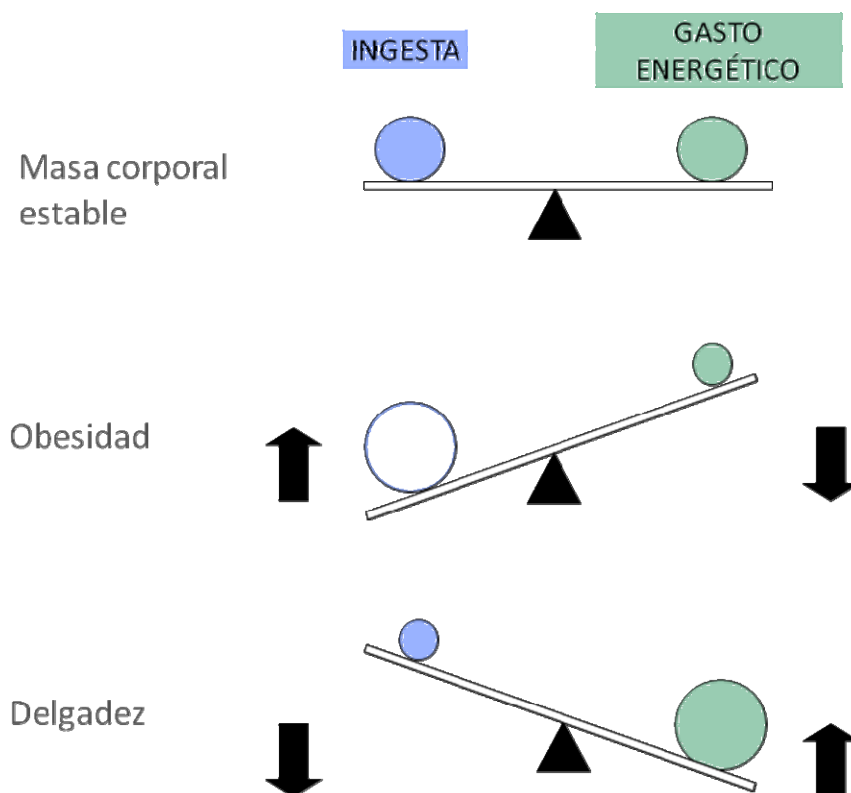


Figura 1. Representación esquemática del balance entre ingesta y gasto energético. Modificado de (4).

Además del aumento de la cantidad de comida ingerida, el otro factor que desregula en balance energético es el gasto energético. Se entiende por gasto energético la suma de la actividad física, el metabolismo basal y la termogénesis adaptativa. Cuando se habla de ejercicio se está refiriendo al movimiento voluntario, mientras que por metabolismo basal se entiende todos aquellos procesos bioquímicos necesarios para mantener las funciones vitales. La termogénesis adaptativa se refiere a la energía disipada en forma de calor en respuesta a cambios ambientales, como pueden ser la exposición al frío o a alteraciones en la dieta, aunque realmente no está del todo bien

definido el límite entre esta y el metabolismo basal, debido a que se puede llegar a considerar que la respuesta al frío puede ser parte de este metabolismo. Todo este gasto energético está orientado a quemar todas esas grasas acumuladas en el tejido adiposo. Como consecuencia de la forma de vida en los países occidentales, sobre todo en las grandes ciudades, el gasto energético se ve disminuido al mínimo, lo que lleva a que el balance energético que debería tender hacia el equilibrio, esté inclinado de una forma muy importante hacia el almacenamiento de grasas sin gasto energético, lo que a largo plazo conduce al sobrepeso y a la obesidad (1;5;6).

Además de estos factores ambientales y sociales, existe otro factor determinante en la regulación de la masa corporal de un individuo: su propia dotación genética (6). La existencia de factores genéticos es a día de hoy uno de los mayores objetos de estudio en las sociedades avanzadas. Desde hace ya más de una década se han investigado moléculas clave en el desarrollo de la obesidad, como es el caso de leptina o ghrelin, y se han descubierto numerosos neuropéptidos y vías metabólicas que actuando en el sistema nervioso central (SNC) modulan la ingesta. Finalmente, también se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las bases moleculares del gasto energético. Todos estos factores se integran formando un sistema regulador de la homeostasis energética, que busca el equilibrio entre todas las señales para mantener la masa corporal entre umbrales específicos.

A grandes rasgos, el mantenimiento de un correcto balance entre ingesta y gasto energético depende de tres elementos reguladores de la respuesta homeostática (7-9):

- Señales periféricas:
 - Procedentes del tracto gastrointestinal (señales de saciedad)
 - Hormonales
- Sistema nervioso central

SEÑALES PERIFÉRICAS

En los últimos años, se ha visto con gran claridad la existencia de una interacción entre el SNC y la actividad de numerosos órganos involucrados en la homeostasis energética. Esto requiere la transmisión de información al cerebro, y el control de la ingesta es un componente del balance de energía en donde la señalización endocrina de la periferia al SNC tiene un papel fundamental (figura 2). La homeostasis energética consiste en procesos interrelacionados integrados por el cerebro para mantener las reservas de energía a niveles apropiados para unas condiciones ambientales determinadas. La homeostasis incluye la regulación de los niveles de nutrientes en órganos de almacenamiento, como puede ser la grasa en el tejido adiposo, y en la sangre, como la glucosa sanguínea. Para llevar a cabo esto, el cerebro recibe información continuada: 1) acerca de las reservas y de flujo de energía en órganos críticos; 2) acerca de los nutrientes que están siendo ingeridos y absorbidos y, 3) sobre las necesidades energéticas basales por los tejidos. El cerebro controla tejidos que tienen mucha importancia en la homeostasis energética, como pueden ser hígado o músculo, a través, fundamentalmente, del sistema nervioso autónomo (SNA) y de la secreción de hormonas activas metabólicamente (9). Las señales periféricas que informan acerca de la ingesta y del gasto energético pueden ser divididas en dos categorías claramente diferenciadas (10;11). Una comprende las señales generadas durante las comidas que causan saciedad; es decir, señales que informan sobre la terminación de la comida o que prolongan el intervalo hasta la siguiente. El otro grupo de señales incluye hormonas que se secretan en proporción a la cantidad de grasa corporal. Estas hormonas adipocitarias llegan al cerebro transportadas a través de la barrera hematoencefálica (BBB) e interaccionan con sus receptores de membrana específicos, expresados preponderantemente en el hipotálamo. Todas estas señales interactúan con otros factores hipotalámicos para controlar el apetito y la masa corporal (9-11).

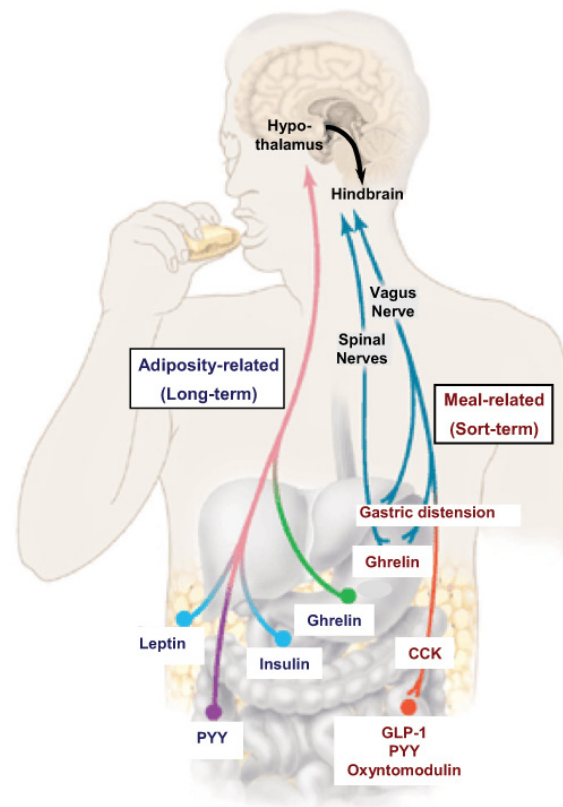


Figura 2. Diferentes señales periféricas que informan al SNC acerca del estado energético. Tomado de (12).

SEÑALES DE SACIEDAD. Señales procedentes del tracto gastrointestinal

Estas señales están íntimamente ligadas a las tres fases en la que se suele diferenciar la ingesta de alimentos: 1) fase preprandial (previa al acto de comer), 2) prandial (durante el propio acto de comer) y 3) postprandial (posterior al acto de comer). La sensación de hambre puede ser definida como la motivación para buscar y consumir alimentos, que inicia el acto de comer. La saciedad es el estado en el cual el hambre y el comportamiento alimentario están inhibidos. El objetivo de estas fases está encaminado a la búsqueda de un estado de saciedad. El tracto gastrointestinal juega un papel crucial en la regulación de la ingesta de alimentos, informando al SNC sobre la cantidad de alimento ingerido y la composición nutricional de mismo (13;14). Esta información engloba toda una serie de estímulos mecánicos, químicos y hormonales que se denominan *señales de saciedad*, y son los mecanismos de control homeostático a corto plazo. El SNC recibe información sensorial procedente de estímulos mecánicos, que informan sobre el grado de distensión del tubo digestivo y aportan información sobre la cantidad de alimento ingerido, y químicos, que aportan información sobre la composición nutricional del mismo. Esta información llega al SNC, concretamente a

núcleos del tronco cerebral como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP), a través de las aferencias vagales del ganglio cervical superior. Sin embargo, la señalización procedente del tracto gastrointestinal no está basada únicamente en estímulos nerviosos. A través de la secreción de hormonas, fundamentalmente anorécticas con la excepción de ghrelin, el tracto gastrointestinal también informa al SNC del estado nutricional.

Una de las primeras de estas hormonas descubiertas fue la colecistoquinina (CCK), que es secretada en respuesta a los lípidos y las proteínas de la comida (15). La liberación de esta hormona activa los receptores de los axones vagales en el duodeno; la señal generada es transmitida al troncoencéfalo a través del nervio vago, y de éste a otras zonas cerebrales, incluyendo el hipotálamo, y contribuye a la aparición de la sensación de saciedad. Se ha visto que la CCK no previene el inicio de las comidas sino que su acción es la de adelantar el fin de la comida que se está llevando a cabo (16;17). En diversos estudios se ha observado que en modelos animales la administración de exógena de CCK reduce la ingesta calórica, que se compensa con una mayor frecuencia en las comidas (18). Además de la CCK existe un gran número de señales gastrointestinales (tabla 1). Estas se caracterizan por promover la sensación de saciedad; por ejemplo: el *glucagón-like peptide-1* (GLP-1), la oxintomodulina o el polipéptido pancreático (PP). Las características más importantes de estas hormonas se describen en la tabla 1. Como ya se ha dicho anteriormente, existe una única excepción, el ghrelin, que hasta el momento es la única hormona gastrointestinal conocida que tiene un efecto orexigénico. Esta hormona, descubierta a finales de la década de los 90 (19), es sintetizada en el estómago y necesita de una modificación post-transcripcional única para ser biológicamente activa. Ghrelin es acilado en el tercer residuo aminoacídico por un enzima denominada gastric O-acyl transferase (GOAT) (20). Ghrelin se ha llegado a denominar como la “*hormona del hambre*”, debido a su efecto estimulador sobre el apetito y en la ingesta al ser administrado tanto de modo ICV como IP en ratas (21-23). Los niveles de ghrelin circulante aumentan en situaciones de ayuno, incrementándose de forma muy pronunciada antes de las comidas y cayendo a niveles mínimos una hora después de la comida (24). Estos hallazgos han llevado a proponer que ghrelin actúa como un iniciador de la ingesta. La caída en los niveles postprandiales de ghrelin es proporcional a las calorías ingeridas, causando la grasa una menor supresión en sus niveles que los carbohidratos o las proteínas (25;26). Otras características de ghrelin se pueden ver en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de los principales péptidos gastrointestinales y sus efectos en la ingesta y la homeostasis energética.

Hormona	Lugar de Secreción	Factores que modulan su secreción	Receptores	Sitios de acción	Acciones sobre regulación de ingesta	Ref.
Colecistoquinina (CCK)	Células I de la mucosa del intestino delgado	↑ Dietas ricas en grasa y proteínas	CCK1	Nervio vago Tronco cerebral Hipotálamo	↑ Saciedad Posible papel patogénico en obesidad	(16;27-29)
Oxintomodulina (OXM)	Células L del intestino	↑ Macronutrientes	GLP-IR	Hipotálamo	↑ Saciedad ↑ Gasto energético	(30-33)
Glucagon like-peptide (GLP-1)	Células L del intestino	↑ Macronutrientes ↓ Somatostatina ↓ Restricción calórica	GLP-IR	Nervio vago Tronco cerebral Hipotálamo	↑ Saciedad ↑ Potencia la liberación de insulina Posible papel patogénico en obesidad	(34) (35-37)
Péptido YY	Células L del intestino	↑ Macronutrientes ↑ Ejercicio	Y2	Nervio vago Tronco cerebral Hipotálamo Circuitos de Recompensa	↑ Saciedad ↑ Gasto energético Regulación a largo plazo de la masa corporal. Posible papel patogénico en obesidad	(38-40)
Polipéptido Pancreático (PP)	Células PP en los islotes de Langerhans del páncreas	↑ Macronutrientes ↑ Ejercicio ↑ Distensión gástrica ↑ CCK ↓ Somatostatina	Y4, Y1, Y5	Nervio vago Tronco cerebral	↑ Saciedad ↑ Gasto energético Posible papel patogénico en obesidad	(41-44)
Ghrelin	Células X/A de la mucosa gástrica	↑ Pérdida de sueño ↑ Restricción calórica ↑ Macronutrientes ↕ Ritmos circadianos	GHS-IRa	Nervio vago Tronco cerebral Hipotálamo Circuitos de Recompensa	Iniciador de comidas Regulación a largo plazo de la masa corporal. Posible papel patogénico en obesidad	(19;21-23;45)

SEÑALES DE ADIPOSIDAD. Tejido adiposo.

Inicialmente se pensaba que el tejido adiposo era un mero reservorio donde se acumulaba en forma de grasa el exceso de energía consumido. Sin embargo, desde el descubrimiento en 1994 de la leptina (46), se estableció con certeza que el tejido adiposo era un órgano endocrino. Se caracteriza por sintetizar y secretar muchos péptidos, denominados adipokinas, que pueden actuar a nivel local (autocrina/paracrina) o sistémico (endocrina), así como por expresar numerosos receptores que le permiten recibir señales procedentes de otros órganos, entre ellos el SNC. Esta capacidad para recibir información desde distintos órganos y poder responder a ella mediante la liberación de adipokinas, hace que se considere al tejido adiposo como elemento clave en la regulación de distintos procesos biológicos tales como metabolismo energético, funciones neuroendocrinas e inmunológicas (47).

A diferencia de las señales de saciedad que se secretan durante la comida, las adipokinas son más activas tónicamente, dando lugar a mensajes que informan al cerebro sobre la masa grasa corporal total. Las señales de adiposidad interactúan con los circuitos neurales catabólicos y anabólicos, causando un cambio en la sensibilidad del cerebro a las señales de saciedad (9). Un mayor nivel de leptina (adipokina) o insulina (hormona secretada en el páncreas en proporción al tejido adiposo) es indicativo de una cantidad elevada de grasa almacenada. Cada hormona es transportada a través de los capilares del cerebro para acceder a sus receptores ubicados en diversas áreas, como en las neuronas del hipotálamo (48). Cuando la leptina o la insulina se distribuyen de tal modo que aumentan su actividad en el cerebro, se consume menos comida, y cuando la acción de cualquiera de estas hormonas disminuye, la ingesta aumenta (10;17;49). A diferencia de lo que ocurre con las señales del tracto gastrointestinal, la insulina y la leptina administradas crónicamente en el hipotálamo modifican la masa corporal. Los animales responden a los cambios en la actividad de estas hormonas como si la cantidad de grasa corporal se hubiese visto modificada. No se debería pensar que tanto la leptina como la insulina son señales intercambiables. Cada una tiene efectos propios sobre el cuerpo y difieren como señales de adiposidad. Así, la leptina es secretada fundamentalmente por la grasa subcutánea, mientras que la insulina refleja la cantidad de grasa visceral. Por ejemplo, en hembras se ha visto que el tamaño de los depósitos de grasa subcutánea son mayores que en machos, mientras que tienen menos grasa visceral, dando como resultado que las hembras tienen mayores niveles de leptina y menores de

insulina en plasma que los machos (50). Existen modelos genéticos muy interesantes en los que se puede observar con claridad la importancia de la leptina en la regulación de la masa corporal: tanto el ratón *ob/ob*, que tiene el gen de la leptina mutado, como el *db/db*, que se caracteriza por carecer de receptores de leptina funcionales, presentan fenotipos hiperfágicos y obesos. Experimentos de parabiosis llevados a cabo en la década de los 70 demostraban la relevancia de una vía de señalización de la leptina intacta para la correcta regulación de la masa corporal de estos modelos. Además de los modelos en ratones existe un modelo en rata, la rata *fa/fa* que como los *db/db* carecen de receptores funcionales para la leptina y por tanto, no responde a ella. Además de la leptina, otras adipokinas son secretadas en proporción a la grasa corporal, como es el caso de la resistina (RSTN), aunque también existen otras que se secretan de forma inversamente proporcional a la cantidad de grasa, como puede ser la adiponectina. Las características más importantes de las adipokinas más relevantes están descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Principales adipokinas y sus acciones biológicas.

Hormona	Lugar de Secreción	Regulación Nutricional	Efectos sobre metabolismo	Ref.
Leptina	Tejido adiposo Fundus gástrico, intestino y músculo (niveles muy bajos)	↑ Obesidad ↓ Ayuno ↑ Re-alimentación	Inhibe ingesta Aumenta gasto energético Aumenta sensibilidad a la insulina Estimula oxidación de ácidos grasos	(51-55)
Adiponectina	Tejido adiposo	↓ Obesidad ↑ Ayuno ↓ Re-alimentación	Aumenta sensibilidad a la insulina Estimula oxidación de ácidos grasos	(56-59)
Resistina	Tejido adiposo en Roedores Macrófagos en humanos	↑ Obesidad ↓ Ayuno ↑ Re-alimentación	Inhibe ingesta Induce resistencia a la insulina en roedores	(60-64)
TNFα	Tejido adiposo Células inmunes	↑ Obesidad	Inhibe ingesta Induce caquexia Inhibe sensibilidad a insulina	(65;66)
IL-6	Tejido adiposo Células inmunes Músculo	↑ Obesidad	Inhibe ingesta Aumente gasto energético Induce resistencia a la insulina	(67-69)

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Toda la información periférica procedente de los mecanismos anteriores es recibida, analizada y procesada en el SNC. La importancia del SNC como punto clave en la regulación de la ingesta se comenzó a observar a mediados de siglo pasado cuando en diferentes estudios se observó que adenomas hipofisarios llevaban asociada la aparición de obesidad (70). Años más tarde, otros estudios corroboraron esta idea y demostraron que, mediante experimentos de lesiones en diferentes zonas, como el SNC (más concretamente el hipotálamo), desempeñaba una función fundamental en la regulación de la ingesta. Estos estudios se realizaron destruyendo diferentes núcleos hipotalámicos como el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo dorsomedial (DMH) y el

núcleo paraventricular (PVH), en los que se vio que la destrucción de estos llevaba asociada la aparición de hiperfagia y obesidad, o en zonas como el hipotálamo lateral (LHA), en donde se pudo observar la aparición de hipofagia (71). Fue entonces cuando se postuló la teoría del “*modelo de doble centro*” que identificaba el VMH como un “*centro de saciedad*” y el LHA como un “*centro del hambre*” (72).

Además del hipotálamo también existen otras zonas del SNC implicadas en la regulación de la ingesta. Por ejemplo, en el tronco cerebral, el NTS y el AP integran la información sensorial y hormonal procedente del tracto gastrointestinal y del hígado (vía nervio vago y aferencias del ganglio cervical superior), así como la información sobre el sabor, procedente de la cavidad bucal (vía nervios craneales), el olor y la apariencia.

HIPOTÁLAMO. Regulación hipotalámica de la ingesta.

Como ya se ha dicho previamente, el hipotálamo es una de las zonas de más importancia en la regulación de la ingesta (7;73). Anatómicamente situado en la parte mediobasal de cerebro, el hipotálamo está estructurado en diferentes agrupaciones de neuronas (núcleos hipotalámicos) que se disponen de modo bilateral en torno al tercer ventrículo (3V) (figura 3). Estos núcleos forman circuitos neuronales interconectados a través de las proyecciones de los axones y responden a cambios en el estatus energético por la alteración neurotransmisores/neuromoduladores específicos dando lugar a variaciones de ingesta y gasto energético. A continuación se pormenorizará en las funciones de los núcleos hipotalámicos más importantes en la regulación de la ingesta.

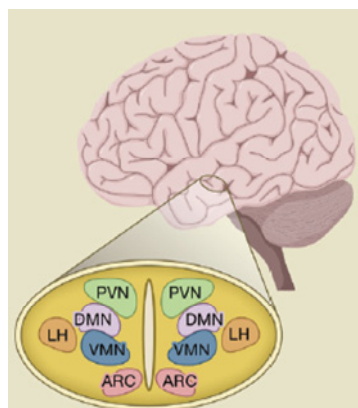


Figura 3. Disposición de los distintos núcleos en el hipotálamo. Tomado de (74).

Núcleo Arcuato

El núcleo arcuato (ARC) tiene un papel crucial en la regulación de la ingesta debido a su posición anatómica más basal del hipotálamo, en donde la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *blood brain barrier*) está especialmente modificada para permitir el paso de péptidos y proteínas circulantes (75). Las poblaciones neuronales presentes en este núcleo están muy cercanas a los capilares fenestrados de la eminencia media, dando acceso a señales humorales que son restringidas en otras zonas del cerebro. Estas neuronas están inervadas por axones que contienen gran cantidad de neurotransmisores, sintetizan receptores para muchas hormonas metabólicas y responden rápidamente a señales nutricionales (70;76).

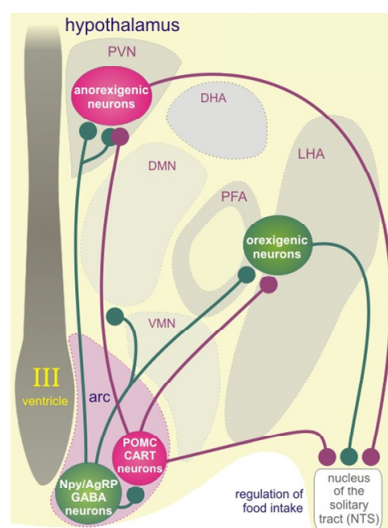


Figura 4. Neuronas del ARC y sus proyecciones a diferentes núcleos hipotálámicos.

En el ARC se pueden clasificar dos tipos de poblaciones neuronales claramente diferenciadas atendiendo al tipo de neuropéptidos hipotálámicos que expresan (figura 4). Una de ellas, formada por neuronas que expresan el péptido relacionado con agouti (*agouti related protein*, AgRP) y neuropéptido Y (NPY), se caracteriza por presentar un efecto orexigénico (inductor de la ingesta) muy potente (77), mientras que el otro grupo presenta un fuerte carácter anorexigénico (inhibidor de la ingesta) debido a que en él se co-expresan pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (*cocaine and amphetamine regulated transcript*, CART) (78;79).

Diversos estudios han comprobado que NPY es uno de los neuropéptidos más orexigénicos. Se ha descrito que el aumento de expresión de NPY estimula la ingesta y disminuye el gasto energético debido a la disminución de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) (80), y a la inhibición del eje tiroideo (81). La expresión de este

neuropéptido es máxima en estados de deficiencia energética, como puede ser durante el ayuno o la lactancia, y en animales genéticamente obesos, como el ratón *ob/ob* o el *db/db* (82;83), mientras que la leptina y la insulina disminuyen su expresión (76;84). Se ha postulado que este neuropéptido actúa a través de sus receptores Y1 y Y5 para transducir dicha señal orexigénica, aunque existen trabajos que dicen que también su efecto puede estar mediado por los receptores Y2 y Y4. A pesar del efecto claramente orexigénico de NPY, se ha visto que la ablación del gen *npv* en estados embrionarios no produce ratones con fenotipo delgado (85), y que la inactivación genética de NPY durante el estado adulto provoca la aparición de un fenotipo hipofágico y delgado muy leve, lo que lleva a pensar en un mecanismo compensatorio generado por otros neuropéptidos (86-89).

Por otra parte, tanto AgRP como POMC forman parte de uno de los circuitos neuronales claves del ARC: el sistema de melanocortinas. Este sistema tiene un papel muy importante en un gran número de procesos endocrinos y homeostáticos. Las acciones de este sistema tienen lugar a través de los receptores de melanocortinas 1-5 (MC1-R, MC2-R, MC3-R, MC4-R, MC5-R), que poseen diferentes funciones. Tanto la activación de MC3-R como de MC4-R, que se expresan en ARC, VMH y PVH fundamentalmente, influyen sobre el control de la ingesta (90;91). Aunque el papel de MC4-R en la ingesta está bien establecido, la función de MC3-R no está del todo clara. Mientras los agonistas específicos de MC4-R muestran reducción en la ingesta y que el receptor está influenciado por el estatus energético, agonistas específicos de MC3-R no influyen en la ingesta, ni el receptor atiende a cambios en el estatus energético (92;93). A pesar de esto, hay evidencias de que ambos receptores son capaces de influir en la homeostasis energética. Un ejemplo es que un antagonista de estos receptores, AgRP, es capaz de estimular ingesta en ratones *mc4-r^{-/-}*. Se puede observar que el ratón *mc4-r^{-/-}* muestra un fenotipo obeso asociado a hiperfagia, lo que confirma el papel del receptor en la regulación del apetito (94;95). En cambio en ratón *mc3-r^{-/-}* no muestra sobrepeso aunque sí presenta aumento en masa grasa, asociado a una disminución en el gasto energético (96;97). Las mutaciones de estos receptores en humanos conllevan asociada la aparición de obesidad (98;99).

Los péptidos que actúan como ligandos endógenos en este sistema son derivados del gen *pomc* por procesamiento proteolítico (figura 5). Uno de estos péptidos, la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) que se expresa en la parte

ventrolateral del ARC, se caracteriza por suprimir agudamente la ingesta después de ser administrada de modo intracerebroventricular (ICV) en ratas y ratones (100;101). Un gran número de observaciones sugieren un papel fisiológico para esta respuesta anoréctica de α -MSH. Por ejemplo, las condiciones asociadas a una reducción de la ingesta de alimentos, como el ayuno o la deficiencia de leptina, van acompañadas de una reducida expresión de este péptido, mientras que en estados de sobrealimentación su expresión disminuye (102;103). El efecto de este péptido se debe a que es un potente agonista de MC3-R y MC4-R, que como ya se ha dicho anteriormente, al activarse causan un efecto anorexigénico muy fuerte (92;93).

Por otra parte, otro de los neuropéptidos que se expresan en el hipotálamo, AgRP, es un antagonista selectivo de los receptores 3 y 4 de las melanocortinas. AgRP es un neuropéptido que al igual que NPY, con la que se co-expresa en un 90% en el ARC, está regulado negativamente por la leptina, siendo su expresión más alta en casos de ayuno (104) o mutación del gen de la leptina (ratones *ob/ob* y *db/db*), y menor en casos de sobrealimentación o administración ICV de leptina. Su acción orexigénica, como se ha dicho anteriormente, se produce cuando antagoniza los receptores de melanocortinas, aunque se ha demostrado que el efecto sobre la ingesta de la administración ICV de AgRP se mantiene durante más tiempo que el de la administración de NPY. Este hecho ha llevado a postular dos teorías muy diferentes: 1) que puede ser debido a que está actuando a través de otro mecanismo además del sistema de melanocortinas (105;106) ó 2) que es debido a un problema de cinética del receptor, presentando el antagonista de AgRP mucha mayor afinidad por su receptor que el antagonista de NPY (107).

Otro de los neuropéptidos que se expresa en el ARC y que actúa regulando ingesta es CART. Este péptido se co-expresa con POMC y también tiene efecto marcadamente anorexigénico (78;79). Las neuronas que secretan CART también están asociadas con recompensa y refuerzo, procesamiento sensorial o estrés (108). La administración ICV de CART, especialmente en el 4º ventrículo, provoca activación neuronal en el PVH, causando así la reducción de la ingesta normal y la inducida por ayuno (109). CART co-localiza con receptores de leptina en las neuronas del hipotálamo. Tanto en ratas *fa/fa* (deficientes en la señalización de leptina) como en ratones *ob/ob*, reduce los niveles de expresión de CART en el ARC, mientras que la administración de leptina a ratones *ob/ob* incrementa el mRNA de CART (110). Los niveles de expresión de CART caen

durante el ayuno o diabetes, indicando que la expresión de este transcrito está regulada por la cantidad de reserva energética y el estado hormonal periférico (111).

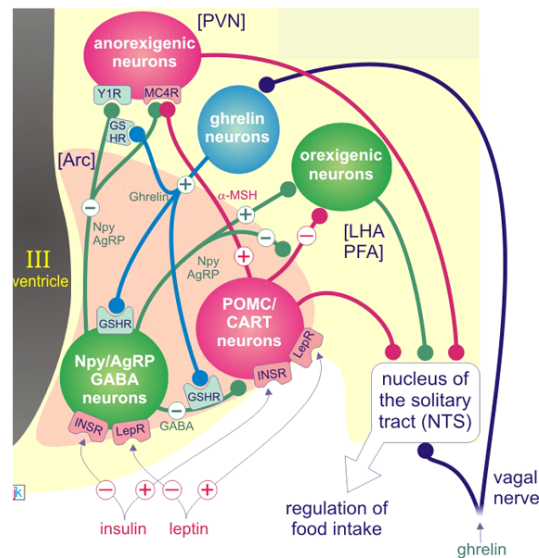


Figura 5. Proyecciones de las neuronas del ARC hacia neuronas de segundo orden.

Todas estas poblaciones neuronales del ARC emiten proyecciones hacia otras zonas hipotalámicas (figura 5). Estas neuronas, denominadas *neuronas de primer orden* (10;112), actúan, por ejemplo en el caso de NPY, enviando señales hacia PVH (en donde existe expresión de sus receptores), DMH y LH. Tanto AgRP como POMC tienen proyecciones hacia, entre otras zonas, el PVH en donde antagonizan o agonizan, respectivamente, a los receptores de melanocortinas presentes. Estas neuronas que reciben proyecciones desde el ARC son denominadas *neuronas de segundo orden* y se ha demostrado que están implicadas fisiológicamente en la homeostasis energética (10;107;113-116).

Núcleo Ventromedial

Este núcleo es de gran importancia en la regulación de la ingesta (figura 6). Desde los primeros estudios en los que se observó que lesiones en esta región producían un fenotipo hiperfágico y obeso, hasta otros en los que se utilizaban lesiones químicas y tratamientos farmacéuticos, se apunta la posibilidad que este núcleo actúe inhibiendo ingesta y aumentando metabolismo (23;117;118). Se ha llegado a denominar como un “*centro de saciedad*”.

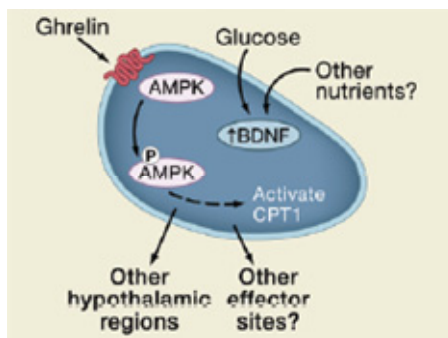


Figura 6. Factores implicados en la regulación de la ingesta a nivel del VMH. Tomado de (74).

El VMH recibe proyecciones de las neuronas inmuno-reactivas de NPY, AgRP y POMC del ARC, y a su vez proyecta sobre otras zonas hipotalámicas (DMH y ARC) y otras regiones del cerebro (NTS) (119). Aunque las proyecciones provenientes de ARC son menores que en otros núcleos, se ha propuesto que la actividad del VMH puede estar modulada por las neuronas de NPY y POMC, debido a que en él se expresan los receptores de NPY Y1 e Y5, y también MC4-R (120-124). La administración de NPY en el VMH aumenta la ingesta. El ayuno está asociado con unos niveles de proteína elevados de este neuropéptido en esta región (107;120), mientras que la respuesta electrofisiológica de las neuronas en el VMH a α -MSH está disminuida en animales en ayuno y/o tratados con AgRP (124).

Existe un número elevado de factores que ejercen sus acciones directamente en el VMH debido a que es en las neuronas de este núcleo en donde se expresan un gran número de receptores para las señales metabólicas, como pueden ser ghrelin, leptina, estrógenos u hormonas tiroideas. Además, este núcleo tiene un papel fundamental en la vía síntesis/oxidación de ácidos grasos a nivel hipotalámico, como se verá más adelante (epígrafe de Metabolismo de Lípidos).

Los estudios sobre el papel de la leptina en el control metabólico se han centrado fundamentalmente en las acciones sobre el ARC. Sin embargo, estudios recientes identifican las neuronas que expresan el factor esteroideogénico tipo 1 (SF-1) en el VMH como neuronas de primer orden mediadoras de los efectos de la leptina en la regulación de la masa corporal (125). SF-1 es esencial para el correcto desarrollo y funcionamiento del VMH (126;127). Se ha demostrado que la co-expresión del receptor de leptina y SF-1 en las neuronas de este núcleo es fundamental para el control de la homeostasis mediada por leptina (125). Además, la delección específica del receptor de leptina en las neuronas de SF-1 conlleva la aparición de patologías propias del síndrome metabólico, tales como la esteatosis hepática, hiperleptinemia o dislipemia (125;128).

También se ha visto que en el VMH se expresa el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), implicado en la regulación del desarrollo neuronal y su plasticidad, y cuya expresión se reduce en situaciones de ayuno (129). Se ha comprobado en humanos que la alteración de BDNF o su receptor TRKB causan hiperfagia y obesidad, además de retraso en el desarrollo mental, disminución de la memoria a corto plazo e hiperactividad (129-131). Este factor, que interviene en las funciones metabólicas reguladas por el VMH, está regulado a su vez por distintos factores nutricionales. Este efecto no es mediado por el sistema de melanocortinas, a diferencia de lo que se pensaba inicialmente, ya que BDNF reduce la ingesta y la masa corporal en ratones deficientes de MC4-R (129).

Núcleo Paraventricular

Está situado en la parte anterior del hipotálamo, próximo a la parte superior del tercer ventrículo (3V) y se ha descrito que su destrucción implica la aparición de hiperfagia. Al igual que el VMH, es un núcleo que integra señales (tales como NPY, AgRP o POMC) procedentes del ARC y de otras regiones del SNC. Además es un núcleo muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta, como CCK, NPY, ghrelin o leptina. Como ocurre con el VMH, estos péptidos pueden actuar mediante la modulación de la kinasa activada por AMP (AMPK) ya que la administración de péptidos anorexigénicos inhibe la subunidad AMPK α 2, mientras que los péptidos orexigénicos la activan (132).

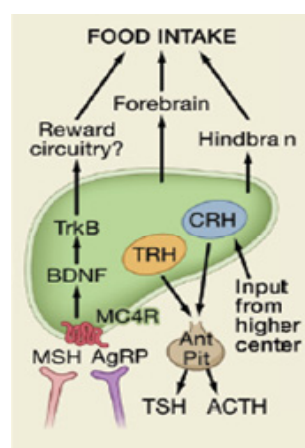


Figura 7. Regulación de la ingesta a nivel del PVH. Tomado de (74).

Una de las características más relevantes de PVH es que es el principal productor de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de hormona liberadora de

tirotropina (TRH), ambos factores anoréxicos. Es en este núcleo, más concretamente en su división parvocelular, en donde se encuentra la neurona hipofisiotrópica de TRH (133;134). Los axones de esta neurona hipofisiotrópica proyectan a la zona externa de la eminencia media en donde la TRH es liberada cerca de los capilares del sistema portal hipofisario, y puede entonces llegar hasta la hipófisis anterior en donde ejerce su función como regulador de la secreción de la hormona estimuladora del tiroides (TSH) (134). La función más importante de TRH es la de mantener la homeostasis de las hormonas tiroideas a través de la regulación de la TSH de la células tirotropas de la hipófisis. La unión de TRH con sus receptores estimula la expresión génica de las subunidades de TSH a través de la ruta de fosfatidilinositol (135). Además, TRH regula la actividad biológica a través de la modulación de la glicosilación de TSH (136). La delección o mutación de TRH provocan un hipotiroidismo muy severo con niveles muy bajos de TSH y de hormonas tiroideas circulantes (137). Se ha descrito una relación inversa entre los niveles de hormonas tiroideas (TH) y la expresión de TRH en el PVH durante la inducción de hipo- e hipertiroidismo. Además, la TRH es de gran importancia en la homeostasis energética debido a que ejerce efectos sobre ingesta, termogénesis, activación del aparato locomotor o la regulación de SNA (138).

Otro factor que se expresa en el PVH es CRH, que es modulado por las proyecciones de NPY del ARC para tener influencia sobre la homeostasis energética. Además, CRH modula la producción hipofisaria de POMC, que es el precursor de la adrenocorticotropina (ACTH), la cual modula la producción de glucocorticoides adrenales (139).

Núcleo Dorsomedial

El DMH se ha implicado en la regulación del balance energético; sin embargo, su función era desconocida hasta hace no mucho tiempo. El DMH está implicado en una gran variedad de mecanismos reguladores que incluyen la modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño y ritmos circadianos de la actividad locomotora (140;141). Este núcleo recibe proyecciones de las células del ARC y de otras zonas cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta. Se ha visto que lesiones provocadas en este núcleo inducen hiperfagia, aunque los animales mantienen la misma composición corporal (142).

Además, en este núcleo existe una pequeña población de neuronas que expresan NPY, que podrían estar mediando en la hiperfagia observada en ratas preñadas y en

lactantes (143;144), así como en modelos de obesidad genética como el ratón *agouti* y el *MCR4 KO* (145-147). También se ha localizado una abundante expresión de CART. Aunque no está del todo claro su función, se piensa que puede estar involucrado en la respuesta a situaciones de ayuno (148).

Hipotálamo lateral

Durante mucho tiempo fue considerado el “*centro del hambre*”. Se ha visto que animales con lesiones provocadas en este área desarrollaron un fenotipo hipofágico y delgado. En él existen dos poblaciones principales de neuronas: las que expresan orexinas (OX-A y OX-B, también llamadas hipocretinas) y las que expresan la hormona concentradora de melanina (MCH), ambos neuropéptidos orexigénicos. Estas neuronas están inervadas por axones de POMC y NPY, sugiriendo que su función estimulando ingesta podría estar mediada por el sistema de melanocortinas del ARC (70). Tanto orexinas como MCH proyectan a una gran variedad de núcleos y zonas extrahipotalámicas, lo que hace que participen en procesos tales como el sueño (orexinas), función neuroendocrina, aprendizaje, memoria o motivación (149-155).

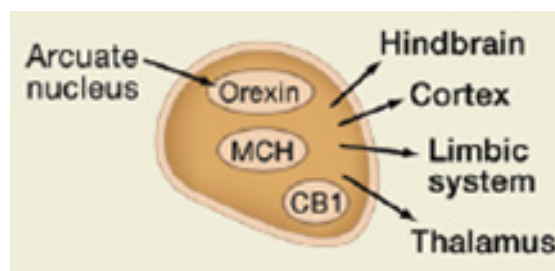


Figura 8. Factores implicados en la regulación de la ingesta a nivel del LHA. Tomado de (74).

Núcleo Supraquiasmático

La función del núcleo supraquiasmático (SCN) en el balance energético ha sido eclipsada por la función que este tiene como mediador de los ritmos circadianos de las funciones biológicas (156). El SCN controla la secreción circadiana de las hormonas metabólicas y se piensa que regula el contenido de tejido adiposo estacional y mantiene las pautas de los niveles de glucosa (157;158). La destrucción de SCN provoca ingesta continua debido a la pérdida del patrón circadiano, y mutaciones en el gen *clock* (un factor de transcripción expresado en el SCN que es crítico para la generación de los ritmos circadianos) provocan la aparición de fenotipo obeso.

El SCN proyecta a muchos núcleos hipotalámicos, sobre todo a PVH y DMH (156). Existen estudios que sugieren que el ARC proyecta al SCN, lo que podría indicar que el sistema de melanocortinas puede influenciar su actividad (159).

OTRAS ZONAS DEL SNC

Tronco Cerebral

Se ha descrito la existencia de conexiones entre el hipotálamo y el tronco cerebral, particularmente en el núcleo del tracto solitario (NTS), y se han encontrado neuronas que están implicadas en el control autónomo de la ingesta, digestión y absorción de comida.

Al igual que el ARC, el NTS se encuentra cerca de la zona en donde la BBB es más laxa, para poder responder a las señales periféricas circulantes, además de recibir aferencias vagales del trato gastrointestinal (70).

Se ha encontrado una gran cantidad de sitios de unión para NPY, incluyendo los receptores Y1 e Y5 (160-162). Además, también se ha descrito que existe expresión de MC4-R y la síntesis de péptidos derivados de POMC, lo que evidenciaría la existencia de un sistema de melanocortinas diferenciado del ARC (163).

Cerebelo

Se han encontrado conexiones bidireccionales entre neuronas hipotalámicas y el cerebelo mediante estudios electrofisiológicos (164). Está relacionado con la motivación de comer, y se ha comprobado que la saciedad disminuye la actividad del cerebelo mientras que la administración oral de glucosa la aumenta. Desde el cerebelo salen proyecciones hacia otras zonas implicadas en la regulación de la ingesta tales como NTS (164).

Hipocampo

Está relacionado con la memoria espacial, así como de eventos y hechos. Además, está implicado en la regulación de la ingesta ya que presenta receptores de señales metabólicas tales como insulina y leptina, necesitando para ello que presente integridad estructural (165). La exposición a dieta alta en grasa está asociada a aumento de ingesta, ganancia de peso y disminución de la memoria (166).

Área tegmenal ventral (VTA)

La relevancia de esta zona es debida a la presencia de neuronas dopaminérgicas. La presencia de estas neuronas en el VTA y que proyectan sobre el núcleo accumbens (NAc) se ha implicado en sistemas de recompensa asociados a la comida (167). Aunque inicialmente se creía que las señales metabólicas modificaban el sistema de la dopamina a través del ARC, ahora se cree que las propias neuronas dopaminérgicas del VTA son sensibles a distintos péptidos hipotalámicos tales como NPY, AgRP y orexinas, y también a ghrelin, insulina o leptina (70).

GASTO ENERGÉTICO

Hasta el momento solo se ha descrito uno de los dos componentes de la ecuación del balance energético: la regulación de la ingesta. Es de gran importancia, debido al auge actual en las investigaciones, tener en cuenta el otro factor que modula este balance, que como ya se ha dicho anteriormente, es el gasto energético.

Al igual que ocurre con la regulación de la ingesta, cualquier variación o modificación en el balance del gasto energético lleva asociada alteraciones en la masa corporal de un individuo. Para poder entender el gasto energético desde un punto de vista fisiológico es necesario explicar los diferentes conceptos que lleva asociados. Se ha descrito que el gasto energético se podría dividir en tres tipos más o menos bien diferenciados de uso de la energía: 1) metabolismo basal, 2) actividad física (ejercicio) y 3) termogénesis adaptativa (figura 9). El primero de ellos, usa la energía almacenada para llevar a cabo todos esos procesos biológicos necesarios requeridos para el mantenimiento de las células y de los órganos; es decir, representa un gasto de energía obligatorio para el correcto funcionamiento del organismo (1;168).

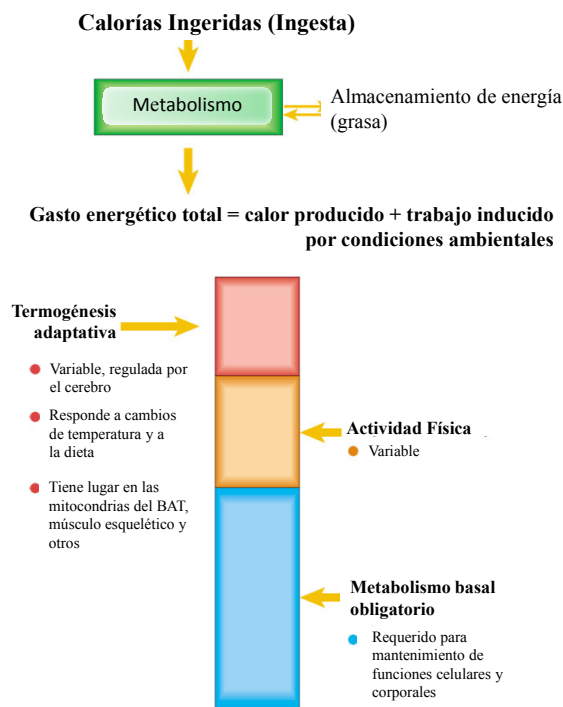


Figura 9. Factores implicados en el gasto energético. Modificado de (169).

Uno de los factores que ayudan más activamente al aumento de la prevalencia del sobrepeso y de la obesidad en la sociedad actual es la actividad física. Como ya se ha dicho, uno de los problemas más perjudiciales de las sociedades industrializadas es el sedentarismo que conduce a poco ejercicio físico necesario para poder desempeñar las actividades cotidianas; es decir, el poco gasto de energía acumulada necesario para el día a día. Esta disminución en la liberación de la energía lleva como consecuencia su almacenamiento como grasa y, como consecuencia directa, un aumento en la adiposidad y la masa corporal al no poder ser gastadas las calorías ingeridas (1;5;6).

El último de los factores implicados en el gasto energético es la termogénesis adaptativa: la energía gastada en forma de calor en respuesta a cambios ambientales, como pueden ser el frío o la dieta. Se podría decir que su función primordial es proteger al organismo de esos cambios ambientales (169;170). Las bases moleculares de este mecanismo son bastante complejas y se tratarán en profundidad en el próximo apartado.

TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA. Tejido adiposo marrón.

Tanto la aclimatación al frío como los cambios en la dieta consumida son capaces de producir variaciones muy importantes en el gasto energético total de un individuo. Se sabe que ante la exposición al frío el cuerpo se protege con una serie de estímulos agudos como son, por ejemplo, los escalofríos (temblores en respuesta a las

bajas temperaturas). Para la aclimatación al frío o a la variación a la dieta, el organismo necesita una producción de energía mucho mayor que cuando se encuentra en condiciones normales. Este intento de producir energía en respuesta al ambiente se denomina termogénesis adaptativa (168;171). En la producción de calor juega un papel crucial el tejido adiposo pardo (*brown adipose tissue*; BAT) (5;169;170).

A pesar de estar compuesto por células grasas, la constitución del BAT es totalmente diferente a la del tejido adiposo blanco (*white adipose tissue* WAT). El BAT está ampliamente innervado por el sistema nervioso simpático (SNS), que hace que tenga una respuesta mucho más rápida a su estimulación, un hecho clave en su función termogénica (5;169;170;172;173). Además, existe una característica bastante llamativa, que es la presencia de gran cantidad de mitocondrias en los adipocitos del BAT (el lugar en donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y la que da lugar a la producción de calor) (174). Los primeros estudios llevados a cabo sobre la fisiología y la actividad termogénica del BAT fueron desarrollados en animales que se someten a periodos de hibernación en los que el organismo se debe proteger contra el frío sin la ayuda de ningún otro factor que ayude a mantener la temperatura corporal (5;175). Se ha visto que en ratas este tejido presenta mayor actividad termogénica en hembras que en machos, y que en ellas el tamaño de las mitocondrias es mayor (176). En humanos se creía en un principio que únicamente se podía encontrar BAT en recién nacidos (177), pero se ha descrito que en respuesta al frío se puede transactivar de los depósitos de WAT para dar lugar a termogénesis (178;179). En los últimos años se ha estudiado más en profundidad y por medio de técnicas más novedosas la evolución de los depósitos de BAT con la edad en humanos. Se ha descrito que muchos de los depósitos encontrados durante la niñez disminuyen o incluso desaparecen (180). En diversos ensayos publicados durante el año 2009 se ha visto, usando la tecnología PET (*positron emission tomography*; PET)(181-183), el aumento de los depósitos de BAT tras la exposición al frío, y que este tejido presenta mayores niveles de UCP-1, D2 ó receptores adrenérgicos (181). Además, también se ha visto que existe una relación entre los depósitos de BAT y la masa corporal, siendo menores los depósitos encontrados en individuos que presentan obesidad (182). Asimismo, se ha descrito que la mujeres presentan mayor cantidad de BAT que los hombres (183).

La gran cantidad de mitocondrias existentes en las células del BAT, es fundamental para que se produzcan la fosforilación oxidativa y la termogénesis (175).

Las mitocondrias presentan dos compartimentos envueltos por una membrana exterior, permeable a metabolitos pequeños, y una membrana interior, que presenta una permeabilidad mucho más restringida. Esta membrana contiene una serie de transportadores específicos para el intercambio ADP-ATP, fosfato, citrato, glutamato y malato. Además, mantiene un gradiente electroquímico muy grande generado por la cadena de transporte electrónico necesaria para la conservación de la energía y para la síntesis de ATP en la mitocondria así como para su uso (175;184). Todos estos pasos representan reacciones acopladas en las que cantidades fijas de reactivos producen cantidades estequiométricas de productos en cada paso (respiración mitocondrial acoplada). Las mitocondrias participan en el gasto energético a través de la oxidación de ácidos grasos, que es un proceso catabólico en el que el ácido graso se descompone en moléculas de acetyl-CoA dando lugar a la generación de energía en forma de ATP, y la oxidación de NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide* (en su forma reducida); NADH) y FADH₂ (*flavin adenin dinucleotide* (en su forma reducida); FADH₂) reducidos. De hecho, los pasos finales de la oxidación de ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos tienen como resultado la formación de NADH y FADH₂. La conversión de glucosa o ácidos grasos a CO₂ genera cantidades estequiométricas de NADH y FADH₂. La oxidación de estos lleva a que un número fijo de protones que se bombeen a través de la membrana interna de la mitocondria, la re-entrada de estos protones por medio de la ATP sintasa genera cantidades fijas de ATP, por fosforilación de ADP, que es utilizado para realizar el trabajo celular necesario para mantener el organismo. La cadena de transporte electrónico, que oxida estos NADH y FADH₂ por transferencia de electrones a O₂, que es el aceptor electrónico final, crea un gradiente en la membrana interna durante la re-oxidación y la transferencia de electrones que provoca el bombeo de protones hacia la capa interna a través de la ATP sintasa (169;175) (figura 10). La eficiencia final de todo este conjunto de procesos, denominado fosforilación oxidativa, no es del 100% y mucha de la energía almacenada es liberada en forma de calor (175). Debido al gradiente existente a ambos lados de la membrana interna se produce un goteo de protones a través de la misma que no es consecuencia de la acción de la ATP sintasa. La proteína que lleva a cabo este proceso físico es la denominada proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein*; UCP-1) y es la que confiere a los adipocitos del BAT su capacidad termogénica (185;186). Este proceso de traspaso de protones desde un lado a otro de la membrana interna se define como un proceso oxidativo desacoplado de la síntesis de ATP.

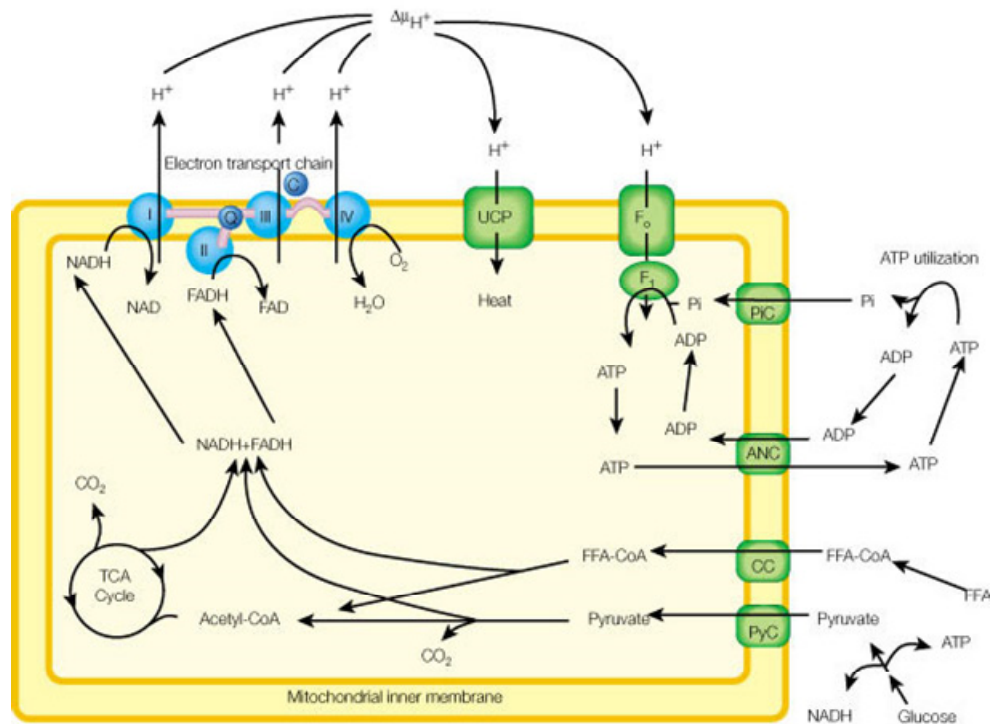


Figura 10. Mecanismo de la fosforilación oxidativa. Tomado de (169).

La respuesta inicial que desencadena la termogénesis se produce a nivel central. Debido tanto a la exposición al frío como a los cambios en el estatus energético (niveles de leptina, por ejemplo), el cerebro responde mandando una serie de estímulos por medio del SNS hacia el BAT. Esta teoría del control central de la termogénesis se propuso después de comprobar que animales con lesiones hipotalámicas desarrollan obesidad a pesar de ser sometidos a restricción calórica (187). Este aumento en el almacenamiento de energía ingiriendo las mismas calorías que un animal sin lesionar indicaba una disminución en el gasto energético (169).

El primer paso del mecanismo molecular que da lugar a la termogénesis es la activación del BAT a través de los receptores adrenérgicos debido a la gran inervación del SNS en este tejido (170). Se ha descrito la existencia de dos clases de receptores adrenérgicos, α y β , y que cada clase se puede dividir en diferentes subtipos, teniendo así al final 5 receptores distintos: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 . Se sabe que los receptores más implicados en la estimulación de la termogénesis adaptativa son los receptores adrenérgicos β (β -AR). Mientras que β_2 -AR no se encuentra expresado en los adipocitos marrones en sí mismos pero sí en el BAT (188-190), se cree que está localizado predominantemente en el sistema vascular (170), y que β_1 -AR existe en los adipocitos marrones pero no tiene ningún efecto significativo en función alguna de esas células

(191), el β_3 -AR se ha visto que además de expresarse en los adipocitos del BAT, media las funciones fisiológicas de la norepinefrina (NE), un neurotransmisor clave para que se lleve a cabo la termogénesis (170). Aunque el β_3 -AR se haya descrito como el receptor fundamental para el inicio de la función termogénica, no se puede decir que sea el único que la pueda llevar a cabo. En ratones con el gen de este receptor deletado se ha visto que la respuesta a norepinefrina puede estar mediada por el β_1 -AR, como compensación a la pérdida de β_3 -AR, lo que no significa que en condiciones normales sea el responsable de la inducción de la termogénesis (192).

Diferentes estudios han mostrado que los efectos de la activación de los receptores adrenérgicos β se producen a través de la activación de la vía de la adenilato ciclasa (inducción de la formación de cAMP) (193;194) (figura 11). Así, la activación de esta vía con forskolina reproduce los efectos de la estimulación adrenérgica, y la inhibición de la protein quinasa A (PKA) bloquea todos sus efectos sobre los adipocitos del BAT (195). Tras la activación de PKA como consecuencia de la estimulación adrenérgica, esta proteína produce diferentes efectos sobre los adipocitos. Una de estas funciones se debe a que PKA actúa sobre Src, a través de un intermediario tirosina quinasa, llevando a la activación de la vía de ERK1/2 y actuando como un controlador anti-apoptótico (196). Otra diana de PKA conocida es la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB), que al ser fosforilado (activado, pCREB) induce la expresión de diversos genes, entre ellos UCP-1 (197).

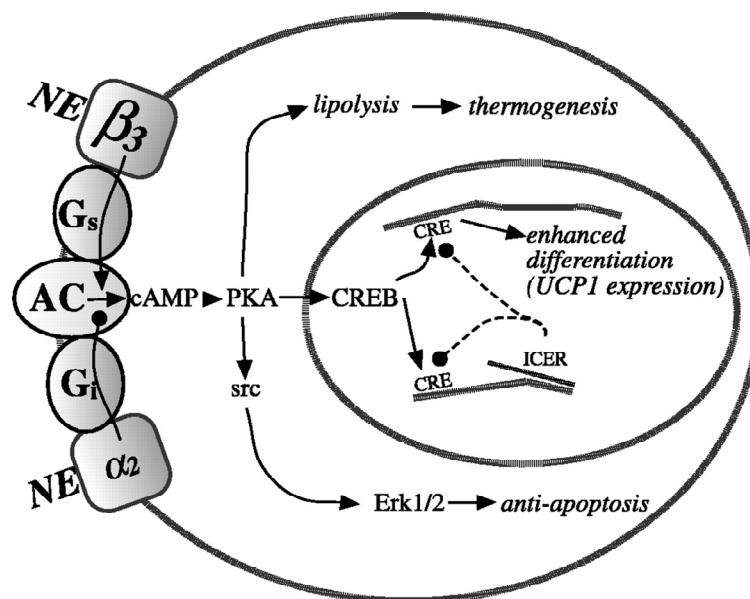


Figura 11. Señalización adrenérgica en los adipocitos del BAT. Tomado de (170).

Se ha observado que uno de los procesos fundamentales que desencadena la termogénesis en los adipocitos marrones es la lipólisis: todo proceso que induzca termogénesis induce también lipólisis (170) (figura 12). La activación de la lipólisis es otra de las acciones, aunque esta vez indirecta, de PKA, que a través de la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y de la fosforilación (desactivación) de perilipina da lugar al inicio de este proceso. Al fosforilarse la perilipina, esta se disocia de las gotas de triglicéridos, que quedan expuestos a la acción de HSL. Esto da lugar a la formación de ácidos grasos libres y glicerol en el citosol (198). Una parte de los FFAs formados en el citosol son esterificados a FFA-CoAs y se translocan hacia el interior de la mitocondria por medio de las carnitín palmitoil transferasas (CPT; proceso descrito en detalle en apartados posteriores). Una vez en el interior de la mitocondria, por medio de las reacciones descritas previamente, crean un gradiente de protones entre el interior y el exterior de la membrana interna (170) (figura 12).

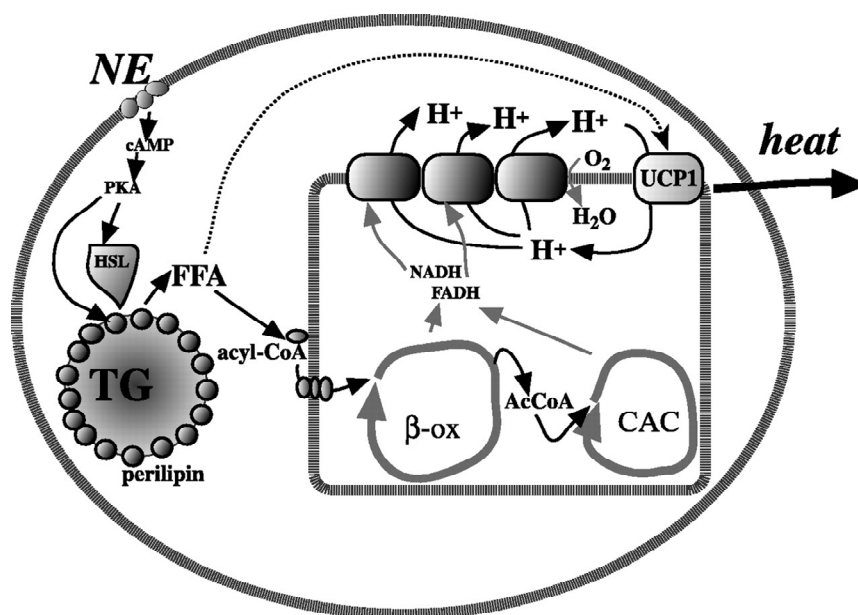


Figura 12. Mecanismo de la activación de la termogénesis inducida por NE en los adipocitos del BAT. Tomado de (170).

Se ha hipotetizado sobre el modo de acción que tienen los FFAs que quedan en el citoplasma sobre la termogénesis mediante su acción en UCP-1 (figura 13). Una de las teorías que se ha postulado dispone a los FFAs como reguladores alostéricos de UCP-1: el FFA interactúa con UCP-1 y provoca en él un cambio conformacional que tiene como resultado su activación (199-201). Otros estudios proponen que la activación de UCP-1 se debe a la función de los FFAs como cofactores: los grupos carboxilo de los FFAs actúan como donadores/aceptores en los canales de translocación de protones de

UCP-1. Los FFAs serían capaces de penetrar en la interfaz de la UCP-1 y poder desempeñar así la función como cofactores (201). Por último, se ha formulado una teoría totalmente diferente en lo que se refiere a la función que desarrolla UCP-1 en todo el proceso de termogénesis. Hasta el momento solo se había propuesto UCP-1 como un transportador de protones hacia la matriz mitocondrial. En 1991, *Skulachev* (202) propuso que el transporte de protones era independiente de UCP-1, cuya función en este modelo es como transportador aniónico, pasando los FFAs desprotonados (se desprotonizan en el interior de la mitocondria debido a las diferencias de pH) desde la matriz hacia el exterior de la membrana interna. Una vez en el exterior, se produce la re-entrada de los FFAs en su forma protonada (202-205).

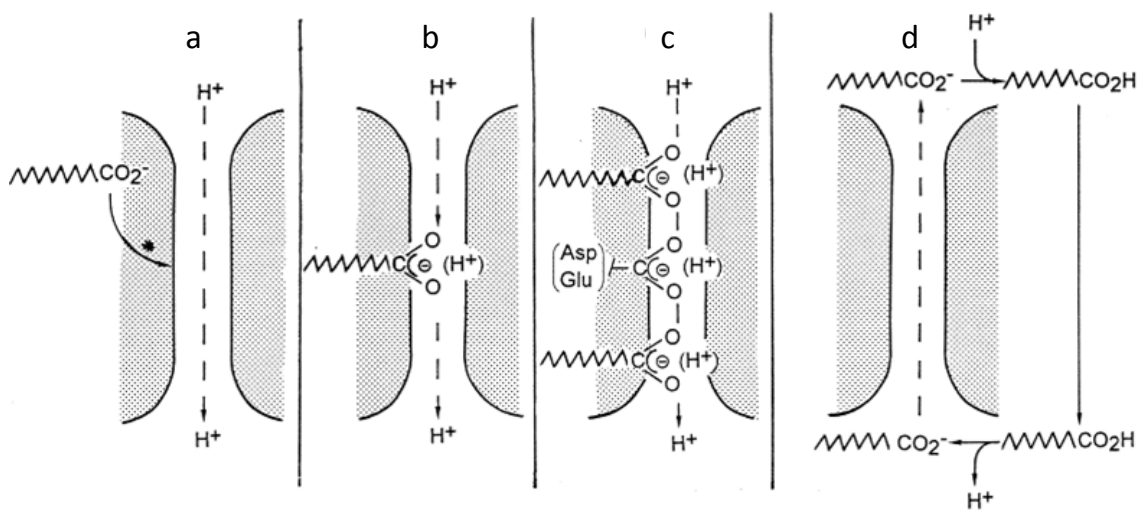


Figura13. Diferentes propuestas para la activación de UCP-1. a) los FFAs provocan un cambio conformacional, b) y c) los FFAs actúan como cofactores, y d) UCP-1 actúa como transportador aniónico. Tomado de (186).

Hasta el momento únicamente se han explicado las bases moleculares del proceso termogénico. Para entender la importancia de este proceso es fundamental examinar el papel fisiológico que tienen algunos de los componentes de esta vía de producción de calor. Un hecho fundamental en el estudio de la termogénesis fue el desarrollo y el estudio del ratón con el gen *ucp-1* delecionado (206). Previo al estudio, y dada la relevancia fisiológica que se suponía que tenía UCP-1, se pensó que el fenotipo que debía presentar era obeso y sensible a la exposición al frío. En el primer estudio llevado a cabo con este ratón se pudo observar que únicamente una de las dos hipótesis realizadas previamente era cierta. Experimentos de exposición al frío (5°C) demostraron que estos ratones eran incapaces de mantener la temperatura corporal, lo que quiere

decir que la termogénesis mediada por UCP-1 en el BAT es fundamental para proteger al organismo frente al frío (206). Por otra parte, se demostró que la otra hipótesis previa al estudio era equivocada, como estos ratones debían de ser incapaces de disipar la energía almacenada en forma de calor debido a la ablación de *ucp-1*, se suponía que presentaría fenotipo obeso. En un principio, en el trabajo original de *Enerback* (206), se describió que estos ratones no presentaban obesidad en condiciones normales y que presentaban también resistencia a desarrollar obesidad inducida por dieta. Se postuló que existían otros mecanismos de compensación. En aquel momento se acababa de descubrir un homólogo de UCP-1, la proteína desacopladora 2 (*uncoupling protein 2*; UCP-2), y se pensó que podía estar mediando un mecanismo compensatorio en el balance energético en ausencia de UCP-1. De hecho, el trabajo inicial indicaba que esta nueva proteína estaba sobreexpresada únicamente en el BAT del ratón *ucp-1^{-/-}*, y que esto era debido a la acumulación de grasa en los adipocitos del BAT de este modelo (206). En el año 2009, y tras la publicación de un gran número de trabajos estudiando las características de este ratón, se llevó a cabo un estudio en el que se intentaba explicar el por qué del fenotipo no obeso de este modelo (207). Una de las causas que parece afectar a que estos ratones no presentasen fenotipo obeso en un primer momento era el estrés térmico: a una temperatura normal de estabulación de 20-22 °C (condiciones en las que fue fenotipado por *Enerback*) los ratones están sometidos a un estrés que les hace aumentar su metabolismo alrededor de un 50% (208). El mantenimiento de una temperatura corporal adecuada es prioritario para el organismo, y esta demanda de energía extra determina el metabolismo basal del ratón, lo que puede estar influenciando otros estudios metabólicos como es, en este caso, la aparición de la resistencia a obesidad en el modelo. Bajo las condiciones de termoneutralidad (30 °C, no existe estrés térmico) en las que se lleva a cabo este estudio se puede observar cómo sin necesidad de exposición a una dieta rica en grasa, estos ratones *ucp-1^{-/-}* aumentan su masa corporal, que se ve incrementada de modo mucho más fuerte cuando estos animales ingieren este tipo de comida. Este modelo tiene una eficiencia metabólica mayor que los ratones *wildtype*, que ganan más masa ingiriendo las mismas calorías (207). Se ha descrito que en condiciones de termoneutralidad la ablación de UCP-1 suprime la termogénesis inducida por dieta, tanto los animales que ingieren comida control como los que ingieren comida rica en grasas muestran una menor respuesta que los ratones *wildtype* a la estimulación con NE (207).

Tras UCP-1 se descubrieron dos homólogos de esta proteína: UCP-2 y UCP-3 (*uncoupling protein 3*; UCP-3). Se cree que están involucrados de alguna manera en la termogénesis adaptativa. Ambas proteínas presentan un 58% de homología con UCP-1, y la gran diferencia entre todas ellas es el lugar de expresión (209). Mientras que UCP-1 se expresa únicamente en los adipocitos del BAT, UCP-2 está expresado, además de en BAT, en otros tejidos como corazón, pulmón o WAT. UCP-3 se caracteriza por tener una elevada expresión en el músculo esquelético (en donde su papel es muy importante), aunque también se ha encontrado en BAT (210). A pesar de estar expresadas en BAT, tanto los niveles de UCP-2 como UCP-3 son mucho más bajos que los de UCP-1 (del rango de 200:1). Además, se ha observado que aunque exista expresión de mRNA no siempre hay expresión de estas proteínas en BAT (211). Tras el estudio de los ratones deficientes en estas proteínas se ha confirmado que no juegan ningún papel alguno en la función termogénica, por lo menos en lo vinculado a la exposición al frío. Tampoco se ha visto que estén reguladas en animales normales tras adaptación al frío o por el cambio de dieta (168;212-215). Se ha postulado que pueden funcionar como mecanismo de compensación al menos en BAT, en estados en los que la actividad de UCP-1 está reducida. En otros tejidos desempeñan otras funciones como es el caso de UCP-2, que está involucrada en la limitación de especies reactivas al oxígeno (ROS), regula de modo negativo la secreción de insulina o controla el metabolismo de ácidos grasos (211). En el caso de UCP-3 cabe destacar la función que lleva a cabo en músculo como desacoplador de la fosforilación oxidativa; el músculo es un tejido en el que se ha postulado que puede tener lugar la termogénesis. En diferentes estudios se ha visto que UCP-3 no tiene un efecto directo sobre la función termogénica, que puede ser debido a su baja expresión con respecto a la de UCP-1 en el BAT. La expresión específica de músculo tanto de mRNA como de proteína hace de UCP-3 un candidato mejor para llevar a cabo la termogénesis en este tejido (216;217), pero se ha demostrado que su expresión solo se ve alterada durante el primer día de exposición a frío, volviendo a niveles basales tras la aclimatación a bajas temperaturas (218;219). Existen indicios de que esta proteína puede estar involucrada en la termogénesis, pero realmente aun no está del todo clara su relevancia (219).

Otro modelo interesante que aporta mucha información sobre la importancia de toda la ruta descrita previamente en la termogénesis adaptativa es el ratón con los receptores adrenérgicos β delecionados. Estos animales presentan una mayor masa corporal, que es atribuida a que estos ratones presentan mayor cantidad de grasa, aun sin

que presenten una mayor ingesta (220). Otro hecho que va en concordancia con la importancia de esta vía es que tras la exposición a dieta rica en grasas estos animales ganan peso muy rápidamente, indicando que los receptores adrenérgicos están mediando la activación de la termogénesis inducida por dieta. En el caso de la exposición al frío de estos animales se ha descrito que pierden la capacidad de responder al estímulo creado por la temperatura y no son capaces de mantener su temperatura corporal entre umbrales óptimos; este hecho va acompañado de una menor expresión de los genes implicados en la termogénesis, como UCP-1 o D2 (220). Por otra parte, otra evidencia del papel relevante del SNS es que estos ratones muestran un menor gasto metabólico; es decir, la consumición de oxígeno es menor a la de los ratones control (220). Estos trabajos clarifican la importancia del mantenimiento del sistema β -adrenérgico intacto para que se lleve a cabo el proceso termogénico, y por tanto, se mantenga el balance energético en un estado óptimo. El fenotipo del ratón β_3 -AR-null no presenta fenotipo normal; únicamente tiene un leve aumento en la masa grasa y en la masa total de las hembras (192). Esto puede deberse a un mecanismo compensatorio con los otros receptores adrenérgicos.

Además de los β -AR, sobre todo β_3 -AR, se ha descrito que los receptores adrenérgicos α pueden tener influencia en el gasto energético. En el caso del α_2 -AR se ha visto que también responde a la estimulación de la NE, pero su activación causa efectos opuestos a los de la activación β -adrenérgica, disminuye actividad de la vía de la adenilato ciclasa e inhibe la termogénesis (170). En el caso de α_1 -AR, se ha comprobado que responde a estímulos de NE, pero una de sus funciones principales es la de liberar iones Ca^{+2} intracelular que inducen el grado de termogénesis a un nivel de cAMP dado (221).

Regulación transcripcional de UCP-1

Como se ha visto hasta el momento, la proteína mas involucrada en la termogénesis adaptativa es UCP-1. Además de su activación, es crítica la regulación de la expresión de su gen, que está mediada por un amplio número de factores de transcripción. La regulación de UCP está mediada por cAMP que, como se ha visto anteriormente, aumenta los niveles de PKA, y a su vez es capaz de fosforilar CREB (222). En el promotor del gen *ucp-1* existe una región *enhancer* de 200 pares de bases que promueve la transcripción en respuesta a la estimulación β -adrenérgica (y por lo tanto dependiente de cAMP) y que es selectiva de la grasa parda (223;224). Además, en

el promotor del gen se encuentra otra región similar a la anterior que presenta sitios de unión para diferentes receptores nucleares, como son el receptor activado del proliferador del perixosoma (*perixosome proliferator-activated receptor*; PPAR), el receptor de hormonas tiroideas β (TR β) o el receptor X de ácido retinoico (RXR). Al ser activados por sus correspondientes ligandos incrementan la transcripción de *ucp-1*(169;222) (figura 14). Estos receptores se encuentran formando heterodímeros (PPAR/RXR y TR β /RXR) que necesitan un cofactor para involucrarse en la transcripción de *ucp-1*. Dicho cofactor, el co-activador de PPAR γ 1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator*, PGC-1 α), actúa como regulador transcripcional y se ha visto que su co-expresión activa de modo muy fuerte ambos heterodímeros (225;226). Este co-activador responde a estímulos adrenérgicos y por lo tanto está regulado por cAMP. Existe otro miembro de la familia de PGC-1, el PGC-1 β ; se ha descrito que esta isoforma está preferentemente implicada en procesos de biogénesis mitocondrial, aunque se ha visto que en el ratón PGC-1 β KO el BAT pierde la capacidad de mediar la termogénesis termoregulatoria tras la exposición al frío (227).

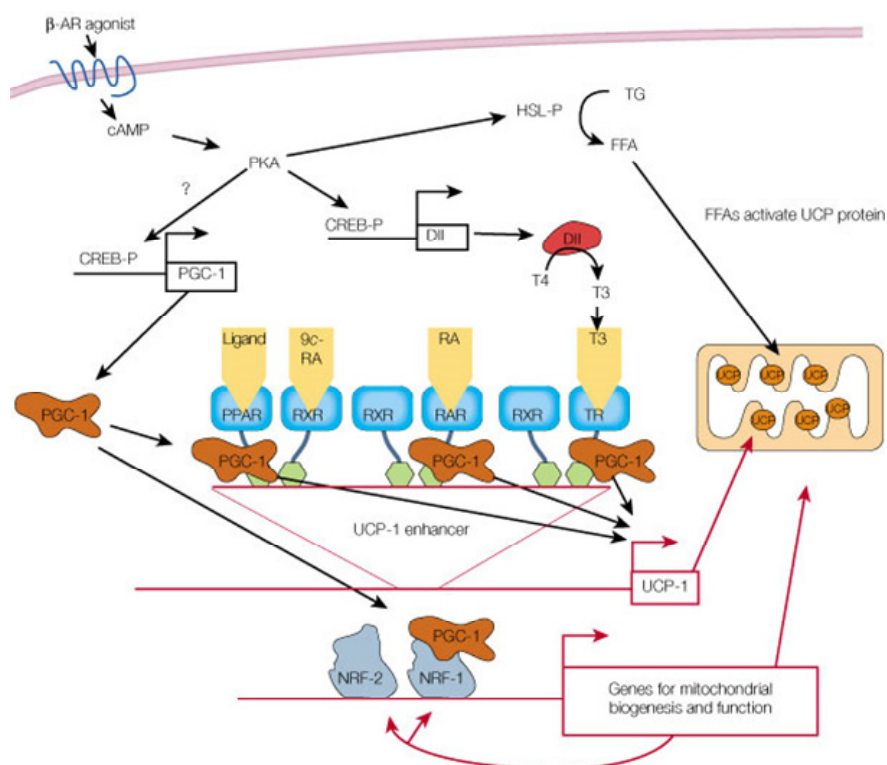


Figura 14. Mecanismo de la regulación transcripcional de UCP-1. Tomado de (169).

La acción del heterodímero formado por TR β /RXR, además de necesitar de la activación por PGC-1 α , está mediada por la actividad de la deiodinasa 2 (D2). Esta es dependiente de cAMP y aumenta la síntesis de triiodotironina (T3), que estimula la

actividad de TR β en la región enhancer del gen *ucp-1*(169;222). Esto lleva a pensar en un posible papel de las hormonas tiroideas en la termogénesis, pero este punto será discutido más adelante (epígrafe de Hormonas tiroideas y termogénesis adaptativa).

Además de a estos estímulos, la expresión de UCP-1 y los genes involucrados en la termogénesis son sensibles a otras señales; por ejemplo, como ya se ha escrito, los depósitos de BAT son más pequeños en individuos obesos, y esto va acompañado con la represión de la expresión de UCP-1. Existen diversos estudios que demuestran la implicación de la leptina y otras señales periféricas en el proceso termogénico; se ha descrito que ratones *ob/ob* o *db/db* presentan un menor gasto energético (168;228), indicativo de que la termogénesis adaptativa no responde del mismo modo que en animales normales, y que la administración de leptina a ratones normales induce la termogénesis aumentando la expresión de UCP-1 y PGC-1 (170).

METABOLISMO DE LÍPIDOS

Hace más de cincuenta años se identificó la molécula de malonil-Coenzima A (malonil-CoA), un derivado del ácido malónico, como un intermediario en la síntesis de ácidos grasos (229). Se demostró que esta molécula, producto de la acción de la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC) sobre la acetil-Coenzima A (acetil-CoA), jugaba un papel fundamental en la regulación tanto de la síntesis como de la oxidación de ácidos grasos en tejidos periféricos (230). Para poder visualizar la importancia de los niveles de malonil-CoA sobre distintas funciones del organismo es necesario entender de un modo general la ruta de síntesis de ácidos grasos (figura 15).

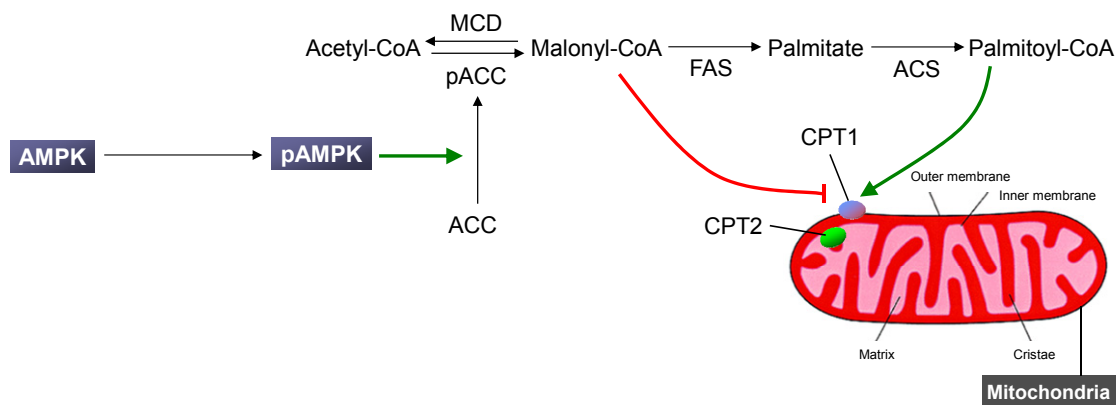


Figura 15. Síntesis de ácidos grasos.

De toda esta vía, los enzimas que actúan directamente, y por tanto que regulan la cantidad de malonil-CoA presente en el citosol, son ACC, malonil-Coenzima A descarboxilasa (MCD), sintasa de ácidos grasos (*fatty acid synthse*; FAS) y la carnitín palmitoil transferasa-1 (CPT-1) (55;231). El paso crítico de producción de malonil-CoA es el sistema formado por ACC y MCD. La regulación de estos enzimas se considera fundamental para la posterior utilización del malonil-CoA. ACC es el enzima encargado de carboxilar acetil-CoA para formar malonil-CoA, mientras que MCD tiene la función contraria; es decir, cataliza la conversión de malonil-CoA en acetil-CoA. ACC puede presentarse como dos isoformas diferenciadas: ACC α (ACC1) y ACC β (ACC2), y aunque ambas tienen la misma función se encuentran en diferentes tejidos. ACC α es una proteína citosólica que se encuentra en tejidos lipogénicos, aquellos en los que es fundamental la síntesis de ácidos grasos, como pueden ser el hígado y el WAT (232;233). La mayor parte del malonil-CoA formado por esta isoforma sirve como sustrato para la formación de ácidos grasos de cadena larga (*long chain fatty acids*; LCFAs). Se ha demostrado que ACC β está anclada a la membrana mitocondrial externa, y está mayoritariamente expresada en tejidos que carecen de síntesis lipídica. En estos tejidos (músculo esquelético o músculo cardíaco, por ejemplo) es fundamental la utilización de los ácidos grasos para la obtención de energía, en ellos se lleva a cabo la β -oxidación(232-234). El punto crítico de acción de ACC es la regulación de su actividad enzimática. Se ha descrito que existen tres modos diferentes de modificar la actividad de este enzima: la actividad de ACC es inhibida por dos metabolitos de la ruta de síntesis lipídica, alostéricamente por los niveles de LCFA-CoAs, y también por su sustrato, malonil-CoA, de modo competitivo. ACC experimenta también una fuerte activación alostérica por citrato, que previene la unión de los LCFA-CoAs y por tanto de su función inhibitoria. Además de las interacciones alostéricas que causan la

modificación su actividad, ACC está regulado por la fosforilación en sus residuos de serina, siendo fosforilada por PKA (Ser1200) y por AMPK (Ser79) (232;235-239). La fosforilación causa la inactivación de ACC *in vivo* al impedirse el correcto ensamblaje de los monómeros de ACC, aunque mientras que PKA causa una reducción de menos del 15% en su actividad, AMPK disminuye hasta un 90% la actividad de ACC (240). Tanto su activación como el control de su expresión marcan la cantidad de malonil-CoA producido y por tanto los ácidos grasos serán oxidados en la mitocondria para la obtención de energía o se almacenarán para periodos de escasez energética.

La regulación de la actividad mediante fosforilación por AMPK depende de factores nutricionales y hormonales: AMPK es una kinasa que se fosforila (activa) dependiendo de los niveles de ATP y AMP y es activada cuando el ratio AMP:ATP está aumentado; es decir, actúa como un sensor del estatus energético del organismo, activándose en situaciones de balance energético negativo (mayores niveles de AMP) (55;241-246). En los últimos años se ha postulado otro modo de regulación de AMPK que no es directamente a través de AMP:ATP: el aumento de AMP inactiva la defosforilación de AMPK por PP2Ca (*protein phosphatase-2Ca*; PP2Ca). La inhibición de PP2Ca y la actividad constitutiva de LKB1 (kinasa “*upstream*” de AMPK) tiene entonces como consecuencia el aumento en la fosforilación y por lo tanto en la actividad de AMPK (242;243;247-249). Además de estar regulada por AMP, se ha encontrado que la fosforilación de AMPK es dependiente tanto de CaMKK α (Ca⁺²/*Calmodulin kinase kinase α*) como de CaMKK β (Ca⁺²/*Calmodulin kinase kinase β*), que activan AMPK al aumentar los niveles intracelulares de Ca⁺² (250;251). Recientemente se ha identificado una nueva kinasa capaz de fosforilar *in vitro* AMPK, TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase*) (252), y una kinasa supresora de Ras (KSR2) que interactúa con la subunidad α 1 de AMPK para regular su actividad (253). Se ha encontrado también un mecanismo diferente de la fosforilación e independiente de los niveles de AMP que modula de actividad de AMPK. En este proceso, CIDEA (*cell-death-inducing like-effector A*; CIDEA) forma un complejo con la subunidad β de AMPK que da lugar a la degradación mediada por ubiquitinación de AMPK reduciendo su actividad kinasa (254) (figura 16).

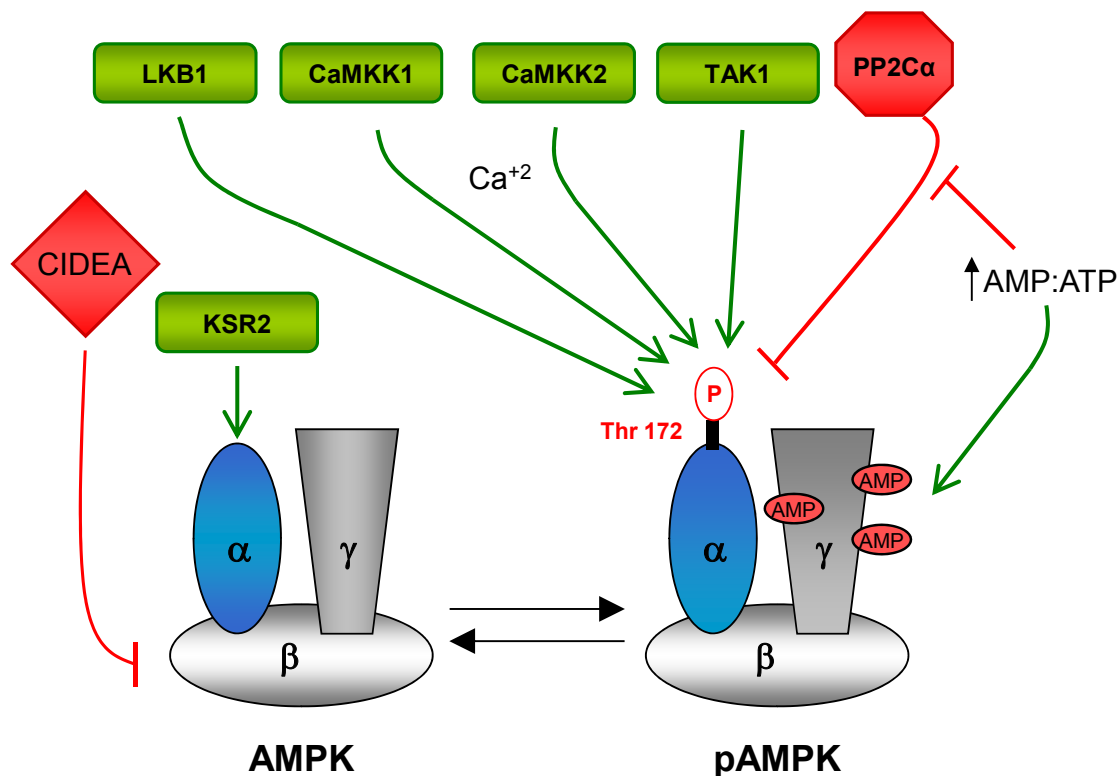


Figura 16. Estructura y regulación de AMPK.

Existe otro factor encargado de regular los niveles de malonil-CoA: MCD, que al contrario que ACC, cataliza su desaparición para producir nuevamente acetyl-CoA. Se ha descrito que MCD presenta en roedores niveles más elevados tanto de RNA como de proteína en hígado y corazón, aunque también existe en niveles altos en otros tejidos como músculo esquelético, riñón o páncreas, mientras que en humano, la mayor expresión es en músculo esquelético y corazón (255-257). La actividad enzimática en hígado y corazón es elevada y en músculo varía según la capacidad oxidativa de las diferentes fibras. Es en el músculo cardiaco donde presenta la actividad más elevada, y las fibras IIb, donde su actividad es menor debido a que estas tienen menor capacidad oxidativa (257;258).

Se ha hipotetizado sobre la forma en la que MCD es regulada. Unos estudios especularon con la posibilidad de que aquellas kinasas que inactivan ACC, activan MCD, mientras que otros defienden la idea de que no es necesaria la fosforilación y que no está claro a qué nivel se produce su regulación (si a nivel de RNA o de proteína) (240). Existen otros estudios que muestran que se activa en músculo tras la realización de ejercicio físico (259). Otro estudio demuestra que la activación de MCD en músculo

es dependiente de la fosforilación de AMPK (260), aunque a día de hoy su activación en otros tejidos, por ejemplo en hipotálamo, no está de todo clarificado (261).

Tras la formación de malonil-CoA, este metabolito juega un papel fundamental en siguientes pasos de la vía. Esta molécula, además de servir como sustrato en la biosíntesis de ácidos grasos es capaz de regular la β -oxidación inhibiendo la actividad de CPT-1.

Como intermedio de la ruta de síntesis de ácidos grasos, malonil-CoA es sustrato de un paso que lleva hacia la producción de palmitato. El complejo enzimático que cataliza dicha conversión es FAS, que por medio de una serie de reacciones encadenadas da lugar a la producción de palmitato. Más tarde, tras la acción de Acil-Coenzima A Sintetasa (ACS), se convierte en palmitoil-CoA (la forma activa) a partir de moléculas de malonil-CoA, acetil-CoA y NADPH procedente de la ruta de pentosas fosfato en la que se transforma oxaloacetato citosólico en piruvato (4). Al igual que ACC α , FAS se expresa de forma muy abundante en tejidos lipogénicos como hígado o WAT, que se caracterizan por ser lugares de almacenamiento de grasas. El hecho de que la actividad de FAS sea mínima en tejidos no lipogénicos, como el músculo esquelético o cardíaco, es debida a que los LCFA-CoAs resultantes sirven únicamente como sustratos para la β -oxidación, no siendo necesario sintetizar LCFA-CoAs para almacenar (262;263).

A diferencia de otros enzimas de la ruta que se regulan de modo post-traducciona, alostéricamente o mediante fosforilación, FAS se regula únicamente a nivel de RNA. Su expresión en tejidos periféricos varía en función de la dieta, la glucosa, de hormonas tiroideas y de SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*). Este último es un factor de transcripción que actúa como mediador de los efectos de la insulina sobre enzimas lipogénicos, como ACC α , FAS o SCD-1. Se ha descrito que en situaciones de deficiencia energética, como el ayuno, la actividad de FAS disminuye drásticamente en tejidos lipogénicos, como resultado de la regulación transcripcional dependiente de SREBP-1c y AMPK, que actúa como kinasa upstream de este factor de transcripción (263).

Como se ha dicho previamente, malonil-CoA juega un papel fundamental en la regulación de la entrada de los LCFA-CoAs en la mitocondria para que se lleve a cabo la β -oxidación. Los enzimas encargados de esta translocación de los LCFA-CoA al

interior de la mitocondria son las carnitin palmitoil tranferasas (CPTs) (264). Existen dos tipos distintos de CPTs: la CPT-1 y la CPT-2. La CPT-1 está presente en la membrana externa de la mitocondria y se caracteriza por llevar a cabo la transferencia del grupo acilo desde la CoA hacia la carnitina, dando lugar a la producción de acil-carnitina en el espacio intermembrana. Una vez traspasada la membrana externa, es CPT-2 proteína anclada a la membrana interna de la mitocondria, la que lleva a cabo el siguiente paso. Este enzima transfiere el grupo acilo desde la carnitina hacia el grupo CoA, para volver a formar LCFA-CoA dentro de la mitocondria y llevar a cabo la β -oxidación y la consiguiente producción de energía en forma de ATP (figura 17). De este sistema de CPT, la única proteína que está sometida a regulación por medio de malonil-CoA es CPT-1. La regulación es inversamente proporcional a los niveles de malonil-CoA existente: a menor nivel de este metabolito, mayor es la activación que ejerce sobre la actividad enzimática de CPT-1 debido a que la caída en los niveles de CPT-1 es traducida como una situación de deficiencia energética, y es necesaria la producción de energía por medio de la β -oxidación. Es importante distinguir tres subtipos de la CPT-1, que según el tejido en el que sea expresada, se puede dividir en CPT-1L, que es la isoforma presente en hígado, CPT-1M, en músculo y CPT-1C que se expresa en cerebro (265-269;269-271).

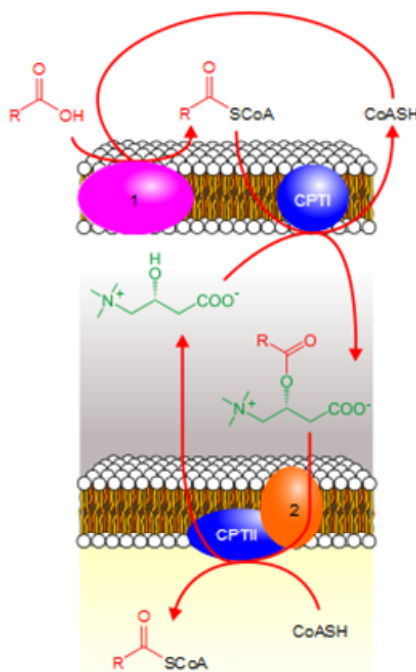


Figura 17. Mecanismo de acción de CPTs.

Hasta este momento solo se han descrito los componentes más importantes de la síntesis *de novo* de ácidos grasos por separado, comentado los aspectos más importantes de su regulación y expresión en diferentes tejidos. Para comprender mejor su importancia fisiológica, es fundamental poder visualizar esta ruta desde un punto de vista global; cómo varía toda la cascada atendiendo a las necesidades del organismo en general y de cada tejido en particular. Tratando a todo el conjunto de enzimas y metabolitos como un sistema en el que en cada uno de ellos se reflejan las fluctuaciones de los componentes "upstream" de la vía, es clave visualizar al primer enzima de la cascada, AMPK, como el desencadenante de los consiguientes cambios en biosíntesis de ácidos grasos. Puesto que, como ya se ha explicado anteriormente, AMPK está regulado directa o indirectamente por los niveles de ATP, se puede proponer esta proteína como un sensor del balance energético, que varía en función de las necesidades del organismo. La fosforilación de AMPK inhibe el anabolismo (como la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos) y estimula los procesos catabólicos (como la oxidación de ácidos grasos, glicolisis, captación de glucosa) en un intento de restaurar los niveles de ATP (55;241;242;245). Un aumento en el ratio AMP:ATP, que indica una situación de deficiencia de energía, lleva asociado un incremento en la fosforilación de AMPK (directa o indirectamente): el aumento de esta provoca la fosforilación e inactivación de ACC, lo que tiene como consecuencia una menor síntesis de malonil-CoA. La disminución de los niveles de malonil-CoA, indicativos de un balance energético negativo, tiene un efecto activador sobre CPT-1 favoreciendo la entrada de LCFA-CoAs en la mitocondria para su posterior oxidación y por tanto producción de energía en forma de ATP. La regulación de toda esta vía es de gran importancia en todo el organismo, pero es fundamental en tejidos lipogénicos, en donde marca la activación de la oxidación de los ácidos grasos frente a su síntesis, un proceso clave en este tipo de tejidos para poder almacenar ácidos grasos para su utilización en periodos de restricción energética (272-274). En tejidos no lipogénicos como el músculo, la escasa expresión de enzimas como ACC α o FAS indica que aun en condiciones anabólicas las síntesis de ácidos grasos no se lleva a cabo; simplemente aumenta la capacidad de CPT-1 de internalizar los LCFA-CoAs en la mitocondria para su utilización como sustratos en la β -oxidación, ya que estos tejidos no son lugares de almacenamiento de lípidos. La síntesis de malonil-CoA en estos tejidos es llevada a cabo por ACC β , lo que lleva a pensar que el malonil-CoA producido por esta isoforma de ACC induce la inhibición de CPT-1(240;263).

Todos estos datos que proponen a los componentes de esta vía como sensores energéticos, se apoyan además en datos genéticos y farmacológicos que demuestran de modo aun más robusto la importancia y la implicación de estos en el balance energético. Que la síntesis de ácidos grasos tiene un papel fisiológico clave se puede ver en el hecho de que muchos de los modelos de ratones con algún gen de esta vía modificado no son viables. Este es el caso de los ratones *ampk α ^{-/-}*, *acc α ^{-/-}* o *fas^{-/-}* (275;276). Por otra parte, se ha podido desarrollar ratones con otros genes como *acc β* o *cpt1* deleccionados que desarrollan unos fenotipos que van en concordancia con lo explicado anteriormente. Por ejemplo, se ha descrito que el ratón *acc β ^{-/-}* presenta un fenotipo delgado e hiperfágico, además de tener aumentada la β -oxidación en músculo e hígado (277-279).

En cuanto a experimentos farmacológicos, se ha visto que la administración periférica de inhibidores de FAS, como cerulenin (compuesto natural) o C75 (sintético), tiene efecto sobre el gasto energético: inducen valores muy altos de oxidación de ácidos grasos, producción de calor y cociente respiratorio (280;281), que son abolidos por la administración periférica de etomoxir (bloqueante de CPT1)(263;282). Además, también se ha descrito que los animales tratados con un bloqueante de FAS presentan menor ingesta y masa corporal tanto si tiene fenotipo delgado o bien sea *ob/ob*. Dichos efectos también son revertidos mediante la administración de etomoxir (281). Todos estos datos se apoyan en el estudio de ratón con el gen *fas* deleccionado en hipotálamo y páncreas; se ha observado que este modelo presenta hipofagia y menor masa corporal que los ratones WT, como consecuencia de que tiene menor masa grasa (283). Además, al igual que el modelo farmacológico, estos ratones presentan un gasto metabólico incrementado y mayor actividad física (283).

En los últimos años se han publicado numerosos estudios que demuestran que los efectos de los inhibidores de FAS pueden ser mediados a nivel hipotalámico; la administración de estos inhibidores de modo ICV además de tener los mismos efectos que a nivel periférico causa la alteración de los sistemas de neuropéptidos más del ARC (284;285). La inhibición de la ingesta tras el bloqueo de FAS está mediada parcialmente por la caída en los niveles de expresión de NPY y AgRP, así como por el incremento en POMC y CART (286). Otro dato que apoya esta hipótesis es que la administración periférica de NPY tras el bloqueo de FAS con C75 revierte su efecto anoréctico (281). Por otra parte, cabe destacar que los efectos de C75 sobre un modelo con la vía de señalización alterada como los ratones *ob/ob* o las ratas Zucker son similares a los

observados en modelos con la señalización de leptina normal con la única diferencia que la pérdida de masa se extiende durante más tiempo. Esto lleva a pensar que el efecto supresor de la ingesta del inhibidor de FAS se produce por mecanismos independientes de leptina (281;285;287).

Con estos datos que llevan a pensar en una posible regulación central del metabolismo de lípidos, se han postulado diversas formas de interacción entre la expresión de neuropéptidos y la síntesis de ácidos grasos: por un lado se piensa que puede ser debida a la interacción de los niveles de malonil-CoA con algún regulador de la expresión de neuropéptidos, mientras que por otra parte se ha descrito que son los LCFA-CoAs tras la modificación de la actividad de CPT-1, los que regulan la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos. En este sentido, se ha visto que el incremento de los niveles plasmáticos de LCFA-CoAs tras la inhibición farmacológica o ablación del gen *cpt1c*, la isoforma específica de cerebro, tiene un marcado efecto anorexigénico, lo cual sugiere que el efecto supresor de la ingesta pasa por un incremento en los niveles de LCFA-CoAs (284;288).

Aunque se conoce desde hace tiempo la regulación del metabolismo oxidativo a nivel central por señales endocrinas (289;290), solo en los últimos años, tras las evidencias de que la modificación de FAS causa su efecto a nivel hipotalámico, se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios que demuestran de modo rotundo la relevancia de toda la cascada sobre la regulación de la ingesta a nivel central. Se han publicado datos que demuestran que la modificación, tanto farmacológica como genética, de enzimas de esta vía afecta en el mismo sentido al balance energético; por ejemplo, se ha visto que la administración de un inhibidor de AMPK como el compuesto C es capaz de revertir los efectos del ayuno o de la administración de ghrelin sobre la expresión de FAS en el VMH y también en ingesta (23). Recientemente nuestro grupo ha publicado un trabajo en el que se demuestra esto mismo de modo mucho más específico con el uso de adenovirus que expresan formas dominantes negativas para AMPK α ; en concreto en este trabajo demostramos que el efecto de ghrelin sobre ingesta se pierde en aquellos animales que expresan estos adenovirus en el VMH (23). En cuanto a la activación de AMPK, hay trabajos que demuestran que la administración de AICAR a ciertas dosis es capaz de estimular ingesta por sí solo (245). El papel de AMPK a nivel hipotalámico es clave como elemento mediador en la regulación de la ingesta en respuestas a señales periféricas; distintas señales anorexigénicas, tales como

la leptina, la insulina, GLP-1, CNTF o los agonistas de los receptores de melanocortinas, inhiben la actividad de AMPK en el hipotálamo, incrementando la actividad de ACC y los niveles de malonil-CoA (132;245;291-294). Por el contrario, las señales orexigénicas como la adiponectina (ADPN), los endocannabinoides, ghrelin o los glucocorticoides incrementan su actividad (23;45;245;295-300). En general, se puede decir que las señales orexigénicas estimulan la actividad de AMPK, y que las anorexigénicas la inhiben, con la única excepción de la resistina que, a pesar de tener efecto anoréctico, aumenta la actividad de AMPK (62).

En 2008 se publicó un trabajo que proponía también que el efecto orexigénico de ghrelin era mediado por la activación de AMPK y el incremento de CPT-1. Además, se identificaron nuevas vías intracelulares involucradas en la activación de las neuronas de NPY/AgRP por ghrelin; se propuso que el aumento de estos neuropéptidos se debe al incremento de la expresión de UCP-2 y la supresión de los radicales libres (ROS) como consecuencia del incremento de la actividad de CPT-1 (45). El mecanismo molecular que regula la expresión de NPY y AgRP no estaba demasiado claro, pero diferentes estudios demostraron que estaba mediada por el factor de transcripción BSX (301;302), que interacciona en las regiones promotoras de los neuropéptidos con otros dos factores: pCREB y FoxO1 (303) (figura 18). Se ha descrito que el efecto orexigénico de ghrelin, así como la inducción de NPY y AgRP mediante el aumento de BSX, pCREB y FoxO1 se producen a través del aumento de la actividad de CPT-1 (299).

La importancia de la interacción entre AMPK y las neuronas de AgRP/NPY se puede observar en el hecho de que la delección de AMPK α 2 en esta población neuronal da lugar a un fenotipo delgado dependiente de la edad (304); la disrupción de la vía altera la expresión de AgRP, produciendo un leve efecto anorexigénico; es decir, es necesaria una correcta señalización de AMPK para la regulación de estos neuropéptidos.

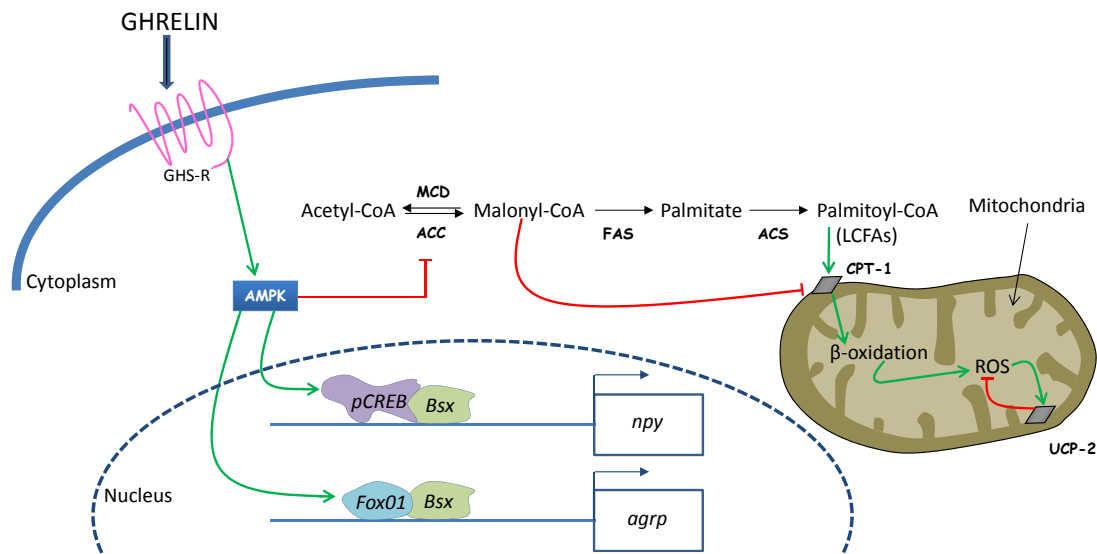


Figura 18. Mecanismo molecular que regula la síntesis de NPY y AgRP.

Se obtuvieron similares conclusiones manipulando otros enzimas de la vía. Así, diferentes grupos han usado adenovirus que sobreexpresan MCD en el VMH y se ha visto que, como era de esperar tras los resultados previos, estos inducen un incremento en la ingesta y en la masa corporal, así como un aumento muy marcado en la adiposidad, como resultado de la disminución de los niveles hipotalámicos de malonil-CoA (305;306). Estos efectos se hacen mucho más fuertes en presencia del inhibidor de FAS C75. La inhibición de FAS produce un incremento en el malonil-CoA, y por lo tanto, en la caída en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (305). Tras la administración de los vectores que expresan MCD se reduce el nivel de malonil-CoA en el hipotálamo, la síntesis de ácidos grasos sigue estando inhibida y los animales desarrollan un fenotipo obeso. Esta evidencia lleva a pensar que es el malonil-CoA y no los LCFA-CoAs quien produce la regulación a nivel central de la ingesta (307).

Por último, se han estudiado los efectos de la actividad de CPT-1 mediante bloqueo farmacológico; la administración de etomoxir, un inhibidor de CPT-1, produce una disminución en la ingesta que va acompañada por la variación en los neuropéptidos hipotalámicos y menores niveles en la oxidación de los ácidos grasos (23;299). La inhibición de CPT-1 hace que todos los LCFA-CoAs procedentes de la acción de FAS sobre malonil-CoA se dirigen únicamente hacia la síntesis y almacenamiento de lípidos. El incremento de todos los metabolitos intermedios de la síntesis de lípidos es interpretado como señal de saciedad, por lo que el animal deja de comer. También se ha creado un modelo animal que tiene delecionado el gen *cpt1c*, que es la isoforma

específica de cerebro; este animal presenta un fenotipo hipofágico y delgado en el que además se aprecia una considerable pérdida de masa grasa (284).

Todas estas evidencias, más allá de que aun queden mecanismos y puntos de control por aclarar, demuestran la importancia de la síntesis *de novo* en el control del balance energético, tanto a nivel de tejidos periféricos, en donde es clara su implicación en la regulación del ratio oxidación/síntesis de ácidos grasos en tejidos lipogénicos y en la potenciación de la oxidación en los no lipogénicos, como a nivel central. Se ha demostrado que los efectos en las alteraciones de la vía son debidos a cambios asociados en los niveles de neuropéptidos hipotalámicos, estimulando o inhibiendo ingesta en función de los niveles de estos.

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)

Desde hace unos años ha cobrado gran importancia el estudio de otra de las dianas de la acción de AMPK, la ruta de mTOR. Esta vía se caracteriza porque es sensible a los cambios en el estatus energético del organismo (308;309); los niveles de mTOR fluctúan directamente con el estado nutricional y varían inversamente a cómo lo hace AMPK; es decir, cuando existe una alta disponibilidad energética la actividad (fosforilación) mTOR disminuye mientras que la de AMPK aumenta (310;311). Además, se ha observado que estimula la síntesis de proteínas debido a que fosforila diversas proteínas que se caracterizan por controlar dicha función, como son S6K1 (*S6 kinase 1*), 4E-BP1 (*4E-binding protein 1*) y eIF4G (*eukariotic initiation factor-4G*) (312;313). S6K a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6 que forma parte de un complejo que inicia la síntesis de proteínas (314) (figura 19).

Recientemente, se han publicado varios trabajos que muestran que la ruta de mTOR tiene un papel importante en la regulación de la ingesta y la masa corporal a nivel hipotalámico. Se ha visto que mTOR co-localiza con AgRP/NPY y POMC en el ARC y que en la parte mediobasal de este núcleo el ayuno ejerce un efecto estimulador sobre la vía (310;315). Además, resulta interesante la observación de un potente efecto estimulador de la leucina sobre la actividad de mTOR, inhibiendo ingesta y reduciendo masa corporal, que se pierde tras la administración de rapamicina, un inhibidor de mTOR (310).

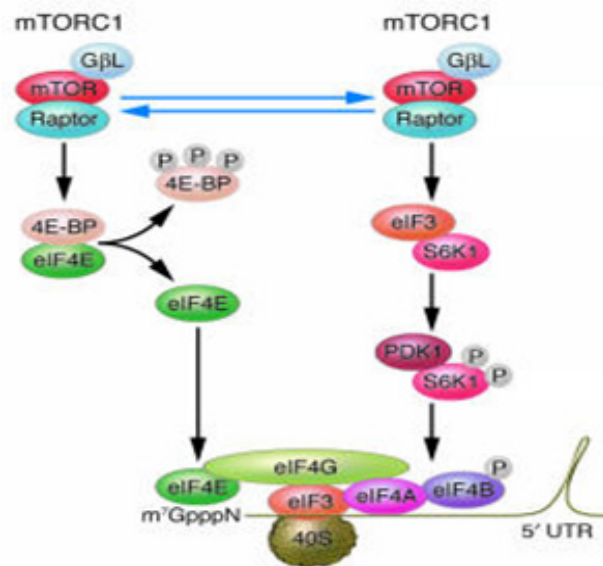


Figura 19. Vía de señalización de mTOR.

Un hecho importante que demuestra la importancia de esta vía en la regulación del balance energético fue la creación del ratón *s6k1^{-/-}*. Tras su estudio, se ha visto que este modelo presenta un fenotipo delgado a pesar de que la ingesta no se ve afectada. Esto se debe a que tiene menor porcentaje de masa grasa (316). Este ratón, además, muestra un mayor gasto metabólico, que puede ser el causante del fenotipo. Existen también trabajos que demuestran que la modulación de AgRP por diferentes nutrientes, como pueden ser los aminoácidos (especialmente la leucina), depende de la activación o inhibición de mTOR. Proponen a mTOR como un mediador intracelular de las acciones de los aminoácidos en el hipotálamo y que estos pueden ejercer sus efectos directos sobre la expresión de AgRP a través de un mecanismo que requiere la señalización intacta de la vía de mTOR. La inhibición de la ingesta que tiene lugar tras la administración de leucina en el 3V es debida a la disminución que induce en la expresión de AgRP. Se ha demostrado tras el bloqueo de la vía de mTOR, activada previamente con leucina, mediante la administración de rapamicina (inhibidor) anula los efectos de este aminoácido sobre la expresión de AgRP (317).

HORMONAS TIROIDEAS

Desde el descubrimiento de la leptina se han investigado en profundidad los mecanismos centrales que modulan la ingesta y el gasto de energía, y se han identificado un gran número de hormonas y neuropéptidos involucrados en el balance energético. Sin embargo, mucho antes de estos descubrimientos, las hormonas tiroideas (TH) eran conocidas por alterar el metabolismo. De hecho, desde la década de los 40 se usaron de distintas formas para reducir peso (318-320). A pesar de ser unas de las primeras hormonas en descubrirse que afectan a la masa corporal, poco se sabe acerca de sus mecanismos de acción a nivel central sobre la regulación de la ingesta y del balance energético (321).

Las primeras evidencias sobre la implicación de las hormonas tiroideas en la regulación de la masa corporal se notaron al ver que individuos con disfunciones tiroideas que presentaban hipertiroidismo o hipotiroidismo, tenían alterado su peso. Individuos con hipotiroidismo tenían su masa corporal incrementada un 30% en relación a un individuo eutiroideo, mientras que el hipertiroidismo hacía que la masa corporal disminuyese en torno al 15% (320;322;323).

Tanto en persona como en animales sanos, la concentración en plasma de hormonas tiroideas se contiene relativamente estable. Esto se debe a la existencia de un fino sistema regulatorio de retro-alimentación negativo, el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (HHT), que se encarga de controlar de secreción de hormonas tiroideas (TH) (figura 20). A grandes rasgos este sistema regulador se encarga de sintetizar TRH en las neuronas del PVH. La liberación de esta estimula la síntesis y liberación de TSH en la hipófisis, y en último lugar es la TSH la encargada de estimular la producción y secreción de THs en la glándula tiroides. Un incremento en la concentración en plasma de TH inhibe la producción tanto de TRH como de TSH, llevando a una disminución de la función tirocitaria con la intención de restablecer los niveles de TH. La posterior disminución de los niveles plasmáticos de TH hace que desaparezca la señal de retro-alimentación negativa, y que el sistema se restablezca de nuevo (134;324;325).

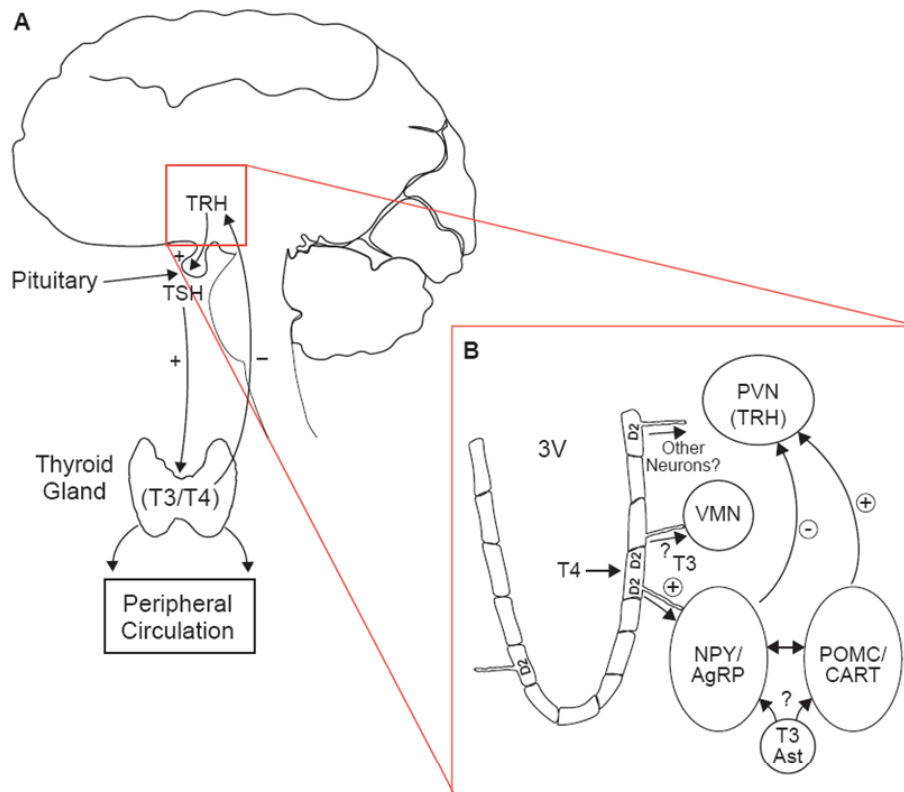


Figura 20. Eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo y su mecanismo de retro-alimentación negativa. Tomado de (321).

En la tiroides se produce 3,5,3',5'-tetraiodotironina (también conocida como L-tiroxina o T4), la hormona tiroidea dominante en la circulación. Esta es transformada en la forma bioactiva 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) en los diferentes tejidos por medio de la acción de las deiodinasas (326). Estas catalizan la cascada de monodeiodinización secuencial que lleva a la producción, además de T3, de 3,3',5'-triiodo-L-tironina (T3-reversa, rT3), a partir de T4, y de 3,5-L-diiodotironina (T2) y 3,3'-diiodotironina (T2-reversa, rT2) a partir de T3 (figura 21). Se han identificado tres tipos diferentes de deiodinasa: deiodinasas tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (D1, D2 y D3, respectivamente) (327). En rata, D1 se expresa preferiblemente en tejidos periféricos como hígado y riñón, aunque también se encuentra en la hipófisis, tiroides o el CNS; es el enzima encargado de llevar a cabo la deiodinización tanto del anillo externo como del interno de la T4 para dar lugar a T3 o rT3 (327-329). Por su parte, D2 se expresa en hipófisis, en diferentes regiones cerebrales, como las células gliales hipotalámicas, BAT, hígado y músculo, en donde cataliza la conversión de T4 a T3 (327;329;330). D3, que está presente en CNS, placenta o piel, lleva a cabo la deiodinización del anillo interno dando lugar a la

producción de rT3 y rT2 (328;331). En condiciones de hipotiroidismo, tanto D1 como D2 están sobre-reguladas para permitir una mayor conversión de T4 en T3 (326).

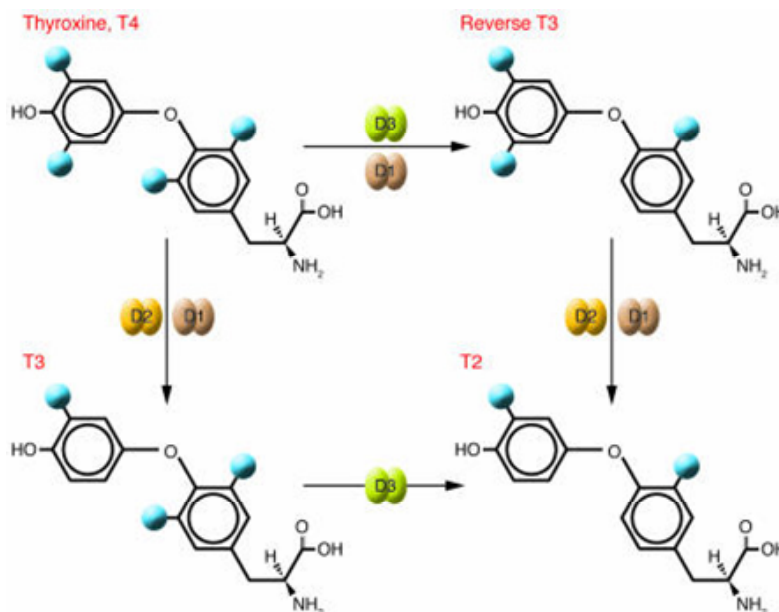


Figura 21. Cascada de monodeiodinización secuencial que lleva a la producción de diferentes THs. Tomado de (332).

Uno de los puntos clave de la regulación del sistema que rige la síntesis y secreción de hormonas tiroideas se encuentra a nivel hipotalámico. Como se ha dicho anteriormente (en el epígrafe sobre el PVH) el área hipotalámica encargada de la síntesis de TRH es el PVH. La T3 que llega este núcleo es producida por la D2 presente en los tanicitos, que son las únicas células gliales que se encuentran alrededor del tercer ventrículo (3V). Estas captan la T4 presente en el fluido cerebro-espinal (CSF) (333). Una vez producida la T3 a partir de T4 periférica, esta difunde por todo el cerebro alcanzando el PVH y las neuronas hipofisiotrópicas por medio del transportador de membrana MCT8 (*monocarboxilate transporter 8*) (321;334). Una vez en las neuronas de TRH, la T3 se une a los receptores de TH (TR) para regular la síntesis de TRH. La T3 unida a TR forma un heterodímero con RXR, que reprime la síntesis de TRH debido a que la formación del heterodímero imposibilita la unión del TR al elemento de respuesta a TH (TRE), que en este caso regula negativamente, existente en el promotor del gen *trh* (335). Es por ello que en casos de hipertiroidismo, en donde los niveles de T4 circulante son muy elevados, la producción de T3 en los tanicitos y su posterior transporte y unión a TR en el PVH inhibe la síntesis de TRH. Esto disminuye la

liberación de TSH y por tanto también de TH, en un intento de restaurar los niveles plasmáticos basales de T4 (134;324;325).

Los mecanismos de acción de TH en los diferentes tejidos también se producen a través de la unión de estas a los TRs, que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Hasta el momento se han identificado diferentes isoformas de estos receptores: TR está codificado por dos genes diferentes, TR α y TR β , localizados en distintos cromosomas. El splicing alternativo de cada uno de estos dos genes genera múltiples isoformas de TR, incluyendo TR α_1 , TR α_2 y TR α_3 a partir del gen TR α , y TR β_1 y TR β_2 desde TR β , aunque únicamente TR α_1 , TR β_1 y TR β_2 son capaces de unirse a las THs. Estos receptores tienen una afinidad mucho mayor por T3 que por T4 (del orden de 15 veces más afinidad). Es este hecho el que le confiere a la T3 la denominación de forma bioactiva de todas las THs (336-340).

Se han realizado estudios mostrando la localización de las diferentes isoformas de los TRs en el cerebro de rata, y se ha visto que existe una expresión intensa de TRs en el PVH, en el ARC y en la eminencia media (341-343). Además, se ha observado que la expresión de TR β_2 es elevada en el PVH (341). Este receptor se expresa de modo más restringido en el cerebro, frente a TR α_1 , TR β_1 , que tiene una expresión más ubicua (344;345). Esto evidencia que puede ser TR β_2 la que media los efectos de la T3 sobre la regulación de la neurona hipofisiotrópica de TRH. Se han llevado a cabo diferentes estudios para comprobar esta hipótesis, y se ha encontrado que tras el silenciamiento de TR β_2 se bloquea la represión de la transcripción causada por T3 (346). El estudio del ratón *tr β_2 ^{-/-}* demostró que la expresión basal de prepro-TRH estaba incrementada a niveles de animales hipotiroideos pero que su expresión no variaba significativamente en respuesta a la administración de T3 (347). Además, la supresión de mRNA de prepro-TRH causada por el ayuno se conserva en el modelo KO (347).

Hormonas tiroideas y la regulación de la ingesta y de la masa corporal

La relación entre el estado nutricional y las hormonas tiroideas se ha estudiado ampliamente desde que se observó que variaciones en el estatus energético llevaban asociados cambios en el eje HHT a través de las THs y viceversa

Existen diferentes estudios que demuestran la variación de los niveles plasmáticos de las THs en función del balance energético del animal. Por ejemplo,

durante el ayuno, una situación de balance energético negativo, se ha visto que los niveles de TH en plasma están reducidos, y que además también disminuyen los niveles plasmáticos de TSH y TRH en el PVH (348;349). Esto es en contraste con la situación de hipotiroidismo, en donde reducidos niveles de TH llevan asociados el incremento tanto de TRH como de TSH (350;351). Este hecho sugiere que la caída de TH en plasma sirve para provocar una reducción en el gasto energético; es decir, permite que durante este estado TSH permanezca bajo a pesar de los niveles de T3. Se ha descrito que la diferencia de síntesis y liberación de TRH durante el ayuno y el hipotiroidismo puede ser debida a la distinta expresión de D2 en ambos casos (352); durante el ayuno se produce un incremento en el mecanismo de retro-alimentación negativa debido a la producción de T3 que hace que se suprima la síntesis de TRH. Los mecanismos de la regulación diferencial de D2 no se comprenden de todo, pero en los últimos años se han publicado diversos trabajos que proponen que los cambios vistos en el eje HHT pueden ser debidos a señales no tiroideas. Se ha demostrado que el restablecimiento de los niveles de leptina durante el ayuno revierte el aumento en la expresión de D2 y por tanto, la supresión del eje tiroideo en este estado (353-355). Parece poco probable que el mecanismo de acción de la leptina sobre D2 sea directo sobre los tanicitos del 3V debido a que estos no expresan receptores de leptina. Se ha postulado que el mecanismo de este proceso se lleva a cabo de modo indirecto a través de las neuronas que expresan AgRP, NPY y POMC en el ARC, y que además proyectan a las neuronas de TRH del PVH (356). Se ha mostrado que lesiones en el ARC bloquean el efecto de la leptina en la expresión de TRH (357), y existen estudios que relacionan la acción de la leptina sobre el eje tiroideo con el sistema de melanocortinas (358), puesto que se ha visto que MC3/4-R están presentes en el PVH (138).

Algunos estudios relacionan la hiperfagia característica del hipertiroidismo con los niveles de expresión de diferentes neuropéptidos del ARC. Así, se ha descrito que la inducción del estado hipertiroideo en ratas causa un incremento en la expresión de un neuropéptido orexigénico como NPY, mientras que disminuye los niveles de los anorexigénicos como POMC y CART (359). Este último también tiene disminuida su expresión en el PVH al igual que en el ARC(360). se ha Descrito que la alteración del estado tiroideo no varía la expresión de las OXs y de MCH en el LHA (360)}.

Además del ARC, se ha visto que el VMH asimismo tiene un papel clave en la regulación de la ingesta por hormonas tiroideas. Se ha publicado que la administración

de dosis altas de T3 en este núcleo estimula ingesta. El mecanismo mediante el cual se produce este incremento de la ingesta aun no se conoce con certeza, pues no se han detectado cambios en los niveles de expresión de los diferentes neuropéptidos tras la administración de T3 (361). Se piensa que esta respuesta a THs en el VMH puede estar mediada por otras moléculas involucradas en la regulación de la ingesta en este núcleo como pueden ser la dopamina, la serotonina o el BDNF (361).

Además del control que ejerce la leptina sobre eje HHT, las THs también juegan un papel fundamental en la regulación de diversas adipokinas, como leptina, resistina o adiponectina, influenciando la homeostasis del peso corporal. Existen diferentes estudios en roedores que demuestran cómo variaciones en el estado tiroideo afectan a los niveles de circulantes de estas adipokinas, aunque en humanos los resultados publicados son discordantes. Por ejemplo, en el caso de la leptina, se ha visto que en ratas la inducción del hipertiroidismo causa la disminución de sus niveles plasmáticos, mientras que en ratas hipotiroideas, los niveles de leptina son mayores que los de las ratas con estado tiroideo normal (362-364). A pesar de estos resultados obtenidos en modelos animales que demuestran que las THs regulan los niveles de leptina, en humanos los estudios publicados hasta el momento muestran datos contradictorios. Así, se ha descrito en diferentes estudios que tanto el hipertiroidismo como el hipotiroidismo no modifican los niveles plasmáticos de leptina, aunque existen diferentes trabajos que indican que estos niveles están incrementados y otros que muestran que disminuyen (365-391). Estos datos discordantes son visibles también en trabajos con otras adipokinas (384-386;389;392-396).

Como ya ha sido comentado, las THs han sido utilizadas desde hace varias décadas como tratamientos contra la obesidad (318-320). A pesar de ello, actualmente no se puede asegurar que los tratamientos con T3 o T4 produzcan reducción en la masa corporal de un individuo (397;398). Tampoco existen evidencias clínicas que confirmen la eficacia de los tratamientos con análogos de las THs como son la D-tiroxina o el TRIAC (ácido 3,5,3'-triiodotiroacético) (398).

En la actualidad, y debido al mayor conocimiento existente de los mecanismos de acción de las THs, se está tratando de obtener nuevos tratamientos terapéuticos mediante el uso de agonistas selectivos de sus receptores. Los trabajos que se han llevado a cabo hasta el momento se han centrado casi exclusivamente en diferentes

agonistas de los TR β , debido a sus efectos sobre el metabolismo hepático (399). Los efectos más importantes que presentan estos agonistas se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Efectos y características de diferentes agonistas de TRs.

	Efectos sobre gasto, masa y composición corporal	Efectos sobre lípidos	Efectos sobre niveles de THs circulantes	Afinidad por TR	Ref.
GC-1	↑Gasto energético ↓Masa y grasa corporal = Ingesta ↑FAO ↓Esteatosis hepática	↓Triglicéridos y colesterol LDL ↑ Recetores de ↑HDL Transporte inverso de colesterol	↓TSH, T3 y T4	10 veces más selectivo para TR β que para TR α	(400-403)
KB-141	↑Gasto energético ↓ Masa y grasa corporal ↓ Glucosa en ratas Zucker y ratones ob/ob	↓Colesterol ↑Recetores de LDL		15 veces más selectivo para TR β que para TR α	(404)
GC-24	↑Gasto energético Previene incremento de masa grasa ↑Expresión génica en BAT ↑Sensibilidad a la insulina	↓Colesterol y triglicéridos	↓TSH, T3 y T4	40 veces más selectivo para TR β que para TR α	(405;406)
KB-2115	= Gasto energético = Masa corporal	↓Colesterol total y LDL ↓Síntesis de ácidos biliares	↓TSH = T3 y T4		(407)
DIPTA	↓Masa corporal	↓Triglicéridos y Colesterol total y LDL	↓TSH, T3 y T4	Baja afinidad por TR	(408;409)

Hormonas tiroideas y termogénesis adaptativa

La importancia de las TH en el gasto energético y en la termogénesis adaptativa se puede observar fácilmente en el hecho de que las ratas hipotiroideas no sobreviven a la exposición prolongada al frío y no incrementan la activación ni expresión de UCP-1 tras la administración exógena de norepinefrina (NE) (410;411).

Desde hace algunos años se sabe que el contenido de T3 en el BAT está profundamente influenciado por la expresión de D2, que convierte T4 en T3, y que además, este enzima es activado a través del SNS e inhibido fuertemente por su sustrato

T4 (326;412) (figura 22). Estas evidencias llevan a pensar que tanto T3 como SNS interactúan en el proceso termogénico. Se produce un efecto sinérgico que lleva a producir una respuesta máxima a la exposición al frío en forma de un gran incremento tanto en actividad como en expresión de UCP-1. Este supuesto efecto común que le otorga a T3 y al SNS se puede verificar claramente en el hecho de que en ausencia de TH, por ejemplo durante condición de hipotiroidismo, la estimulación de UCP-1 por NE es mínima, y que además, en animales con el BAT denervado apenas se produce el estímulo de la administración de T3 sobre la expresión de UCP-1 (410;411;413;414).

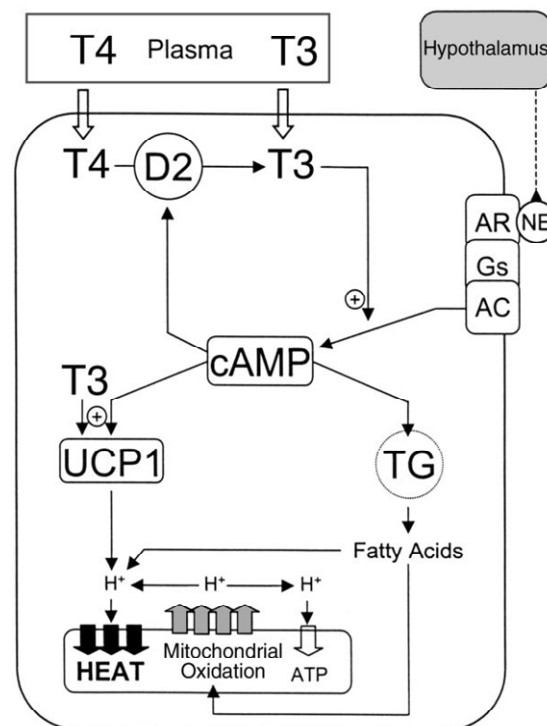


Figura 22. Papel de las THs en la regulación de la termogénesis. Tomado de (415).

Las bases moleculares de este denominado efecto sinérgico residen en que en el promotor de gen *ucp-1* existen dos elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) y un elemento de respuesta a cAMP (CRE) localizados en regiones adyacentes (224;416-418), y en la capacidad de T3 de regular el sistema adrenérgico por sí solo (412). Como se ha dicho previamente, la T3 producido por D2 se une a un TR, y en este caso, como los TRE se regulan positivamente, estimulan la transcripción de *ucp-1*. Cuando la T3 se une al receptor, en este caso TR α_1 , forma heterodímeros con RXR o PPAR γ a los que se une el co-activador PGC1-1 γ para actuar sobre la región promotora de *ucp-1* que contiene TRE y comenzar la transcripción. Se ha visto que el ratón con el

gen tra_1 delecionado presenta una temperatura corporal más baja, algo que no se ha observado en el ratón $tr\beta^{-/-}$, lo que apoya la hipótesis de que es $TR\alpha_1$ el receptor que media la respuesta termogénica de T3 en BAT (326;412).

Además del efecto sobre UCP-1, también se ha visto que las THs actúan sobre UCP-2 y UCP-3. Se han publicado estudios que demuestran que tras la administración de T3 en ratas se incrementa la expresión UCP-2 y UCP-3 en corazón y en músculo esquelético (419-421). Se ha observado que en músculo la expresión de UCP-3, la proteína termogénica fundamental en este tejido, está aumentada en condiciones de hipertiroidismo, y disminuida en hipotiroidismo cuando se compara con su expresión en animales eutiroideos (421). Además, se ha visto que durante el hipotiroidismo, la administración de T3 incrementa los niveles de proteína de UCP-3, e incrementa el gasto metabólico basal (411;422). En contraste con estas observaciones, el estudio del ratón $ucp-3^{-/-}$ crea discrepancias sobre el papel de UCP-3 y la termogénesis inducida por THs, al ver que la administración crónica de T3 en este modelo no incrementa el gasto metabólico (212), aunque se ha hipotetizado que podía ser debido a las altas dosis de T3 usadas en este estudio (estas podrían haber sobre-estimulado otros mecanismos termogénicos o a rápida conversión del T3 administrado a T2 u otras tironinas)(411;423).

Hormonas tiroideas y metabolismo lipídico

Desde hace algunos años se ha investigado acerca de la relación entre las THs y el metabolismo lipídico. Los primeros estudios hechos en modelos *in vivo* se centraron en el estudio de la variación de la ruta de las síntesis *de novo* de los ácidos grasos en tejidos periféricos (424-427); desde el comienzo de las investigaciones se han publicado diferentes estudios que muestran resultados discrepantes en cuanto a las acciones de las THs estimulando o inhibiendo lipogénesis en el mismo tejido. Un caso evidente de estos resultados contradictorios se ve en lo que ocurre con WAT; existen estudios que muestran que la administración de T3 disminuye la síntesis de ácidos grasos en este tejido, mientras que otros grupos han publicado que el tratamiento con T3 no afecta en modo algunos a enzimas lipogénicas como FAS. En contraste con estos resultados, se ha descrito que el hipertiroidismo induce el incremento en la expresión de FAS y ACC y por lo tanto, la estimulación de la lipogénesis (425).

Además de los estudios llevados a cabo en WAT, existen diferentes trabajos en los que se intenta caracterizar la modulación del metabolismo lipídico en otros tejidos. Distintas observaciones mostraron que, en músculo, la alteración del estado tiroideo conlleva cambios en AMPK y en toda la cascada de proteínas envueltas en la síntesis *de novo*. En condiciones de hipertiroidismo se observa un incremento de la activación de los enzimas implicados en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y una disminución en la concentración de malonil-CoA; es decir, las THs estimulan la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético (427). En animales que presentan hipotiroidismo toda la vía está regulada al contrario: los enzimas lipogénicos están inhibidos y la concentración de malonil-CoA aumenta (426). En un estudio posterior se muestra que los efectos de T3 sobre la activación de AMPK son visibles a corto plazo (427).

En hígado, la inducción del estado tiroideo tiene los mismos efectos sobre lipogénesis, con la única variación de que en este tejido las diferencias son mayores que las vistas en músculo: el hipertiroidismo inhibe lipogénesis y el hipotiroidismo la estimula (427).

Recientemente se ha descrito la relación entre las THs y vía de síntesis de ácidos grasos a nivel hipotalámico (428). En este trabajo, en el que se usa una dosis de T3 considerablemente alta, se observa que tras la administración de T3 ICV se estimula ingesta. Esta alteración en la ingesta está acompañada por los incrementos vistos de AMPK y ACC (en sus formas activas), y que además, tras la inhibición de AMPK mediante la administración de compuesto C se pierde el efecto orexigénico que T3 presenta a nivel central (428).

OBJETIVOS

Estudiar y evaluar los mecanismos a través de los cuales las hormonas tiroideas influyen la homeostasis energética con especial énfasis en la caracterización de sus efectos sobre el metabolismo lipídico en el hipotálamo y su relación con el proceso termogénico en el BAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este trabajo se utilizan ratas Sprague-Dawley (Animalario General, Universidad de Santiago de Compostela). En todos los diseños experimentales se tratan ratas macho adultas (peso aproximado de 250-300g).

Los animales permanecen en el animalario durante 5 ó 6 días antes de ser usados, para que se adapten a las condiciones de temperatura y luz. Estas condiciones, que se mantienen constantes, son de 21-23° C e iluminación controlada con ciclos alternos de 12h (luz/oscuridad). Las ratas son alimentadas con pienso comercial y agua *ad libitum*. En aquellos casos en los que es necesaria la cirugía, se utiliza como anestésico una mezcla de Ketamina-Xilazina en unas proporciones determinadas. La dosis administrada es de 200 µl/100 g de masa corporal, considerándose esta una dosis adecuada para conseguir una anestesia de grado II-III durante períodos de una o dos horas, siendo la mortalidad muy baja. La anestesia se administra vía intraperitoneal.

SOLUCIÓN ANESTÉSICA:

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

Todos los experimentos se realizan de acuerdo con el Comité Ético Animal de la Universidad de Santiago de Compostela, cumpliendo las Normas de Cuidado de Animales de Laboratorio y la Ley Internacional de Experimentación Animal.

TÉCNICAS EXPERIEMENTALES *in vivo*

-CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Esta operación debe llevarse a cabo aproximadamente unos 4 días antes del experimento. El objeto de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral.

Se utilizan cánulas de polietileno (PE-20, Clay-Adams, Becton-Dickinson, New Jersey, USA), de calibre fino (1.09 mm de diámetro externo y 0.38 mm de diámetro

interno). En uno de los extremos de la cánula se pone un tope, y se corta en bisel a unos 3/4 mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce en el cerebro y que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se sella hasta el día del experimento.

Una vez anestesiados los animales se realiza un corte transversal en la piel de la cabeza a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localiza a simple vista el bregma, que separa frontales de occipitales, y que se utiliza como punto de referencia para realizar un orificio (1.2 mm lateral y 1 mm posterior) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente, se añade cianoacrilato para que la cánula quede perfectamente fijada y se selle toda la zona abierta.

Para comprobar que la cánula se ha colocado en la posición correcta, se inyecta Protamina 2%, disuelta en agua con acetato sódico, que claramente tiñe el ventrículo lateral de azul, demostrando así la buena implantación de la cánula.

-IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS

Para la realización de un tratamiento crónico (8 días) a nivel periférico se usan minibombas osmóticas (modelo 2001; Alza Corp., Palo Alto, CA). Estas bombas, que tienen un volumen de expulsión constante de 1 µl/hora, se rellenan con el compuesto a utilizar o su vehículo hasta un volumen total de 200 µl, y se ponen sobre salino en un baño a 37 °C durante, al menos, 4 horas previas a la operación para asegurar que ya están liberando el tratamiento cuando se colocan sobre el animal. Para colocar estas bombas se procede a realizar un corte en la zona lumbar de la rata, haciendo un poco de hueco para crear el espacio suficiente para implantar la minibomba. Una vez en el interior, se sutura el corte para evitar que la minibomba se desplace.

-ADMINISTRACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES EN EL VMH

Una vez anestesiados los animales y comprobado el plano quirúrgico, se les practica un corte de aproximadamente un centímetro en la piel de la cabeza, perpendicular a la sutura sagital del cráneo y se retira el tejido subcutáneo dejando el cráneo al descubierto. A continuación, los animales son inmovilizados en un marco estereotáxico (*David Kopf Instruments*). Las inyecciones se realizan por duplicado en cada núcleo con una microjeringa *Hamilton (Hamilton, Serie 700, Modelo 7001, Vol.*

1uL calibre 25) dirigida a las coordenadas estereotáxicas: 2.4, 3.2 mm posterior al bregma, 0.6mm lateral a la sutura sagital y 10.2 mm por debajo de la superficie del cráneo, que se determinan siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico Paxinos G. & Watson C de cerebro de rata (figura 23). El sistema inyector se mantiene en las coordenadas durante 5 minutos adicionales posteriores a la administración intranúcleo. Una vez finalizada la inyección y retirada la microjeringa, la piel de la cabeza se fija al cráneo con cianicrilato (*SuperGlue-3, Loctite*).

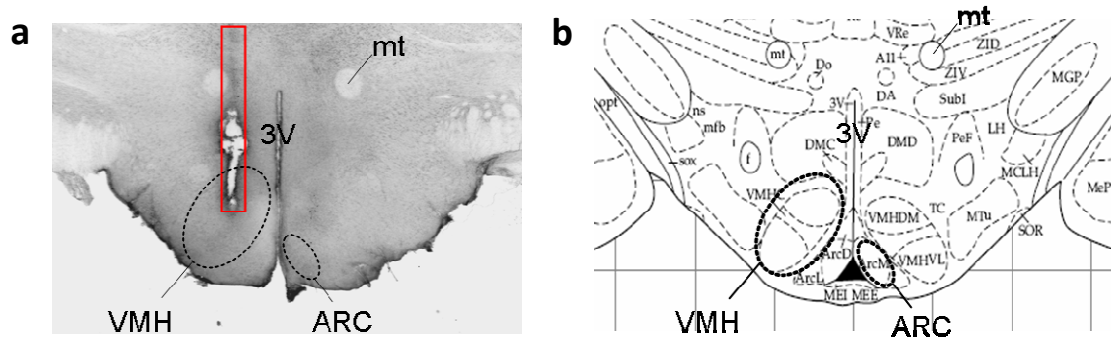


Figura 23: Imagen parcial de una sección coronal del cerebro de rata en la que se muestra una trayectoria unilateral (rectángulo izquierdo) y el punto de administración (VMH) de los vectores adenovirales empleados. a) Imagen obtenida mediante microscopía. b) representación estereotáxica parcial de una sección coronal del cerebro de rata (Paxinos G. & Watson C.) representativa de la sección mostrada.

-CONDICIONATED TASTE AVERSION

Este experimento se realiza para averiguar si el tratamiento con una determinada sustancia está causando algún tipo de reacción aversiva a la rata. Para ello, se intenta asociar el tratamiento con sabor dulce (bebida preferida al agua por las ratas). Así, durante los cinco primeros días de experimento se restringe a 2 horas diarias el acceso a la bebida (agua normal), mientras que el día del tratamiento, en el mismo momento de la administración de la sustancia, se le da de beber durante media hora la bebida dulce (agua con sacarina) (231;429;430). Además de la sustancia en estudio y del vehículo, se hace un grupo con LiCl (que se sabe que les produce aversión y gran malestar abdominal). Al día siguiente, a la misma hora que se les permitió el acceso a la bebida los días anteriores, se le ofrecen a cada rata dos botellas, una con agua y otra con sacarina (figura 24). Si el tratamiento administrado les causa algún tipo de malestar, las ratas asociaran el sabor dulce con ese malestar, y elegirán preferentemente el agua corriente como bebida. Mientras que si el tratamiento no tiene ningún tipo de efecto sobre la rata, optaran por beber la bebida dulce.

El protocolo del experimento es del siguiente modo:

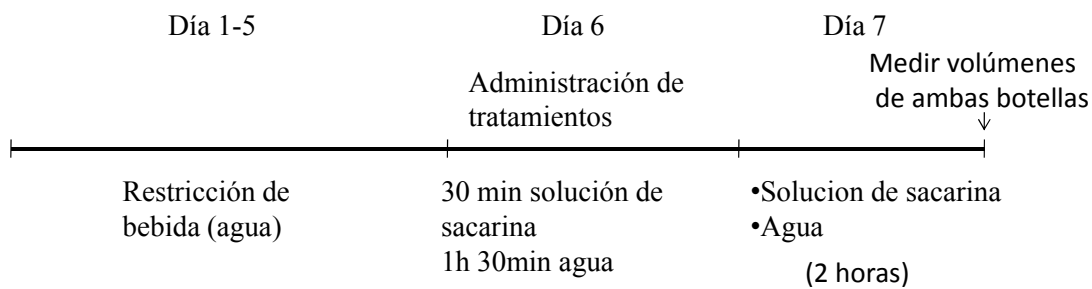


Figura 24. Protocolo seguido para realizar el experimento de Taste Aversion.

-PERFUSIÓN INTRACARDIACA

El cerebro de la rata se fija mediante perfusión intracardiaca como paso previo al estudio inmunohistoquímico (figura 25). Tras la anestesia intraperitoneal del animal con el anestésico habitual y comprobar el plano quirúrgico (referenciado anteriormente) se procede a la apertura de la cavidad abdominal. Tras la localización del apéndice xifoides, este se levanta ligeramente con unas pinzas procediendo a la rotura del diafragma y al corte de las parrillas costales. Tras la apertura de la caja torácica y del pericardio, a continuación se administra mediante una inyección intracardiaca 200 µl de heparina (*Heparina sódica Mayne 5%; Mayne Pharma*) en el ventrículo izquierdo, con el fin de evitar problemas de coagulación en los vasos durante la perfusión.

A continuación, se realiza una pequeña incisión en la punta del ventrículo izquierdo por la cual se introduce una cánula hasta llegar a la raíz de la aorta. Tras el clampaje de la vía se secciona la orejuela de la aurícula derecha. A través de dicha vía se bombea una solución de suero salino 0.9% NaCl, con el fin de eliminar la sangre del sistema circulatorio. La decoloración del hígado, así como la de la propia solución salina que sale por la orejuela seccionada marca el inicio del proceso de fijado. A través de la misma vía se introducen 500 ml de una solución de formalina (100mM) en tampón fosfato (PB, pH=7.4) durante aproximadamente 10 minutos. La eficacia de la perfusión puede constatarse por la rigidez plena del animal. Los tejidos son diseccionados y mantenidos en la solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se realizan un par de lavados en tampón fosfato.

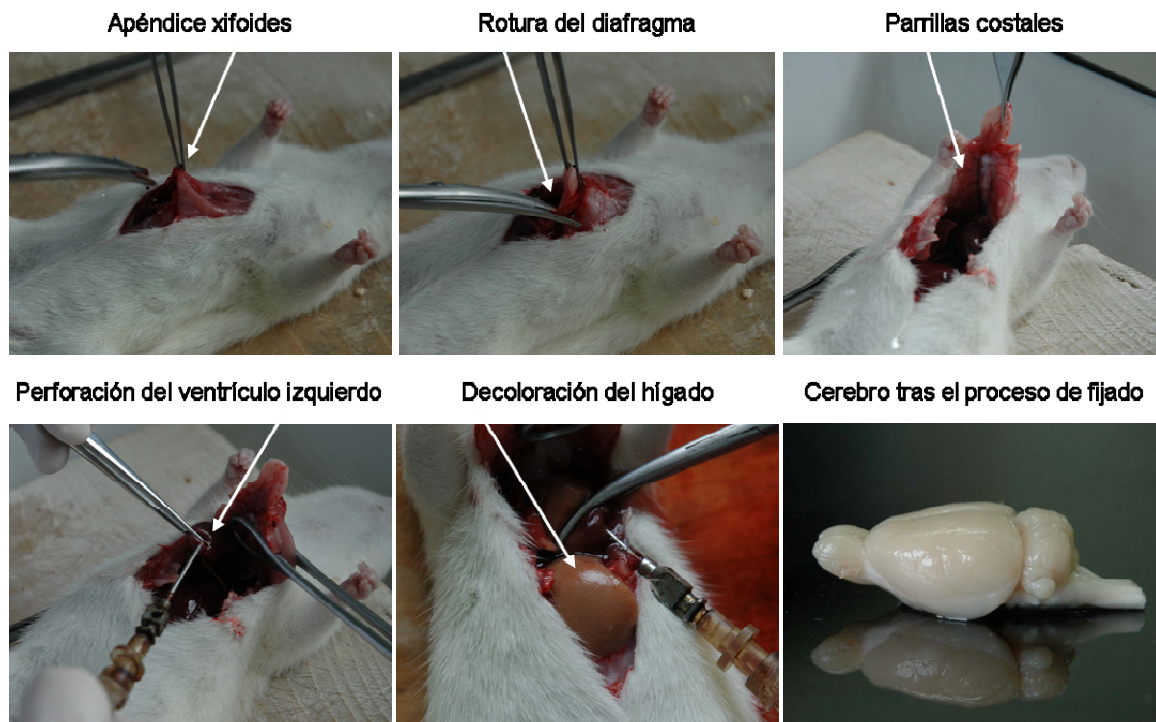


Figura 25. Imágenes de diferentes pasos de la perfusión intracardiaca.

-REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO

Una vez anestesiados los animales del modo previamente descrito, se les mantiene bajo anestesia mediante el uso de α -cloralosa (dosis inicial: 25mg/kg, dosis repetidas: 50 mg/kg/h) administrada vía catéter en la vena femoral. Una vez anestesiadas, se canula la tráquea para permitir la respiración. La temperatura rectal se mantiene a 37.5°C usando una mesa quirúrgica de temperatura controlada y una lámpara. Se identifica una fibra nerviosa inervando el BAT interescapular usando un microscopio de disección, y se coloca sobre un electrodo bipolar de platino-iridio al que se le une una sonda de alta impedancia (HIP-511, *Grass Instruments*; West Warwick, RI USA). La señal se amplifica 10^5 veces con la ayuda de un pre-amplificador Grass P5 AC. Tras la amplificación, la señal del nervioso se filtra a 100 y 1000 Hz.

A continuación, la señal del nervio se acopla a un osciloscopio (modelo 54501A, *Hewlett-Packard*, Iowa, USA) para monitorizar la calidad del registro del nervio. Las medidas de actividad del SNS en el BAT se realizan cada 15 minutos durante 6 horas tras las microinyecciones ICV o en el VMH. Para asegurarse que el ruido eléctrico es excluido durante el estudio, cada registro se corrige por la actividad que presenta post-mortem. (Protocolo experimental realizado por el *Dr. Kamal Rahmouni*. Departments of

Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, 52242, USA)

-MEDIDA DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Para la realización de las medidas de composición corporal se ha usado la técnica de resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer; EchoMRI). Las medidas se realizan el último día de tratamiento, previo al sacrificio de los animales.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

-ALTERACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO

Gran parte de los diseños experimentales se realizan con ratas con el estado tiroideo alterado. Para la generación de estos modelos se somete a los animales a tratamientos de 19 días en los que se les induce tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo:

-El hipotiroidismo se induce por administración de 0.1% de aminotriazol (Sigma; ref. A8056), 3% de albúmina de suero bovina (BSA, *Sigma*) y 0.0003% de HCl (*Merck*) en el agua de bebida durante un período de 19 días.

-El hipertiroidismo se induce por administración subcutánea de L-tiroxina (Sigma; ref. T2501) (100 µg/rata/día, disuelta en suero salino, en un volumen de 200 µl) durante 19 días. A los animales control (eutiroideos) y a los hipotiroideos se les suministra la misma cantidad, subcutánea, de vehículo (431;432).

Como control negativo de este último experimento, se lleva a cabo un tratamiento subcutáneo de 3,5-diiidotironina (T2) (Sigma; ref. D0629) durante 19 días al igual que se hace con T3. La dosis administrada de T2 es de 100 µg/rata/día en un volumen de 200 µl. Como vehículo se administra 200 µl de suero salino.

-TRATAMIENTOS INTRACEREBROVENTRICULARES

En todos los casos el tratamiento ICV se hace crónicamente; es decir, se administra la molécula deseada durante cuatro días, justo antes del inicio de la fase oscura, y se sacrifican por la mañana del quinto día. Como ya se ha dicho previamente,

la implantación de las cánulas se debe llevar a cabo cuatro días antes del inicio del tratamiento.

Gran parte de los experimentos con este tipo de tratamientos se realiza con ratas hipertiroideas, lo que añade otro factor a la hora de diseñar el experimento. En el caso de estas ratas, se comienzan a tratar con dosis diarias de L-tiroxina (descrito previamente) y a día 11 se les implanta la cánula. A partir de ese día se sigue tratando exactamente igual con la hormona tiroidea y después de cuatro días se comienza con el tratamiento ICV, quedando el diseño experimental del siguiente modo (figura 26):

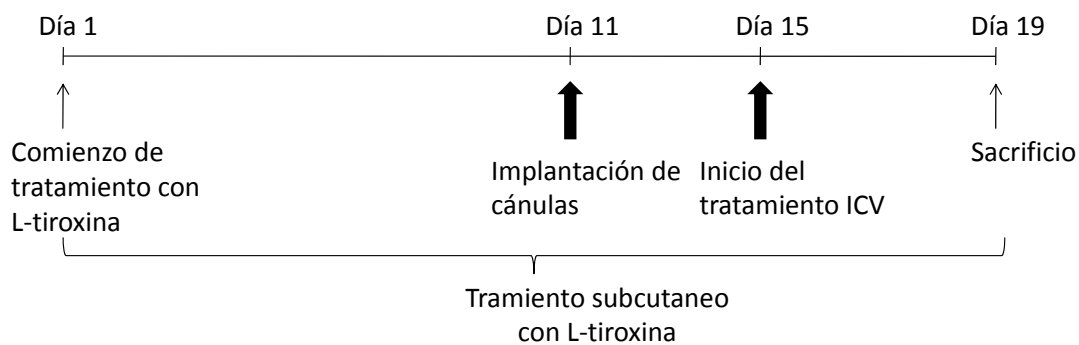


Figura 26. Protocolo seguido para la realización de tratamientos ICV en ratas hipertiroideas.

- CERULENIN

Para este experimento son necesarios cuatro grupos, dos de los cuales están formados por ratas hipertiroideas. La configuración de los grupos experimentales es la siguiente:

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con CERULENIN
- Ratas hipertiroideas tratadas con vehículo
- Ratas hipertiroideas tratadas con CERULENIN

En todos los casos los grupos experimentales constan de $n = 8$. La dosis administrada de CERULENIN (Sigma; ref. c-2389) es de $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$. Como vehículo, DMSO ($5 \mu\text{l}$).

- TOFA

Como en el caso anterior, el diseño consta de cuatro grupos experimentales:

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con TOFA
- Ratas hipertiroideas tratadas con vehículo

- Ratas hipertiroideas tratadas con TOFA

En todos los casos los grupos están formados por 8 animales. La dosis administrada de TOFA (Sigma; ref. T6575) es de 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$. Como vehículo se inocula DMSO (5 μl).

- AICAR

Como en los experimentos descritos anteriormente, este diseño consta de cuatro grupos experimentales:

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con AICAR
- Ratas hipertiroideas tratadas con vehículo
- Ratas hipertiroideas tratadas con AICAR

Todos los grupos constan de un $n = 8$. La dosis administrada de AICAR (Sigma; ref. A9978) es de 3 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$. Como vehículo de administra salino (5 μl).

- T3

- Crónico

Para la realización de este experimento son necesarios cuatro grupos. Al contrario que en los experimentos descritos hasta el momento, en este dos de los grupos están formado por ratas hipotiroideas. El experimento está formado por los siguientes grupos:

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con T3
- Ratas hipotiroideas tratadas con vehículo
- Ratas hipotiroideas tratadas con T3

- Agudo

Son necesarios dos grupos. Las animales se sacrifican tres horas después de la administración de T3.

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con T3

Todos los grupos están formados por 8 ratas cada uno. La dosis administrada de T3 (Sigma; ref. T2877) es de 4 $\text{ng}/10 \mu\text{l}$. Como vehículo de administra DMSO (10 μl).

- T3 + TRAMAMIENTO SUBCUTANEO CON SR59230A

Únicamente se realiza con ratas eutiroideas. Es necesario un pretratamiento de dos días con SR59230A (antagonista del receptor adrenérgico β_3) previo a la administración crónica de T3 ICV. Los grupos creados para este experimento son:

- Vehículo ICV- Vehículo SC
- Vehículo ICV- SR59230A SC
- T3 ICV- Vehículo SC
- T3 ICV- SR59230A SC

Los grupos formados constan de 8 ratas cada uno. La dosis y el vehículo de T3 son los mismos citados anteriormente. El tratamiento con SR59230A (*Tocris Bioscience*; ref.1511) se realiza de modo subcutáneo. Se comienza con el tratamiento dos días de la primera administración de T3. La dosis utilizada de SR59230A es de 3 mg/kg/día dividida en dos inyecciones diarias (una a primera hora de la mañana y otra justo antes del inicio de la fase oscura). La dosis de antagonista se elige teniendo en cuenta un experimento de puesta a punto descrito en un apartado posterior. El vehículo del antagonista es DMSO (200 μ g).

- RAPAMICINA

Este experimento está formado por los siguientes cuatro grupos:

- Ratas eutiroideas tratadas con vehículo
- Ratas eutiroideas tratadas con RAPAMICINA
- Ratas hipertiroideas tratadas con vehículo
- Ratas hipertiroideas tratadas con RAPAMICINA

Todos los grupos están formados con un n = 8. La dosis administrada de RAPAMICINA (*Calbiochem*; ref. 553210) es de 50 μ g/5 μ l. Como vehículo se administra DMSO (5 μ l).

-TRATAMIENTOS INTRAPERITONEALES (IP)

- T3

Este tratamiento se lleva a cabo tratando las ratas durante 4 días. Los animales se sacrifican a día 5. Los grupos necesarios para este diseño son:

- Vehículo

- T3

Los grupos están formados un por 8 animales cada uno. La dosis administrada T3 es la misma que la usada en para el tratamiento central. La única diferencia es que la misma cantidad inyectada de T3 debe estar diluida en un volumen mucho mayor (4 ng/200 μ l). Como vehículo se administra DMSO (200 μ l).

-ADMINISTRACIÓN EN EL VMH

• T3

El compuesto se administra mediante estereotaxia de la forma anteriormente descrita. Par la realización de este experimento son necesarios 2 grupos:

- Vehículo
- T3

Tras la administración de la T3 o el vehículo en el VMH, los animales se sacrifican 1 hora después de la última inyección. Los grupos constan de 8 ratas cada uno. La concentración de T3 usada para este experimento en de 0.4 ng/ μ l para cada una de las 4 inyecciones de 1 μ l que se le hacen a cada animal. Como vehículo se administra 1 μ l de DMSO.

- ADMINISTRACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES

La administración de adenovirus se lleva a cabo siguiendo las instrucciones anteriormente descritas. Para conseguir una eficiencia adecuada se realizan dos inyecciones en cada núcleo. Tras la administración de los adenovirus, se controla peso e ingesta durante los seis días siguiente, siendo el ultimo día el sacrificio.

• AMPK ACTIVADO CONSTITUTIVAMENTE (AMPK α -CA)

Para este experimento es necesario crear 4 grupos experimentales diferentes.

- Eutiroideas-GFP
- Eutiroideas-AMPK α -CA
- Hipertiroideas-GFP
- Hipertiroideas-AMPK α -CA

Cado uno de los grupos está compuesto por 8 ratas.

El vector adenoviral administrado aparte de expresar una la isoforma AMPK α -CA, expresa el cDNA de GFP, que servirá de marcador para poder ver la efectividad de la infección en el núcleo.

La dosis administrada de este adenovirus AMPK α -CA (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) es de 1 μ l por inyección de un stock de 1×10^{12} pfu/ml. Como control del tratamiento se administra un adenovirus que únicamente expresa GFP. De este también se inocula 1 μ l por inyección de un stock de 1×10^{12} pfu/ml.

Previamente al tratamiento con adenovirus, se inicia un tratamiento para la inducción del hipertiroidismo. El protocolo final es el siguiente (figura 27):

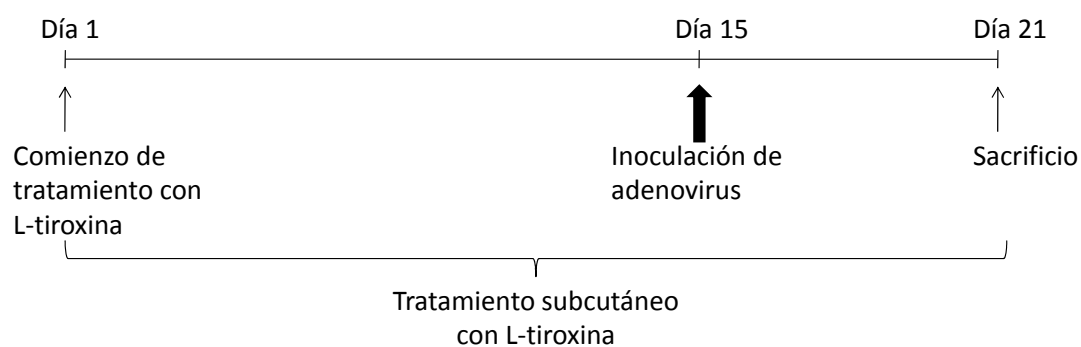


Figura 27. Protocolo seguido para la administración de adenovirus en el VMH.

Como control de la infección se estudia la expresión de GFP en el VMH mediante el uso de inmunofluorescencia y western blot tras la administración estereotáxica de los vectores como medida de su eficiencia de infección (figura 28). Los animales tratados con adenovirus AMPK α -CA muestran expresión de GFP localizada en el VMH frente a lo que ocurre con las ratas control a las cuales no se les administra el vector adenoviral. Igualmente, mediante western blot se detecta expresión hipotalámica de GFP en los animales tratados con adenovirus control que expresan exclusivamente GFP y los tratados con los adenovirus AMPK-CA frente a lo que ocurre con las ratas control a las cuales no se les administraron los adenovirus.

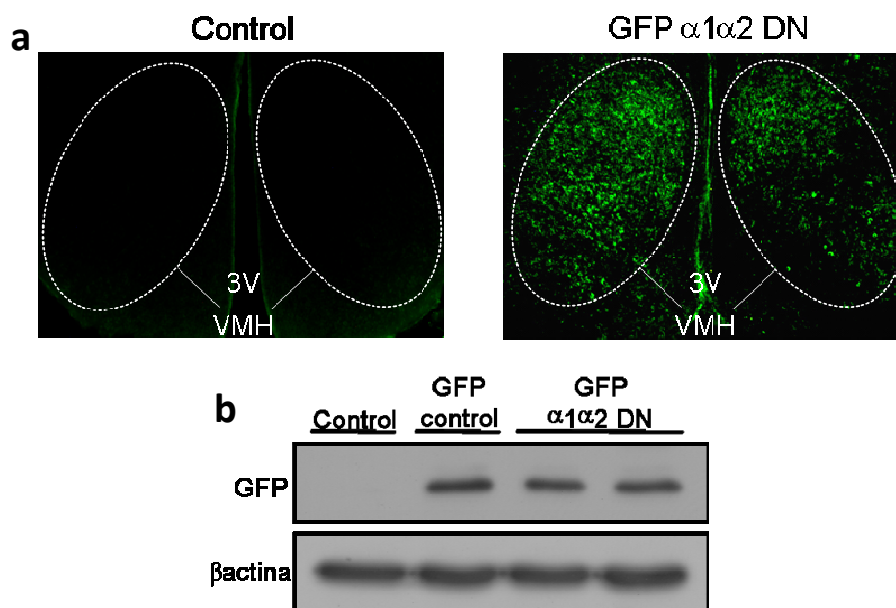


Figura 28. a) Inmunofluorescencia de secciones coronales del cerebro de rata a nivel del VMH. b) Imágenes autorradiográficas de western blot.

- AMPK α_1 , α_2 DOMINANTES NEGATIVOS (AMPK α -DN)

Los grupos experimentales necesarios para este diseño son:

- GFP
- AMPK α -DN

El adenovirus administrado es una mezcla de las mismas cantidades de dominantes negativos para AMPK α_1 y AMPK α_2 (ambos adenovirus también expresan GFP). La dosis administrada de AMPK α -DN (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) es de 1 μ l por cada una de las cuatro inyecciones que se hacen a cada animal. Las concentraciones de estos adenovirus son para los ambos dominantes negativos 1.2×10^{12} pfu/ml. Como control se usan adenovirus que sólo expresan GFP. la dosis administrada es la misma y su concentración es 1.2×10^{12} pfu/ml.

- RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS (TR) DOMINANTE NEGATIVO (TR-DN)

El experimento consta de 4 grupos de 8 ratas cada uno:

- Eutiroideas-GFP
- Eutiroideas- TR-DN
- Hipertiroideas-GFP
- Hipertiroideas- TR-DN

La dosis administrada de este adenovirus TR-DN (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) es de 1 μ l por inyección de un stock de 1×10^{12} pfu/ml. Como control del tratamiento se administra un adenovirus que expresa el cDNA de GFP. De este adenovirus también se inocula 1 μ l por inyección de un stock de 1×10^{12} .

Previo a la inoculación de los adenovirus se comprobó *in vitro* su funcionalidad (figura 29). Se observó cómo estos adenovirus prevenían la activación dependiente de THs de un sistema de elementos de respuesta a THs, y la inhibición de la inducción de la globulina de unión a hormona sexual (SHBG) en las células HepG2.

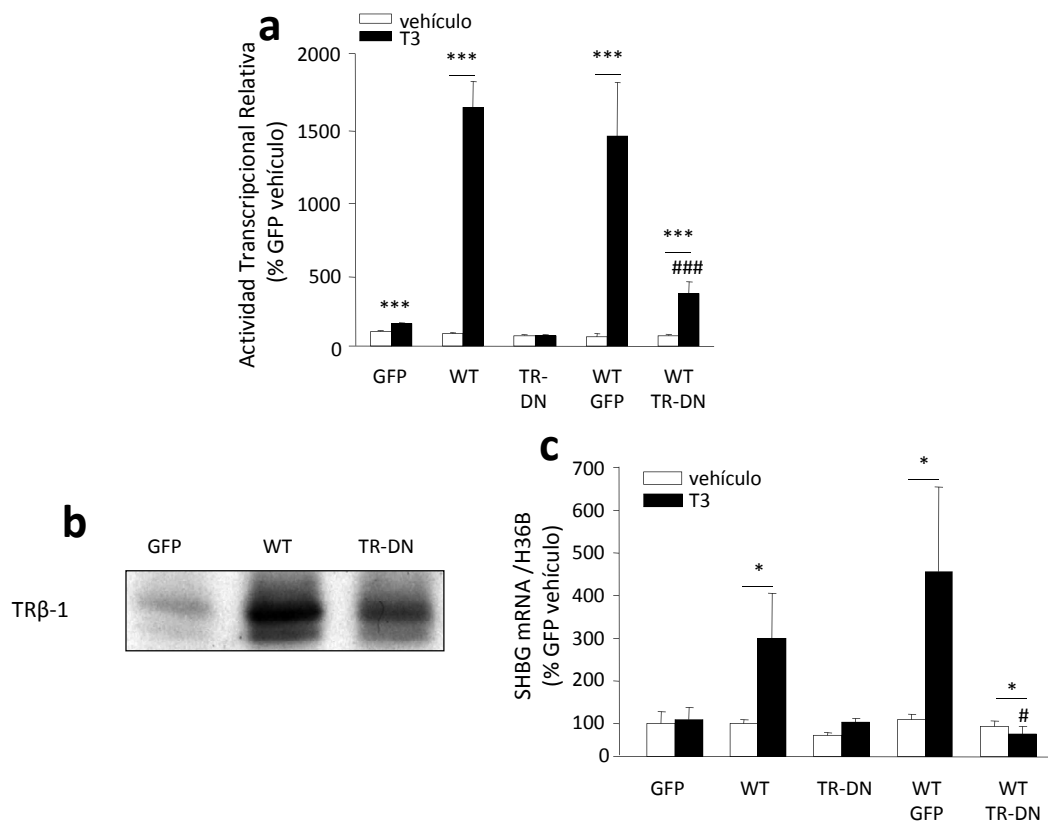


FIGURA 29. a) Actividad transcripcional del elemento de respuesta THs tras la administración de T3 100nM en células HepG2 infectadas con control (GFP), wildtype (WT) o TR-DN. b) Niveles de expresión de TR β 1 en células HepG2 infectadas con adenovirus. c) expresión de SHBG en células HepG2 tras la administración de T3 100nM; la co-expresión de TR-DN inhibe la acción de TR en WT. *: P<0,05 y ***: P<0.001 vs. Vehículo. #: P<0,01 vs. WT T3.

- ADMINISTRACIÓN DE AMPK α -DN EN VMH Y TRATAMIENTO CON ANTAGONISTA DE RECEPTOR ADRENÉRGICO β 3.

En este experimento, además de la administración del adenovirus explicado en el apartado anterior, es necesario un tratamiento subcutáneo con SR59230A, antagonista del receptor adrenérgico β 3. La administración de este antagonista se lleva a cabo mediante implantación de minibombas osmóticas. Los grupos necesarios para realizar este experimento son:

- Vehículo-GFP
- Vehículo-AMPK α -DN
- SR59230A-GFP
- SR59230A-AMPK-DN

Cada uno de los grupos está compuesto por 8 ratas. Antes de la administración de los adenovirus, es necesario implantar dos días antes las minibombas con el SR59230A. El diseño experimental queda del siguiente modo (figura 30):

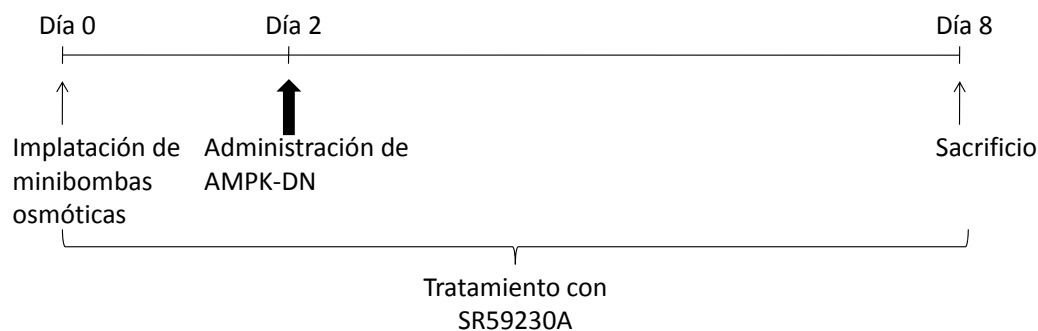


Figura 30. Protocolo seguido para la administración de adenovirus AMPK α -DN durante el tratamiento con SR59230A.

Las dosis de adenovirus son exactamente las mismas que las usadas en el experimento anterior. La dosis de antagonista SR59230A (*Tocris Bioscience*; ref.1511) utilizada es de 3 mg/kg/día. Como vehículo del tratamiento se administra suero salino. La dosis de antagonista se determinó en base a un experimento previo, en el que se ha visto que esta concentración era capaz de revertir de UCP-1 en el BAT al someter a las ratas a frío (4°C) durante 48 horas (figura 31).

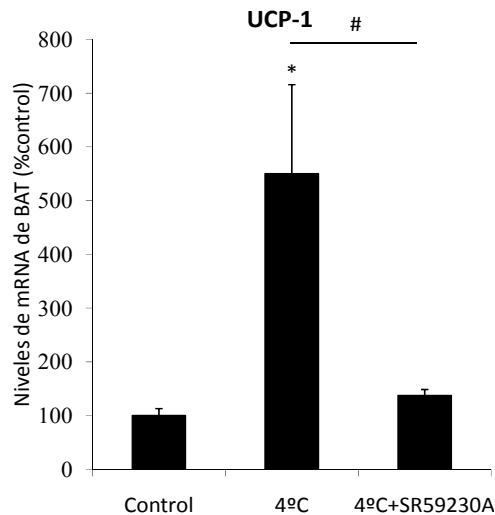


Figura 31. Efecto del tratamiento con SR59230A sobre los niveles de mRNA de UCP en BAT en ratas expuestas a 4°C. *: P<0.05 vs. Control (temperatura ambiente); #: P<0.05 4°C vs. 4°C+ SR59230A.

-CONDICIONATED TASTE AVERSION

RAPAMICINA

➤ ICV

El procedimiento experimental se lleva a cabo de la forma descrita en el apartado de técnicas experimentales *in vivo*. Para este experimento es necesario crear tres grupos experimentales:

- Vehículo ICV- Vehículo IP
- Vehículo ICV- LiCl 0.15M IP
- Rapamicina ICV-Vehículo IP

Los grupos están compuestos por 8 ratas cada uno. La dosis de rapamicina es la misma que la usada para el tratamiento crónico ICV y el vehículo administrado es DMSO.

La implantación de las cánulas se hace cuatro días antes de iniciar la restricción del agua de bebida.

➤ IP

Los grupos experimentales son:

- Vehículo SC- Vehículo IP
- Vehículo SC- LiCl 0.15M IP
- Rapamicina SC-Vehículo IP

Los grupos son de 8 animales. La cantidad de Rapamicina administrada es la misma (50 µg) pero en un volumen mayor (200 µl).

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

-HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La mayor parte de los neuropéptidos estudiados se expresan en más de un núcleo hipotalámico. La hibridación *in situ* permite hacer un estudio anatómico, determinando los núcleos en los cuales se expresa el gen y un estudio semicuantitativo del mismo determinando el grado de expresión del mismo. Para todas las hibridaciones *in situ* analizadas en este trabajo se utilizaron como sondas desoxioligonucleótidos monocatenarios antisentido.

- Parámetros de diseño de los desoxioligonucleótidos.

El diseño de las sondas de hibridación *in situ* se realiza a través del programa informático *Primer Express (Applied biosystems)*. Para ello, basándose en la secuencia de cDNA del gen, se diseñan una pareja de sondas para la amplificación del mismo, manteniendo para todos ellos los mismos parámetros (tabla 4). Se selecciona siempre la sonda antisentido.

Tabla 4. Parámetros de diseño de los desoxioligonucleótidos.

	T ^a media (°C)	% GC	Tamaño (bp)
Mínimo	75	45	30-34
Máximo	100	65	45
Óptima	90		40

- Obtención de los cortes

Tras el sacrificio del animal los cerebros son rápidamente congelados en CO₂ sólido, manteniendo su anatomía, y almacenados en un congelador a -80°C hasta el momento de su uso. Los cortes del cerebro se realizan en un criostato (*HM505E[®], Microm*) en secciones de 16 µm de grosor. Los cortes resultantes se montan en portaobjetos de

polilisina (*Microscope Slides Polysine, VWR*) para facilitar la adhesión de los cortes. Las secciones se eligen en función del área de expresión del gen de estudio basándose en los criterios estereotáxicos del atlas “*The rat brain*” de Paxinos & Watson (433).

- Marcaje de la sonda

Los oligonucleótidos se marcan en el extremo 3' con [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP (*Amersham*). La reacción de transcripción se lleva a cabo en un volumen total de 20 μl , con las siguientes proporciones:

- 100 ng del oligonucleótido en cuestión (tabla 5)
- 2 μl de tampón de reacción (“*10X one-phor all buffer*: 100mM tris-acetato, 100 mM acetato de magnesio, 500 mM acetato de potasio, *Amersham*)
- 2 μl de [$\alpha^{32}\text{S}$] dATP (*Amersham*), con una concentración de 12.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ y una actividad específica de 1250 Ci/mmol (46.2 TBq/mmol)
- 34 unidades de Tdt (*terminal deoxynucleotidil tranferase, Amersham*)

La mezcla de reacción se incuba durante un intervalo de 120-150 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se procede a la purificación de la sonda a través de columnas de Sephadex (*NickTM column, Amersham*) previamente lavadas con tampón de elución estéril (20 mM Tris-HCl pH 7.5, *Merck*; 2 mM EDTA pH 8, *Merck*). Se eluyen tres fracciones en 400 μl del tampón, y se cuentan 4 μl de cada una en el contador β (*WinSpectral 1414[®], Wallac*). La segunda fracción corresponde al oligonucleótido marcado.

- Preparación del tejido (Pre-hibridación)

Las secciones, una vez seleccionadas, se someten a un proceso de secado rápido para eliminar la capa superficial de hielo y con ello evitar cualquier interferencia en el proceso de fijación. La fijación se realiza por inmersión de los cortes en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.2 M (38 mM NaH_2PO_4 , *Sigma*; 0.15 M Na_2HPO_4 , *Sigma*) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizan dos lavados rápidos con tampón fosfato sódico (PBS) (72mM NaCl, *Sigma*; 9.5 mM NaH_2PO_4 , *Sigma*; 39 mM Na_2HPO_4 , *Sigma*) y se deshidratan los mismos mediante inmersiones sucesivas en concentraciones crecientes de etanol (*Merck*) (70, 80, 90, 95 y 100%, 5 minutos cada uno a excepción de la inmersión final en etanol absoluto que se realiza durante 10 minutos). Finalmente las secciones se dejan secar al aire.

Sobre cada porta se aplican las cuentas (cpm) necesarias (tabla 5) en función del oligonucleótido de estudio, en 200 μ l de una solución de hibridación que contiene: SSC 4X (SSC 20X: 3M NaCl, *Sigma*; 280 mM $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, *Sigma*), 50% formamida desionizada (*Sigma*), disolución Denhart's 1X (albúmina de suero bovino (BSA) 1%, ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%, *Sigma*), 440 μ g/ml de DNA de espermatozoos de salmón (*Sigma*) y 10 % dextrán sulfato (p/v) (*Sigma*). Las secciones se incuban con la sonda durante toda una noche en un horno de hibridación en unas condiciones de humedad y temperatura (37°C) constantes.

- Lavados

Una vez hibridadas las secciones se someten a los siguientes lavados para eliminar los posibles restos de sonda:

- Se elimina el exceso de la solución mediante decantación.
- 5 lavados a temperatura ambiente en SSC 1X
- 4 lavados de 30 minutos a temperatura controlada, a 42 ó 55°C en SSC 1X en función del oligonucleótido (tabla 6)
- un lavado de 1 hora a temperatura ambiente en SSC 1X
- lavado rápido en agua *milliQ* autoclavada
- lavado rápido en etanol 70% con 0.3 M de NH_4Ac (*Sigma Aldrich*), lavado rápido en etanol absoluto.
- Una vez secos, los portaobjetos se exponen en un cassette (*HypersassetteTM*, *Amersham Biosciences*) a una película de autoradiografía (*Hyperfilm β -Max*, *Amersham*).

Los tiempos de exposición varían en función del oligonucleótido (tabla 6).

- Cuantificación

Las películas autoradiográficas se escanean (*CanonScan 9900F*) a una resolución de 800X y digitalizadas para su procesamiento con el programa de imagen (*ImageJ 1.33*, *NIH; Maryland, USA*). El estudio cuantitativo se realiza corrigiendo de la densidad óptica de las señales de hibridación en núcleos concretos por la señal de fondo del área adyacente. Las áreas de medición (señal positiva y fondos) son idénticas en todos los casos. Todos los grupos experimentales de un mismo ensayo se exponen en la misma película autorradiográfica.

Tabla 5. Oligonucleótidos antisentido para hibridación *in situ*.

Sonda	Código GenBank	Secuencia
AgRP	AF206017	5'-CGACGCGGAGAACGAGACTCGCGGTTCTGTGGATCTAGCACCTCTGCC-3'
CART	M29712	5'-CCGAAGGAGGCTGTCACCCCTCACA-3'
FAS	NM_017332	5'-GGGTCCATTGTGTGTGCCTGCTTGGGGTG-3'
NPY	M20373	5'-AGATGAGATGTGGGGGAAACTAGGAAAAGTCAGGAGAGCAAGTTTCATT-3'
POMC	AF510391	5'-CTTGATGATGGCGTTCTTGAAGAGCGTCACCAGGGGCGTCTGGCTCTT -3'
TRH	NM_013046	5'-ATACCAGTTAGGGTGAAGATCAAAGCCAGAGCCAGCAGCAACCAA-3'

Tabla 6. Condiciones de hibridación, lavados y exposición.

Sonda	cpm (X10 ⁶)	T de lavado (°C)	t de exposición (días)
AgRP	1	55	4-5
CART	1	42	5-6
FAS	0,5	55	15
NPY	1	42	4-5
POMC	0,5	55	2-3
TRH	0,5	55	6-7

-WESTERN BLOT

El análisis mediante Western Blot (WB) de las distintas proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos se realiza en base a protocolos estandarizados por nuestro grupo de investigación.

- Extracción de proteínas totales:

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

- Las muestras de tejido se homogeneizan mecánicamente hasta que están completamente disgregadas.

- Se añade tampón de lisis en proporción al tejido (1:5 (p:v) si es hipotálamo, 1:10 si es hígado o 1:2 si es WAT).

** Tampón de lisis: 50 mM TRIS-HCl pH=7.5, 1% Triton X-100 v/v, 1mM EDTA, 1 mM EGTA,

1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 5mM Na₄P₇O₂ y 42.75g Sacarosa.

Esta solución se conserva a 4° C y en el momento de su uso se le añaden los inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics): 1 pastilla de cóctel de inhibidores/25ml tampón de lisis.

Después de los inhibidores de proteasas se añade 0.2% β-mercaptoetanol.

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

- Electroforesis y Transferencia

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

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

**** Gel 8%:** 5.2 ml H₂O d, 13,5 ml Tampón A, 7.2 ml Acrilamida, 75 µl TEMED y 150 µl APS

La cantidad total de proteína cargada: 40 µg de hipotálamo, 20 µg de hígado o 15 µg en el caso del tejido adiposo. La cantidad de proteína a cargar se lleva a un volumen final de 16 µl con tampón de lisis y tampón de carga 5X.

**** Tampón de carga 5X (25 ml):** 12,5 ml glicerol, 1,25 ml β-mercaptoetanol, 2,5 g SDS, 0.125 ml azul de bromofenol y 6,25 ml Tris-HCl pH 6.8.

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

- La electroforesis se lleva a cabo durante 60 minutos aproximadamente bajo las siguientes las condiciones de un voltaje constante de 130 V y un amperaje limitado de 180 mA.

** Tampón de electroforesis 5X (1 l): 72 g Glicina, 15 g Tris base y 5 SDS.

Para pasar a 1X: 100 ml de tampón de electroforesis 5X en un volumen final de 500 ml.

- Transferencia

La transferencia (Semiseca) se realiza sobre membrana de PVDF (*Millipore*), que debe ser activada previamente (5 minutos en metanol, 2 minutos en H₂O y 2 minutos en Tampón de Transferencia).

** Tampón de transferencia 25X (500 ml): 72.5 g Tris base, 36.5 g Glicina y 4.5 g de SDS. Para pasar a 1X: 40 ml del tampón de transferencia 25X, 200 ml de metanol en un volumen final de 1 L de H₂O.

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

- Finalizada la Transferencia se bloquea la membrana con exceso de proteína (BSA 3%) durante 60 minutos de agitación a temperatura ambiente.

- Inmunodetección

- Se lava la membrana con solución de lavado TBS-TWEEN 0.1 % (24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl y 1 ml Tween 20© en un volumen final de 1L, a un pH=7.6) durante unos 30 minutos.

- Se incuba con el Anticuerpo primario toda la noche a 4°C ó 2 horas a T^a ambiente en solución de bloqueo (TBS-TWEEN al 0.1% + 3% BSA) en agitación. La concentración de anticuerpo varía en función de la proteína a estudiar (tabla 7).

- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.

- Se incuba 1 hora a T^a ambiente con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo.

- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado.

- Se incuba la membrana durante 1-2 minutos con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia a volúmenes iguales (1ml de cada), en oscuridad y sin agitación

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

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	Casa Comercial	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	Casa Comercial
ACC	1:500	Upstate	anti-conejo	1:5000	DaKO cytomation
pACC	1:2000	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
AMPK α 1	1:1000	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
AMPK α 2	1:1000	Upstate	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pAMPK	1:2000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
FAS	1:1000	Santa Cruz	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
CPT1-M	1:500	Santa Cruz	anti-conejo	1:7000	Dako cytomation
pSTAT-3	1:500	Abcam	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
p-FOXO1	1:500	Santa Cruz	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
mTOR	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pmTOR	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
S6K1	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pS6K1	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
S6	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
pS6	1:1000	Cell signaling	anti-conejo	1:5000	Dako cytomation
β -Actina	1:5000	Sigma Aldrich	anti-ratón	1:5000	Dako cytomation

** Para detectar la proteína se usa anticuerpo secundario conjugado con HRP y quimioluminiscencia.

** Sustrato de Quimioluminiscencia: Pierce® ECL Wb substrate (Thermo scientific)

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

- Se coloca la membrana en un cassette de autoradiografía con películas fotográficas (*Amersham, Hiperfilm M RPN 6K*) y se revelan las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

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

A continuación se lava con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos) y se procede a bloquear de nuevo la membrana. Para conservar la membrana para futuros experimentos se lava en PBS, se seca al aire sobre un papel de filtro y se guarda.

- Cuantificación

Las películas autorradiográficas son escaneadas (*CanonScan 9900F*) a una resolución de 400X y digitalizadas para su procesamiento con el programa de imagen (*ImageJ 1.33, NIH; Maryland, USA*). El estudio cuantitativo se realiza corrigiendo la densidad óptica de las señales de inmunodetección por la señal de fondo de cada placa. Las áreas de medición (señal positiva y fondo) son idénticas en todos los casos. Todos los grupos experimentales de un mismo ensayo fueron expuestos en la misma película fotográfica.

-RT-PCR

I. EXTRACCION DE RNA TOTAL

- Extracción de RNA de los tejidos

Las muestras congeladas son homogeneizadas mecánicamente (Polytron) después de añadirles 500 ml de Trizol (TRIZOL® Reagent; Invitrogen)

Después de la homogeneización las muestra se dejan reposar a T^a ambiente durante unos 5 minutos.

- Aislamiento de RNA

A continuación se añade 1 ml de CHCl₃, se agita fuertemente durante varios segundos y se deja reposar durante 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, observando ya claramente las 2 fases: una fase acuosa (donde se halla el RNA) y una fase orgánica (que contiene las proteínas y los lípidos). Entre ambas se encuentra la interfase (donde está el DNA).

Se retira la fase acuosa con cuidado pasándola a otro tubo de polipropileno autoclavado y se desprecia la fase orgánica. De esa manera se separa el RNA del resto de los componentes celulares.

- Precipitación de RNA

Una vez separado el RNA, se le añade 1 ml de isopropanol, se agita y se mete a -20°C durante unos 10 minutos, consiguiendo así que el RNA precipite. Transcurrido este tiempo se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm a 4°C para concentrar el RNA al fondo.

- Lavado

Una vez eliminado el sobrenadante se añade 1 ml de etanol al 70% en H₂O-DEPC, y tras una agitación corta se centrifuga durante unos 5 minutos a 12000 rpm y 4°C.

Para eliminar la mayor cantidad de etanol posible, se vuelve a centrifugar 1 minuto a 13500 rpm y 4°C, y posteriormente se retira el sobrenadante con una pipeta.

Finalmente se resuspende en H₂O DEPC calentándolo a 60 °C durante 15 minutos.

- Cuantificación

La concentración de ARN de la muestra se determina en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm proporciona la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determina estudiando el cociente 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1.4 y 1.8

** H₂O DEPC: agua bidestilada con dietilpirocarbonato al 0.1%. Tras una noche a T^a ambiente se autoclava.

II. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

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

- Volumen de muestra necesario para obtener: 500 ng (grasa) ó 100 ng (hígado) de RNA total
- 6 µl de tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer; Invitrogen)(250 nM Tris-HCl, pH 8.3, 375nM KCl, 15mM MgCl, 50nM DDT)
- 1.5 µl Mg₂Cl 50 mM (Invitrogen)
- 6 µl de mezcla de dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP, dATP, con una concentración de 10 mM de cada uno)
- 0.17 µl de Random primers (Invitrogen)
- 0.25 µl inhibidor de RNasa (RNaseOUT®, 40 U/µl Invitrogen)
- 2 µl de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/µl, Invitrogen)
- Volumen correspondiente de H₂O MQ para obtener el volumen final de 30 µl

También se realiza una RT- (30 µl de mezcla de reacción excepto M-MLV, cuyo volumen era sustituido por H₂O MQ)

Una vez preparadas las mezclas de reacción se incuban en un termociclador, que realiza los siguientes pasos: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C, y finalmente las muestras se mantienen a 4°C.

III. PCR Tiempo Real (TaqMan)

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

Los primers usados fueron diseñados con el programa Primer Express (*Applied biosystems*) y cotejados según la base de datos BLAST (tabla 8).

La mezcla de reacción de PCR, cuyo volumen final era de 12 µl, está constituida por:

- 2.92 µl H₂O-MQ
- 0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM)
- 0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM)
- 0.36 µl Sonda (5 µM)
- 6 µl Taqman Universal PCR master mix; (Applied Biosystems)
- 2 µl Muestra (RT)

Además de las muestras, se añade un control negativo (-RT), un blanco y 6 muestras para la realización de una curva patrón tanto para el gen problema como para el *housekeeping* o gen de expresión constitutiva, todo ello por duplicado.

** Curva patrón: consta de 6 puntos realizados por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40 µl resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2 µl de distintos productos de RT, pero siempre del mismo tratamiento o tejido).

Las condiciones de amplificación fueron de:

- 1) 50°C durante 2 minutos
- 2) 95°C durante 10 minutos
- 3) 95 °C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Número de ciclos: 40

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utiliza 7300 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) mediante el programa informático 7300 *System Software*® (*Applied Biosystems*).

El análisis de los datos se realiza en base a un gen de referencia (en este caso el 18S) calculando la diferencia entre eficiencias de ambos genes: referencia y problema.

Tabla 8. Primers para PCR- Tiempo Real (Taqman).

mRNA	Código GenBank		Secuencia
D2	NM_031720	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00581867_m1
FABP3	NM_024162	Fw Primer	5'-ACGGAGGCAAACCTGGTCCAT-3'
		RvPrimer	5'-CACTTAGTTCCTCGTGAAGCGTAGTC-3'
		Probe	FAM-5'-TGCAGAAGTGGGACGGCAGG-3'-TAMRA
HPRT	NM_012583	Fw Primer	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		RvPrimer	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC -3'
		Probe	FAM-5'- CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT 3'-TAMRA
HSL	NM_012859	Fw Primer	5'-CCAAGTGTGTGAGCGCCTATT -3'
		RvPrimer	5'-TCACGCCAATGCCTTCT -3'
		Probe	FAM-5'-AGGGACAGAGACGGAGGACCATTTTGACTC -3'-TAMRA
LPL	NM_012598	Fw Primer	5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCTTCA-3'
		RvPrimer	5'-CCGTGTAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'
		Probe	FAM-5'-CCTGCCGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA
PGC1α	NM_031347	Fw Primer	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		RvPrimer	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Probe	5'-AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'
PGC1β	NM_176075	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
UCP-1	NM_012682	Fw Primer	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		RvPrimer	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Probe	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTCAAAGGGTTG-3'-TAMRA
UCP-3	NM_013167	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00565874_m1

-ENSAYOS ENZIMÁTICOS

➤ ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CPT-1

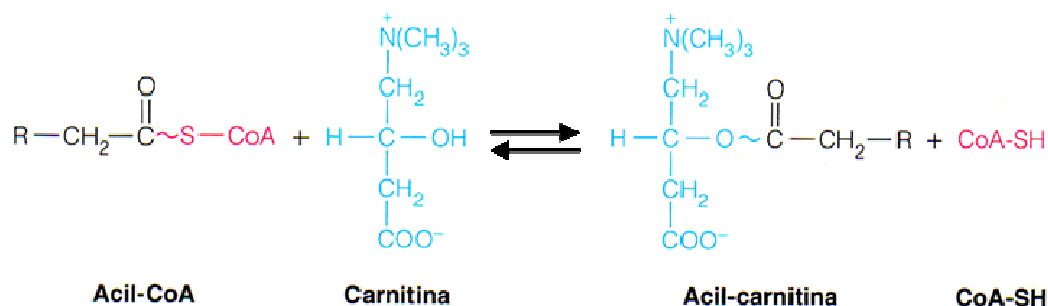


Figura 32. Reacción de la Carnitina palmitoil transferasa I.

La determinación de la actividad CPT-1 se realiza determinando la liberación de grupos CoA-SH del palmitoil-CoA usando el método descrito por Bieber (434). Este método se basa en la reacción del grupo sulfidrilo con el reactivo de *Ellman* (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)) y en la variación que se produce en la absorción del mismo a 412 nm.

Los grupos tiol (-SH) de los aminoácidos sulfurados de las proteínas suelen encontrarse en su forma reducida, como sulfidrilos, y son estables a la oxidación en medio ácido. El procedimiento utilizado para su cuantificación, desarrollado por *Ellman* en 1959 (435) consiste en oxidar los grupos sulfidrilo de las muestras con un disulfuro simétrico (ácido 5-5'-ditiobis[2-nitrobenzoico]; *DTNB*; *reactivo de Ellman*) que, al reducirse, genera un disulfuro mixto y un anión tiolato (5-tio-2-nitrobenzoato; *TNB*). Este puede cuantificarse espectrofotométricamente debido a su fuerte absorción a 412 nm (coeficiente de extinción de $13'6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (figura 32). De este modo el reactivo del *Ellman* (*DTNB*) (figura 33) permite la determinación espectrofotométrica de los grupos sulfidrilo reactivos presentes en la reacción.

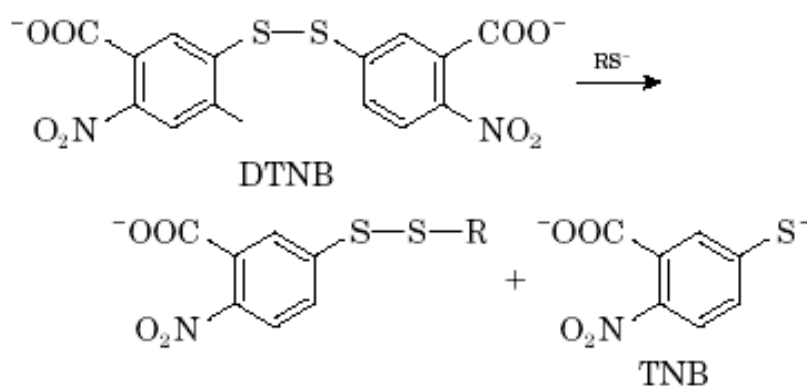


Figura 33. Fórmula química del reactivo de Ellman.

La medida de actividad se realiza durante 7 minutos a 412 nm en un tampón de medida: 60 mM TRIS-HCl (pH 8), 2.125 mM EDTA, 1.7 mM DTNB, 0,17% TRITÓN X-100, 0.5 mM L-Carnitina, muestra (20 μ l; dilución 1:5). Después de incubar 5 minutos a 37°C el tampón de medida con la muestra, se añaden los sustratos: y 0.5 mM Palmitoil-CoA (excepto en los controles).

La actividad enzimática se define como nmol CoA-SH liberado/min/mg proteína.

➤ Determinación radioenzimática de los niveles de malonil-CoA

Los niveles de malonil-Coa se determinan mediante una modificación del método radioenzimático de *McGarry*, basado en la incorporación de acetyl-CoA marcado a la molécula de palmitato, en una reacción catalizada por la ácido graso sintasa, en presencia de NADPH y dependiente de malonil-CoA. (436;437) (Realizado por el *Dr. Asish K. Saha* .Diabetes Research Unit, EBRC-827, Boston Medical Center, Boston, MA, USA)



➤ Ensayo kinasa de AMPK α_1 Y AMPK α_2

Los extractos de proteína hipotalámica (50 μ g para AMPK α_1 y 250 μ g para AMPK α_2) se incuban en agitación a 4°C durante una hora con el anticuerpo correspondiente (2.5 μ g para AMPK α_1 y 5 μ g para AMPK α_2), que se conjugan previamente a 5 μ l de proteína G-Sepharosa (438). La parte innumoprecipitada se lava dos veces con 1 ml de solución NaCl 0.5M y dos veces con 1 ml de una solución que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EGTA 0.1 mM y 0.1% de β -mercaptoetanol. Para medir la actividad de AMPK se mide la actividad fosfotransferasa usando como sustrato el péptido AMARA (AMARAASAAALARRR; sintetizado por *Dr. Graham B. Bloomberg*, University of Bristol; UK). Es decir, se determina la cantidad de fósforo marcado radiactivamente incorporado al péptido AMARA como consecuencia de la fosforilación debida a la actividad de AMPK (438;439).

La mezcla final está formada por el precipitado de la proteína con anticuerpo, que se lleva un volumen final de 50 μ l con una solución 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 10 mM magnesium acetate, 0.1 mM [γ - 32 P] ATP (~200 cpm/pmol) (Amersham Biosciences; Little Chalfont, UK) a la que se le añade el péptido AMARA en una concentración 200 μ M. La reacción se lleva a cabo a 30°C durante 30 minutos en agitación continua para asegurar de que la proteína inmunoprecipitada esté en todo momento en suspensión. Para la determinación de la actividad se necesitan 40 μ l de la mezcla final, que son absorbidos en papel p81 (Whatman; Maidstone, UK). Estos papeles se lavan con H₃PO₄ y se mide la radiactividad en un contador Beta. La actividad kinasa se define como nmol 32 P incorporados/min/mg proteína (438;439).

-LIPIDÓMICA

Los extractos de lípidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Q-ToF (*Waters*; Milford, MA, USA) combinado con un Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC/MS; Chicago, IL, USA). El perfil lipídico se lleva a cabo usando un modo de ion positivo. Los resultados obtenidos se convierten en formato netCDF usando *Dbridge Software* (MASSLYNX. *Waters*; Milford, MA, USA). Los datos convertidos se procesan usando el programa informático *MZmine Software* version 0.60 58-60 (440-442). Los lípidos se identificaron basándose en su tiempo de retención (RT) y el ratio masa/carga (MZ) a partir de una base de datos ya creada.

(Realizado por el Dr. Matej Orešic. VTT Technical Research Centre of Finland, Tietotie 2, Espoo, FIN-02044, Finland)

-INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio inmunohistoquímico, el cerebro de la rata se fija mediante perfusión intracardiaca tal y como se detalló anteriormente. Una vez fijados los tejidos del animal, se extrae el cerebro y se mantiene inmerso en la misma solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1M durante 1 hora.

Las secciones se realizan en un vibrotomo (*Vibratome® Series 1000*) en secciones de 50 µm de espesor. Las secciones se recogen en buffer fosfato.

- Co-localización de pAMPK y TR

a) Incubación en anticuerpo primario monoconal rabbit anti pAMPK (*Cell Signalling*) a una dilución 1:100 en diluyente de anticuerpos (*Dakopatts, Glostrup; Denmark*) toda la noche a temperatura ambiente.

b) Incubación en anticuerpo Anti-conejo Fab₂ (Sigma) marcado con cianina 3 a una dilución de 1:100 en PBS (tampón fosfato 0,1M salino -0,065M NaCl- pH7,4), 1h. Las secciones se protegen de la exposición a la luz a partir de este paso para evitar la pérdida de la fluorescencia.

c) Incubación con goat anti TR (*Abcam*) 1:50 toda la noche temperatura ambiente

d) Incubación con Anti-cabra Fab₂ (*Molecular Probes*) conjugado con Alexa 488 a una dilución de 1:100 en PBS, 1h

Entre cada uno de los pasos se realizan 2 lavados de 10 min cada uno con PBS

Las secciones se extienden en portas xilanizados protegiéndolos de la luz durante el secado. El montaje se efectúa en medio acuoso con Dapi (Vectastain) lavando previamente los portas en agua destilada.

Como controles negativos se realizan: 1) omisión de alguno de los pasos de la técnica; 2) incubación con suero no inmune (suero normal de conejo) a la misma

concentración que el anticuerpo primario; 3) pre-absorción del anticuerpo primario con el péptido control (*Cell Signalling*) a una concentración 1-10 nmoles/mL.

La reacción fue observada y fotografiada bajo un microscopio de fluorescencia Provis AX70 (Olympus Corp., Tokyo, Japan)

- Detección inmunohistoquímica de la expresión de c-FOS
 - a) Incubación en anticuerpo primario c-FOS (*Santa Cruz*) en dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C
 - b) H₂O₂ 3% en agua destilada (para inhibir la peroxidasa endógena) 10 min
 - c) Como sistema de detección se utilizó *EnVision policlonal* (polímero de dextrano conjugado con anticuerpos anti-conejo y con peroxidasa; *Dako*) 30 min.
 - d) DAB (*Dako*) 10 min, preparada siguiendo el protocolo del fabricante (1 gota de DAB en 1 mL del disolvente suministrado).

Entre cada uno de los pasos se realizan 2 lavados de 10 min cada uno.

Al finalizar la reacción las secciones se extienden en portas xilanizados (*Histobond*) dejándolos secar y posteriormente se deshidratan (etanol), se aclaran (xilol) y se montan con un medio de montaje permanente.

La reacción fue observada y fotografiada bajo un microscopio de fluorescencia *Provis AX70* (*Olympus Corp.*; Tokyo, Japan). Además, se cuantifica la inmuno-reactividad de c-FOS en DMN. El número de células teñidas en cada sección se usa como número representativo de células con inmunoreactividad positiva de c-FOS.

-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). Los test estadísticos empleados han sido t-student o ANOVA y *post-hoc* Bonferroni siendo considerado como significativo $P < 0.05$. El programa informático empleado para el análisis estadístico fue el *Instat 3*.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO

Efecto del hipotiroidismo y del hipertiroidismo sobre la composición corporal y los niveles plasmáticos de distintas hormonas

Con el fin de comprobar que la administración de T4 y AMT durante 21 días inducían hipertiroidismo y hipotiroidismo respectivamente, se llevaron a cabo medidas de diferentes hormonas y de otros parámetros que se modifican con el estado tiroideo (tabla 9).

Tabla 9. Parámetros corporales y plasmáticos, y niveles hipotalámicos de TRH en ratas tratadas con vehículo, T4 y AMT.

	Vehículo	T4	AMT
Tamaño corporal (cm, sin cola)	44.44±0.18	44.25±0.25	42.63±0.46**
Tamaño corporal (cm, con cola)	24.78±0.22	24.50±0.29	23.75±0.25**
Masa grasa (g)	34.99±2.06	17.25±1.90 ***	-
Masa no-grasa (g)	314.61 ±5.84	295.83±5.29**	-
Agua libre (g)	1.32±0.09	1.19±0.08	-
Temperatura (°C)	34.60±0.09	35.43±0.13***	-
TSH (ng/ml)	3.47±0.20	0.42 ± 0.08***	27.17±1.71***
T4 (nmol/l)	80.20±7.16	321.64±33.42***	25.0±7.67***
T3 (nmol/l)	3.17±0.23	5.10±0.64***	1.28±0.19***
Glucosa(mmol/l)	7.36±0.15	7.38±0.35	6.12±0.23*
Insulina (ng/ml)	2.11±0.34	2.48±0.41	1.50±0.55
Leptina(ng/ml)	3.89±0.46	1.65±0.42***	3.40±1.05
TRH PVH (% vehículo)	100.00±9.29	48.15±4.51***	189.68±14.45***

* P<0.0 1, **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. vehículo.

Los niveles plasmáticos de TSH, T4 y T3 en los distintos modelos demostraron que los tratamientos de inducción del estado tiroideo habían ejercido el efecto esperado; en ratas hipertiroideas las concentraciones T4 y T3 en plasma eran mayores que en un animal eutiroideo, mientras que los niveles de TSH disminuyeron como consecuencia del mecanismo de retro-alimentación negativo que rige la síntesis y liberación de THs; durante el hipotiroidismo se produjeron efectos contrarios en estos parámetros (134;324;325).

Efecto del hipertiroidismo sobre la regulación de la ingesta y la masa corporal

Como se puede observar, durante la administración crónica de T4 la ganancia de masa corporal disminuyó respecto a la de las ratas vehículo; esta disminución iba acompañada, además, de un elevado incremento en la ingesta diaria, presentando así las ratas tratadas con T4 un fenotipo delgado e hiperfágico (figura 34). Los datos de la evolución de la masa corporal se apoyaron en medidas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en las que se demostró que tanto la masa grasa como la magra eran menores durante el hipertiroidismo (tabla 9). Estudiando los distintos depósitos se comprobó que el hipertiroidismo inducía la disminución de la cantidad de grasa en los depósitos de WAT, mientras que el depósito de BAT era significativamente mayor que en ratas eutiroideas (figura 35).

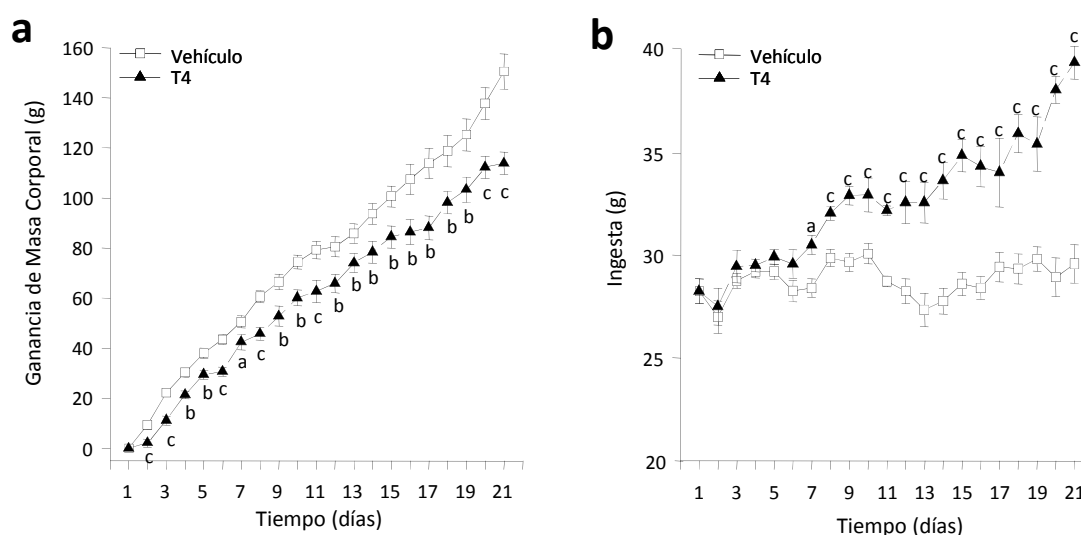


Figura 34. Evolución de la a) masa corporal y b) la ingesta durante el tratamiento de 21 días con T4. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$ vs. vehículo.

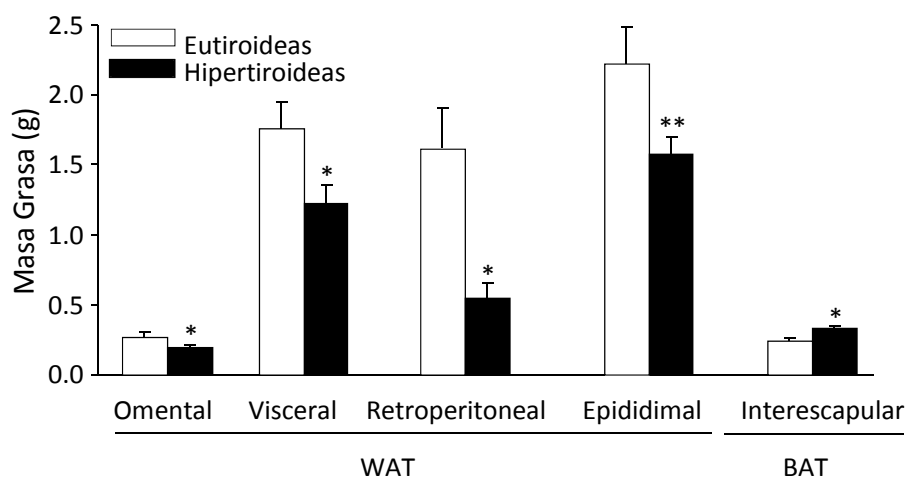


Figura 35. Masas de los distintos depósitos de grasa de ratas eutiroides e hipertiroides. *: $P<0.05$ y **: $P<0.01$ vs. eutiroides.

Efecto del hipertiroidismo sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico

Con el fin de determinar a qué se debía la marcada hiperfagia que muestran las ratas hipertiroides, se llevó a cabo el análisis de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos más importantes en diferentes núcleos hipotalámicos (figura 36).

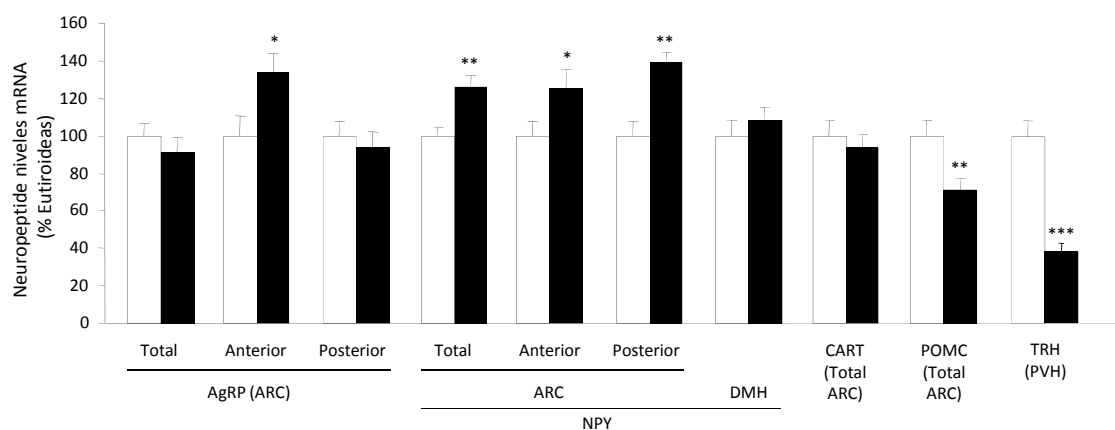


FIGURA 36. Niveles de mRNA de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en distintos núcleos hipotalámicos de ratas eutiroides y hipertiroides. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ y ***: $P<0.001$ vs. eutiroides.

La expresión de los neuropéptidos demostró que la hiperfagia del modelo hipertiroides está asociada a cambios en su expresión. Así, se pudo observar claramente como NPY, neuropéptido orexigénico, tiene incrementada su expresión de mRNA en el ARC, tanto en la zona anterior como en la posterior, variación que no se observó en el DMH. Otro neuropéptido orexigénico como es AgRP también mostró un incremento en la expresión en el ARC, pero en este caso únicamente se observó esta variación en la

parte anterior del ARC. En cambio, la expresión del prepro-neuropéptido anorexigénico, POMC estaba disminuida en el ARC de ratas hipertiroideas.

Efectos del hipertiroidismo sobre la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos

El hecho de que las ratas hipertiroideas aun siendo hiperfágicas muestren fenotipo delgado, lleva a pensar que presentan un gasto metabólico elevado que hace que disipen mayor cantidad de energía en forma de calor. Para comprobar esta hipótesis se realizó el estudio de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en los tejidos más importantes para esta función (figura 37).

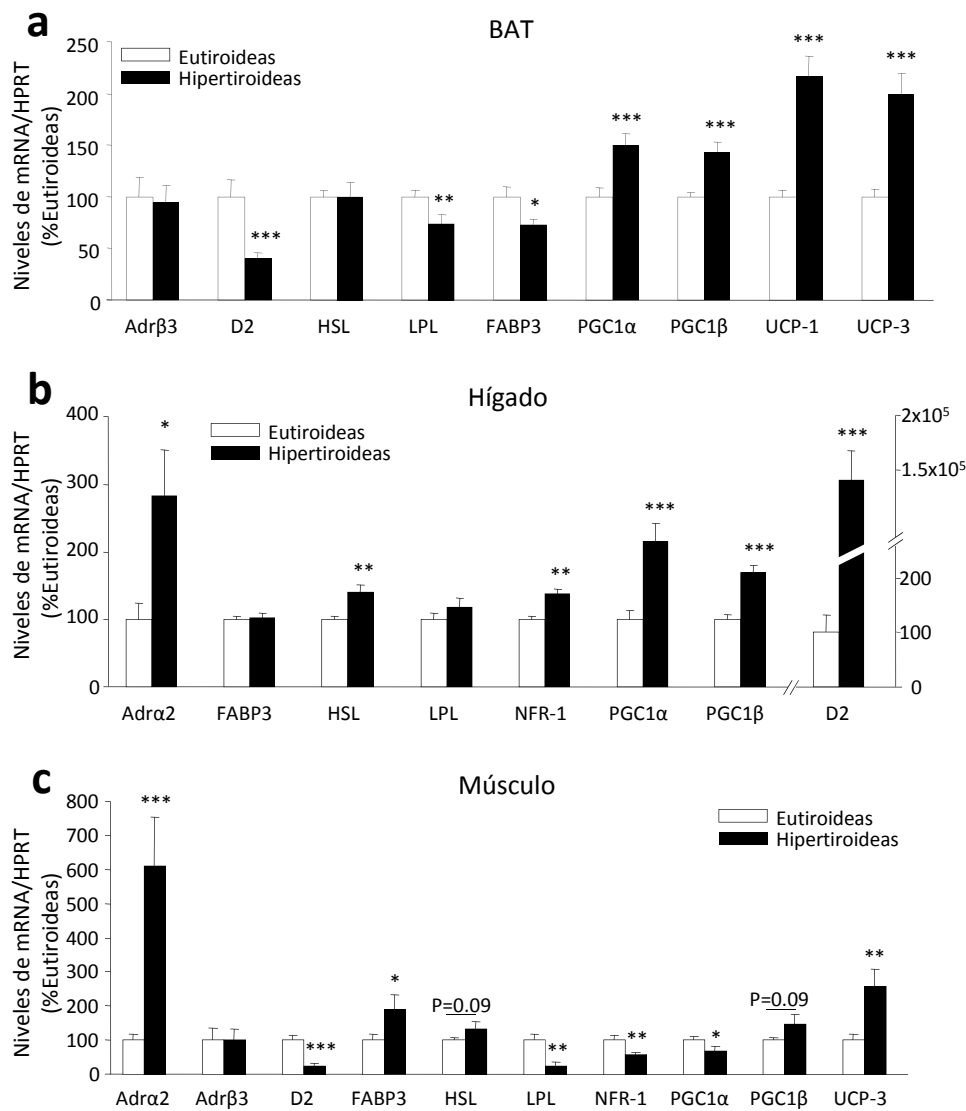


FIGURA 37. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos. a) BAT, b) hígado y c) músculo. *: P<0.05, **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. eutiroides.

De un modo general, se puede ver que en estos tejidos el programa termogénico estaba fuertemente incrementado. La mayoría de los genes implicados de modo más directo en la función termogénica; es decir, UCPs y PGC-1s, tenían una expresión de mRNA elevada en tejidos periféricos. Individualmente, el BAT, el tejido fundamental en la termogénesis mostraba incrementos significativos en UCP-1, UCP-3, PGC-1 α y PGC-1 β , que indicaba que se estaba disipando una gran cantidad de energía. En músculo se observó el incremento de la isoforma específica de UCP, la UCP-3. En el hígado también se observó de modo claro como la termogénesis estaba incrementada. Estos datos podrían explicar el porqué aun siendo hiperfágicas las ratas hipertiroides son delgadas. Esto se debe a que su gasto es muy superior al de las ratas eutiroides y todos los lípidos ingeridos por la dieta y sintetizados se usan como sustrato en la termogénesis adaptativa.

Estudio de la vía de señalización de AMPK durante el hipertiroidismo a nivel central y periférico

Mediante el uso de la técnica de Western Blot se procedió al estudio de la vía de señalización de AMPK en el hipotálamo (figura 38). Como se puede comprobar, la activación de AMPK disminuyó, lo que indica que durante el hipertiroidismo en el hipotálamo está incrementada la síntesis de ácidos grasos. La disminución en los niveles de pAMPK α se correlacionó con los menores niveles de proteína de tAMPK α , que a su vez parecía ser debido únicamente a la disminución de la expresión de la isoforma AMPK α 1. La inactivación de AMPK correlacionaba con unos menores niveles de pACC y una mayor expresión de FAS.

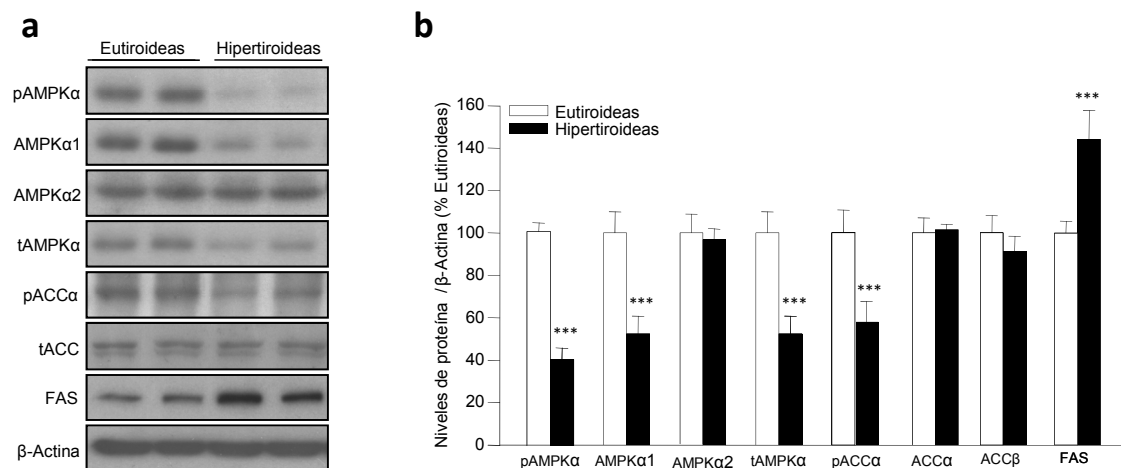


Figura 38. Efectos del tratamiento crónico con T4 durante 21 días en los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) imágenes autorradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. ***: P<0.001 vs. eutiroides.

Como ya se ha explicado anteriormente, FAS es un enzima que está regulado a nivel transcripcional (263). Tras ver el dato del aumento de los niveles proteicos de FAS, se realizaron mediante hibridación *in situ* estudios de la expresión de mRNA en distintos núcleos hipotalámicos; como se puede observar en la figura 39 la expresión de FAS estaba incrementada en todos los núcleos estudiados.

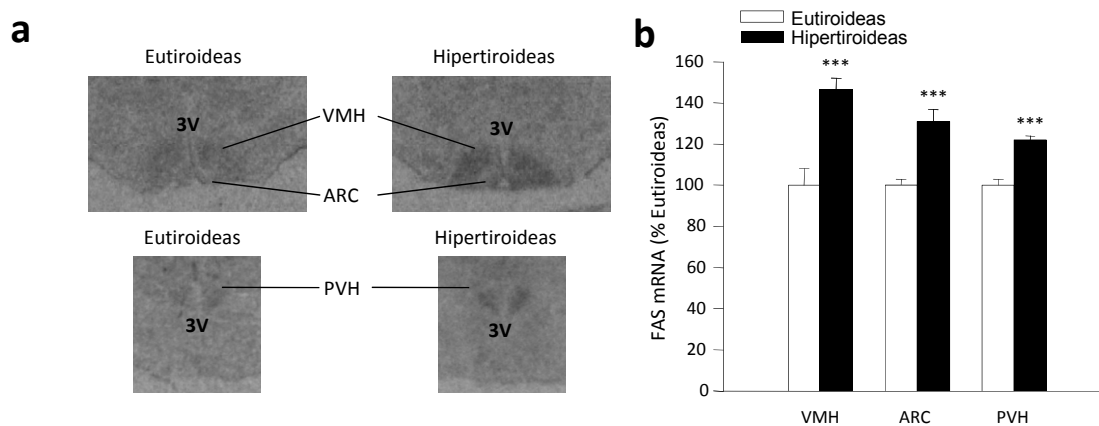


Figura 39. Efecto del tratamiento crónico con T4 durante 21 días en los niveles de mRNA de FAS en distintos núcleos hipotalámicos. a) imágenes autorradiográficas de hibridación *in situ*. b) cuantificación de los niveles de mRNA. ***: P<0.001 vs. eutiroides.

Hasta el momento todas las evidencias, tanto por medidas de proteína como mRNA indicaban que la vía lipogénica estaba aumentada tras el tratamiento crónico de T4, es decir, en el hipotálamo de las ratas hipertiroideas predomina la síntesis de lípidos frente a su oxidación. Además de estos datos, se han llevado a cabo diferentes medidas

de actividades enzimáticas y concentración de malonil-CoA (figura 40) que confirman con los ya obtenidos de proteína y mRNA.

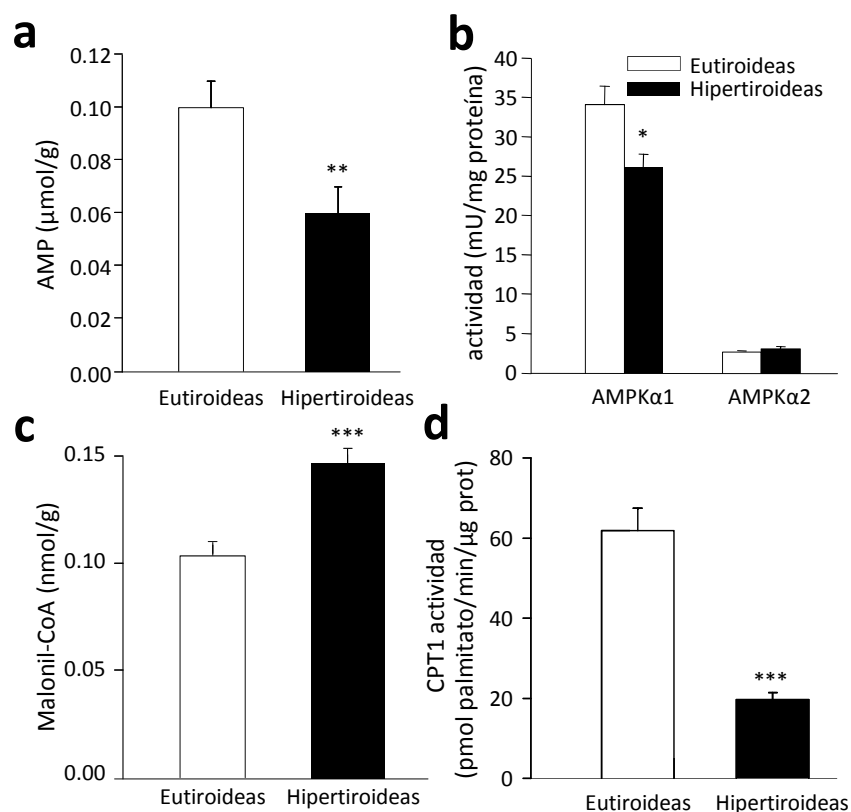


Figura 40. a) Concentración de AMP, b) actividad de AMPK α 1 y AMPK α 2, c) concentración de malonil-CoA y d) actividad de CPT-1 en hipotálamos de ratas eutiroides e hipertiroideas. *: $p < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides.

Como cabía de esperar tras ver los niveles de proteína de pAMPK α , la concentración de AMP detectada en los hipotálamos de las ratas hipertiroideas era mucho menor que en los de las eutiroides. Como se ha descrito previamente, la variación de AMPK se debe, entre otras causas, a alteraciones en el ratio AMP:ATP (55;241-246): la disminución de la concentración de AMP lleva a una caída en este ratio y por tanto a la disminución de pAMPK. Por otra parte, la medida de las actividades kinasa de AMPK α 1 y AMPK α 2 confirmó el dato obtenido mediante Western Blot, la isoforma regulada en hipertiroidismo era la AMPK α 1. Finalmente, para acabar el análisis de la vía de síntesis de lípidos en el hipotálamo de ratas hipertiroideas, se llevaron a cabo medidas de concentración de malonil-CoA y de actividad enzimática de CPT-1. El aumento detectado en la concentración de malonil-CoA en el hipertiroidismo concordaba con los datos de proteína (figura 38); es decir, todas las evidencias

indicaban que la síntesis de lípidos estaba sobre-regulada en ratas hipertiroideas. Como se ha explicado previamente, el malonil-CoA es un inhibidor alostérico de la actividad enzimática de CPT-1. En este caso, se puede observar como el incremento de malonil-CoA iba acompañado con la disminución de la actividad de CPT-1, lo que sugería que la entrada de los LCFA-CoAs en la mitocondria para su posterior oxidación estaba inhibida y consecuentemente, la β -oxidación.

Con el fin de aclarar si el incremento visto en la concentración hipotalámica de malonil-CoA era inherente al estado tiroideo del animal o consecuencia del estatus energético, se analizaron los niveles de malonil-CoA en ratas, tanto eutiroideas como hipertiroideas, después de haberlas sometido a un periodo de restricción alimentaria del 30% (figura 41). Mientras que en ratas eutiroideas la restricción causaba la disminución de la concentración de malonil-CoA, en ratas hipertiroideas los niveles de dicho metabolito permanecían inalterados. De los resultados obtenidos se podía concluir que el incremento de la concentración de malonil-CoA era debido a la alteración del estado tiroideo del animal.

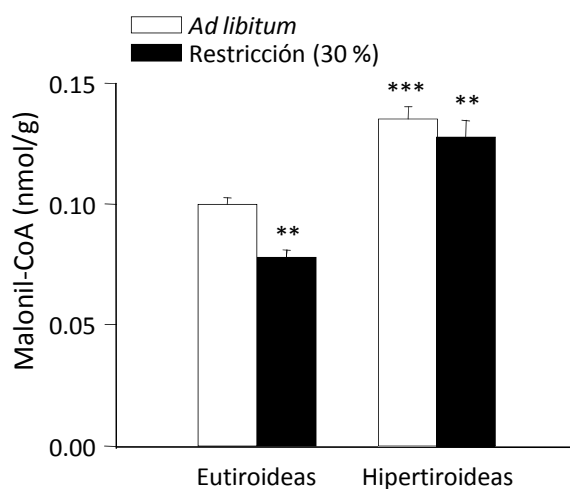


FIGURA 41. Concentración de malonil-CoA en el hipotálamo de ratas eutiroideas e hipertiroideas tras un periodo de restricción alimentaria del 30%. **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. eutiroideas *ad libitum*.

A continuación, con el fin de estudiar si los cambios observados eran específicos del hipotálamo, se analizó la vía de AMPK en otras regiones del SNC: en áreas como el córtex la vía permanecía inalterada en ratas hipertiroideas (figura 42a), mostrando que los efectos de las THs a nivel central se producían únicamente en el hipotálamo.

Los efectos del hipertiroidismo no son visibles únicamente a nivel central. Se ha visto que en tejidos periféricos la ruta de síntesis de ácidos grasos varía de forma específica. Así por ejemplo, en el hígado la vía estaba modulada de igual forma que en hipotálamo (figura 42b); es decir, el hipertiroidismo estimulaba la síntesis *de novo* de lípidos en hígado. En cambio, en tejidos como el músculo y el WAT la síntesis de ácidos grasos estaba inhibida (figura 42c/d), y el hipertiroidismo causaba incremento tanto en pAMPK como en pACC.

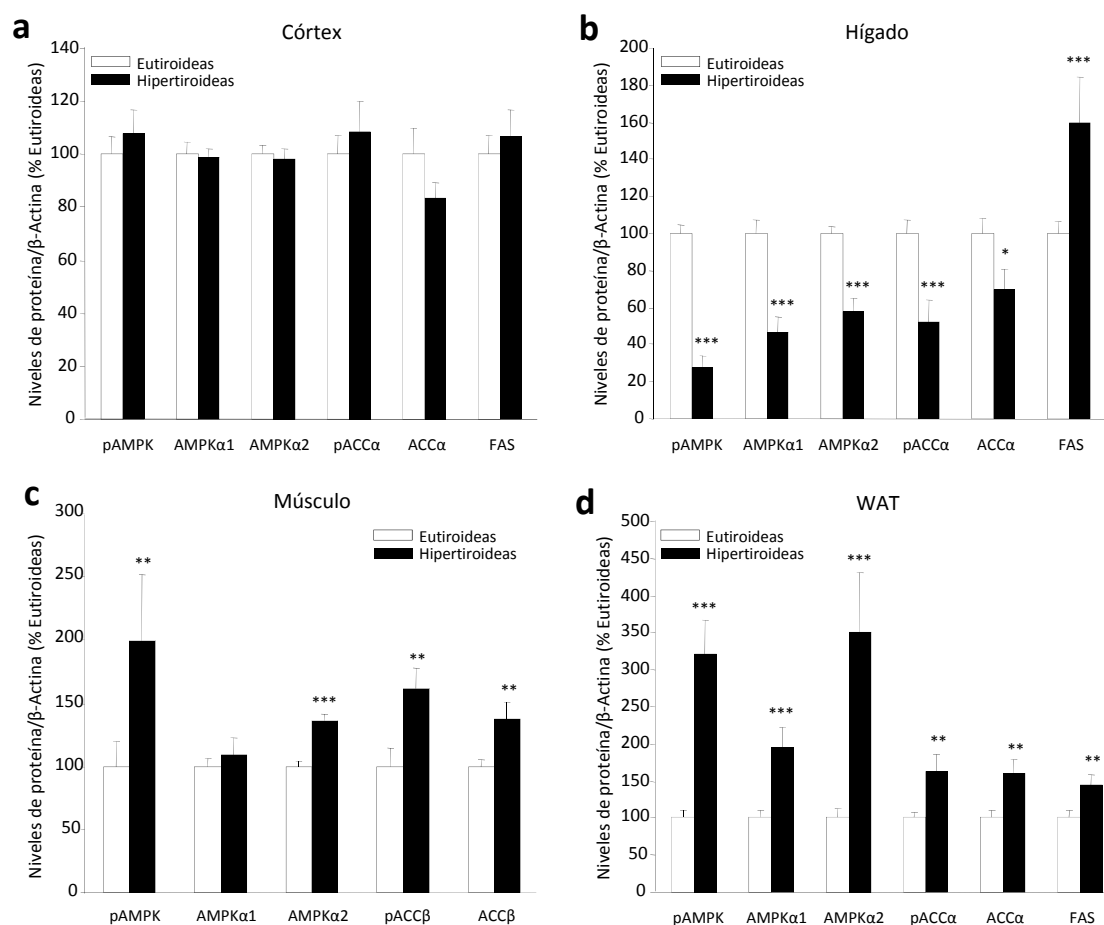


Figura 42. Efectos del tratamiento crónico con T4 durante 21 días en los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) córtex, b) hígado, c) músculo y d) WAT. *: $p < 0.05$, **: $P < 0.01$ y $P < 0.001$ vs. eutiroides.

Para comprobar si los efectos vistos hasta el momento sobre la regulación de la ingesta y de la masa corporal, así como sobre el metabolismo de lípidos eran debidos a la inducción del estado hipertiroideo y no a otros efectos de las THs, se realizó un tratamiento con una TH biológicamente inactiva, la T2. Los resultados obtenidos tras este experimento (figura 43), en el que no se observaba cambio alguno en ingesta, masa

corporal ni síntesis de ácidos grasos demostraron que los datos obtenidos previamente se debían únicamente a la aparición del hipertiroidismo.

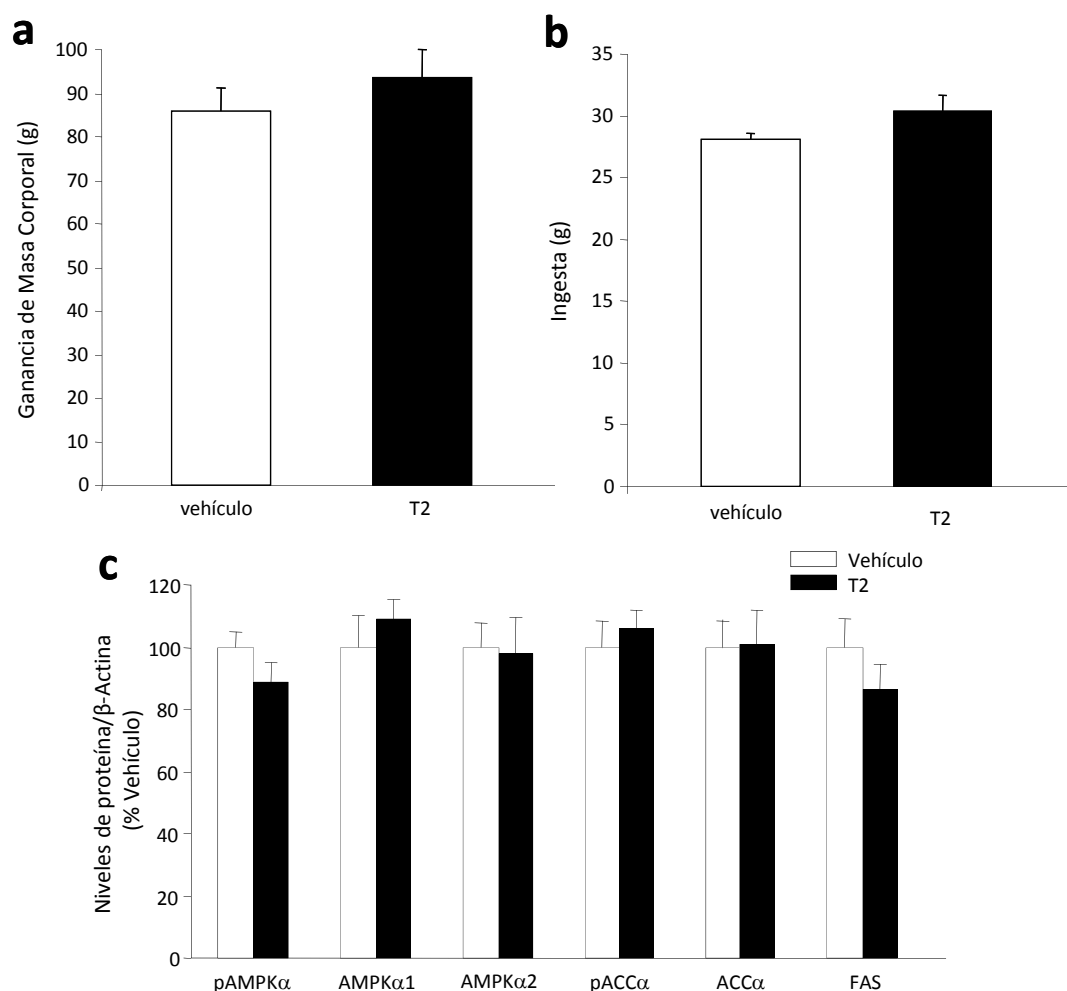


Figura 43. a) Ganancia de masa corporal, b) ingesta diaria y c) niveles de proteína de la vía de síntesis ácidos grasos tras el tratamiento crónico de 21 días con T2.

Efecto del hipotiroidismo sobre la regulación de la ingesta y la masa corporal

Al igual que durante el hipertiroidismo, se estudiaron los cambios que ocurren en el estado hipotiroideo.

Durante la inducción del hipotiroidismo se observó que las ratas presentaban una menor ganancia de masa corporal respecto a las ratas eutiroides, y que además su ingesta era significativamente inferior (figura 44). A pesar de que el hipotiroidismo debería inducir un fenotipo obeso (443), el tratamiento con AMT dió lugar a la aparición de una pérdida de masa.

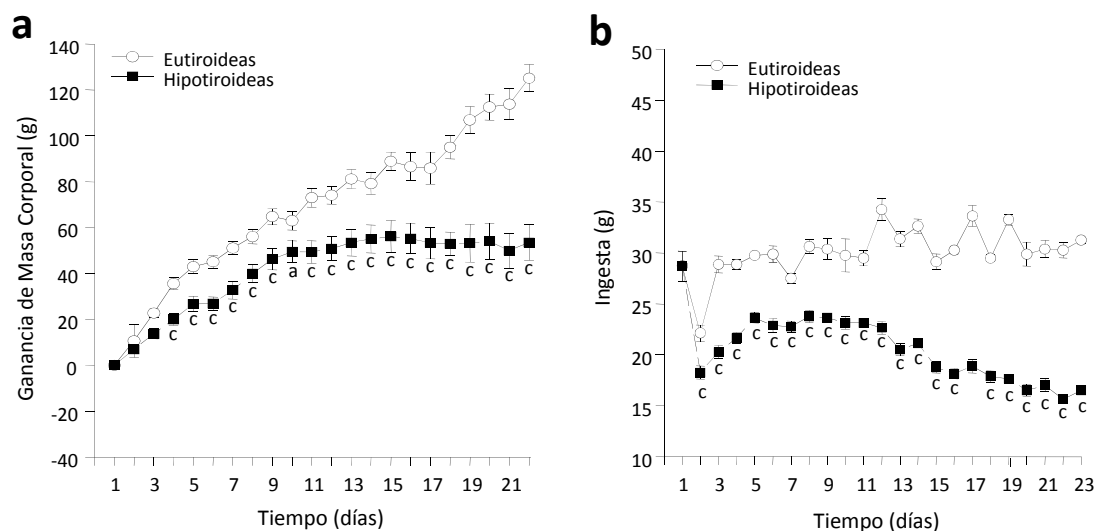


Figura 44. Evolución de a) masa corporal y b) ingesta durante el tratamiento de 21 días con AMT. a: $P < 0.05$, c: $P < 0.001$ vs. vehículo.

Efecto del hipotiroidismo sobre la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos a nivel hipotalámico

Con el fin de determinar a qué se debía la marcada hipofagia que presentan las ratas hipotiroides se estudió la expresión de distintos neuropéptidos hipotalámicos (figura 45).

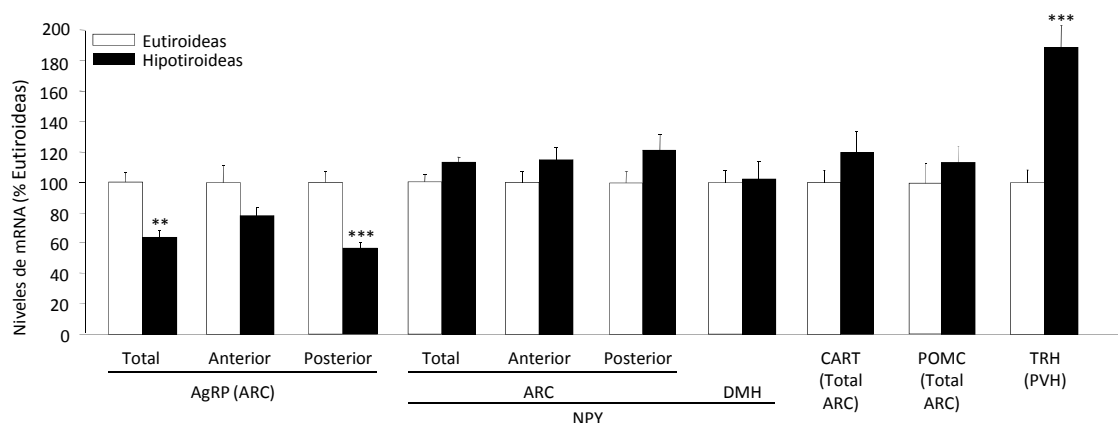


FIGURA 45. Niveles de mRNA de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en distintos núcleos hipotalámicos de ratas eutiroides y hipotiroides. **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides.

Los resultados obtenidos mostraron que únicamente se observaba una disminución en el ARC de los niveles de expresión de AgRP y que esta disminución se

debía en gran parte a su caída en la zona posterior. Así, la hipofagia de las ratas hipotiroideas podría asociarse con este descenso en la expresión de AgRP. El resto de los neuropéptidos analizados no presentaron cambios en ninguno de los núcleos estudiados.

Efectos del hipotiroidismo sobre la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos

Los resultados de la evolución de masa corporal en hipotiroidismo muestran una inesperada pérdida de masa. En un intento por explicar la aparición de este fenotipo se han estudiado los niveles de expresión de los genes implicados en termogénesis en BAT, hígado y músculo (figura 46).

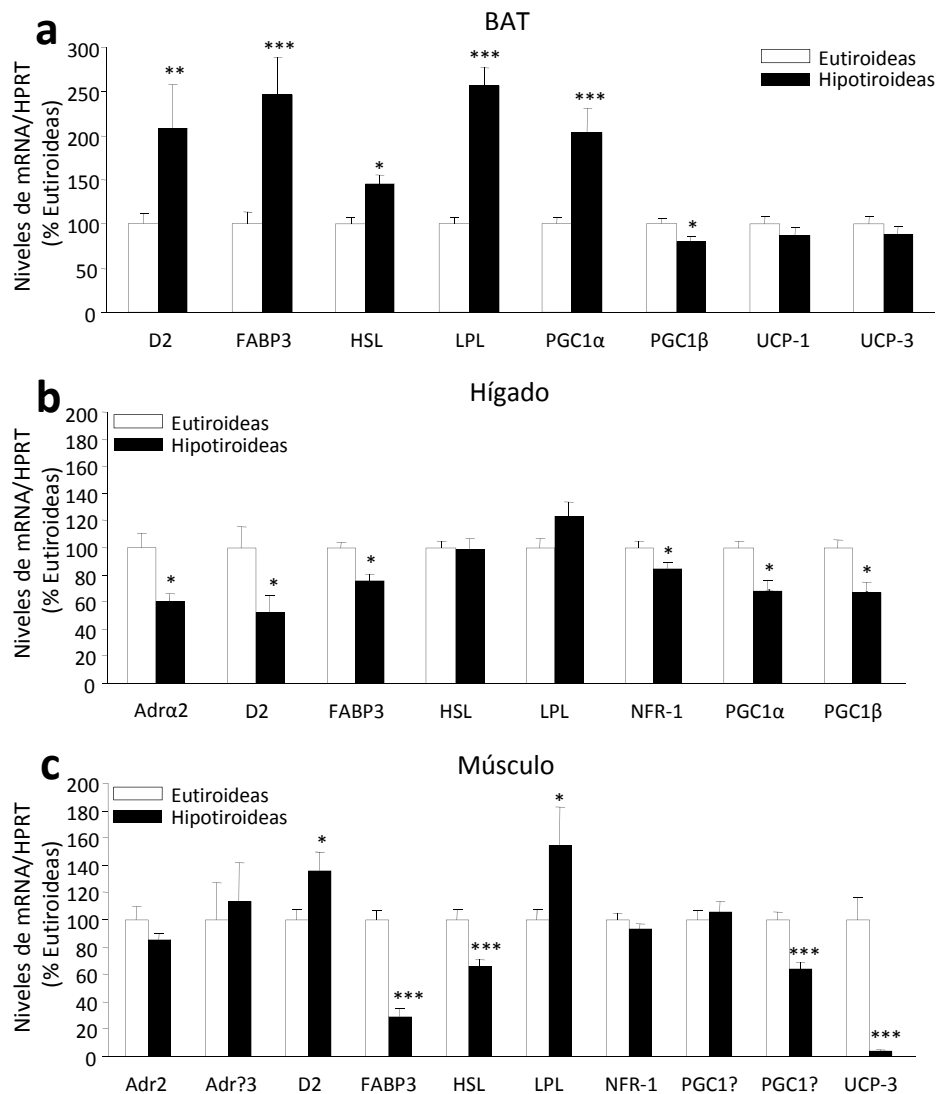


FIGURA 46. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos. a) BAT, b) hígado y c) músculo. *: P<0.05, **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. eutiroides.

Antes del análisis cabría esperar que la termogénesis en BAT estuviera disminuida; una situación opuesta a lo visto en el hipertiroidismo. Tras el estudio de los resultados se pudo observar que muchos de los genes presentaban incrementos significativos que no concordaban con lo esperado. En cambio, en hígado y en músculo se podía ver como la mayoría de los genes presentaban disminuida su expresión. Uno de los motivos por el cual se podría explicar la pérdida de masa y el incremento de termogénesis en el BAT podría ser la temperatura ambiente y la incapacidad que muestran los animales hipotiroideos en defender su temperatura corporal.

Estudio de la vía de síntesis de lípidos durante el hipotiroidismo a nivel central y periférico

Además de la caracterización de hipertiroidismo en cuanto a sus efectos sobre el metabolismo de lípidos, estudiamos los efectos que el hipotiroidismo causa sobre el metabolismo lipídico, a nivel central y periférico (figuras 47 y 48).

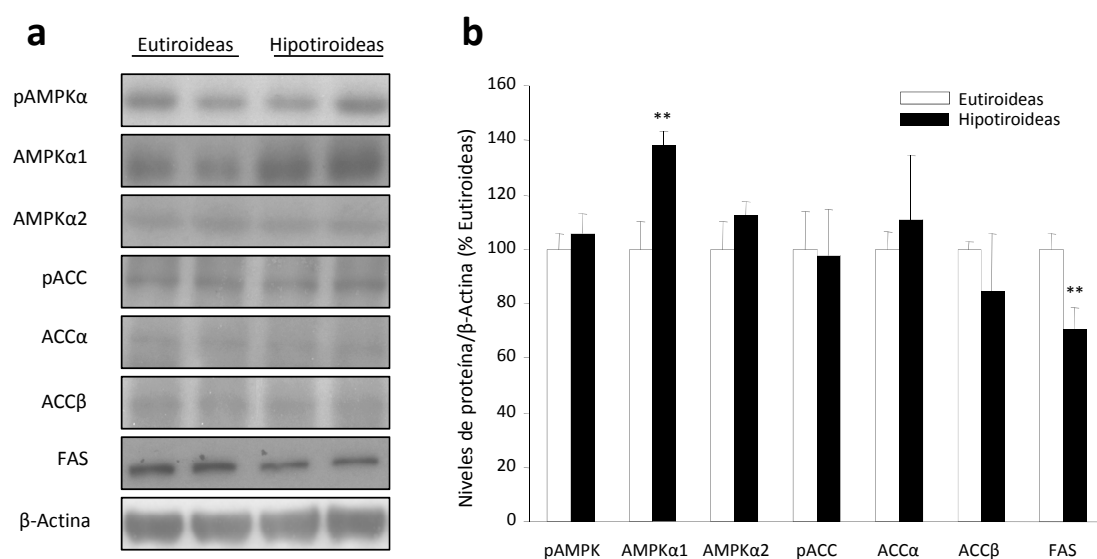


FIGURA 47. Efectos del hipotiroidismo sobre los niveles de proteína de la vía de AMPK en hipotálamo. a) imágenes autorradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. **: $P < 0.01$ vs. eutiroideas.

Nuestros datos mostraron que los efectos del hipotiroidismo sobre la biosíntesis de lípidos en el hipotálamo eran menores que durante el hipertiroidismo (figura 47). Las fosforilaciones de pAMPK y de pACC no se veían afectadas por el tratamiento con AMT. En cambio, sí se puede observar un incremento en la isoforma AMPKα1. Por otra

parte, es de destacar la disminución observada en FAS, que indica que se está limitando la conversión del parte del malonil-CoA a LCFA-CoAs.

Estudiando los efectos del estado hipotiroideo en tejidos periféricos se pudo ver que, a grandes rasgos, en el hígado produjo las mismas variaciones vistas en hipertiroidismo, excepto para los niveles de proteína de FAS, que en este caso, a pesar de que la ruta está incrementada (disminución en pAMPK y pACC), muestra una menor expresión que en ratas eutiroides (figura 48). Tanto en músculo como en WAT se comprobó que el hipotiroidismo afectaba de manera opuesta al metabolismo lipídico que el hipertiroidismo y que los enzimas implicados en la síntesis de lípidos se encontraban reducidos.

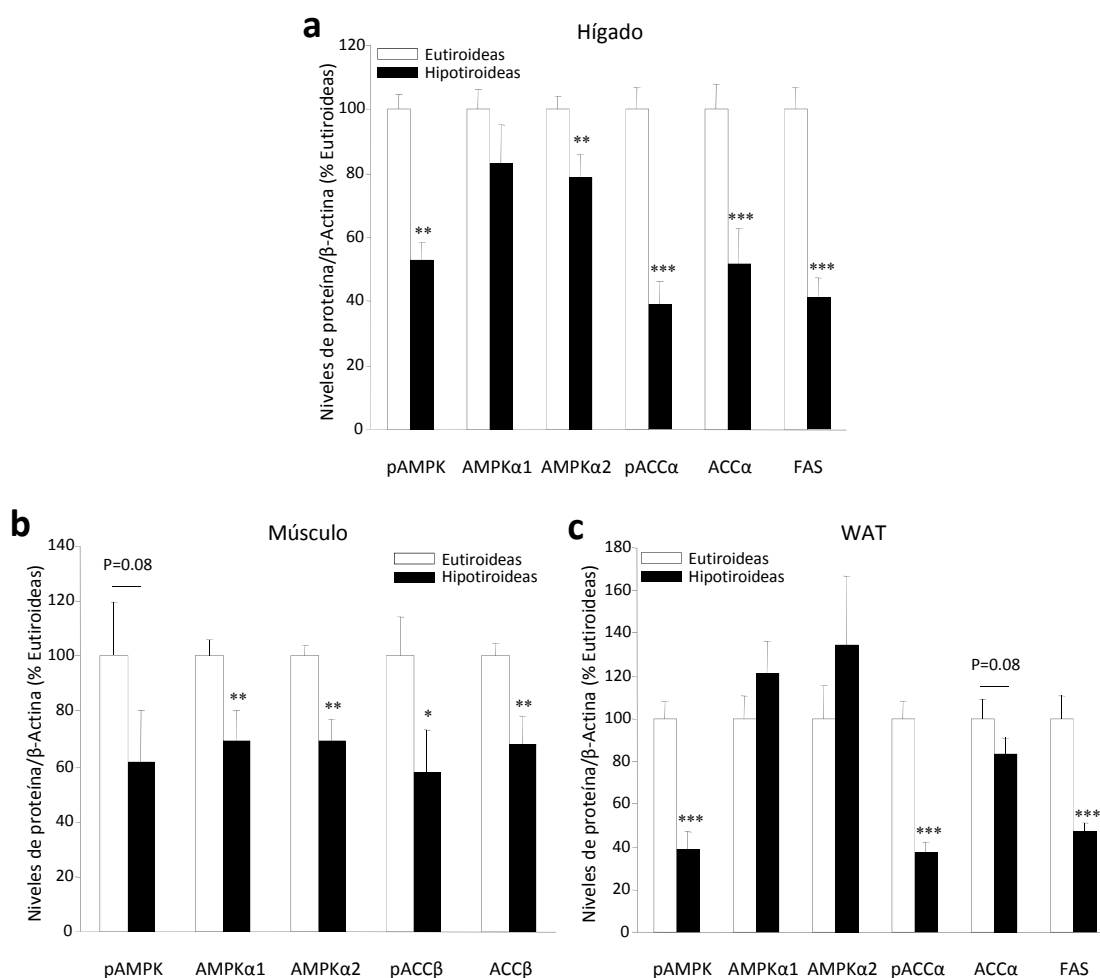


Figura 48. Efectos del tratamiento crónico con AMT durante 21 días en los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) hígado, b) músculo y c) WAT. *: $p < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides.

Estudio de la variación de las especies lipídicas complejas durante el hipertiroidismo

Vistos los resultados de metabolismo lipídico en el hipotálamo de ratas hipertiroides, el siguiente punto del trabajo fue investigar, mediante lipidómica, cómo variaban los lípidos complejos en el estado hipertiroides (figura 49).

Tras el análisis de los datos obtenidos por lipidómica, se pudo observar que en hipertiroidismo todas las especies lipídicas analizadas en hipotálamo estaban incrementadas. La única excepción a esto la constituyen las glicerofosfoetanolaminas, que no varían su concentración. Por otra parte, cabe destacar que al igual que lo que ocurre sobre los enzimas de metabolismo lipídico, los cambios vistos en hipotálamo no se presentaban en otras áreas cerebrales, como el córtex.

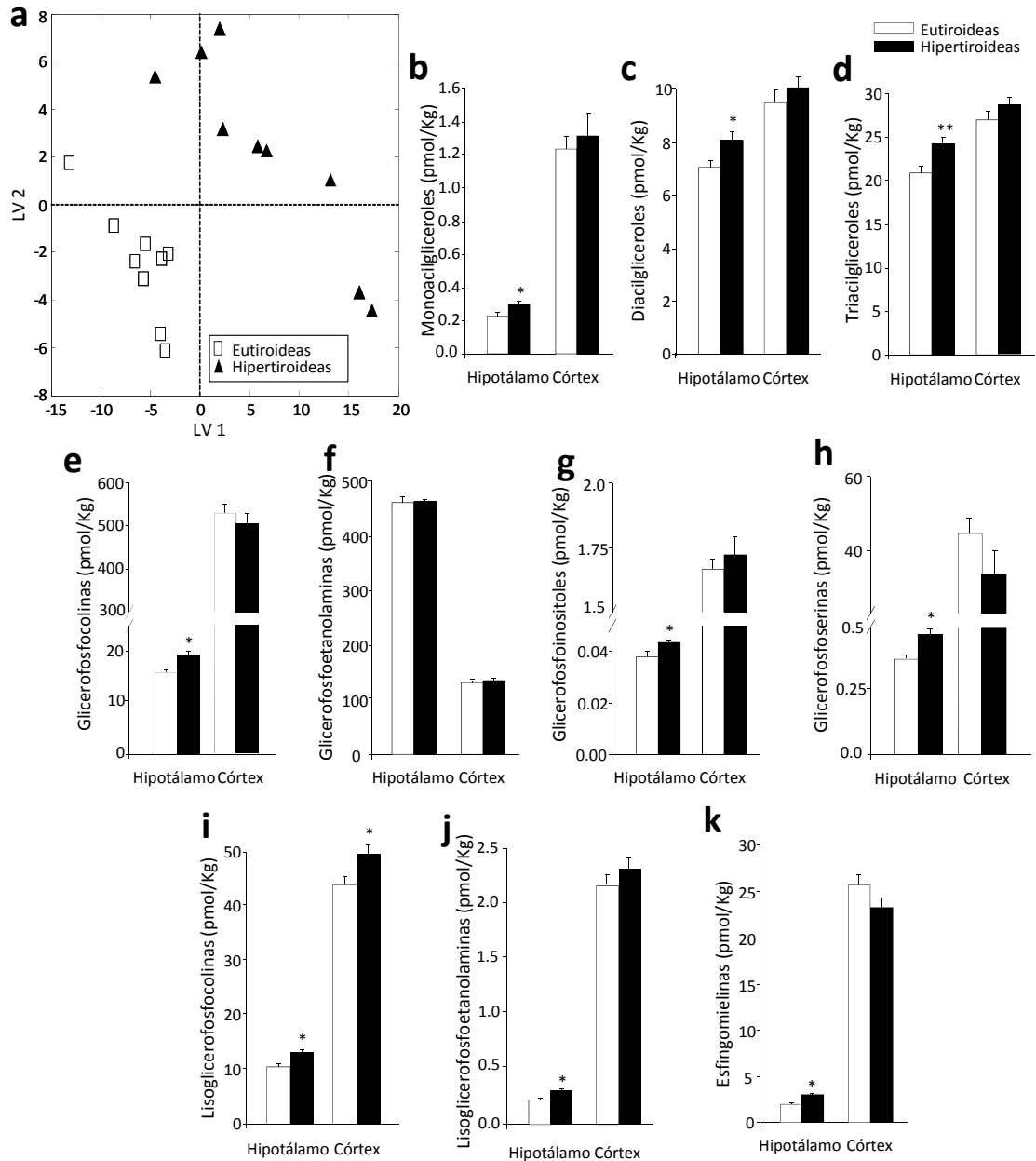


FIGURA 49. a) Análisis multivariado modelo PLS/DA (2 LVs, Q2=61%) en hipotálamo. Niveles en hipotálamo y en córtex de: b) monoacilgliceroles, c) diacilgliceroles, d) triacilgliceroles, e) glicerofosfolinas, f) glicerofosfoetanolaminas, g) glicerofosfoinositoles, h) glicerofososerinas, i) lisoglicerofosfolinas, j) lisoglicerofosfoetanolaminas y k) esfingomielinas. *: $p < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. eutiroides.

Además de los lípidos complejos, también se estudió la expresión de los enzimas que llevaban a cabo las síntesis de dichos complejos (figura 50).

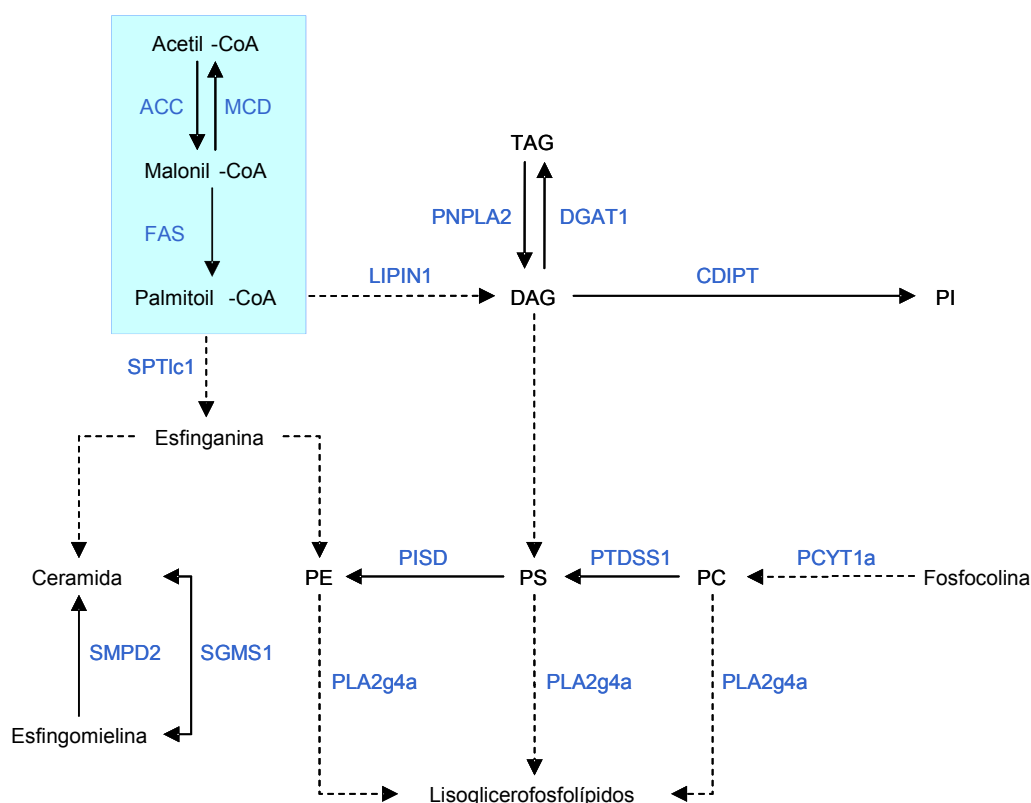


Figura 50. Vía de síntesis de Lípidos Complejos.

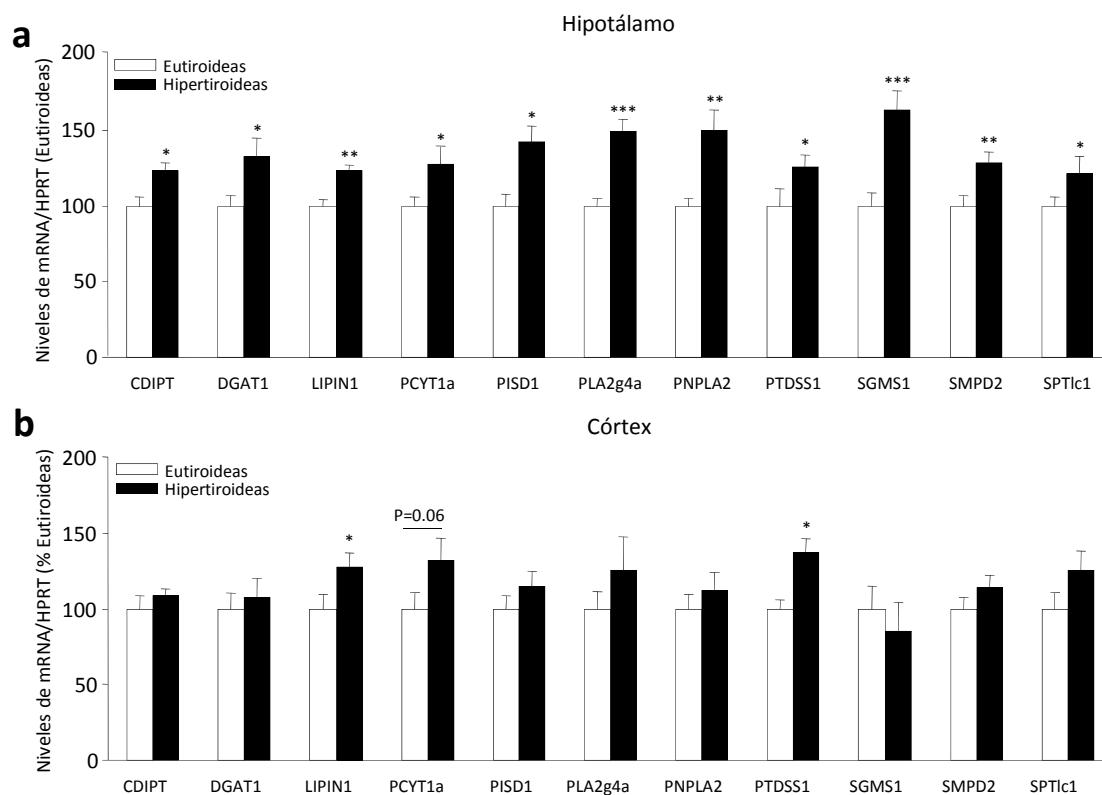


FIGURA 51. Efectos del hipertiroidismo sobre los niveles de mRNA de los genes de la vía de síntesis de lípidos complejos. a) hipotálamo y b) córtex. *: $p < 0.05$, **: $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs. eutiroides.

De los enzimas analizados todos presentaban incremento en hipotálamo de ratas hipertiroideas, mientras que únicamente dos de ellos (LIPIN1 y PTSS1) lo hacían en el córtex (figura 51). Todos estos datos junto con los obtenidos anteriormente, demuestran también que el hipertiroidismo activa las vías lipogénicas de modo selectivo en hipotálamo.

ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE HORMONAS TIROIDEAS

Efectos sobre masa corporal e ingesta de la administración central de T3

Dado que el estado hipertiroideo induce, además del incremento en THs, importantes cambios metabólicos que podrían influir en la vía lipogénica, el siguiente paso fue averiguar qué efectos directos tienen las THs administradas crónicamente de modo ICV.

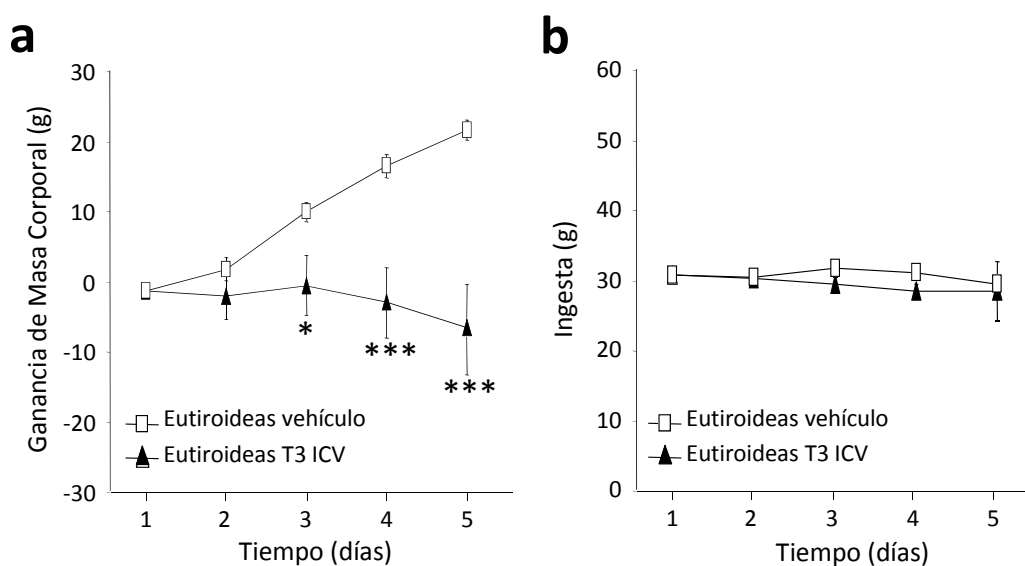


Figura 52. Evolución de la a) masa corporal y b) la ingesta durante el tratamiento con T3 ICV. *: $p < 0.05$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides vehículo.

Los datos obtenidos mostraron que la administración ICV de T3 causaba, al igual que el hipertiroidismo, una gran pérdida de masa sin afectar en cambio a la ingesta (figura 52). Además, para comprobar que los efectos observados no se debían a un incremento en la concentración circulante de hormonas tiroideas o a la difusión de T3

desde el CSF a la circulación periférica, se analizaron los niveles de T3 y T4 en plasma (figura 53).

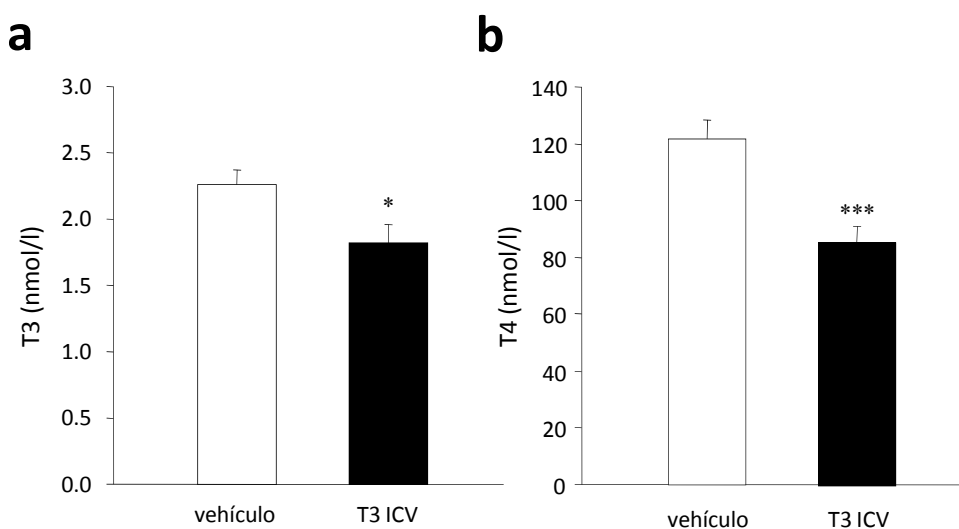


Figura 53. Niveles plasmáticos de a) T3 y b) T4 en ratas tratadas crónicamente con T3 ICV. *: $p < 0.05$ y ***: $P < 0.001$ vs. vehículo.

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de T3 ICV causaba una reducción en los niveles plasmáticos de T3 y T4. Debido a la alta concentración de T3 a nivel central, el eje HHT actúa a través de TRH reduciendo la síntesis y liberación de THs. Estos resultados demostraban que los efectos de la T3 sobre la pérdida de masa se debían a su acción central y no a una acción periférica tras su difusión al plasma.

Efecto de la administración central de T3 sobre el metabolismo lipídico

Visto que los cambios en metabolismo lipídico a nivel central en hipertiroidismo eran exclusivos de hipotálamo, se llevó a cabo el análisis de los niveles de proteína de los enzimas implicados en la síntesis de lípidos tras la administración crónica de T3 ICV en hipotálamo (figura 54).

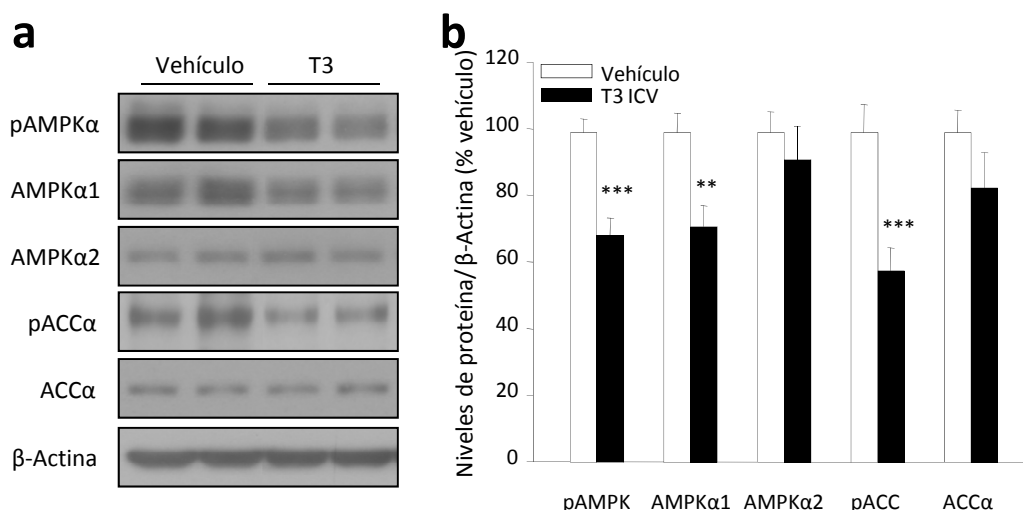


Figura 54. Efectos del tratamiento con T3 ICV durante 4 días en los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) imágenes autoradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. **: $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs. vehículo.

Los datos obtenidos indican que la lipogénesis *de novo* estaba incrementada tras el tratamiento con T3 ICV, del mismo modo que ocurría en hipertiroidismo. La fosforilación de AMPK y ACC estaba disminuida, al igual que el nivel AMPKα1, mientras que AMPKα2 y ACCα no mostraba ninguna variación tras el tratamiento con T3.

Efecto de la administración central de T3 sobre la termogénesis adaptativa

Viendo que el tratamiento con T3 ICV provocaba los mismos efectos sobre metabolismo lipídico que el hipertiroidismo, y que además llevaba asociado pérdida de masa, se estudiaron los genes involucrados en termogénesis (figura 55), en un intento por explicar esta disminución de la masa corporal.

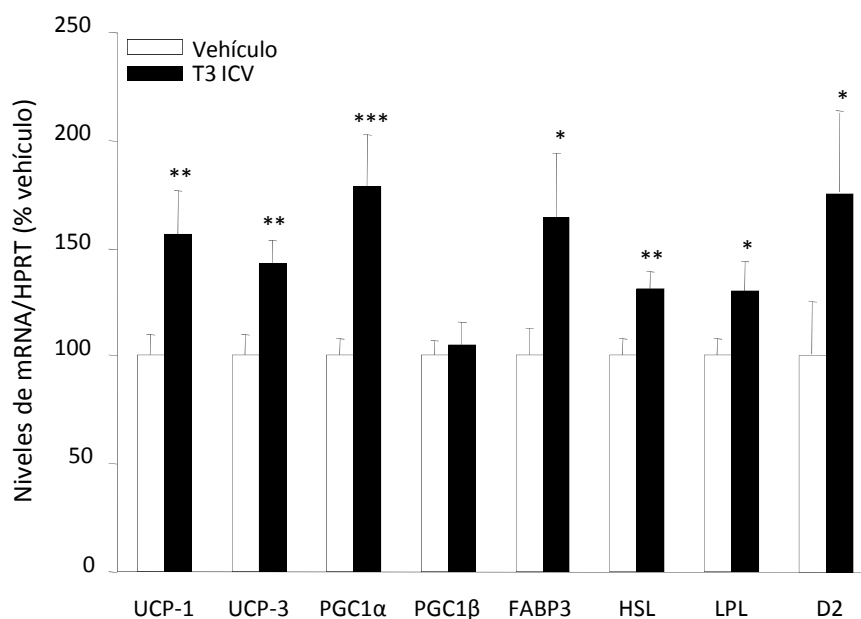


Figura 55. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras el tratamiento crónico con T3 ICV. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides.

Los datos en BAT mostraron que todo el programa termogénico estaba significativamente incrementado tras el tratamiento con T3 ICV; de hecho, siete de los ocho genes estudiados estaban elevados en BAT. Además, UCP-1, la proteína fundamental que lleva a cabo la termogénesis, mostraba un elevado incremento. Por otra parte, analizando los resultados de termogénesis en otros tejidos, hígado y músculo, se observó que no se reproducían los cambios vistos en BAT (figura 56), indicando que en ellos no se incrementaba la termogénesis.

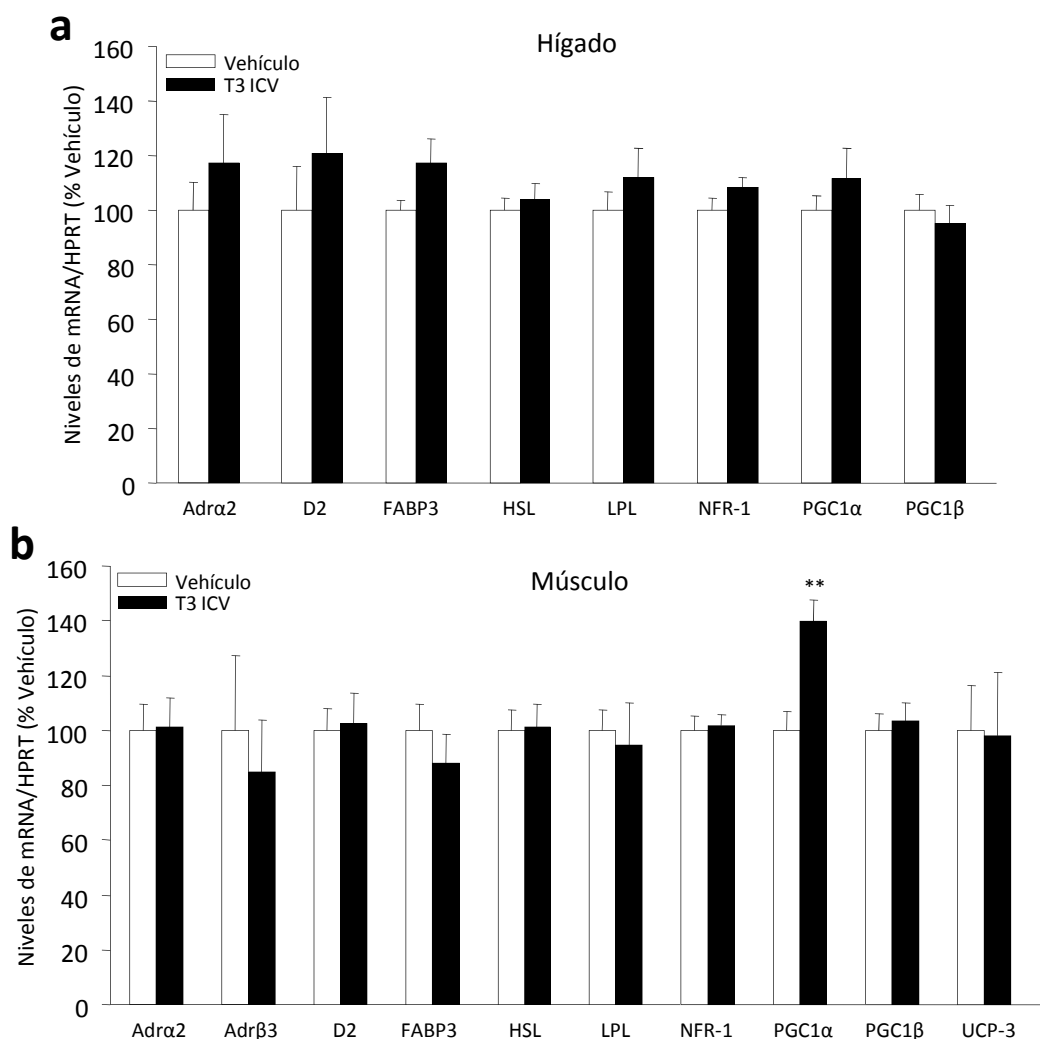


Figura 56. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en a) hígado y b) músculo tras el tratamiento crónico con T3 ICV. **: $P < 0.01$ vs. vehículo.

Es importante destacar que los efectos del tratamiento con T3 ICV fueron independientes del estado tiroideo del animal, pues en ratas hipotiroideas, la administración de T3 ICV causó los mismos resultados tanto en masa e ingesta (figura 57) como en termogénesis en BAT, hígado y músculo (figura 58).

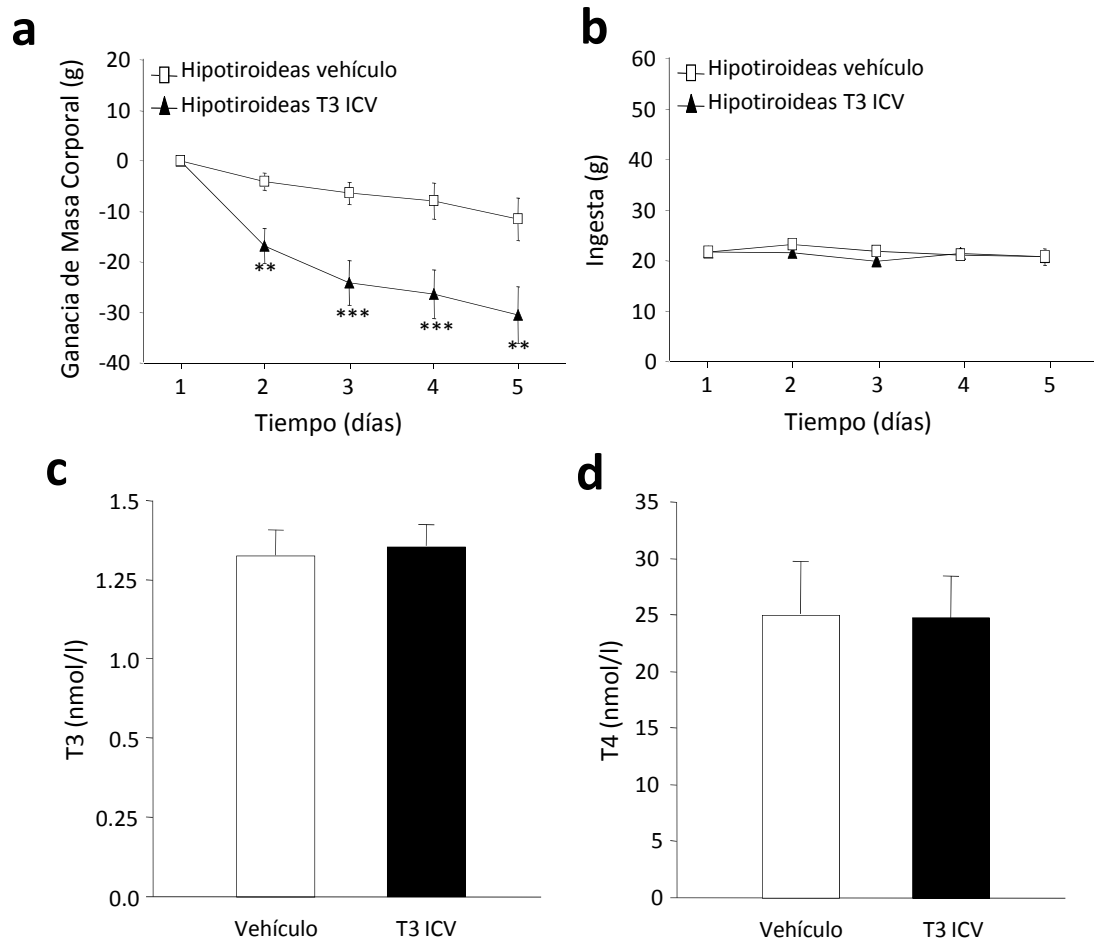


Figura 57. Evolución de la a) masa corporal y b) la ingesta durante el tratamiento con T3 ICV en ratas hipotiroideas. Niveles plasmáticos de a) T3 y b) T4 en ratas hipotiroideas tratadas crónicamente con T3 ICV. **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. hipotiroideas vehículo.

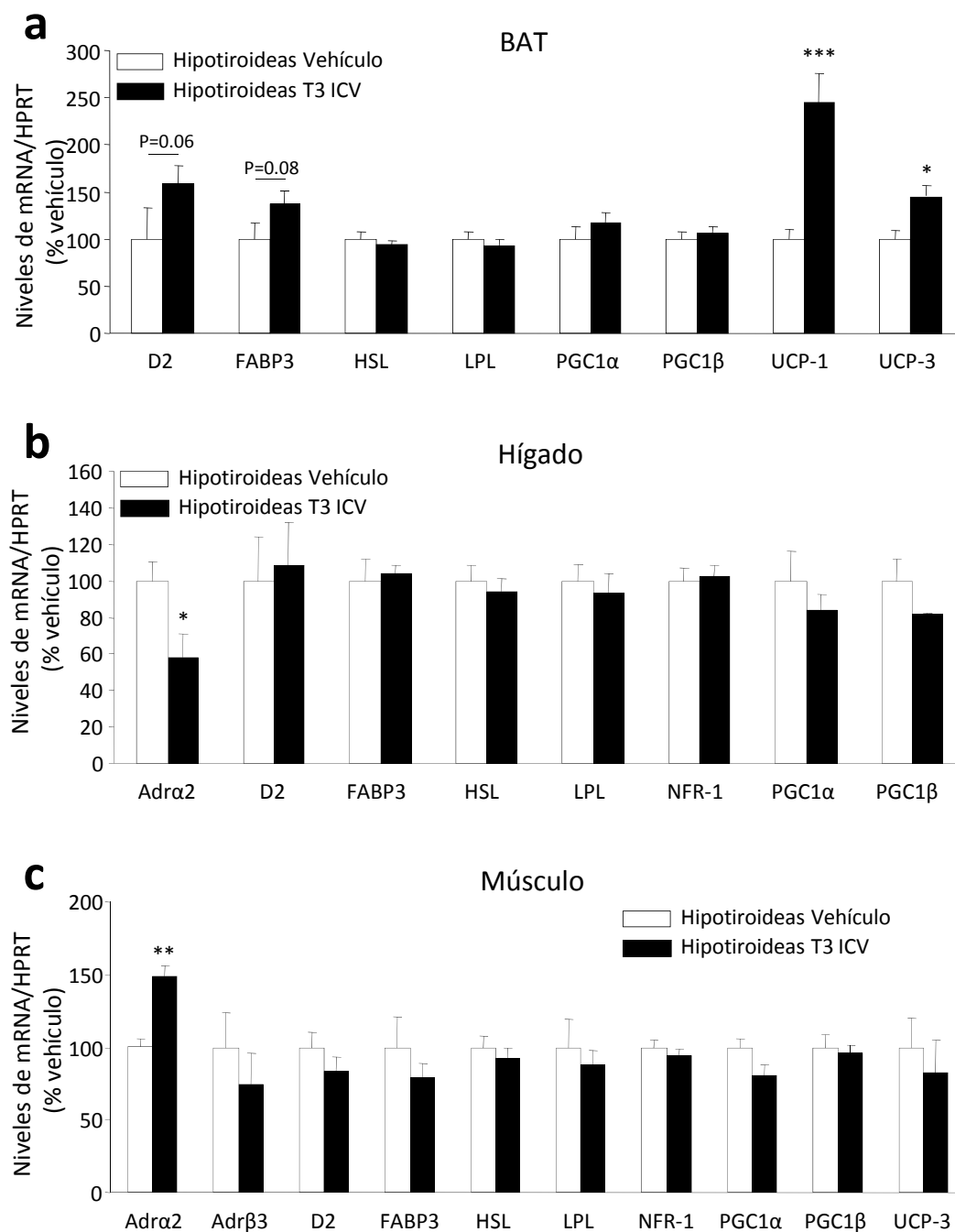


FIGURA 58. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en diferentes tejidos tras el tratamiento con T3 ICV en ratas hipotiroideas. a) BAT, b) hígado y c) músculo. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. hipotiroideas vehículo.

Todos los datos obtenidos tras el tratamiento con T3 ICV indican que sus efectos sobre el BAT son debidos a su acción directa a través del hipotálamo, y no al resultado de la difusión de la T3 en plasma. Para verificar esta idea se llevó a cabo la administración T3 IP (misma dosis que ICV) de modo crónico (figura 59).

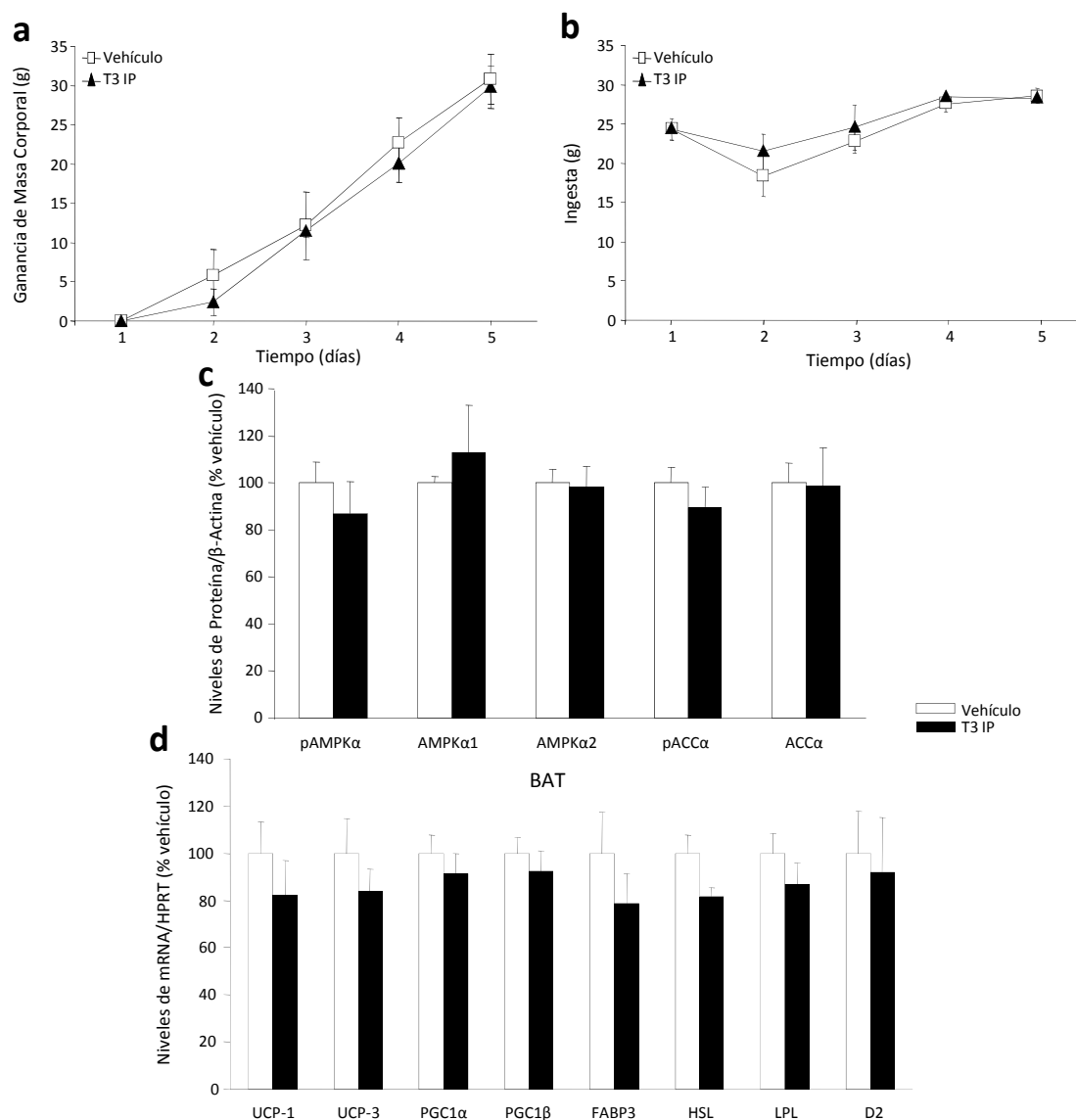


Figura 59. Evolución de a) masa corporal y b) ingesta durante el tratamiento con T3 IP. c) niveles hipotalámicos de proteína de la vía de AMPK tras el tratamiento con T3 IP. d) niveles de mRNA de los genes implicados en termogénesis en el BAT tras el tratamiento con T3 IP.

Los resultados obtenidos confirman que las acciones de la T3 ICV son producidas únicamente por sus efectos a nivel hipotalámico y no por las variaciones en los niveles plasmáticos de T3 y T4. Tras el tratamiento con T3 IP no se observaron ninguno de los cambios vistos tras la administración central de T3 en masa corporal, metabolismo lipídico o termogénesis (figura 59). La T3 administrada de modo central afectó al metabolismo hepático únicamente en ratas eutiroides en donde incrementó la lipogénesis *de novo* de manera muy significativa, mientras que en ratas hipotiroideas sus efectos en hígado se vuelven casi inapreciables (figura 60). Únicamente se

observaron pequeños cambios en AMPK α 1 y AMPK α 2 sin llegar a variar sus niveles de fosforilación.

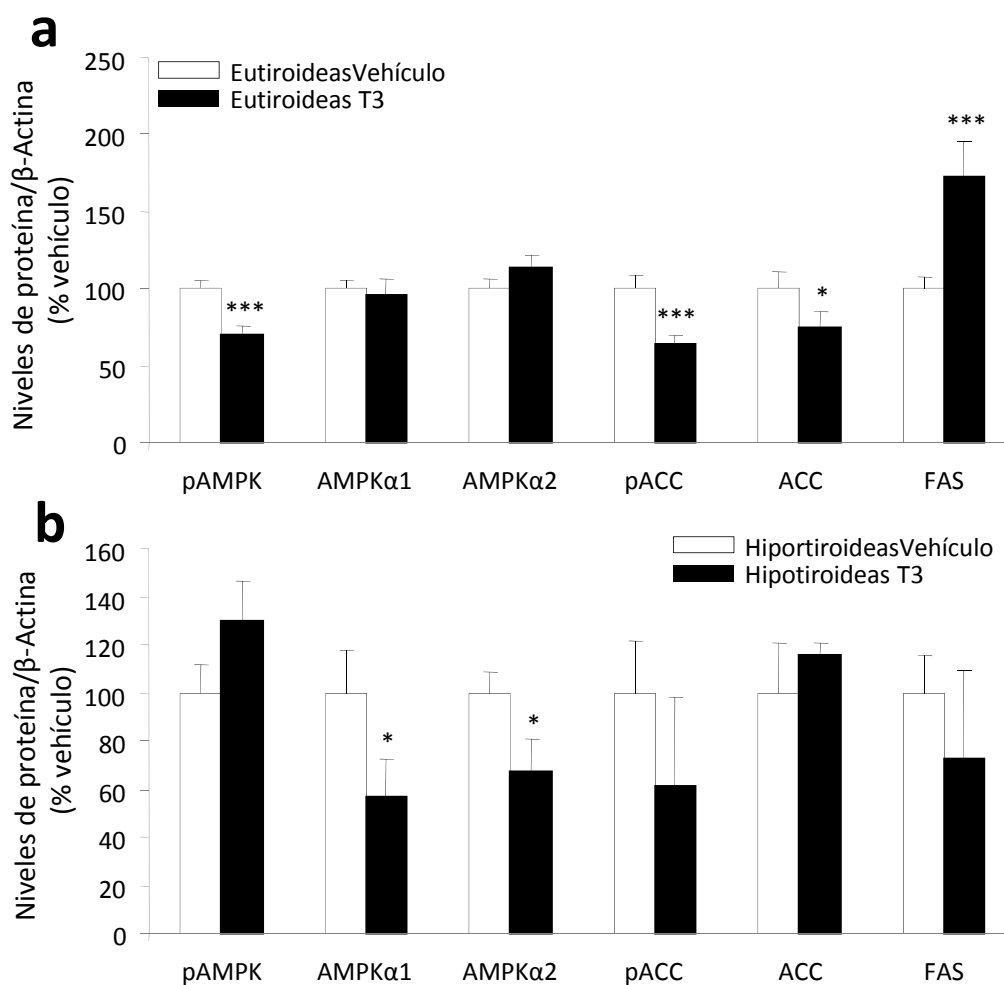


FIGURA 60. Niveles hepáticos de proteína de la vía de AMPK tras el tratamiento crónico con T3 ICV en ratas a) eutiroideas y b) hipotiroideas. *: $P < 0.05$ y ***: $P < 0.001$ vs. Vehículo.

Una vez demostradas las acciones de T3 sobre termogénesis en el BAT, y que estas están mediadas a través de sus efectos a nivel hipotalámico y no periféricamente, se estudió el modo en que la T3 ejercía estas funciones. Como se ha descrito previamente, el hipotálamo ejerce sus efectos sobre termogénesis en el BAT por medio de SNS (169;187). Los estímulos procedentes del SNS producen la activación de AR- β 3, que inicia todo el proceso termogénico (170). Para confirmar la hipótesis de que la T3 ICV afecta al BAT a través del SNS, inicialmente se inhibió farmacológicamente los AR- β 3 usando el antagonista específico SR59230A administrado de modo subcutáneo. Los datos obtenidos demostraron que la inhibición de AR- β 3 prevenía la pérdida de

masa inducida por la administración central de T3, sin que la ingesta se viese afectada (figura 61).

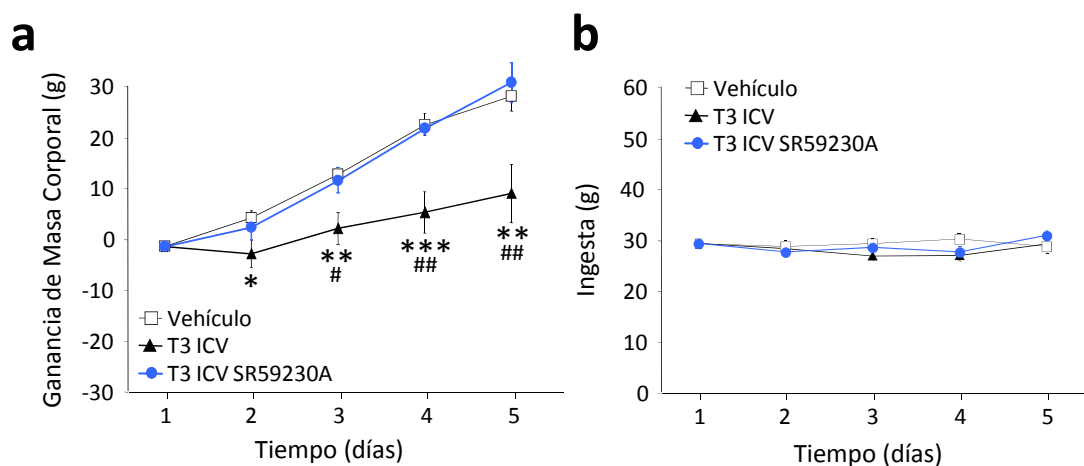


FIGURA 61. Evolución de a) masa corporal y b) ingesta durante el tratamiento con T3 ICV y SR59230A. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. Vehículo. #: $P < 0.05$ y ##: $P < 0.01$ vs. T3 ICV SR59230A.

Además, el antagonista también revirtió el incremento en la expresión de los genes involucrados en el proceso termogénico que producía la T3 ICV en BAT (figura 62).

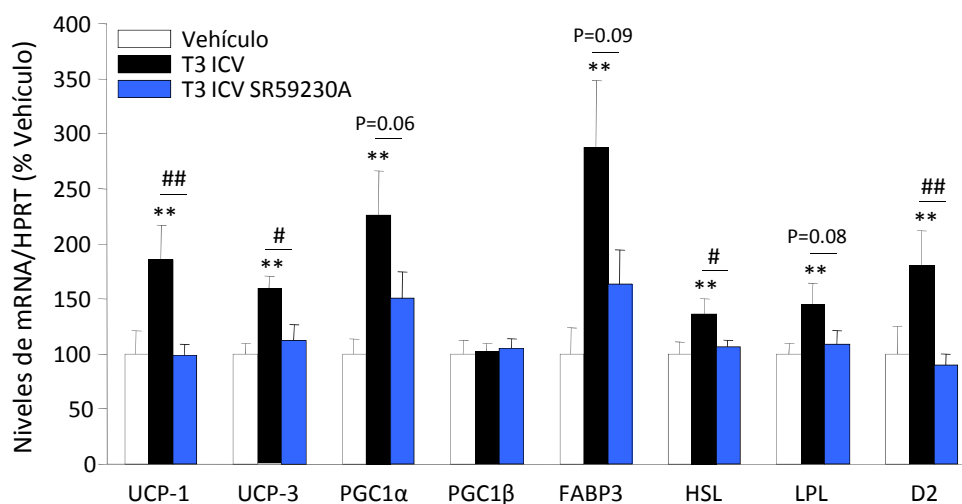


Figura 62. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras el tratamiento crónico con T3 ICV y SR59230A. **: $P < 0.01$ vs. Vehículo. #: $P < 0.05$ y ##: $P < 0.01$ vs. T3 ICV SR59230A.

El conjunto de los datos obtenidos tras la administración central demostraron que la T3 regula la termogénesis en BAT a través de un mecanismo que necesita la activación del SNS.

Todos los datos obtenidos hasta el momento mostraban una gran implicación de las THs sobre el metabolismo lipídico en el hipotálamo. Con el fin de demostrar si las THs ejercen una acción directa sobre AMPK en diferentes áreas hipotalámicas se realizó un estudio inmunohistoquímico (figura 63). Este mostraba un alto grado de co-localización entre TR y pAMPK en diversas zonas del hipotálamo claves en el balance energético como el ARC o el VMH.

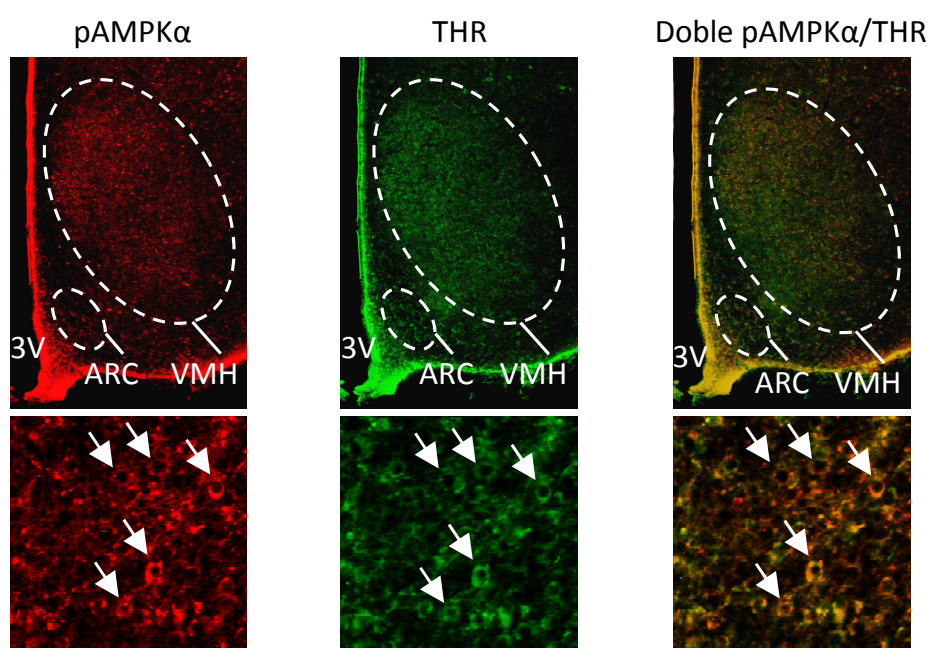


Figura 63. Imágenes de la co-localización de pAMPK y TR en distintos núcleos hipotalámicos.

Con el fin de caracterizar los efectos de la T3 a nivel hipotalámico, además de realizar la administración crónica de esta molécula, se observó que los cambios vistos en este experimento sobre metabolismo lipídico hipotalámico se replicaban al ser administrada la T3 ICV de modo agudo. Se vio que la administración aguda de T3 ICV no causaba ninguna variación sobre la ingesta (figura 64), y se pudo comprobar cómo la T3 ejercía un efecto inhibitorio robusto sobre la expresión de pAMPK y pACC una hora después de su administración (figura 65).

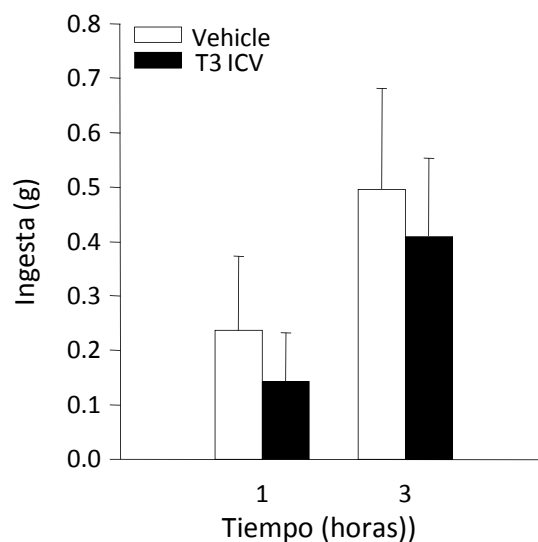


Figura 64. Ingesta a 1 y 3 horas tras la administración de T3 ICV.

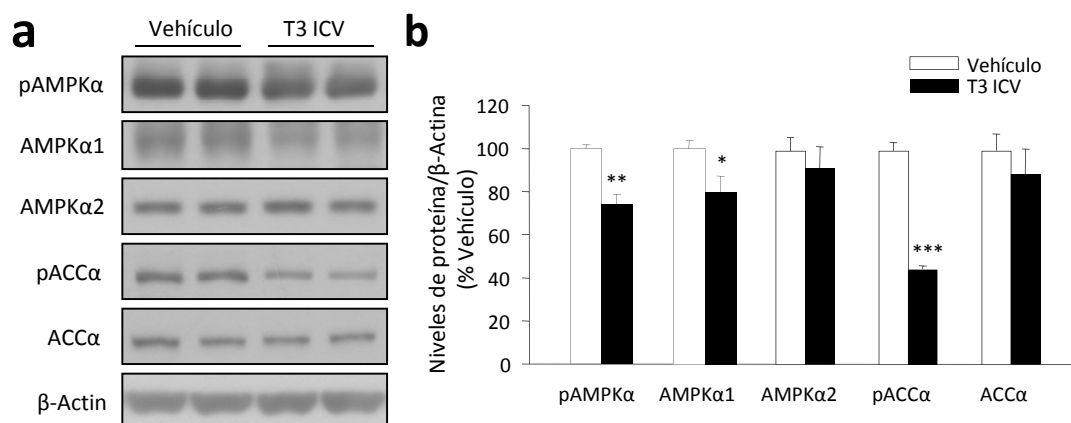


FIGURA 65. Efectos del tratamiento con T3 ICV agudo en los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) imágenes autorradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. *: P<0.05, **: P<0.01 y ***P<0.001 vs. Vehículo.

Además, los efectos de la administración de T3 ICV de forma aguda se asocian con un marcado incremento en la inmunoreactividad (IR) de c-Fos en el núcleo dorsal motor del vago (DMV), en el núcleo inferior de la oliva (IO) y en el raphe pallidus (RPa) (figura 66), caracterizados por recibir proyecciones neuronales provenientes del VMH (170;444).

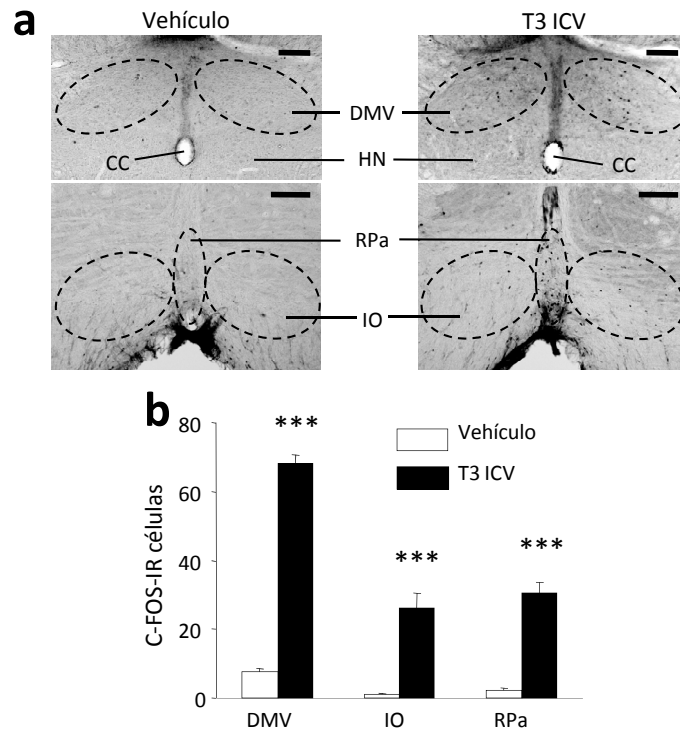


FIGURA 66. Efecto de la T3 ICV sobre c-Fos en el DMV. a) imágenes de la inmunohistoquímica de c-Fos en el DMV. b) cuantificación de las células inmuno-reactivas de c-Fos en el DMV. *** $P < 0.001$ vs. vehículo.

Finalmente, se estudió la actividad del SNS y se encontró que la administración de T3 ICV causaba grandes incrementos en la actividad neuronal del SNS en el BAT (figura 67), lo que estaba indicando que la T3 modulaba las funciones en el BAT a través de sus acciones a nivel hipotalámico.

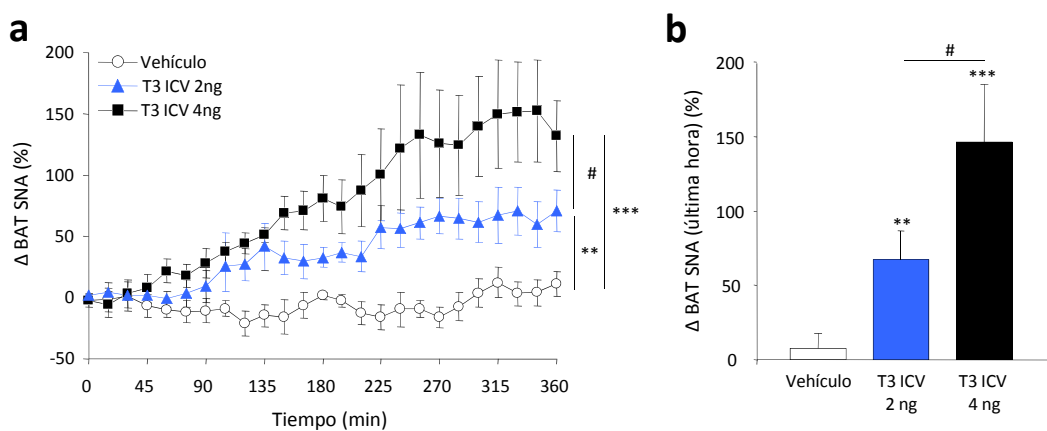


Figura 67. Actividad del SNS tras la administración de distintas dosis T3 ICV. a) evolución de la actividad en las 6 primeras horas tras el tratamiento. b) actividad del SNS en la última hora. **: $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs. Vehículo. #: $P < 0.05$ vs. T3 ICV 2ng.

Hasta el momento, todos los tratamientos centrales con T3 fueron administrados de modo ICV. Visto que uno de los núcleos en los que co-localizan pAMPK y TR es el VMH, y que además se ha descrito que este núcleo tiene gran importancia en metabolismo de lípidos y en la modulación del BAT (23), junto a la evidencia vista por la IR de c-Fos, se estudiaron los efectos de la administración de T3 directamente, mediante esterotaxia, en el VMH.

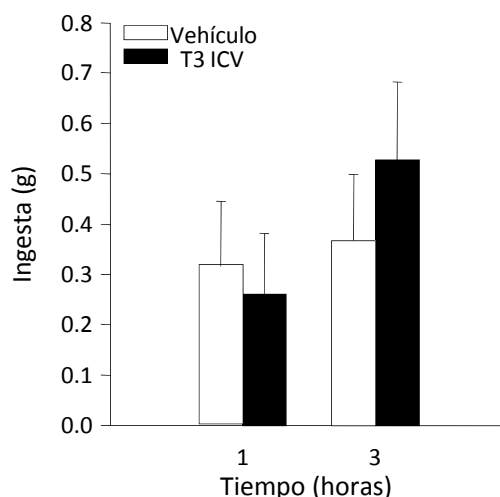


Figura 68. Ingesta a 1 y 3 horas tras la administración de T3 en el VMH.

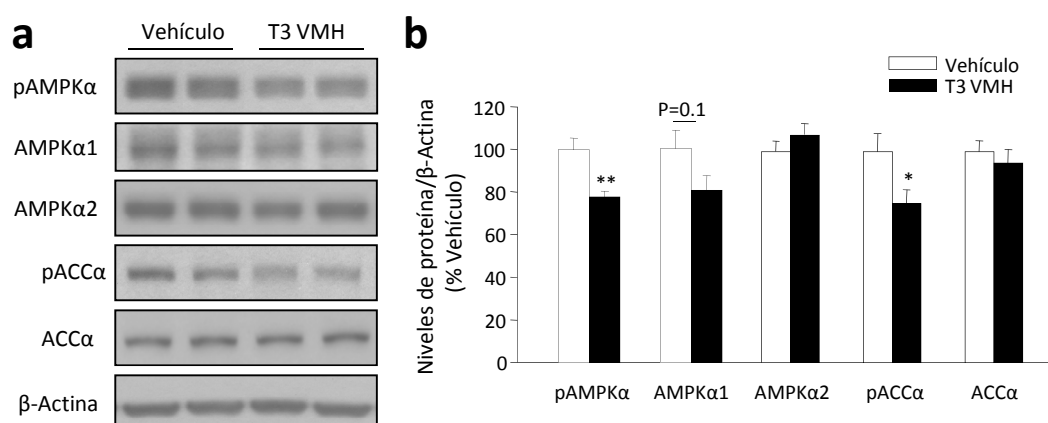


FIGURA 69. Efectos de la administración de T3 en el VMH sobre los niveles de proteína de la vía de AMPK. a) imágenes autorradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. Vehículo.

Los resultados obtenidos, además de no presentar variaciones en ingesta (figura 68) mostraron que los cambios sobre metabolismo lipídico tras la administración de T3

en el VMH eran iguales que los vistos tras los tratamientos con T3 ICV, indicando que las variaciones vistas en proteína total del hipotálamo se debían en gran medida a los cambios ocurridos en el VMH.

Al igual que lo visto en el caso de la administración ICV de T3, se encontró que su administración estereotáxica en el VMH también producía los mismos cambios sobre la actividad neuronal del SNS (figura 70), lo que llevaba a pensar que no solo la T3 modulaba las funciones del BAT a través de sus acciones en el hipotálamo, sino que más concretamente se debían a las acciones directas sobre el VMH.

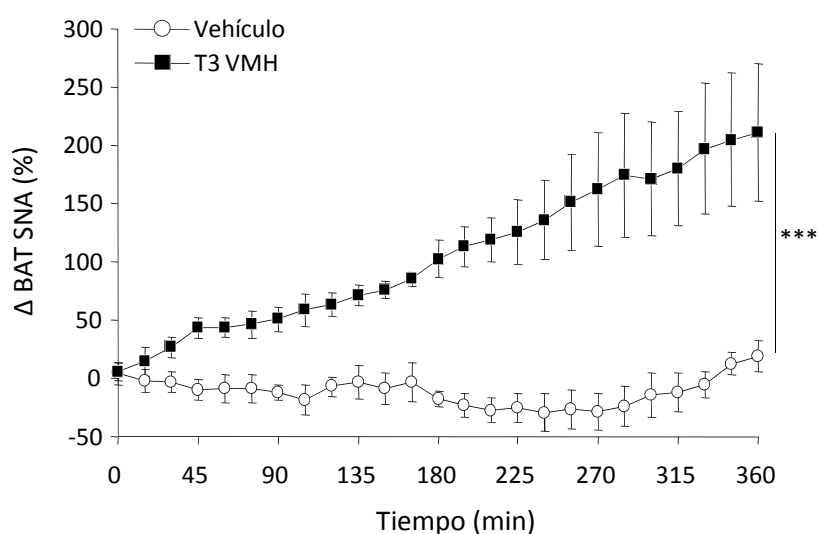


Figura 70. Evolución de la Actividad del SNS durante las 6 primeras horas tras la administración de T3 en el VMH. *** $P < 0.001$ vs. Vehículo.

Todas las evidencias halladas hasta el momento tras los tratamientos con T3 indicaban que los efectos sobre el BAT eran debidos a sus acciones en el hipotálamo y no como consecuencia de los niveles de THs circulantes. Se realizó un último experimento con el objetivo de demostrar de modo más robusto las evidencias obtenidas tras el análisis de los resultados anteriores. Con el fin de analizar si durante la inducción de hipertiroidismo de modo periférico, los cambios vistos en el programa termogénico en el BAT se debían a las THs circulantes o estaban mediados por sus efectos en el VMH, se ha llevado a cabo un experimento en el que se han bloqueado genéticamente los TR estereotáxicamente en el VMH.

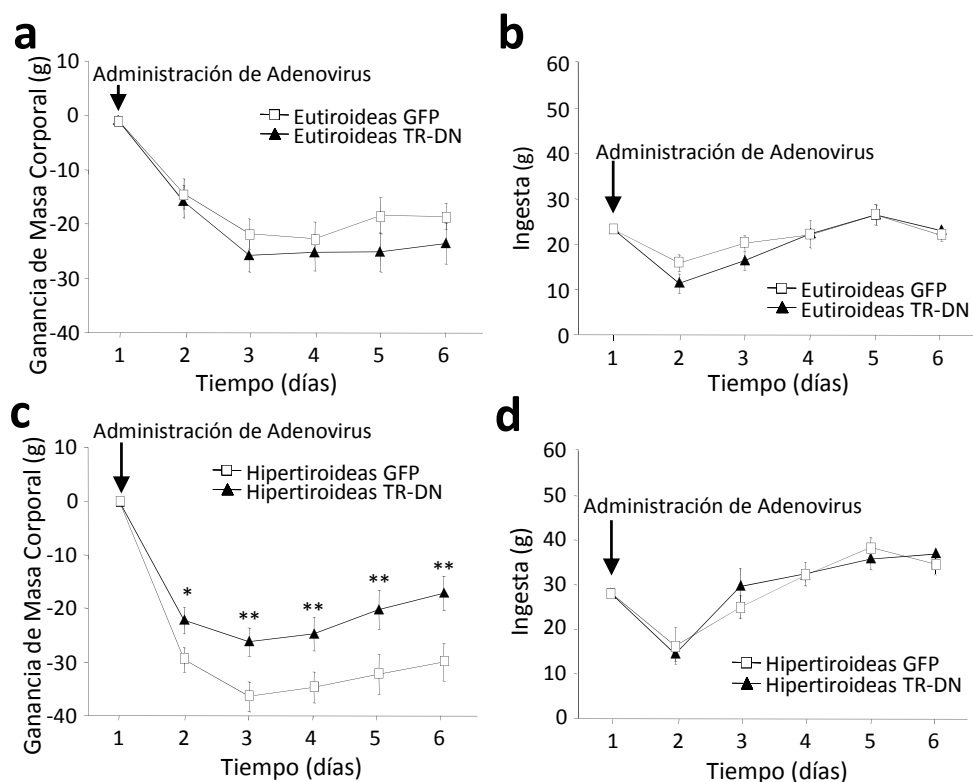


Figura 71. Evolución de la ganancia de masa corporal e ingesta diaria tras la inoculación de adenovirus TR-DN en ratas eutiroideas (a y b) y hipertiroideas (c y d). *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. GFP.

Se puede comprobar que únicamente en ratas hipertiroideas, la administración de los adenovirus que codificaban una isoforma dominante negativa del receptor de hormonas tiroideas (TR-DN) llevó asociado un incremento significativo en la masa corporal, sin causar alteración alguna sobre la ingesta en ninguno de los grupos (figura 71).

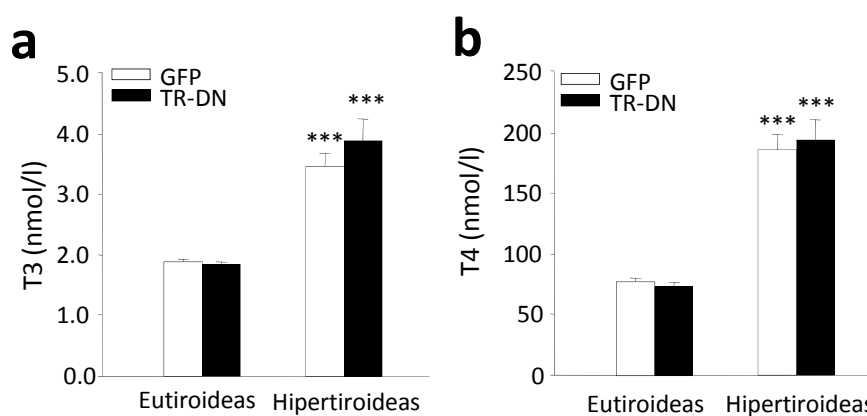


FIGURA 71. Niveles plasmáticos de a) T3 y b) T4 tras la inoculación de los adenovirus TR-DN. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroideas GFP.

Al igual que lo ocurrido tras la administración de T3, la administración de los adenovirus TR-DN no provocó ninguna variación en los niveles plasmáticos de THs (figura 71).

Curiosamente, los datos mostraron que tras la administración de adenovirus, las ratas hipertiroideas presentaban menores valores en la expresión de los genes implicados en el proceso termogénico en BAT (figura 72a), sobre todo UCPs y PGCs, indicando que incluso durante el hipertiroidismo inducido periféricamente las acciones sobre termogénesis en BAT están mediadas mayoritariamente a nivel hipotalámico, y más concretamente a través del VMH. En ratas eutiroides no se observó ninguna variación en termogénesis tras la administración de TR-DN, la expresión de las UCPs se mantuvo al mismo nivel que en las ratas control (figura 72).

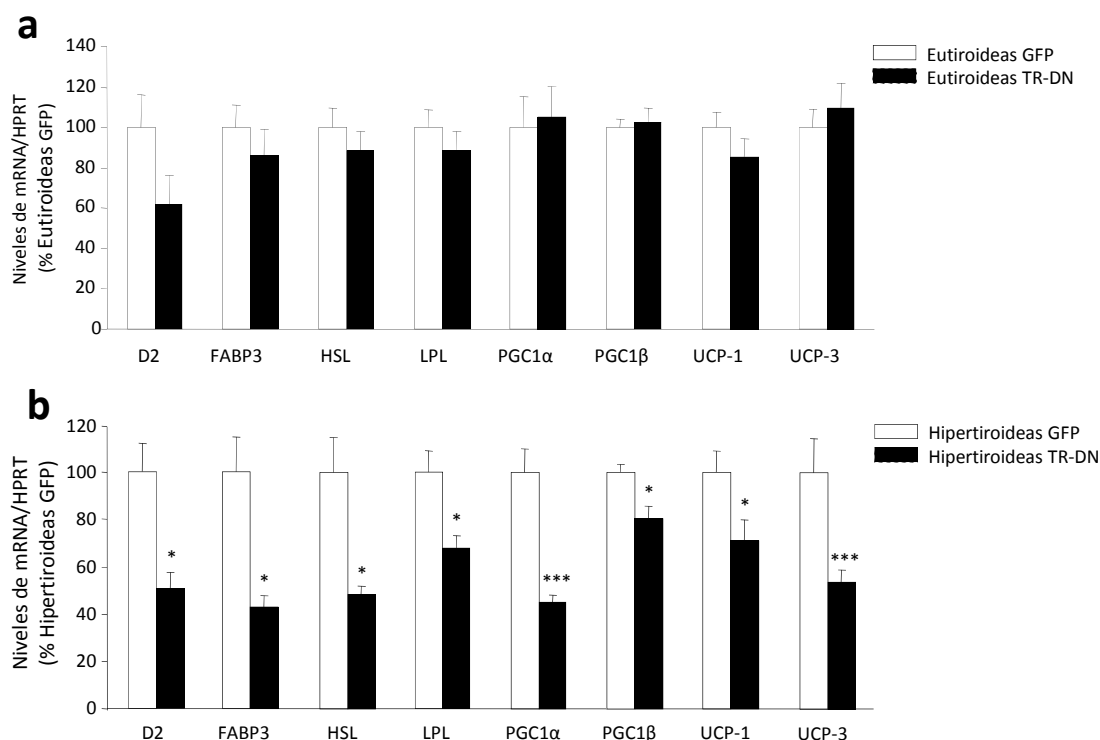


Figura 72. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras la inoculación de los adenovirus TR-DN en ratas a) eutiroides y b) hipertiroideas. *: $P < 0.05$ y ***: $P < 0.001$ vs. GFP.

Hasta el momento se había observado que las acciones que las THs ejercían a nivel central únicamente afectaban al proceso termogénico específicamente en el BAT; siguiendo con estas observaciones se estudiaron diferentes tejidos tras el tratamiento con los adenovirus TR-DN en el VMH (figura 73), en donde se pudo comprobar cómo, al igual que lo anteriormente descrito, en hígado y músculo ninguno de los genes

implicados en el proceso termogénico tenía revertida su expresión como se vio en el caso de BAT, indicando que las alteraciones en termogénesis vistas en estos tejidos durante el hipertiroidismo eran debidas a efectos de las THs plasmáticas.

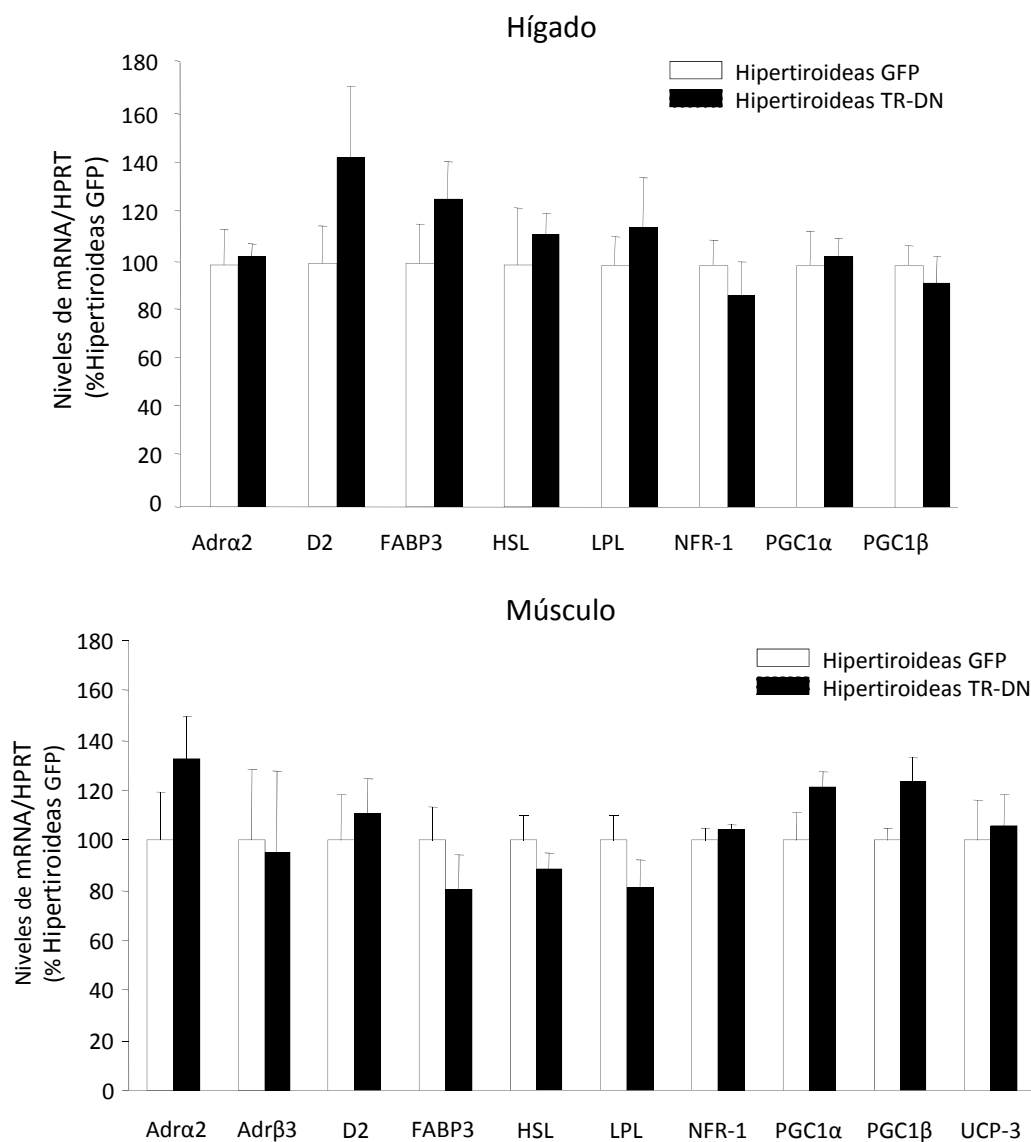


Figura 73. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en a) hígado y b) músculo tras la inoculación de los adenovirus TR-DN.

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE METABOLISMO LIPÍDICO EN HIPOTÁLAMO Y TERMOGÉNESIS DURANTE EL HIPERTIROIDISMO

Los datos obtenidos hasta el momento mostraban que el hipertiroidismo causaba la activación de la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo y que sus efectos en termogénesis eran mediados a nivel central. El siguiente punto a estudiar fue la interconexión que tenían ambos factores; es decir, si la activación del metabolismo lipídico en el hipotálamo era la causa del incremento de la termogénesis en BAT y otros tejidos, además de intentar explicar el fenotipo hiperfágico y delgado a pesar de los altos niveles de malonil-CoA hipotalámico. Para llevar a cabo este enfoque experimental, se emplearon diversos activadores e inhibidores farmacológicos de los distintos enzimas de la ruta de síntesis de ácidos grasos. El primer paso fue estudiar los efectos de la administración de un inhibidor específico de FAS, denominado cerulenin, en ratas hipertiroides.

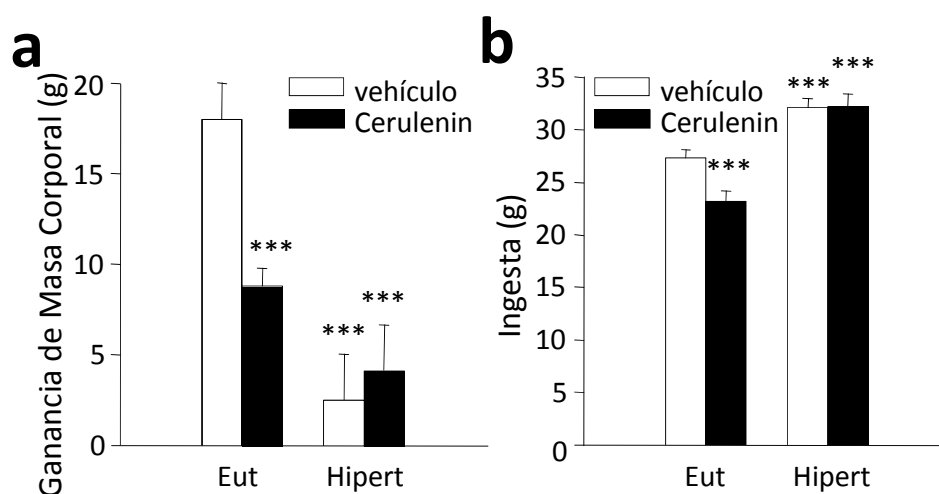


Figura 74. a) Ganancia de masa corporal y b) ingesta diaria durante el tratamiento central con cerulenin. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroideas vehículo.

La administración de cerulenin no tuvo ninguna repercusión ni en la masa corporal ni en la ingesta de las ratas hipertiroides (figura 74) a pesar de que, como era de esperar, presentaban una mayor concentración de malonil-CoA hipotalámico (figura 75). En cambio, las ratas eutiroideas, presentaban una disminución conjunta de la masa

corporal y la ingesta, que correlacionaba con el incremento en la concentración hipotalámica de malonil-CoA similar al observado en las hipertiroides

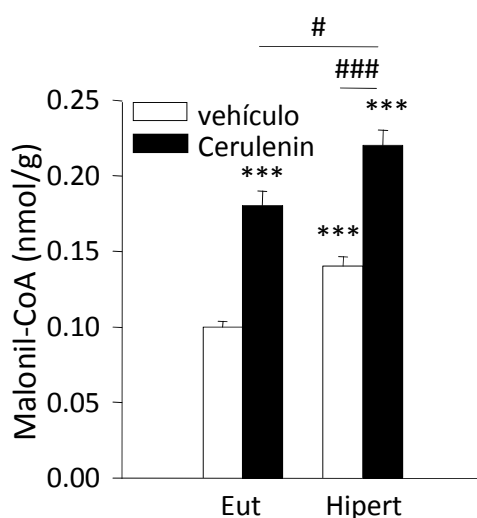


Figura 75. Niveles hipotalámicos de malonil-CoA tras el tratamiento central con cerulenin. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides vehículo. #: $P < 0.05$ vs. hipertiroides cerulenin. ###: $P < 0.001$ vs. hipertiroides vehículo.

Estos datos indicaban que las ratas hipertiroides no respondían a los efectos anorécticos de los inhibidores de FAS y del incremento de los niveles hipotalámicos de malonil-CoA. Es decir, en conjunto los resultados indicaban que las ratas hipertiroides eran resistentes a la acumulación de este metabolito. Con el fin de explorar en profundidad el mecanismo mediante el cual ocurría este fenómeno se analizó la expresión de distintos neuropéptidos implicados en el control de la ingesta (figuras 76 y 77).

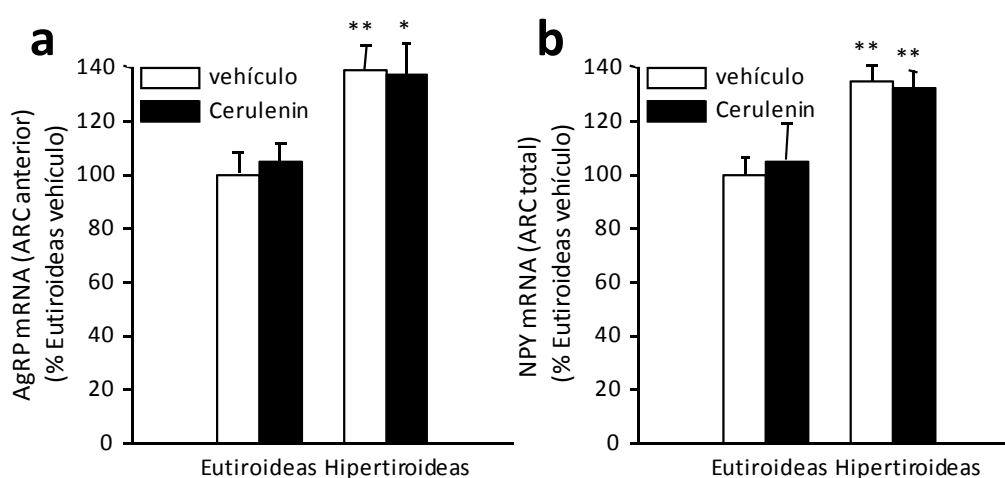


Figura 76. Niveles de expresión de mRNA de AgRP y NPY tras el tratamiento central con cerulenin. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. eutiroides vehículo.

El análisis mediante *hibridación in situ* demostró que la expresión de mRNA de AgRP y NPY en el ARC no se veía afectada tras el tratamiento con el inhibidor ni en ratas eutiroides ni en hipertiroideas (figura 76).

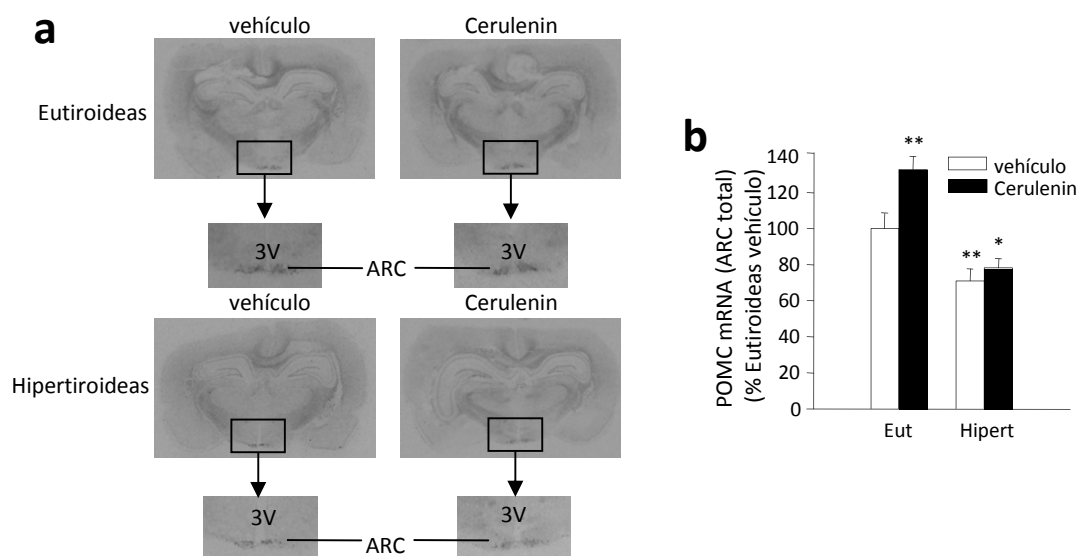


Figura 77. Efecto del tratamiento central con cerulenin en los niveles de mRNA de POMC en el ARC. a) imágenes autorradiográficas de *hibridación in situ*. b) cuantificación de los niveles de mRNA. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. eutiroides vehículo.

Analizando la expresión de mRNA de POMC en este experimento, se pudo comprobar que el cerulenin indujo un incremento significativo en la expresión de este prepro-neuropéptido en ratas eutiroides en el ARC (figura 77), lo que correlacionaba con el efecto anoréxico de la droga. Contrariamente, en los animales hipertiroideos, en los que el cerulenin no indujo la ingesta, la expresión de POMC no se vio afectada. Para estudiar los mecanismos moleculares de esta falta de respuesta, se analizaron los niveles hipotalámicos de pFoxO1 y pSTAT3 (figura 78), dos factores de transcripción claves en la regulación de POMC.

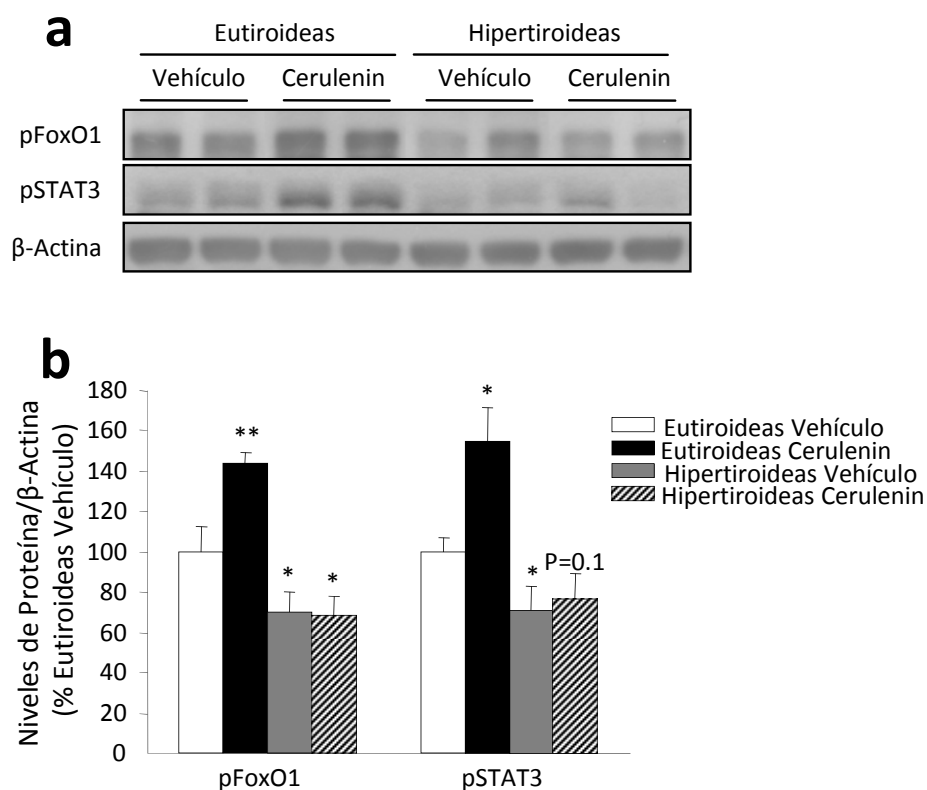


Figura 78. Efectos de la administración central de cerulenin sobre los niveles de proteína de pFoxO1 y pSTAT3. a) imágenes autorradiográficas de western blot. b) cuantificación de los niveles de proteína. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. eutiroideas vehículo.

Los resultados obtenidos mostraron que el incremento en mRNA de POMC en los animales eutiroideos iba acompañado de un aumento en los niveles de proteína, tanto de pFoxO1 como de pSTAT3 (figura 78). Inversamente, en las ratas hipertiroideas este efecto no se observaba, indicando que la falta de respuesta en la expresión de POMC correlacionaba con alteraciones en su maquinaria de transcripción.

Siguiendo con el estudio de la interacción entre la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo y la termogénesis, se utilizaron otros dos inhibidores farmacológicos de la vía lipogénica: un activador de AMPK, denominado AICAR, y un inhibidor de ACC, denominado TOFA. La administración central de AICAR no producía ningún efecto sobre la masa corporal de las ratas eutiroideas, mientras que en ratas hipertiroideas restablecía la masa corporal a valores de las eutiroideas. Además, no se vieron efectos en ingesta diaria ni en la ingesta acumulada en ninguno de los grupos tras el tratamiento (figura 79).

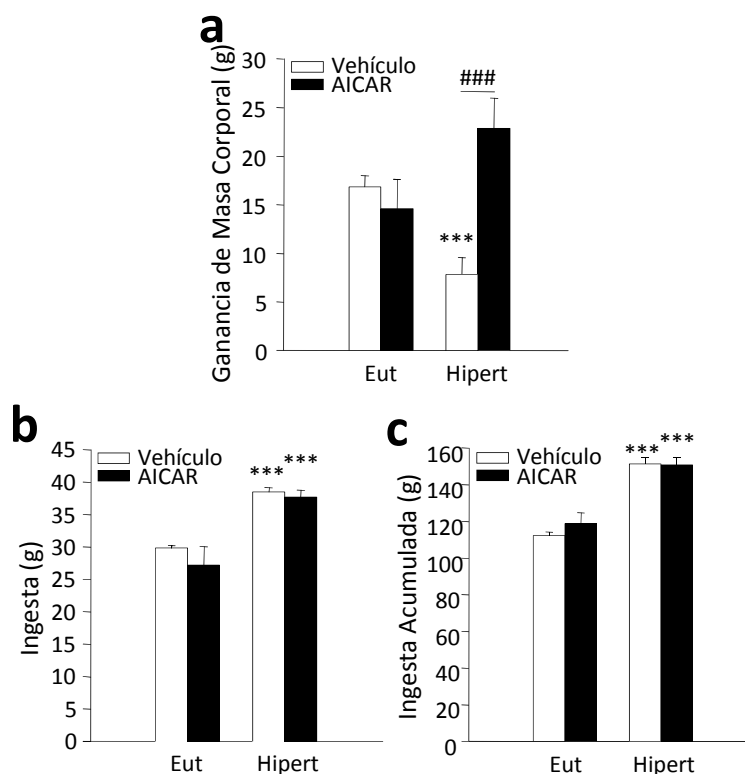


Figura 79. a) Ganancia de masa corporal, b) ingesta diaria y c) ingesta acumulada de ratas eutiroides e hipertiroideas durante el tratamiento central con AICAR. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides vehículo. ###: $P < 0.001$ hipertiroideas vehículo vs. hipertiroideas AICAR.

Como control positivo de la acción del AICAR analizamos los niveles hipotalámicos de malonil-CoA (figura 80). La administración de AICAR causó la caída en la concentración de malonil-CoA hipotalámico en ambos modelos, como consecuencia de la activación de AMPK y por tanto, de la inhibición de ACC.

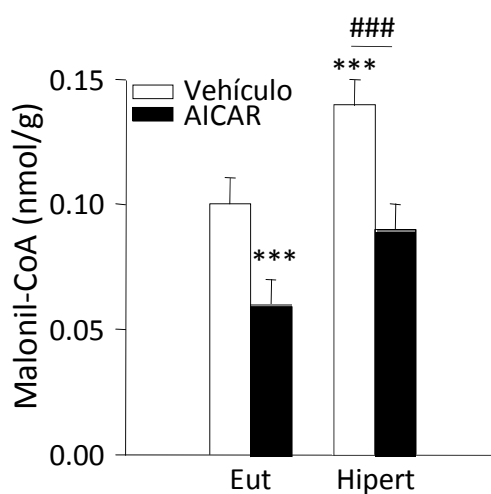


Figura 80. Niveles hipotalámicos de malonil-CoA tras el tratamiento central con AICAR. ***: $P < 0.001$ vs. Eutiroides Vehículo. ###: $P < 0.001$ hipertiroideas vehículo vs. hipertiroideas AICAR.

A continuación se procedió a estudiar la expresión UCP-1 y UCP-3 en el BAT tras el tratamiento con AICAR (figura 81). Nuestros datos mostraron que la inhibición de la lipogénesis *de novo* mediante esta droga causó un descenso en la expresión de mRNA de los dichos genes, ambos implicados de manera clave en la termogénesis adaptativa en el BAT. Así, el incremento en masa corporal en ratas hipertiroideas lleva asociada la disminución de UCP-1 y UCP-3.

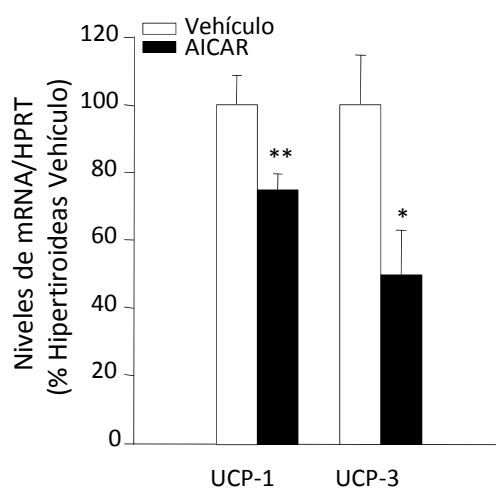


Figura 81. Niveles de expresión de mRNA durante el hipertiroidismo de los principales genes implicados en termogénesis adaptativa en el BAT tras el tratamiento con AICAR. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. hipertiroideas vehículo.

Al igual que AICAR, el empleo de TOFA indujo los mismos resultados en términos de ganancia de masa corporal, ingesta (figura 82), concentración de malonil-CoA hipotalámico (figura 83) y niveles de expresión de UCP-1 y UCP-3 en BAT (figura 84). En conjunto, estos resultados demuestran que la inhibición de la actividad de ACC y la reducción de malonil-CoA en el hipotálamo de ratas hipertiroideas induce una disminución en la termogénesis en el BAT y promueve el incremento de masa corporal.

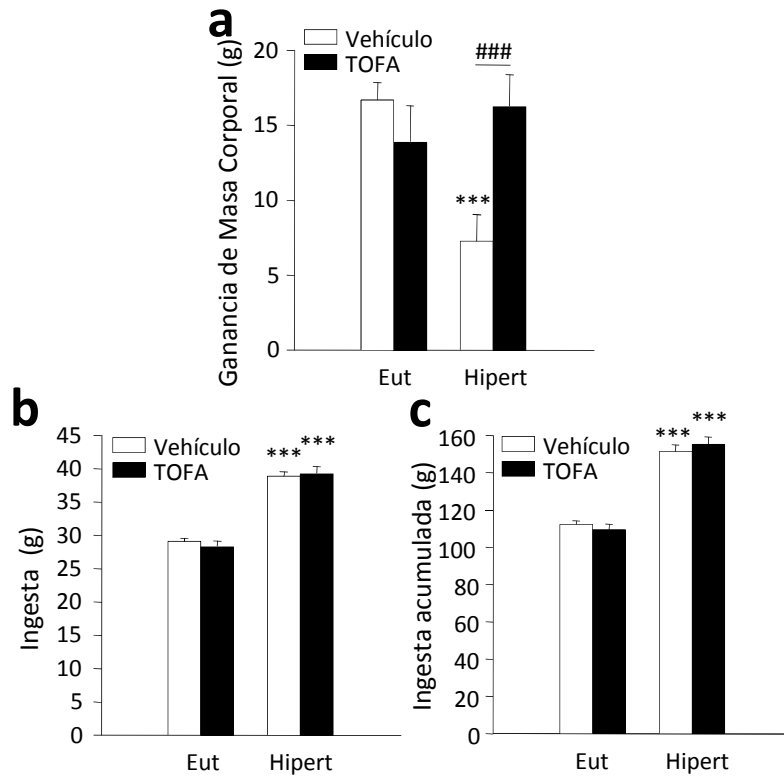


Figura 82. a) Ganancia de masa corporal, b) ingesta diaria y c) ingesta acumulada de ratas eutiroides e hipertiroideas durante el tratamiento central con TOFA. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides vehículo. ###: $P < 0.001$ hipertiroideas vehículo vs. hipertiroideas TOFA.

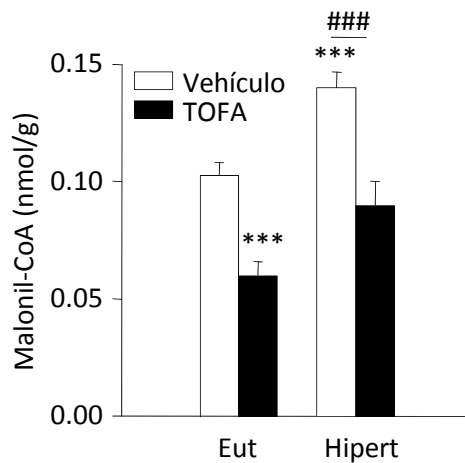


Figura 83. Niveles hipotalámicos de malonil-CoA tras el tratamiento central con TOFA. ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides vehículo. ###: $P < 0.001$ hipertiroideas vehículo vs. hipertiroideas AICAR.

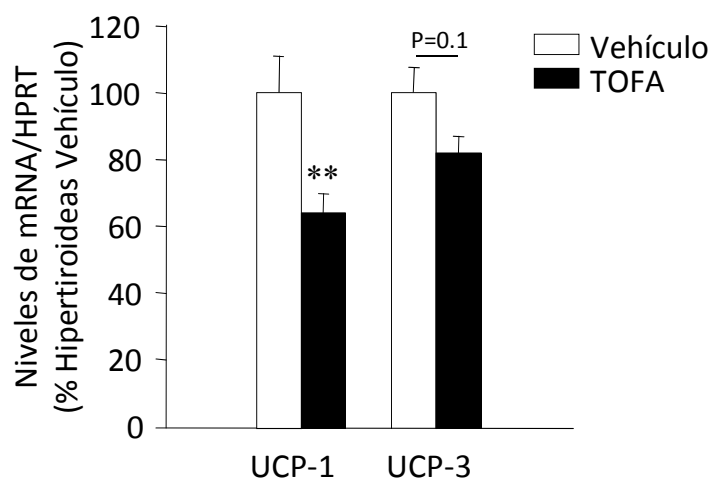


Figura 84. Niveles de expresión de mRNA durante el hipertiroidismo de los principales genes implicados en termogénesis adaptativa en el BAT tras el tratamiento con AICAR. *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. hipertiroides vehículo.

Los resultados de los experimentos con compuestos farmacológicos indican la existencia de una clara contribución entre metabolismo lipídico hipotalámico y termogénesis en el BAT. Para seguir investigando la relación entre ambos procesos, y visto que pAMPK y TRs co-localizan en el VMH, se procedió a inocular adenovirus que codificaban una isoforma constitutivamente activada de AMPK α (AMPK α -CA) en dicho núcleo hipotalámico.

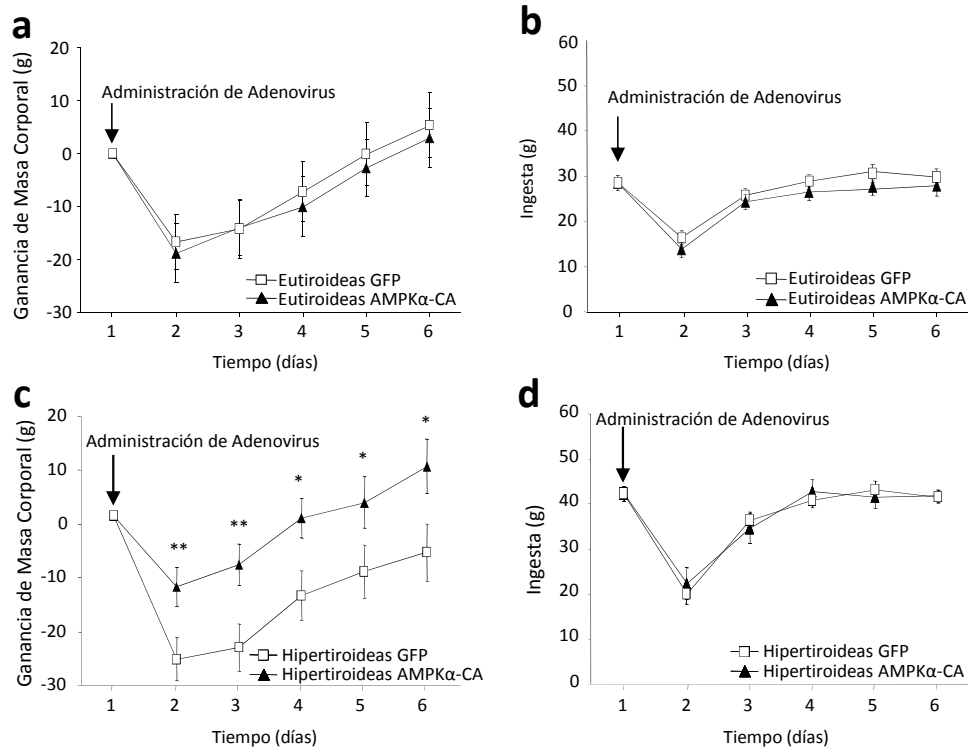


Figura 85. Evolución de la ganancia de masa corporal e ingesta diaria tras la inoculación de adenovirus AMPK-CA en ratas eutiroides (a y b) e hipertiroideas (c y d). *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. GFP.

Los resultados mostraron que la administración de los adenovirus AMPK α -CA causaba un incremento en la ganancia de masa corporal en los animales hipertiroideos (figura 85c), mientras que en ratas eutiroides la masa corporal no se vio afectada por el tratamiento (figura 85a); en ambos caso la ingesta permaneció invariable (figura 85b y d).

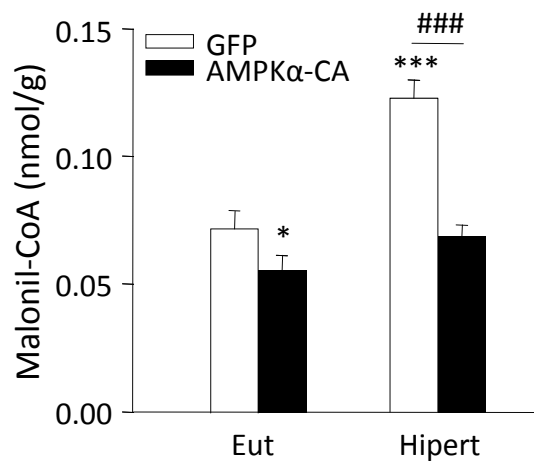


Figura 86. Niveles hipotalámicos de malonil-CoA tras el la inoculación de los adenovirus AMPK α -CA. *: $P < 0.05$ y ***: $P < 0.001$ vs. eutiroides GFP. ####: $P < 0.001$ hipertiroideas GFP vs. hipertiroideas AMPK α -CA.

Al igual que lo que se ha visto en los experimentos con AICAR y TOFA, la administración de AMPK α -CA en el VMH se vio acompañada de un descenso en la concentración de malonil-CoA en el hipotálamo (figura 86). Este resultado demuestra la eficacia del tratamiento con adenovirus en la inhibición de ACC.

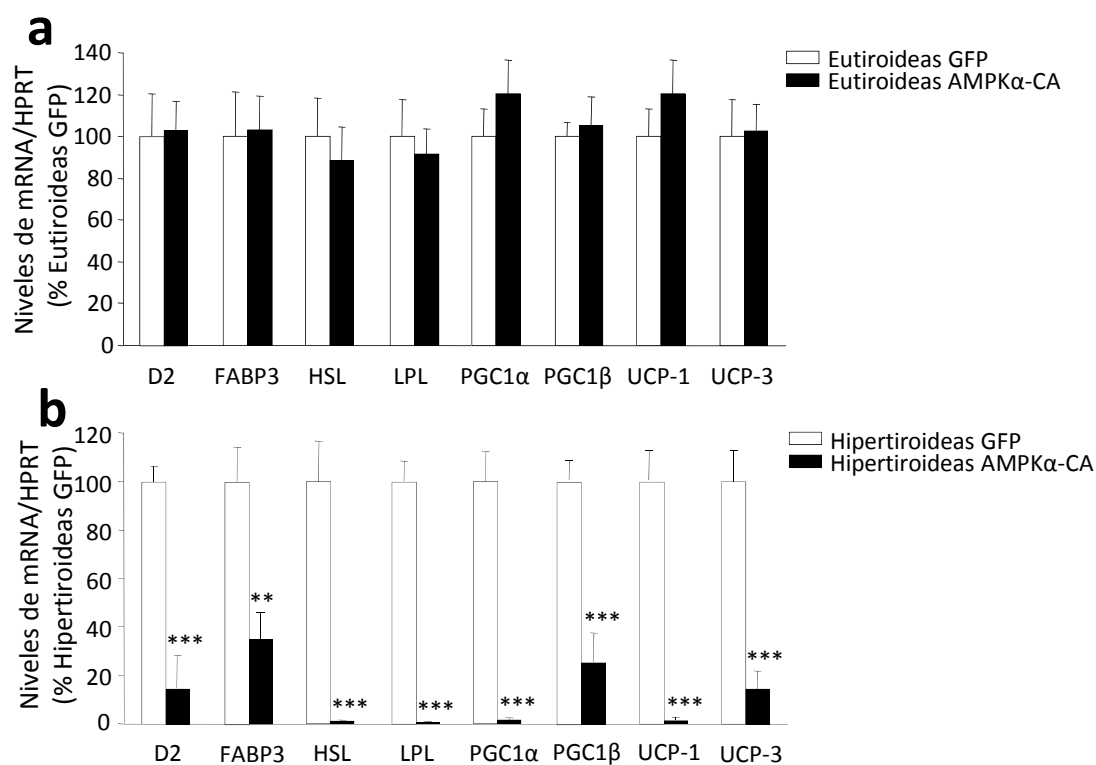


Figura 87. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras la inoculación de los adenovirus AMPK α -CA en ratas a) eutiroides y b) hipertiroideas. *: P<0.05, **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. GFP.

Finalmente, se procedió a estudiar el efecto de la activación selectiva de AMPK (y consecuente inhibición de ACC) sobre el programa termogénico en distintos tejidos. La administración de AMPK α -CA causó una marcada y específica reducción en la expresión de los genes involucrados en la termogénesis adaptativa en el BAT (figura 87) de ratas hipertiroideas, mientras que en eutiroides esta alteración no se apreciaba. Estos resultados correlacionaban perfectamente con el incremento de masa corporal observado en las hipertiroideas tratadas con AMPK α -CA.

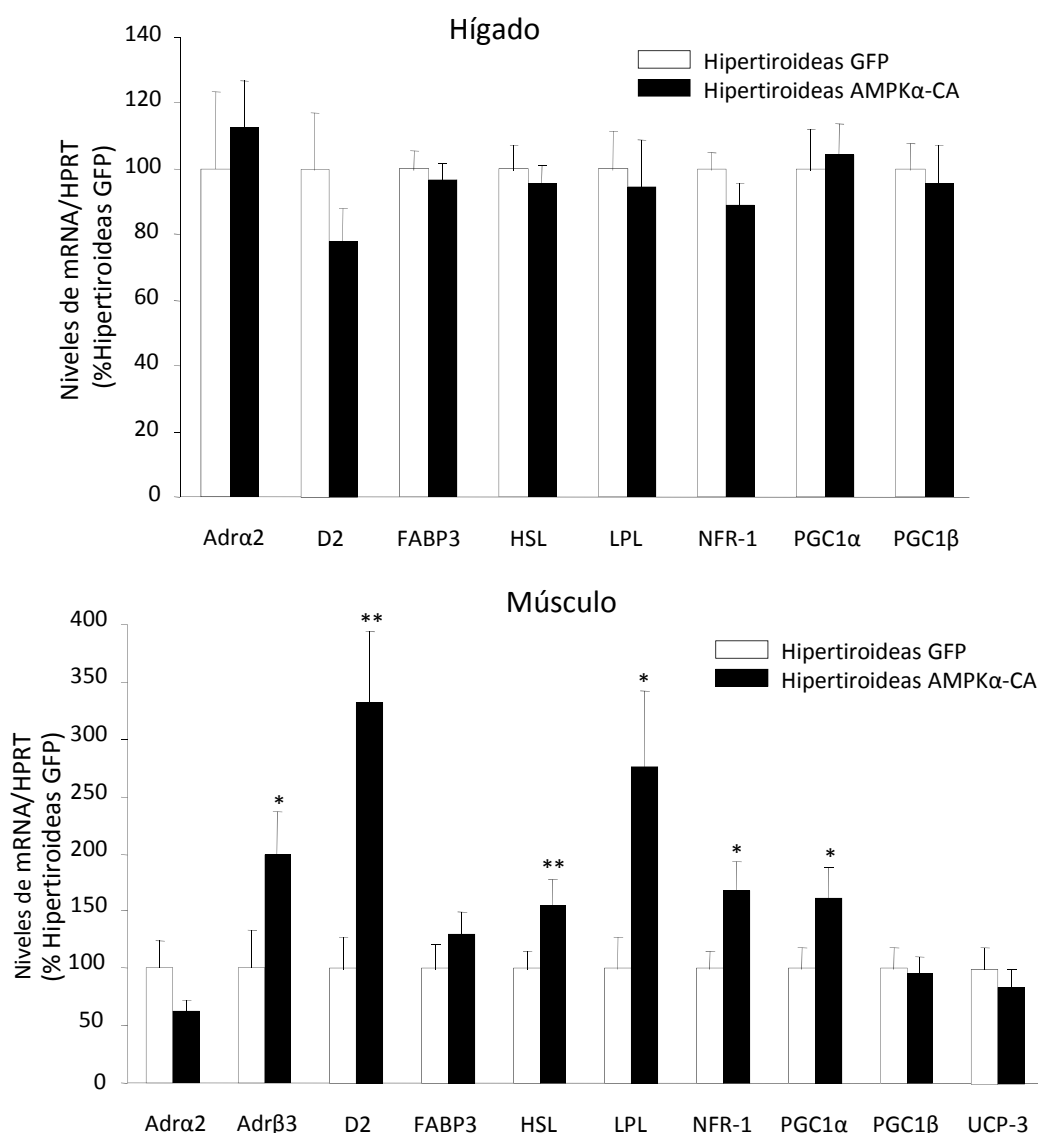


Figura 88. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en a) hígado y b) músculo tras la inoculación de los adenovirus AMPK α -CA en ratas hipertiroideas. *: P<0.05 y **: P<0.01 vs. GFP.

El análisis de otros tejidos periféricos, como hígado y músculo, demostró como los cambios vistos en termogénesis eran exclusivos del BAT, pues en hígado ninguno de los genes termogénicos se vio afectado por el tratamiento con los adenovirus AMPK α -CA (figura 88a), y en músculo el gen implicado en termogénesis más importante en este tejido, UCP-3, no tenía alterada su expresión a pesar de que otros, como LPL, D2 o PGC1 α si se viesan afectados (figura 88b).

Los resultados de este último experimento estaban en total consonancia con los obtenidos en los estudios anteriores, y demostraban una dependencia de la activación del programa termogénico en el BAT de ratas hipertiroideas con el estado del

metabolismo lipídico en el hipotálamo, y más concretamente en el VMH; es decir, los cambios en metabolismo lipídico en el VMH inducen cambios en el programa termogénico. En ninguno de los experimentos farmacológicos o genéticos llevados a cabo con el fin de inhibir la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo se observaron variaciones de masa corporal alguna en las ratas eutiroideas. Una explicación a este hecho fue que durante el estado eutiroideo la activación de AMPK era máxima, por lo que ninguna estimulo exógeno sería capaz de incrementarla. Con el fin de aclarar la relevancia de AMPK sobre el gasto energético en ratas eutiroideas, y de validar nuestra hipótesis, se realizó un estudio en que se inactiva AMPK genéticamente en el VMH mediante el uso de adenovirus dominantes negativos para AMPK α (AMPK α -DN).

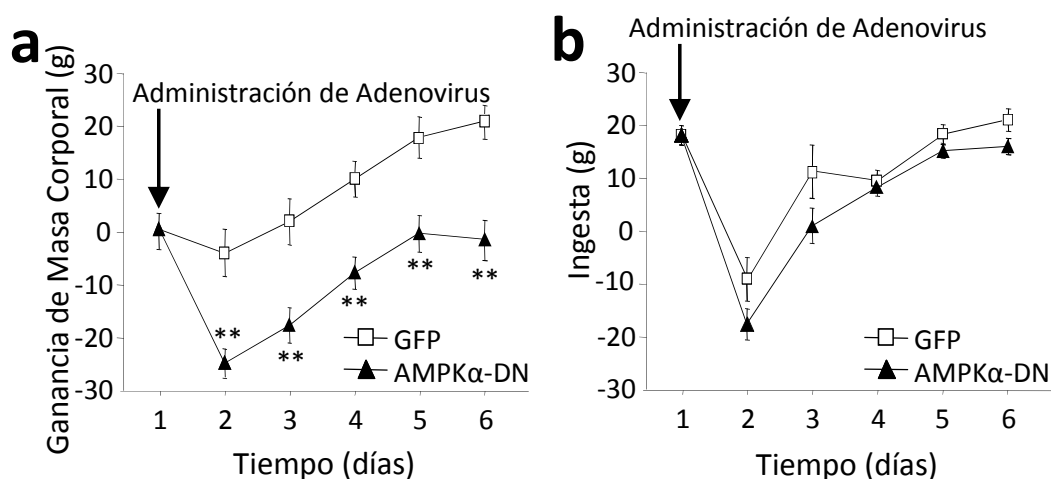


Figura 89. Evolución de a) ganancia de masa corporal y b) ingesta diaria tras la inoculación de adenovirus AMPK α -DN. **: P<0.01 vs. GFP.

Los resultados obtenidos mostraron que la inactivación de AMPK en el VMH promovía la ganancia de masa corporal en ratas eutiroideas sin afectar a la ingesta (figura 89) ni a los neuropéptidos hipotalámicos (figura 90).

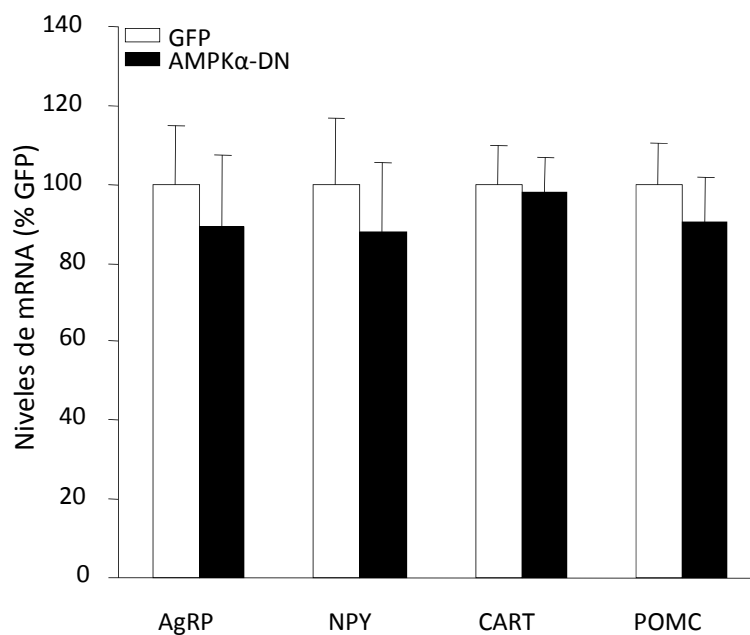


FIGURA 90. Efectos de la inoculación de los adenovirus AMPK α -DN sobre la expresión de mRNA de diferentes neuropéptidos hipotalámicos.

Además, la inoculación de AMPK α -DN causó el incremento en la concentración de malonil-CoA en el hipotálamo (figura 91).

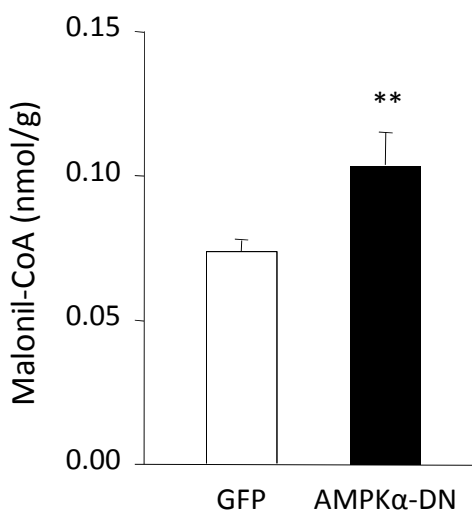


Figura 91. Niveles hipotalámicos de malonil-CoA tras la inoculación de los adenovirus AMPK α -DN. **: P<0.01 vs. GFP.

La menor ganancia de masa corporal sin variación en la ingesta llevó a pensar que estas ratas tenían un gasto energético elevado; es decir, a igual cantidad de comida ingerida perdían más masa porque consumían gran parte de las calorías de la dieta en

generar energía en forma de calor. Visto esto, estudiamos la expresión de los genes implicados en la termogénesis en el BAT (figura 92).

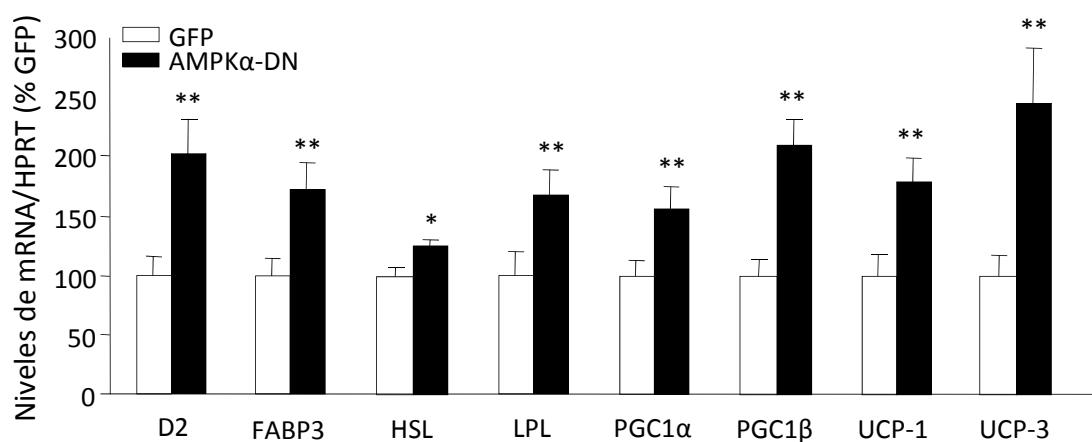


Figura 92. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras la inoculación de los adenovirus AMPK α -DN. *: P<0.05 y **: P<0.01 vs. GFP.

Tras el análisis, pudimos comprobar cómo en el BAT de los animales tratados con AMPK α -DN en el VMH, todos los genes involucrados en termogénesis adaptativa tenían incrementada su expresión, mostrando así que no solo se inducían cambios en termogénesis cuando AMPK se activaba, sino que también se producían, aunque en dirección contraria, cuando AMPK se inactivaba.

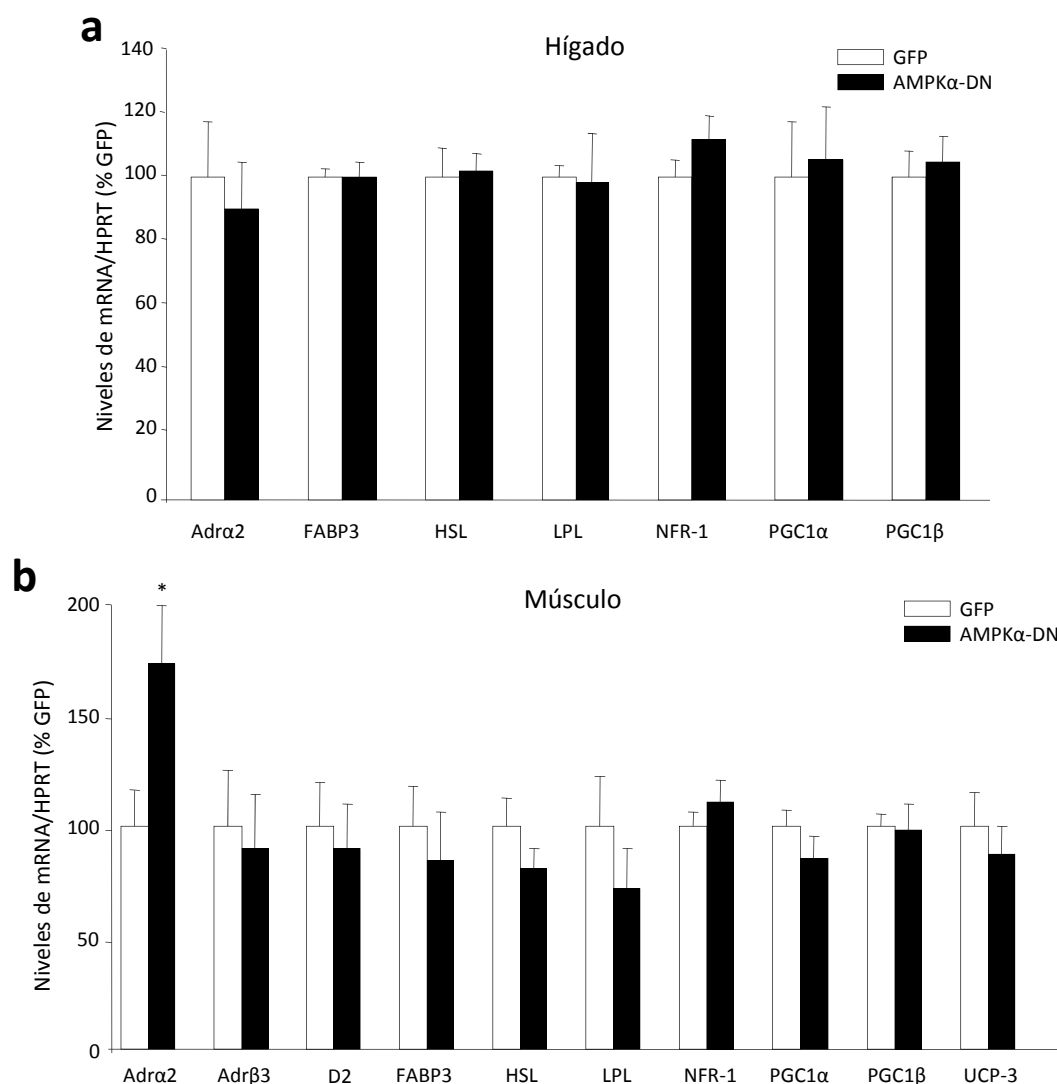


Figura 93. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en a) hígado y b) músculo tras la inoculación de los adenovirus AMPK α -DN. *: P<0.05 vs. GFP.

Es de destacar, que estos efectos sobre termogénesis tras la inactivación de AMPK eran específicos de BAT. En otros tejidos, tales como hígado y músculo no se observaron estas variaciones en la expresión de mRNA de los genes estudiados (figura 93).

Los datos presentados hasta el momento mostraban una clara relación entre lo que sucede a nivel hipotalámico, concretamente en el VMH, y los cambios que desencadenaba en el BAT. Desde hace años se sabe que el SNS une regiones hipotalámicas que controlan el balance energético y los adipocitos del BAT. Para investigar el SNA media la termogénesis inducida tras la activación/inhibición de la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo, empleamos un antagonista farmacológico de AR-

$\beta 3$, SR59230A, al igual que ya se realizó en el experimento con T3 ICV y que demostró que el SNS mediaba las acciones de las THs en el hipotálamo sobre el BAT. Los resultados obtenidos mostraron que la administración subcutánea de SR59230A en ratas con el adenovirus AMPK α -DN inoculado revertía la caída en masa corporal hasta valores de las ratas tratadas con los adenovirus que codificaban sólo GFP (figura 94).

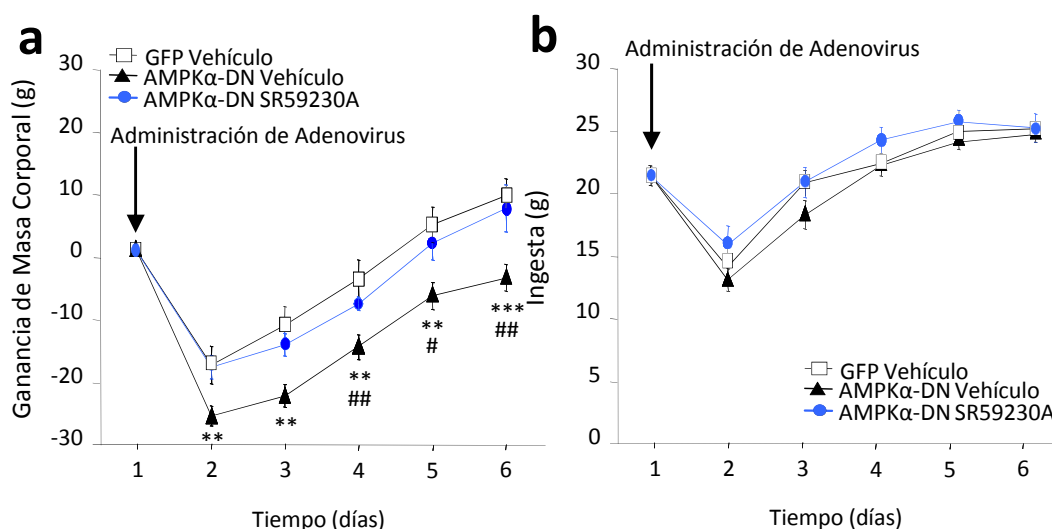


FIGURA 94. Evolución de la a) masa corporal y b) la ingesta durante el tratamiento con adenovirus AMPK α -DN y SR59230A. *: P<0.05, **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. GFP vehículo. #: P<0.05 y ##: P<0.01 vs. AMPK α -DN SR59230A.

Analizando los genes clave en la termogénesis de BAT se observó que el tratamiento con el antagonista reducía el incremento de expresión causado por los adenovirus AMPK α -DN a valores similares a los del grupo control (figura 95). En conjunto, estos resultados, indicaban que la activación de SNS era crucial para en la interconexión entre metabolismo lipídico en el hipotálamo y termogénesis en el BAT.

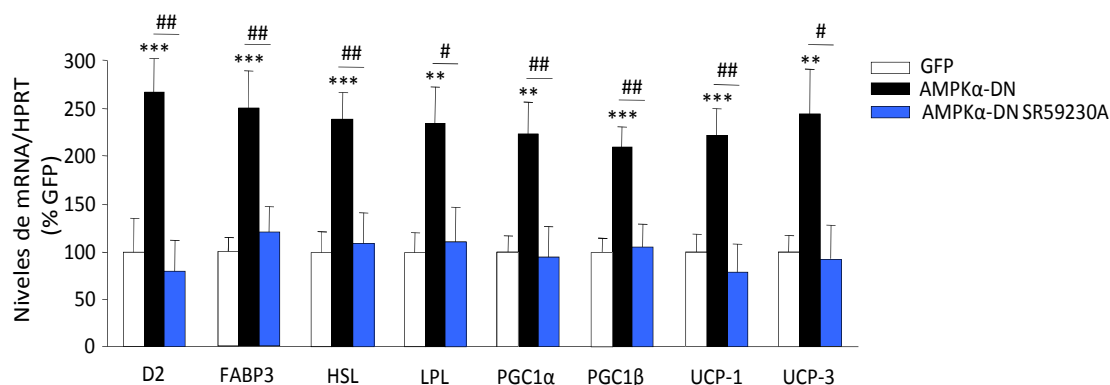


Figura 95. Niveles de mRNA de los genes implicados en la termogénesis adaptativa en BAT tras el tratamiento crónico con AMPK α -DN y SR59230A. **: P<0.01 y ***: P<0.001 vs. GFP vehículo. #: P<0.05 y ##: P<0.01 AMPK α -DN SR59230A.

CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE mTOR DURANTE EL HIPERTIROIDISMO

En los últimos años ha cobrado especial relevancia en la regulación de la ingesta el estudio de la vía de mTOR a nivel hipotalámico (310;315). Se ha descrito que la expresión de las proteínas de esta ruta varían de forma inversa a como lo hace AMPK (310). Hasta el momento todo el trabajo sobre regulación de la ingesta se ha realizado en torno al estudio de AMPK, pero dada su importancia y la relación funcional entre ambos sensores metabólicos (310) se ha caracterizado la vía de mTOR en el hipotálamo durante el estado de hipertiroidismo (figura 96).

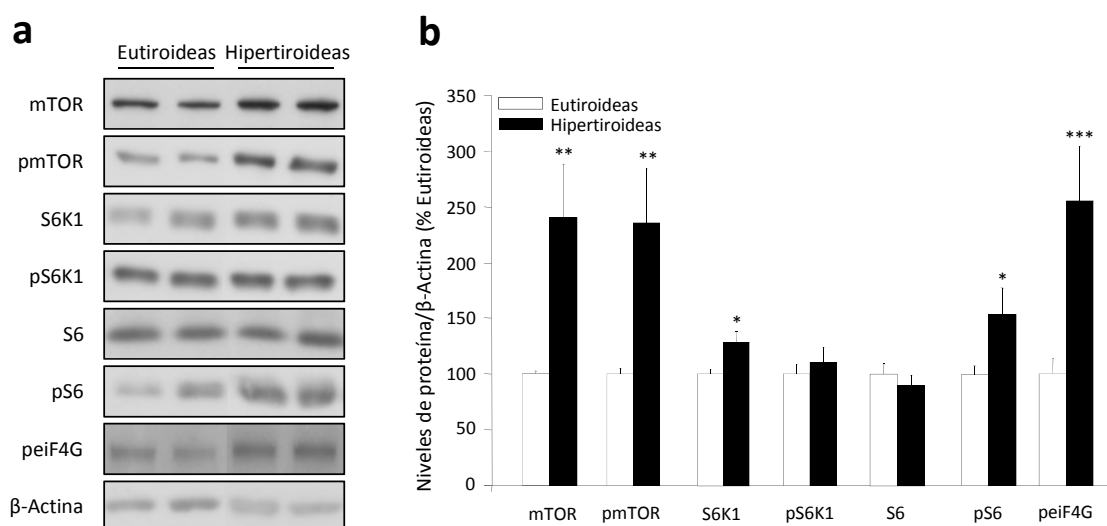


FIGURA 96. Efectos del hipertiroidismo sobre los niveles de proteína de la vía de mTOR en el hipotálamo. a) imágenes autorradiográficas de Western Blot, b) cuantificación de los niveles de proteína. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. Eutiroides.

El análisis de los datos demostró que la vía de mTOR estaba activada en hipertiroidismo, contrariamente a lo que ocurre con AMPK. A pesar del gran incremento observado tanto en mTOR como en pmTOR, su forma activa, su diana inmediata *downstream* (S6K1 y su forma fosforilada pS6K1) apenas muestra variaciones. Sin embargo, la diana final de la vía de mTOR, la proteína S6, presenta un incremento significativo en su activación. Una de las explicaciones de este hecho se debe a que S6K1 no es la única diana *downstream* de mTOR. Además de S6K1, mTOR actúa sobre 4E-BP1 a la que hiperfosforila y hace que rompa el complejo que forma con eiF4G, que una vez liberado se fosforila y se une al complejo de iniciación de la síntesis

de proteínas. En ratas hipertiroideas los niveles de proteína de *peiF4G* estaban muy incrementados lo que confirma la activación de la vía.

Siguiendo con el estudio de mTOR y viendo que el hipertiroidismo inducía alteraciones en esta vía, se investigó la verdadera influencia fisiológica de mTOR, utilizando un inhibidor selectivo, la rapamicina (figura 97). Al igual que en estudios anteriores se ha administrado el fármaco de modo ICV durante los últimos cuatro días del hipertiroidismo.

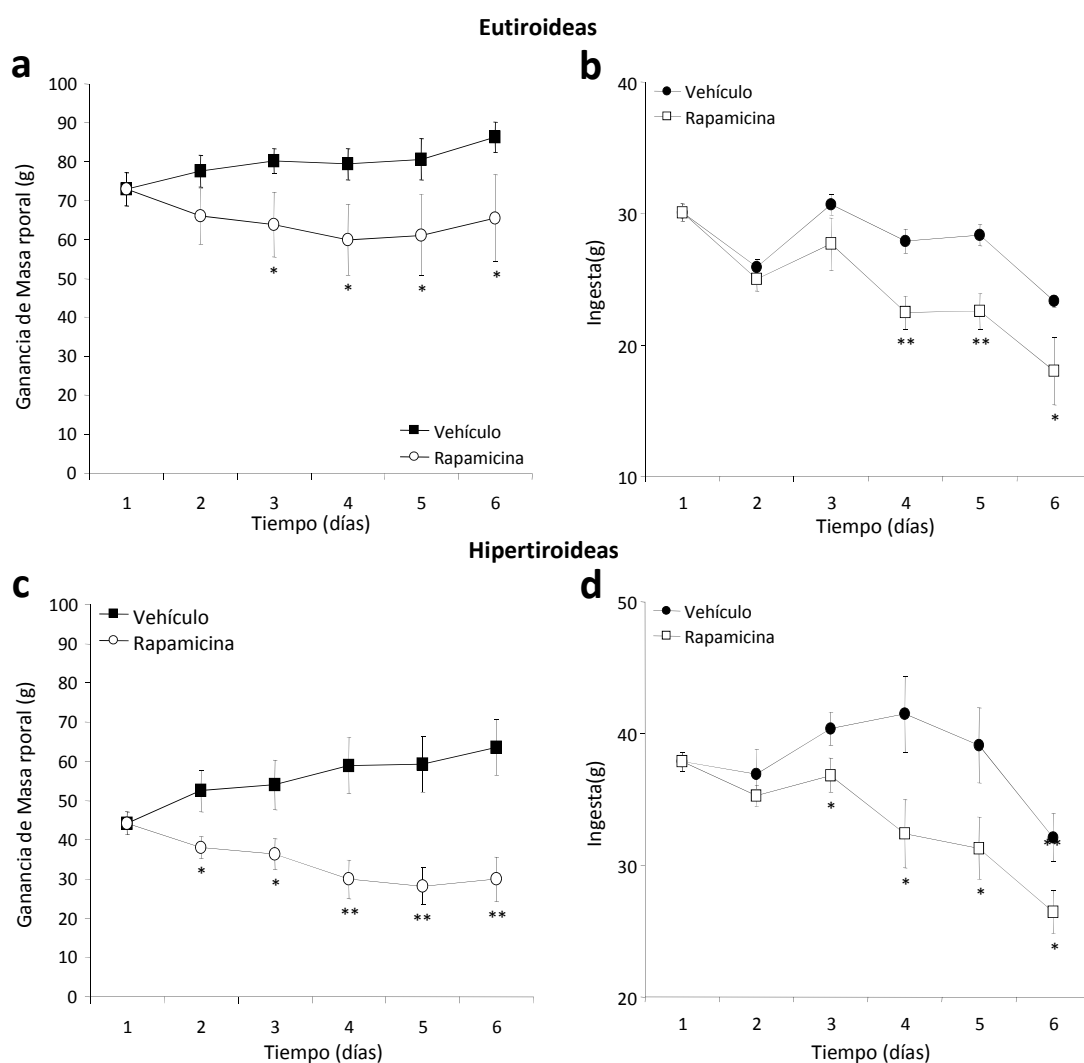


Figura 97. Evolución de la masa corporal y la ingesta durante el tratamiento con rapamicina en ratas eutiroideas (a y b) e hipertiroideas (c y d). *: $P < 0.05$ y **: $P < 0.01$ vs. vehículo.

La administración de rapamicina causó una gran pérdida de masa corporal asociada a una menor ingesta diaria tanto en animales eutiroideos como en

hipertiroideos (figura 97). Para comprobar si rapamicina actuaba sobre la vía, como control positivo del experimento, se estudiaron los niveles de esta proteína (figura 98).

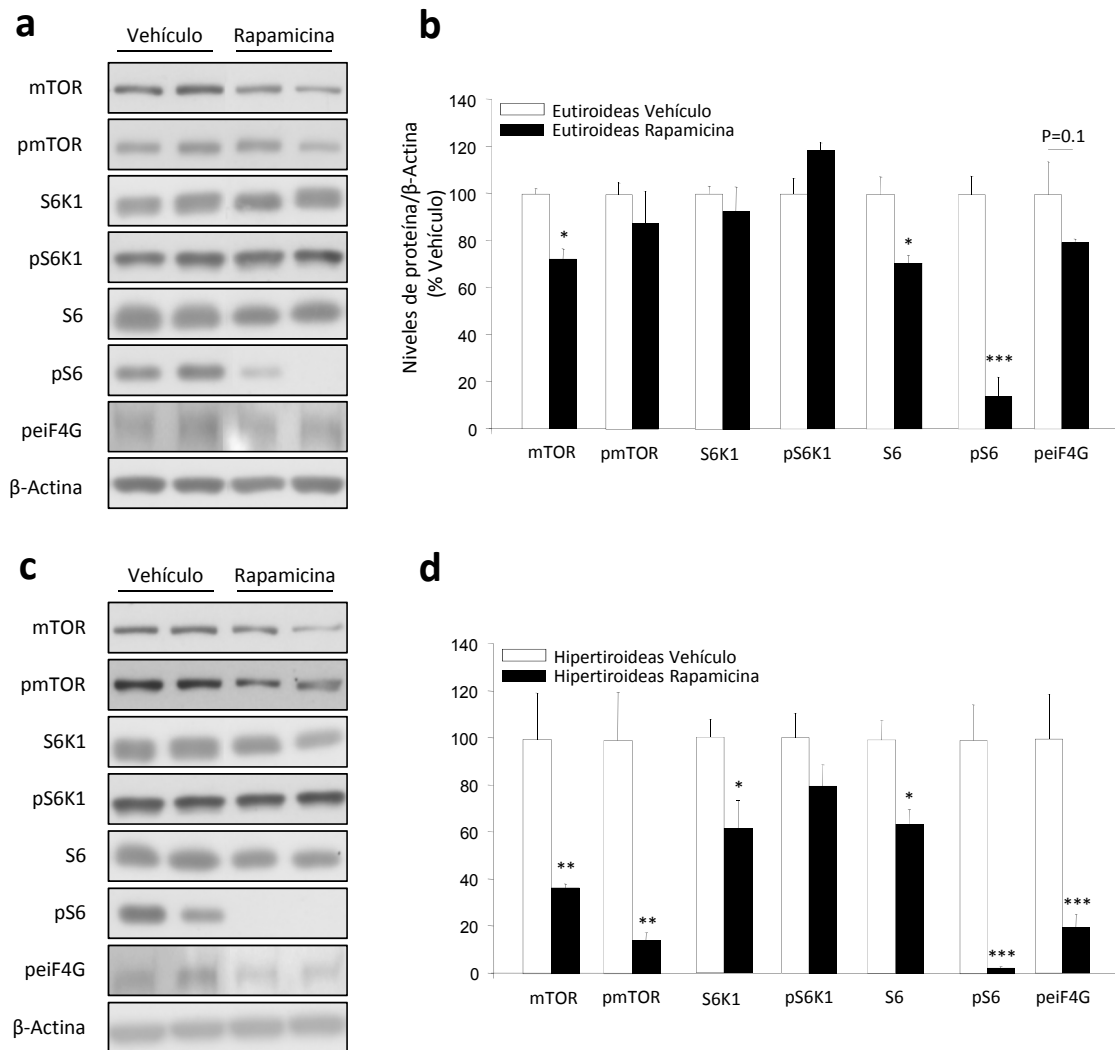


Figura 98. Efectos de la rapamicina sobre los niveles de proteína de la vía de mTOR en el hipotálamo de ratas eutiroides (a y b) e hipertiroideas (c y d). a) y c) imágenes autorradiográficas de Western Blot, b) y d) cuantificación de los niveles de proteína. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ y ***: $P < 0.001$ vs. vehículo.

Se pudo observar claramente cómo los efectos de la rapamicina eran muy potentes, llegando a inhibir casi completamente la fosforilación de la diana final de la vía mTOR, pS6. Las expresiones de las otras proteínas de la vía, S6K1 y S6, también se vieron afectadas por el tratamiento pero de modo mucho más leve. Además, viendo también los resultados de peiF4g, todos los datos hacían indicar que mTOR actuaba principalmente sobre la 4E-BP1 y eiF4G. Los efectos se hacían presentes en hipertiroidismo y en ratas eutiroides.

A pesar del evidente efecto anoréctico de la rapamicina, se quiso comprobar si la hipofagia inducida por el fármaco era debida al efecto directo del fármaco o si podía ser debida a que la rapamicina les causaba algún tipo de malestar o reacción adversa. Para ello, se realizó el clásico experimento de “*taste aversion*” (231;429;430)(figura 99).

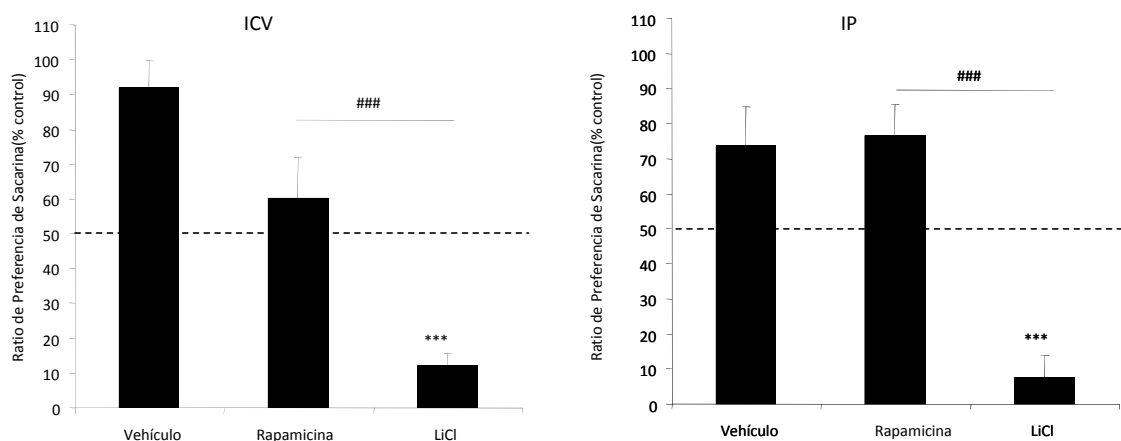


Figura 99. Ratio de preferencia de sacarina tras la administración a) ICV y b) IP de rapamicina. ***: $P < 0.001$ vs. vehículo. ###: $P < 0.001$ vs. rapamicina.

Los datos mostraron que la rapamicina administrada tanto central como periféricamente no producía ningún tipo de aversión hacia la comida; es decir, el efecto anoréctico era debido a la acción directa de la rapamicina sobre la ingesta y no se debe a efectos secundarios adversos

Finalmente, con el fin de estudiar cual era la causa de la hipofagia que inducía la rapamicina, se estudiaron los niveles de los neuropéptidos hipotalámicos en el ARC (figura 101).

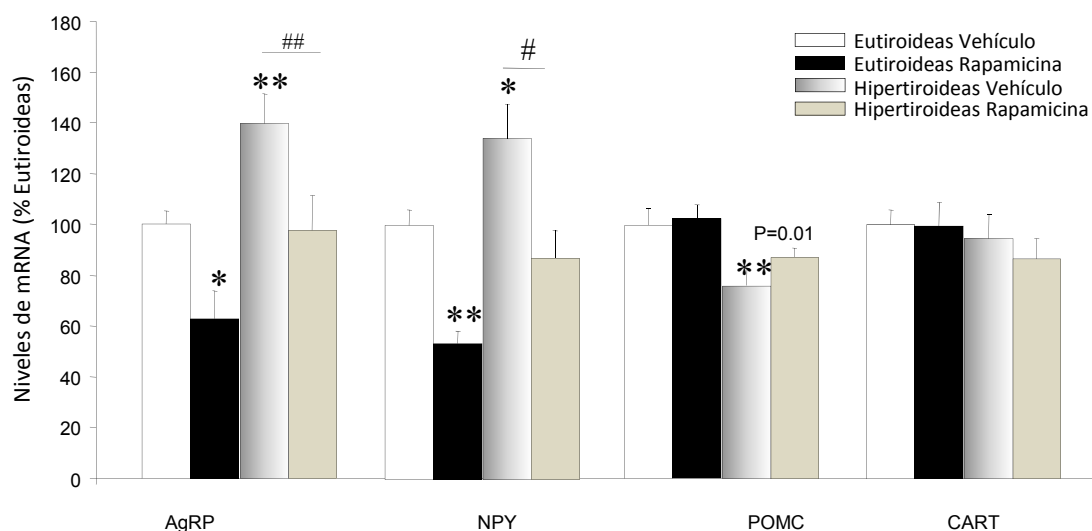


Figura 101. Efecto del tratamiento central con rapamicina sobre la expresión de diferentes neuropéptidos hipotalámicos en ratas eutiroides e hipertiroideas. *: $P<0.05$ y **: $P<0.01$ vs. eutiroides vehículo. #: $P<0.05$ y ##: $P<0.01$ vs. hipertiroideas vehículo.

Los resultados mostraron que la hipofagia que muestran las ratas tratadas con rapamicina concuerda con el análisis de la expresión de los neuropéptidos. La rapamicina causa un marcado descenso en la expresión de los neuropéptidos orexigénicos, AgRP y NPY. Además, en hipotiroideas la expresión de POMC muestra tendencia a elevarse. Estos resultados demuestran que la hipofagia está asociada a cambios en la expresión de los neuropéptidos orexigénicos tanto en ratas eutiroides como en hipertiroideas.

DISCUSIÓN

Desde hace años se sabe que las variaciones del estado tiroideo llevan asociadas importantes alteraciones en el balance energético. La aparición de un estado de hipertiroidismo o de hipotiroidismo provoca una desregulación tanto en ingesta como en gasto energético, que llevan a la aparición de fenotipos característicos: el hipertiroidismo causa la aparición de un fenotipo hiperfágico y delgado (320;445;446), y el hipotiroidismo se caracteriza por llevar asociada hipofagia y obesidad (321).

Es sabido que las THs tienen un papel estimulador muy importante sobre la actividad metabólica (138). Así, se han publicado diversos trabajos que dejan constancia de que la administración de T3 exógena induce un incremento en el gasto metabólico basal, que supone una mayor producción de energía en forma de calor (327;443;447;448). Este gran incremento en el gasto energético se asocia sobre todo con la inducción de la termogénesis en el BAT. Las calorías consumidas en estos procesos provienen tanto de los lípidos almacenados en el organismo, sobre todo en WAT, como de los ingeridos en la dieta diaria. En líneas generales se podría decir que la relación existente entre THs y gasto energético está más o menos bien definida; el hipertiroidismo causa delgadez debido a que el incremento en la concentración de THs induce una mayor producción de calor, que quema gran parte de las grasas acumuladas en el cuerpo y de la calorías ingeridas (138;443), mientras que el hipotiroidismo tiene efectos contrarios (443). La aparición de obesidad se debe a que el gasto energético está inhibido y por lo tanto no se consiguen consumir las calorías de la dieta con lo que se favorece su almacenamiento en forma de lípidos. Visto esto, se debe tener en cuenta que las THs no solo influyen en el gasto sino que también tienen potentes efectos sobre ingesta (348-351). Se ha publicado que la administración central de T3 provoca un gran incremento en ingesta (361), al igual que la inducción periférica de hipertiroidismo. La inducción del hipotiroidismo lleva asociada un descenso en la ingesta (350;351). En cuanto a los efectos que las THs causan sobre metabolismo lipídico debería decirse que casi la totalidad de los trabajos realizados hasta el momento se centran únicamente en tejidos periféricos (424-427). Así, a pesar de las contrariedades vistas en los diferentes estudios se puede afirmar que la administración de THs induce lipogénesis en WAT, mientras que en el resto de tejidos, como músculo, hígado o corazón, estimula la β -oxidación. Se ha descrito recientemente que el tratamiento central con T3 inhibe la síntesis de lípidos en el hipotálamo, aunque en este estudio se ha utilizado una dosis muy alta (428).

Se ha descrito de modo amplio que el metabolismo lipídico desempeña un papel clave en la regulación del homeostasis energética a nivel periférico (230). En los últimos años ha cobrado especial relevancia el estudio de su implicación en la regulación de la ingesta a nivel hipotalámico (23;231;281;283;293;299). Se ha publicado un gran número de trabajos que demuestran la relación existente entre la regulación del metabolismo de lípidos y el control de la ingesta. Así, de modo general se puede identificar un metabolito de la vía, el malonil-CoA, como una señal de saciedad (229). El incremento en los niveles hipotalámicos de esta molécula actúa como señal de abundancia suprimiendo la ingesta, mientras que una caída en los niveles conducen a un incremento de la ingesta y a una mayor ganancia de masa corporal. Esto se puede comprobar viendo los diferentes trabajos que consiguen alterar la ingesta activando o inhibiendo diferentes componentes de la ruta como AMPK, ACC o FAS de modo farmacológico o genético; es decir, variando los niveles hipotalámicos de malonil-CoA. Además, cabe destacar la importante relación funcional vista entre metabolismo lipídico y los clásicos sistemas de neuropéptidos (284;285); la supresión de la ingesta tras la inhibición de FAS o AMPK está parcialmente mediada tanto por la caída en los niveles de AgRP y NPY, como por el incremento en la expresión de POMC y CART (286).

En el presente trabajo se han investigado las implicaciones fisiológicas de la alteración del estado tiroideo, tanto del hipertiroidismo como del hipotiroidismo, y para ellos se han caracterizado los efectos observados tras la inducción de cada uno de ellos.

El hipertiroidismo regula el balance energético modificando neuropéptidos hipotalámicos y termogénesis en el BAT

La inducción de hipertiroidismo mediante el tratamiento crónico con T4 muestra, como era de esperar, una gran alteración tanto en masa corporal como en ingesta desde la primera semana, haciéndose mucho mayor a medida que el tiempo de tratamiento avanza. El hipertiroidismo provoca una disminución en la ganancia de masa corporal y un elevado incremento en la ingesta diaria, indicativos de la aparición del estado hipertiroides. Además, otros datos que indican que el tratamiento con T4 produce el efecto deseado son diversas medidas de hormonas en plasma: las concentraciones de T4 y T3 están incrementadas, mientras que TSH decae como consecuencia del mecanismo de retro-alimentación negativo que rige el eje tiroideo. El

análisis de la expresión de TRH en el PVH, en donde se observa que disminuye, concuerda perfectamente con los datos anteriores.

Investigando acerca del porqué de los datos de ingesta y de ganancia de masa corporal, se ha visto que la hiperfagia mostrada en el modelo hipertiroideo se asocia con el aumento en la expresión de neuropéptidos orexigénicos, AgRP y NPY, y a la disminución en la expresión de anorexigénicos, POMC, en el ARC así como a la disminución en los niveles de pFoxO1 y pSTAT3, que son dos factores de transcripción que modulan la expresión de POMC (449;450). Para intentar explicar el fenotipo delgado, que además concuerda con la disminución de peso de los depósitos de WAT, hemos estudiado uno de los procesos claves en el gasto energético: la termogénesis adaptativa (168;171). En el BAT, principal tejido termogénico, la expresión de los genes involucrados en este proceso muestra un fuerte efecto estimulador de las THs sobre termogénesis (326;412). Además, otros tejidos que llevan a cabo la termogénesis, como el músculo y el hígado, también muestran esta estimulación, sobre todo en PGC-1s y UCPs. Con estos resultados se puede explicar cómo a pesar de la hiperfagia del modelo se produce un fenotipo delgado: la mayor producción de energía debida a la inducción de la termogénesis, hace que una gran cantidad de las calorías ingeridas, así como de las almacenadas como lípidos, se consuman en este proceso.

El hipertiroidismo induce la activación de la síntesis de ácidos grasos a nivel hipotalámico

Una vez explicados los motivos de la aparición del fenotipo, se ha querido caracterizar el metabolismo lipídico en el hipotálamo. El análisis de proteína muestra como en hipertiroidismo decae la fosforilación AMPK y de ACC, y se incrementa la expresión de FAS; es decir, el hipertiroidismo induce lipogénesis en el hipotálamo. Los resultados observados a nivel proteína se correlacionan perfectamente con otras medidas obtenidas, tanto en mRNA de FAS, actividades de CPT-1 y AMPK α 1 y concentración de AMP. El estudio del metabolismo lipídico en otras áreas cerebrales, como el córtex, no muestra variación alguna, determinando así que los efectos de las THs a nivel central son visibles únicamente en hipotálamo. Se ha estudiado además, el metabolismo lipídico a nivel periférico, en donde se puede ver que en hígado el hipertiroidismo estimula lipogénesis, mientras que en músculo y WAT estimula la oxidación de ácidos grasos.

Como era de esperar, la activación de la vía de síntesis de lípidos lleva asociada el incremento en la concentración de malonil-CoA, y además se observa que es debido al estado tiroideo del animal, pues permanece invariable tras someterlo a restricción alimentaria, que en caso de un animal eutiroideo disminuye la concentración de malonil-CoA. Estos datos chocan con las observaciones descritas de que la inhibición de CPT-1 produce una respuesta anoréctica (288;451). Los resultados vistos tras la inhibición de FAS después de la administración central de cerulenin, que induce un incremento en la concentración de malonil-CoA sin disminuir ingesta, se pueden interpretar como que el hipertiroidismo provoca resistencia a los niveles de este metabolito que es la causante de la hiperfagia presente en el modelo.

La vía de mTOR media la hiperfagia inducida por el hipertiroidismo

Recientemente se han publicado diversos trabajos que muestran la importancia de la vía de señalización de mTOR en la regulación hipotalámica de la ingesta (310;315). Además se ha descrito una relación inversa de los niveles de esta ruta con los de la vía de AMPK (310); en de balance energético negativo, en donde AMPK está incrementada, mTOR se encuentra inhibida. Dados estos resultados previos, se ha querido caracterizar la vía de mTOR en el hipotálamo en un estado de hipertiroidismo; se ha observado un incremento en mTOR y en su forma fosforilada que se relaciona perfectamente con los niveles de AMPPK. Sin embargo, el efecto estimulatorio del hipertiroidismo se va perdiendo a medida que se avanza en el estudio de la vía. Uno de las explicaciones se debe a que mTOR no solo actúa sobre S6K1 sino que además lo hace sobre 4E-BP1 al cual fosforila haciendo que se separe de eIF4E que formará un complejo con eIF4G que activa en inicio de la traducción (312;313). Los datos de proteína indican que las acciones de mTOR pueden ir más por el camino de actuar sobre 4E-BP1 que sobre S6K1.

Para continuar con el estudio, se ha querido investigar acerca la verdadera relevancia fisiológica de la vía mTOR en el modelo hipertiroideo; los resultados de la inhibición de mTOR mediante el empleo de rapamicina muestran que este inhibidor muestra un potente efecto anorexigénico, que llega a revertir el aumento en ingesta que muestran las ratas hipertiroideas, asociado a una gran caída en la ganancia de masa corporal. Además, se puede comprobar que los efectos vistos se deben única y exclusivamente a los efectos de la rapamicina, pues se ha visto que no causa ningún tipo de aversión a las

ratas, y que disminuye los niveles de proteína de la vía, revirtiendo el incremento descrito durante el hipertiroidismo.

Se ha visto también que la hipofagia producida por la rapamicina se asocia directamente con una caída en los niveles de expresión de NPY y AgRP. Estos datos concuerdan perfectamente con estudios previos en los que se demuestra que en el hipotálamo, mTOR co-localiza en casi un 90% con las neuronas de AgRP/NPY y en aproximadamente un 45% con las de POMC/CART. Esto parece ser crucial en los efectos que mTOR tiene sobre ingesta (310). En el mismo trabajo muestran también que la reducción en la ingesta tras la inhibición de la vía mediante el empleo de leucina, causa una disminución en los niveles de expresión de NPY (310).

La hipofagia característica de los animales hipotiroideos es debida a la disminución de los niveles de AgRP en el ARC. La inducción de este estado causa a inhibición de la lipogénesis de novo en el hipotálamo, aunque de modo leve

Tras el estudio del hipertiroidismo, se ha llevado a cabo la caracterización del estado hipotiroideo. En cuanto a los efectos sobre ganancia de masa corporal e ingesta, se ha visto que el hipotiroidismo produce un marcado hipofagia, y a pesar del esperado fenotipo obeso, muestra una disminución en la ganancia de masa corporal. Los datos de parámetros plasmáticos concuerdan con los descritos: disminución de T4 y T3 e incremento de TSH, además de una mayor expresión de TRH en el PVH. La disminución de ingesta diaria se puede asociar con la disminución en la expresión de AgRP en el ARC. Los demás neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos permanecen inalterados tras el tratamiento con AMT. Por otra parte, la aparición del fenotipo delgado lleva a estudiar la termogénesis. A pesar de que en músculo e hígado la mayoría de los genes estudiados indican que la termogénesis está inhibida en el hipotiroidismo, en el BAT los resultados son indican que la expresión de UCP-1 y UCP-3 permanecer invariable, por lo que se puede pensar que es este el motivo de que no aparezca la obesidad esperada. Una de las explicaciones de este hecho lleva a pensar en que este modelo no sea capaz de mantener su temperatura corporal a 22-23°C, con lo que se ve obligado a incrementar la termogénesis y el consumo de calorías para producir calor. Debido a la hipofagia mostrada deben provenir gran parte de ellas de los lípidos almacenados en los depósitos grasos. Como ocurre en el caso de ratón *ucp-1^{-/-}* (207), podría esperarse que en condiciones de termoneutralidad (30°C) el modelo hipotiroideo presentase fenotipo obeso.

Al igual que en el caso del estado hipertiroideo, se ha estudiado la modulación del metabolismo lipídico a nivel central en ratas hipotiroideas. El análisis de los datos muestra como en este modelo el metabolismo se ve menos alterado, no hay variaciones en la fosforilación de AMPK ni de ACC y tan solo se incrementan los niveles totales de AMPK α 1 y disminuyen los de FAS; es decir, el hipotiroidismo, al contrario que el hipertiroidismo, inhibe lipogénesis en el hipotálamo. El estudio de los tejidos periféricos muestra que tanto en hígado, músculo y WAT, el tratamiento con AMT reduce los niveles de pAMPK y de pACC, y que además también se ven reducidos los de FAS. La explicación de esta caída en los niveles de FAS puede ser una medida de prevención contra el excesivo acúmulo de grasas que deberían de ser incluso mayores a una temperatura de estabulación termoneutral.

Los efectos vistos en termogénesis y metabolismo lipídico hipotalámico durante el hipertiroidismo son debidos a las acciones de la THs a nivel hipotalámico y más concretamente en el VMH

Tras el estudio de los dos modelos usados en este trabajo, y visto que el estado hipertiroideo está mejor definido en lo que se refiere a ganancia de masa corporal, termogénesis y metabolismo lipídico, se han seguido investigando los efectos de las THs en el hipertiroidismo. Teniendo en cuenta los resultados que indicaban que la lipogénesis *de novo* está incrementada a nivel hipotalámico durante un estado de hipertiroidismo, se ha llevado a cabo el análisis de las especies lipídicas presentes en este modelo. Los cambios vistos en los enzimas de la vía de síntesis de ácidos grasos se asocian con un incremento en la concentración de casi la totalidad de los complejos lipídicos analizados. Estos cambios, al igual que los de los enzimas, son exclusivos de hipotálamo pues en córtex de no se aprecia dicha variación. Además, cabe destacar que todos los enzimas responsables de la síntesis de estos lípidos complejos están también incrementados en hipotálamo de ratas hipertiroideas.

A pesar de todos estos resultados, aún queda por determinar si los efectos que muestran las THs sobre metabolismo lipídico hipotalámico y termogénesis son debidos a las acciones de las THs circulantes o a las acciones directas sobre el hipotálamo. Los resultados del tratamiento con T3 ICV, que producen una caída en la masa corporal sin afectar a la ingesta, muestran efectos similares a los observados tras la inducción de hipertiroidismo en lipogénesis y en termogénesis en BAT únicamente; en hígado y músculo no se ve ningún efecto. Esto indica, por una parte que las funciones de las THs

sobre ambos procesos son debidas a sus acciones directas a nivel central, y por otra parte sugiere una posible relación entre los cambios del metabolismo lipídico hipotalámico y la termogénesis en BAT. La afirmación de que los efectos de las THs se deben a sus acciones a nivel central y no a nivel periférico se apoya además en que la administración de T3 a ratas hipotiroideas induce los mismos cambios sobre termogénesis que los visto en ratas eutiroideas, y que las administración de T3 IP no causa ningún cambio ni sobre metabolismo ni sobre termogénesis, excluyendo la posibilidad de que dichos efectos se deban a la difusión de T3 desde el CSF a la sangre. Contrariamente al hipotálamo, la administración de T3 produce variaciones únicamente en el hígado de ratas eutiroideas, en donde disminuye los niveles de pAMPK y de pACC, e incrementa los de FAS para activar lipogénesis. Estos datos indican que las acciones centrales de T3 sobre el metabolismo hepático dependen del estado tiroideo.

A continuación, se estudió la relevancia funcional de nuestros datos y la posible implicación del SNS en la transmisión de la señal desde el hipotálamo al BAT. En este sentido, se ha descrito que la regulación del proceso termogénico está mediada por el SNS, que se encarga de hacer llegar los estímulos procedentes del hipotálamo hasta el BAT (452). En nuestro modelo, la inhibición farmacológica del β 3-AR revierte los cambios inducidos por la administración de T3 en ganancia de masa corporal y termogénesis en BAT, mostrando así que el perfecto funcionamiento de SNS es fundamental para una correcta activación de la termogénesis tras la administración central de T3. Datos de tratamientos agudos de T3, tanto de modo ICV como en el VMH, apoyan de modo más fuerte la hipótesis de que las THs influyen sobre metabolismo lipídico hipotalámico y sobre termogénesis, mostrando una fuerte activación del SNS. Además, se ha visto que la administración de T3 ICV también produce un pronunciado incremento en la actividad neuronal, cuantificada como células inmuno-reactivas de c-fos, en el RpA y el IO, que son núcleos que reciben señales provenientes del VMH hacia las neuronas intermediolaterales y la cadena simpática, que inervan el BAT(170).

Hasta el momento se ha demostrado que 1) los efectos de las THs sobre metabolismo lipídico son debidas a sus acciones centrales y que 2) la administración de T3 ICV tiene un efecto estimulador clave sobre la termogénesis en BAT. Esta última afirmación es de gran relevancia debido a que hasta el momento se creía que los efectos de las THs sobre termogénesis se debían únicamente a sus acciones a nivel periférico.

Para analizar la contribución relativa de las acciones centrales de la T3 frente a las periféricas, procedimos a la ablación genética de los TRs en el VMH, el núcleo hipotalámico clave en este aspecto. Tras la ablación genética de TR mediante el empleo de adenovirus dominantes negativos para estos receptores se confirmó esa conclusión. En el hipotálamo, la T3 se une a los TRs para llevar a cabo sus efectos, durante el hipertiroidismo, las concentraciones elevadas de T3 en el hipotálamo activan los TRs para desempeñar distintas funciones. Es este experimento, la ablación de los TRs en el VMH (en donde co-localiza con pAMPK) durante la inducción del hipertiroidismo revierte los efectos de este tanto en ganancia de masa corporal como en termogénesis en el BAT.

La activación/inactivación de la termogénesis en el BAT es debida a los cambios en el metabolismo lipídico hipotalámico producidos por las THs; esta relación entre ambos procesos está mediado por el SNS

Viendo algunos de los resultados anteriores se había postulado la posibilidad de la existencia de una relación entre el metabolismo lipídico hipotalámico y el proceso termogénico en BAT. Tras los resultados obtenidos con los estudios anteriores, se ha intentado indagar sobre esta hipotética relación funcional entre ambos procesos. Los primeros datos que vienen a demostrar con claridad la existencia de una conexión entre metabolismo lipídico y termogénesis proceden de estudios con el empleo de inhibidores de la lipogénesis: AICAR, un activador de AMPK, y TOFA, un inhibidor de ACC. Ambos compuestos desencadenan, como es de esperar, los mismos resultados. La inhibición de la vía de síntesis de ácidos grasos en el hipotálamo revierte el incremento en la concentración de malonil-CoA en ratas hipertiroideas, lo que no causa cambios en ingesta. Sin embargo, la administración crónica de estos compuestos provoca en las ratas hipertiroideas un incremento en la ganancia de masa corporal, similar a la observada en ratas eutiroideas. Este efecto va acompañado de una disminución en la expresión del programa termogénico en el BAT, concretamente. La inhibición de la lipogénesis en el hipotálamo de modo farmacológico causa la reducción en la expresión de UCP-1 y UCP-3 en el BAT.

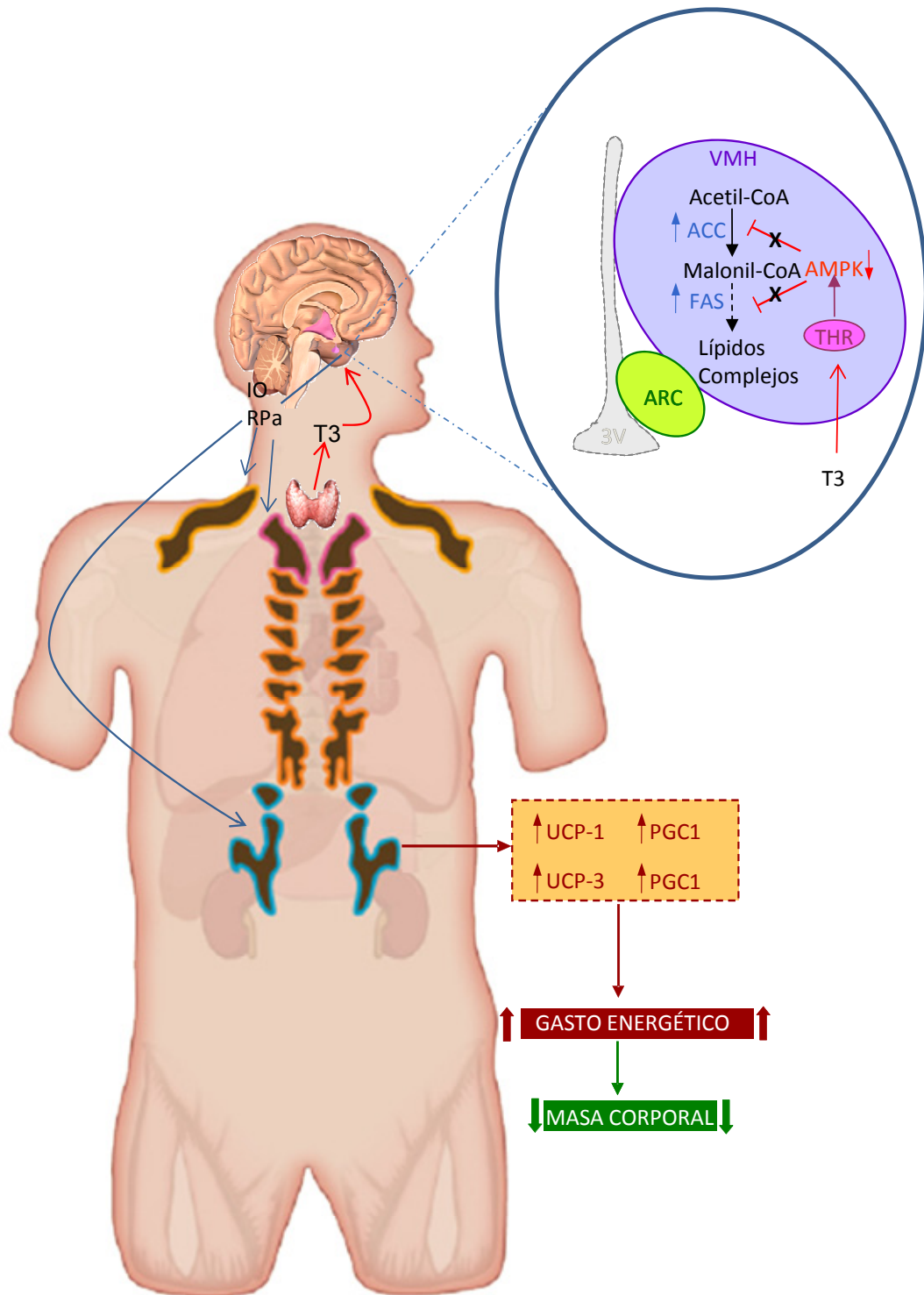
Además de los datos farmacológicos que apoyan la idea de la relación entre la síntesis hipotalámica de lípidos y termogénesis, y dada a importancia del VMH en ambos procesos, pues se ha descrito que AMPK integra señales periféricas en este núcleo y que la estimulación eléctrica del VMH provoca la activación del BAT, se ha

visto que la activación genética de AMPK en este núcleo también previene la pérdida de masa corporal característica del hipertiroidismo y reduce únicamente la activación del BAT, como se puede ver observando la expresión de UCP-1, UCP-3, PGC-1 α y PGC-1 β , sin afectar a otros tejidos como hígado o músculo.

También se ha demostrado que la inactivación de genética de AMPK en el VMH provoca la acumulación de malonil-CoA e induce una menor ganancia de masa corporal, que además se asocia con el incremento en la activación de la termogénesis en BAT de manera específica. Del mismo modo que ocurre con la administración de T3 ICV, este incremento en la expresión de los genes involucrados en termogénesis, así como en la reducción de masa corporal, se ve revertido tras el tratamiento con el antagonista selectivo de AR- β 3, SR59230A, indicando que la alteración del metabolismo lipídico en el hipotálamo produce la modulación de SNS.

Globalmente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran la existencia de un nuevo mecanismo fisiológico que relaciona el metabolismo lipídico en el hipotálamo, más concretamente en el VMH con la regulación, además de la ingesta (23), con el gasto energético (453). De hecho, las consecuencias del hipertiroidismo sobre la ganancia de masa corporal se pueden explicar en base a la acción de este mecanismo. Las implicaciones de estos datos en el caso de humanos son de gran interés. Desde hace bastantes años el BAT ha recibido gran atención como principal lugar de termogénesis tanto en roedores como en humanos, aunque en adultos su relevancia se ha visto recientemente; los últimos estudios demuestran la existencia de una correlación inversa entre el BMI y la cantidad BAT, así como la importancia que muestra en la respuesta a la exposición al frío (181-183). Este trabajo proporciona indicaciones de que la activación o inhibición de la lipogénesis en el VMH es capaz de hacer desencadenar alteraciones en termogénesis en BAT. Así, en una situación de balance energético negativo como el hipertiroidismo, se ha demostrado que los cambios encontrados en metabolismo lipídico en el hipotálamo se deben mayoritariamente a las acciones directas de las THs a nivel central, y que estas alteraciones, tanto en el hipotálamo como en el VMH, son las causantes de la activación/inhibición de la termogénesis en BAT a través de la modulación del SNS.

CONCLUSIONES



Tras los resultados obtenidos en la realización de este trabajo se puede concluir que:

- El efecto de las hormonas tiroideas sobre la homeostasis del peso corporal es ejercido fundamentalmente a nivel hipotalámico, concretamente en el VMH.
- El mecanismo de acción a través del cual las hormonas tiroideas desencadenan dicho efecto está mediado por una vía de señalización que incluye pAMPK, pACC, malonil-CoA y FAS.
- La activación de dicha vía produce cambios en la actividad del SNS que da lugar a un incremento en termogénesis en el BAT mediado por UCP-1
- Además, las hormonas tiroideas regulan la vía de mTOR a nivel hipotalámico, produciéndose un incremento en ella durante el hipertiroidismo. La inhibición farmacológica de la vía revierte la hiperfagia característica del hipertiroidismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Spiegelman BM, Flier JS** 2001 Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543
2. **Rossner S** 2002 Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 4:S2-S4
3. **Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK** 2008 Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* 16:2323-2330
4. **Lopez M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A** 2007 Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 29:248-261
5. **Redinger RN** 2009 Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res* 154:52-60
6. **Friedman JM** 2009 Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 459:340-342
7. **Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Williams LM, Dieguez C** 2007 Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66:131-155
8. **Halford JC, Blundell JE** 2000 Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res* 54:25-58
9. **Woods SC, D'Alessio DA** 2008 Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S37-S50
10. **Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG** 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671
11. **Woods SC** 2005 Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav* 86:709-716
12. **Foster-Schubert KE, Cummings DE** 2006 Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev* 27:779-793
13. **Gibbs J, Young RC, Smith GP** 1973 Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245:323-325
14. **Badman MK, Flier JS** 2005 The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307:1909-1914
15. **Raybould HE** 2007 Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol* 7:570-574
16. **Moran TH, Kinzig KP** 2004 Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G183-G188
17. **Woods SC** 2009 The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. *Cell Metab* 9:489-498

18. **West DB, Fey D, Woods SC** 1984 Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol* 246:R776-R787
19. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K** 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
20. **Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL** 2008 Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396
21. **Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913
22. **Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547
23. **Lopez M, Lage R, Saha AK, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodriguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castaneda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschop MH, Dieguez C, Vidal-Puig A** 2008 Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7:389-399
24. **Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS** 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719
25. **Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M** 2003 Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5510-5514
26. **Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS** 2004 Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1319-1324
27. **Ballinger A, McLoughlin L, Medbak S, Clark M** 1995 Cholecystokinin is a satiety hormone in humans at physiological post-prandial plasma concentrations. *Clin Sci (Lond)* 89:375-381
28. **Kissileff HR, Carretta JC, Geliebter A, Pi-Sunyer FX** 2003 Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R992-R998
29. **Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, Starlinger M, Eichner M, Raybould HE, Becker HD, Jehle EC** 1999 C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res* 846:1-11
30. **Cummings DE, Overduin J** 2007 Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23
31. **Mendieta-Zeron H, Lopez M, Dieguez C** 2008 Gastrointestinal peptides controlling body weight homeostasis. *Gen Comp Endocrinol* 155:481-495

32. **Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology* 142:4244-4250
33. **Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR** 2004 Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145:2687-2695
34. **Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Goke B** 1992 Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 22:283-291
35. **Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR** 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69-72
36. **Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgard MJ, Juul HJ, Astrup A** 2001 The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1206-1214
37. **Tatemoto K, Mutt V** 1980 Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285:417-418
38. **Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR** 2002 Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418:650-654
39. **Keire DA, Mannon P, Kobayashi M, Walsh JH, Solomon TE, Reeve JR, Jr.** 2000 Primary structures of PYY, [Pro(34)]PYY, and PYY-(3-36) confer different conformations and receptor selectivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G126-G131
40. **Lumb KJ, DeCarr LB, Milardo LF, Mays MR, Buckholz TM, Fisk SE, Pellegrino CM, Ortiz AA, Mahle CD** 2007 Novel selective neuropeptide Y2 receptor PEGylated peptide agonists reduce food intake and body weight in mice. *J Med Chem* 50:2264-2268
41. **Conlon JM** 2002 The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* 23:269-278
42. **Hameed S, Dhillon WS, Bloom SR** 2009 Gut hormones and appetite control. *Oral Dis* 15:18-26
43. **Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR** 2003 Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3989-3992
44. **Whitcomb DC, Taylor IL, Vigna SR** 1990 Characterization of saturable binding sites for circulating pancreatic polypeptide in rat brain. *Am J Physiol* 259:G687-G691
45. **Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S** 2008 UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846-851

46. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
47. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
48. **Banks WA** 2006 The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. *Physiol Behav* 89:472-476
49. **Bjorntorp P** 1997 Hormonal control of regional fat distribution. *Hum Reprod* 12 Suppl 1:21-25
50. **Dusserre E, Moulin P, Vidal H** 2000 Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1500:88-96
51. **Coleman DL** 1973 Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294-298
52. **Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK** 2000 Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21:263-307
53. **Tartaglia LA** 1997 The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096
54. **Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ** 2001 Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484
55. **Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG** 2005 AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15-25
56. **Havel PJ** 2004 Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-S151
57. **Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y** 2001 Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133
58. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T** 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295
59. **Shulman GI** 2000 Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176
60. **Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C** 2003 Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 548:21-27

61. **Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castaneda TR, Vazquez MJ, Morris A, Williams LM, Dickson SL, Dieguez C** 2005 Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol* 153:R1-R5
62. **Vazquez MJ, Gonzalez CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Lopez M, Dieguez C** 2008 Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 149:4534-4543
63. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA** 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312
64. **Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS** 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53:1671-1679
65. **Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW** 2004 Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282
66. **Ruan H, Lodish HF** 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447-455
67. **Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W** 2003 Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care* 26:1362-1368
68. **Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO** 2002 Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75-79
69. **De Benedetti F., Alonzi T, Moretta A, Lazzaro D, Costa P, Poli V, Martini A, Ciliberto G, Fattori E** 1997 Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J Clin Invest* 99:643-650
70. **Gao Q, Horvath TL** 2008 Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* 582:132-141
71. **ANAND BK, BROBECK JR** 1951 Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77:323-324
72. **STELLAR E** 1954 The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61:5-22
73. **Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ** 2001 The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S63-S67
74. **Coll AP, Yeo GS, Farooqi IS, O'Rahilly S** 2008 SnapShot: the hormonal control of food intake. *Cell* 135:572

75. **Broadwell RD, Brightman MW** 1976 Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol* 166:257-283
76. **Dietrich MO, Horvath TL** 2009 Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci* 30:1688-1696
77. **Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW** 1998 Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1:271-272
78. **Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK** 1998 Leptin activates hypothalamic *CART* neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375-1385
79. **Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S** 1998 Hypothalamic *CART* is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76
80. **Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA** 1991 Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260:R328-R334
81. **Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickingler A, Lechan RM** 2002 Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 143:4513-4519
82. **Morley JE, Hernandez EN, Flood JF** 1987 Neuropeptide Y increases food intake in mice. *Am J Physiol* 253:R516-R522
83. **Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD** 1990 Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127:730-737
84. **Sanchez-Lasheras C, Konner AC, Bruning JC** 2010 Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol* 31:4-15
85. **Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD** 1996 Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-421
86. **Thorsell A, Heilig M** 2002 Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 36:182-193
87. **Marsh DJ, Miura GI, Yagaloff KA, Schwartz MW, Barsh GS, Palmiter RD** 1999 Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic *agouti*-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res* 848:66-77
88. **Ste ML, Luquet S, Cole TB, Palmiter RD** 2005 Modulation of neuropeptide Y expression in adult mice does not affect feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18632-18637
89. **Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC** 2005 *Agouti*-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8:1289-1291

90. **Cone RD** 2005 Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-578
91. **Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S** 2004 Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2557-2562
92. **Abbott CR, Rossi M, Kim M, AlAhmed SH, Taylor GM, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR** 2000 Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res* 869:203-210
93. **Benoit SC, Schwartz MW, Lachey JL, Hagan MM, Rushing PA, Blake KA, Yagaloff KA, Kurylko G, Franco L, Danhoo W, Seeley RJ** 2000 A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neurosci* 20:3442-3448
94. **Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD** 1997 Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168
95. **Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F** 1997 Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141
96. **Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD** 2000 A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141:3518-3521
97. **Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van Der Ploeg LH** 2000 Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 26:97-102
98. **Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P** 1998 A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20:113-114
99. **Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S** 1998 A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111-112
100. **Brown KS, Gentry RM, Rowland NE** 1998 Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Regul Pept* 78:89-94
101. **Tsujii S, Bray GA** 1989 Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull* 23:165-169
102. **Bergendahl M, Wiemann JN, Clifton DK, Huhtaniemi I, Steiner RA** 1992 Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology* 56:913-920

103. **Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M** 1990 Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52:441-447
104. **Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houtp TA** 2002 Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R1020-R1026
105. **Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ** 2000 Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-R52
106. **Hagan MM, Rushing PA, Benoit SC, Woods SC, Seeley RJ** 2001 Opioid receptor involvement in the effect of AgRP- (83-132) on food intake and food selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R814-R821
107. **Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS** 1999 Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68-100
108. **Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB** 1999 From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22:221-232
109. **Zheng H, Corkern MM, Crousillac SM, Patterson LM, Phifer CB, Berthoud HR** 2002 Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1773-R1781
110. **Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P** 2000 Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8:590-596
111. **Li HY, Hwang HW, Hu YH** 2002 Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 323:203-206
112. **Obici S, Rossetti L** 2003 Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* 144:5172-5178
113. **Horvath TL, Diano S, Tschop M** 2004 Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* 10:235-246
114. **Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmqvist JK** 1998 Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442-459
115. **Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH** 2001 The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74:683-701
116. **Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S** 2005 Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 85:1131-1158

117. **Tejwani GA, Richard CW, III** 1986 Effect of electrolytic and chemical ventromedial hypothalamic lesions on food intake, body weight, analgesia and the CNS opioid peptides in rats and mice. *NIDA Res Monogr* 75:497-500
118. **Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP** 2002 Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy. *Endocrinology* 143:4409-4421
119. **Everitt BJ, Hokfelt T** 1990 Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 47:1-15
120. **Bouali SM, Fournier A, St-Pierre S, Jolicoeur FB** 1995 Effects of NPY and NPY2-36 on body temperature and food intake following administration into hypothalamic nuclei. *Brain Res Bull* 36:131-135
121. **Lopez-Valpuesta FJ, Nyce JW, Griffin-Biggs TA, Ice JC, Myers RD** 1996 Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hyperthermia and feeding in rats. *Proc Biol Sci* 263:881-886
122. **Harrold JA, Widdowson PS, Williams G** 1999 Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* 48:267-271
123. **Wisialowski T, Parker R, Preston E, Sainsbury A, Kraegen E, Herzog H, Cooney G** 2000 Adrenalectomy reduces neuropeptide Y-induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. *J Clin Invest* 105:1253-1259
124. **Li YZ, Davidowa H** 2004 Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J Neurosci Res* 77:596-602
125. **Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelman EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr, Elmquist JK, Lowell BB** 2006 Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49:191-203
126. **Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N, Schimmer BP** 2002 Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57:19-36
127. **Davis AM, Seney ML, Stallings NR, Zhao L, Parker KL, Tobet SA** 2004 Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol* 60:424-436
128. **Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL** 2002 Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143:607-614
129. **Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF** 2003 Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-742

130. **Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El GA, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'Rahilly S, Farooqi IS** 2006 Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55:3366-3371
131. **Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS** 2004 A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7:1187-1189
132. **Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB** 2004 AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428:569-574
133. **Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M** 1988 Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology* 47:384-388
134. **Fekete C, Lechan RM** 2007 Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol* 28:97-114
135. **Gereben B, Pachucki J, Kollar A, Liposits Z, Fekete C** 2004 Ontogenic redistribution of type 2 deiodinase messenger ribonucleic acid in the brain of chicken. *Endocrinology* 145:3619-3625
136. **Weintraub BD, Gesundheit N, Taylor T, Gyves PW** 1989 Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. *Ann N Y Acad Sci* 553:205-213
137. **Yamada M, Saga Y, Shibusawa N, Hirato J, Murakami M, Iwasaki T, Hashimoto K, Satoh T, Wakabayashi K, Taketo MM, Mori M** 1997 Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10862-10867
138. **Lechan RM, Fekete C** 2006 The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153:209-235
139. **Richard D, Baraboi D** 2004 Circuitries involved in the control of energy homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Treat Endocrinol* 3:269-277
140. **Gooley JJ, Schomer A, Saper CB** 2006 The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9:398-407
141. **Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J** 2003 Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23:10691-10702
142. **Bellinger LL, Bernardis LL** 2002 The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* 76:431-442

143. **Li C, Chen P, Smith MS** 1998 The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 139:1645-1652
144. **Garcia MC, Lopez M, Gualillo O, Seoane LM, Dieguez C, Senaris RM** 2003 Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB J* 17:1392-1400
145. **Chen P, Williams SM, Grove KL, Smith MS** 2004 Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. *J Neurosci* 24:5091-5100
146. **Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, Bi S** 2009 Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci* 29:179-190
147. **Kinzeler NR, Edwards KS** 2009 Functional implications for modulating neuropeptide Y gene expression in the dorsomedial hypothalamus. *J Neurosci* 29:7389-7391
148. **Henry BA, Rao A, Ikenasio BA, Mountjoy KG, Tilbrook AJ, Clarke IJ** 2001 Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Res* 918:40-50
149. **Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de LL, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS** 1998 Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015
150. **Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** 2001 Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354
151. **Lopez M, Tena-Sempere M, Dieguez C** 2010 Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol* 31:113-127
152. **Ludwig DS, Mountjoy KG, Tatro JB, Gillette JA, Frederich RC, Flier JS, Maratos-Flier E** 1998 Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am J Physiol* 274:E627-E633
153. **Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ** 2000 Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 37:335-344
154. **Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E** 2001 Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. *Brain Res* 895:160-166
155. **Broberger C, de LL, Sutcliffe JG, Hokfelt T** 1998 Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402:460-474
156. **Morin LP, Allen CN** 2006 The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev* 51:1-60

157. **Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A** 2003 The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177:17-26
158. **Sumova A, Bendova Z, Sladek M, Kovacikova Z, Illnerova H** 2004 Seasonal molecular timekeeping within the rat circadian clock. *Physiol Res* 53 Suppl 1:S167-S176
159. **Yi CX, van d, V, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM** 2006 Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147:283-294
160. **Harfstrand A, Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, Goldstein M** 1986 Receptor autoradiographical evidence for high densities of 125I-neuropeptide Y binding sites in the nucleus tractus solitarius of the normal male rat. *Acta Physiol Scand* 128:195-200
161. **Glass MJ, Chan J, Pickel VM** 2002 Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons. *J Neurosci Res* 67:753-765
162. **Dumont Y, Fournier A, Quirion R** 1998 Expression and characterization of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype in the rat brain. *J Neurosci* 18:5565-5574
163. **Kawai Y, Inagaki S, Shiosaka S, Shibasaki T, Ling N, Tohyama M, Shiotani Y** 1984 The distribution and projection of gamma-melanocyte stimulating hormone in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 297:21-32
164. **Zhu JN, Wang JJ** 2008 The cerebellum in feeding control: possible function and mechanism. *Cell Mol Neurobiol* 28:469-478
165. **Lathe R** 2001 Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol* 169:205-231
166. **Davidson TL, Kanoski SE, Schier LA, Clegg DJ, Benoit SC** 2007 A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Curr Opin Pharmacol* 7:613-616
167. **Volkow ND, Wise RA** 2005 How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci* 8:555-560
168. **Lowell BB, Bachman ES** 2003 Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 278:29385-29388
169. **Lowell BB, Spiegelman BM** 2000 Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404:652-660
170. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
171. **Klingenspor M** 2003 Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 88:141-148
172. **Robidoux J, Martin TL, Collins S** 2004 Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:297-323

173. **Lafontan M, Berlan M** 1993 Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34:1057-1091
174. **Cinti S** 2005 The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:9-15
175. **Ricquier D** 2005 Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64:47-52
176. **Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M, Roca P** 2002 Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 277:42958-42963
177. **Avram AS, Avram MM, James WD** 2005 Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol* 53:671-683
178. **Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D** 2003 Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278:33370-33376
179. **Morrison RF, Farmer SR** 2000 Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130:3116S-3121S
180. **Enerback S** 2010 Human brown adipose tissue. *Cell Metab* 11:248-252
181. **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P** 2009 Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518-1525
182. **van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ** 2009 Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360:1500-1508
183. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** 2009 Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517
184. **Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA** 1999 The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 6:S4-11
185. **Nicholls DG, Locke RM** 1984 Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64:1-64
186. **Klingenberg M, Huang SG** 1999 Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1415:271-296
187. **Himms-Hagen J** 1989 Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res* 28:67-115
188. **Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J** 2000 Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J* 347 Pt 3:643-651

189. **Revelli JP, Pescini R, Muzzin P, Seydoux J, Fitzgerald MG, Fraser CM, Giacobino JP** 1991 Changes in beta 1- and beta 2-adrenergic receptor mRNA levels in brown adipose tissue and heart of hypothyroid rats. *Biochem J* 277 (Pt 3):625-629
190. **Revelli JP, Muzzin P, Giacobino JP** 1992 Modulation in vivo of beta-adrenergic-receptor subtypes in rat brown adipose tissue by the thermogenic agonist Ro 16-8714. *Biochem J* 286 (Pt 3):743-746
191. **Bronnikov G, Bengtsson T, Kramarova L, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J** 1999 beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* 140:4185-4197
192. **Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, Himms-Hagen J, Flier JS, Lowell BB** 1995 Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 270:29483-29492
193. **Zhao J, Unelius L, Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J** 1994 Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. *Am J Physiol* 267:C969-C979
194. **Zhao J, Cannon B, Nedergaard J** 1997 alpha1-Adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of beta3-adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells. *J Biol Chem* 272:32847-32856
195. **Scarpace PJ, Matheny M** 1996 Thermogenesis in brown adipose tissue with age: post-receptor activation by forskolin. *Pflugers Arch* 431:388-394
196. **Lindquist JM, Fredriksson JM, Rehnmark S, Cannon B, Nedergaard J** 2000 Beta 3- and alpha1-adrenergic Erk1/2 activation is Src- but not Gi-mediated in Brown adipocytes. *J Biol Chem* 275:22670-22677
197. **Thonberg H, Lindgren EM, Nedergaard J, Cannon B** 2001 As the proliferation promoter noradrenaline induces expression of ICER (induced cAMP early repressor) in proliferative brown adipocytes, ICER may not be a universal tumour suppressor. *Biochem J* 354:169-177
198. **Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ** 2000 Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:5011-5015
199. **Rial E, Poustie A, Nicholls DG** 1983 Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. *Eur J Biochem* 137:197-203
200. **Rial E, Gonzalez-Barroso MM** 2001 Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta* 1504:70-81
201. **Winkler E, Klingenberg M** 1994 Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem* 269:2508-2515
202. **Skulachev VP** 1991 Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 294:158-162

203. **Jezek P, Orosz DE, Modriansky M, Garlid KD** 1994 Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem* 269:26184-26190
204. **Garlid KD, Orosz DE, Modriansky M, Vassanelli S, Jezek P** 1996 On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 271:2615-2620
205. **Garlid KD, Jaburek M, Jezek P** 1998 The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* 438:10-14
206. **Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP** 1997 Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387:90-94
207. **Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J** 2009 UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9:203-209
208. **Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennstrom B, Nedergaard J** 2004 Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 18:384-401
209. **Krauss S, Zhang CY, Lowell BB** 2005 The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-261
210. **Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB** 1997 UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 235:79-82
211. **Echtay KS** 2007 Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43:1351-1371
212. **Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML** 2000 Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 275:16251-16257
213. **Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB** 2000 Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275:16258-16266
214. **Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D** 2000 Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26:435-439
215. **Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB** 2001 Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105:745-755

216. **Kozak LP, Harper ME** 2000 Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 20:339-363
217. **Ricquier D, Bouillaud F** 2000 Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol* 529 Pt 1:3-10
218. **Lin B, Coughlin S, Pilch PF** 1998 Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol* 275:E386-E391
219. **Schrauwen P, Hesselink M** 2002 UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol* 205:2275-2285
220. **Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, Lowell BB** 2002 betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297:843-845
221. **Bronnikov GE, Zhang SJ, Cannon B, Nedergaard J** 1999 A dual component analysis explains the distinctive kinetics of cAMP accumulation in brown adipocytes. *J Biol Chem* 274:37770-37780
222. **Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y** 2008 Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. *Biol Pharm Bull* 31:775-784
223. **Cassard-Doulier AM, Gelly C, Fox N, Schrementi J, Raimbault S, Klaus S, Forest C, Bouillaud F, Ricquier D** 1993 Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol Endocrinol* 7:497-506
224. **Kozak UC, Kopecky J, Teisinger J, Enerback S, Boyer B, Kozak LP** 1994 An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol* 14:59-67
225. **Handschin C, Spiegelman BM** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27:728-735
226. **Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM** 2006 Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 3:333-341
227. **Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P, Zhang D, Litwin SE, Zaha VG, Fountain KT, Boudina S, Jimenez-Linan M, Blount M, Lopez M, Meirhaeghe A, Bohlooly Y, Storlien L, Stromstedt M, Snaith M, Oresic M, Abel ED, Cannon B, Vidal-Puig A** 2006 Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol* 4:e369
228. **Coleman DL** 1978 Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14:141-148
229. **WAKIL SJ** 1962 Lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* 31:369-406

230. **McGarry JD, Foster DW** 1980 Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49:395-420
231. **Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, Blount M, Vazquez MJ, Finer N, Powles TJ, O'Rahilly S, Saha AK, Dieguez C, Vidal-Puig AJ** 2006 Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55:1327-1336
232. **Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA** 1990 Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 265:1502-1509
233. **Iverson AJ, Bianchi A, Nordlund AC, Witters LA** 1990 Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit composition. *Biochem J* 269:365-371
234. **Saddik M, Gamble J, Witters LA, Lopaschuk GD** 1993 Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem* 268:25836-25845
235. **Barber MC, Price NT, Travers MT** 2005 Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta* 1733:1-28
236. **Hardie DG** 1989 Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* 28:117-146
237. **Kim KH** 1997 Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 17:77-99
238. **Kim KH, Lopez-Casillas F, Bai DH, Luo X, Pape ME** 1989 Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J* 3:2250-2256
239. **Munday MR** 2002 Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 30:1059-1064
240. **Saggerson D** 2008 Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr* 28:253-272
241. **Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW** 2003 Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144:5166-5171
242. **Carling D** 2004 The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18-24
243. **Hardie DG** 2007 AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:774-785
244. **Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M** 2008 AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14:539-549
245. **Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ** 2004 AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279:12005-12008

246. **Carling D** 2004 AMPK. *Curr Biol* 14:R220
247. **Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D** 2007 Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403:139-148
248. **Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D** 2003 LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13:2004-2008
249. **Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D** 2006 Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281:32207-32216
250. **Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA** 2005 The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280:29060-29066
251. **Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG** 2005 Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2:9-19
252. **Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD** 2006 A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17378-17383
253. **Costanzo-Garvey DL, Pfluger PT, Dougherty MK, Stock JL, Boehm M, Chaika O, Fernandez MR, Fisher K, Kortum RL, Hong EG, Jun JY, Ko HJ, Schreiner A, Volle DJ, Treece T, Swift AL, Winer M, Chen D, Wu M, Leon LR, Shaw AS, McNeish J, Kim JK, Morrison DK, Tschop MH, Lewis RE** 2009 KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 10:366-378
254. **Qi J, Gong J, Zhao T, Zhao J, Lam P, Ye J, Li JZ, Wu J, Zhou HM, Li P** 2008 Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J* 27:1537-1548
255. **Dyck JR, Berthiaume LG, Thomas PD, Kantor PF, Barr AJ, Barr R, Singh D, Hopkins TA, Voilley N, Prentki M, Lopaschuk GD** 2000 Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism. *Biochem J* 350 Pt 2:599-608
256. **Sacksteder KA, Morrell JC, Wanders RJ, Matalon R, Gould SJ** 1999 MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem* 274:24461-24468
257. **Voilley N, Roduit R, Vicaretti R, Bonny C, Waeber G, Dyck JR, Lopaschuk GD, Prentki M** 1999 Cloning and expression of rat pancreatic beta-cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem J* 340 (Pt 1):213-217
258. **Kerner J, Hoppel CL** 2002 Radiochemical malonyl-CoA decarboxylase assay: activity and subcellular distribution in heart and skeletal muscle. *Anal Biochem* 306:283-289

259. **Goodwin GW, Taegtmeyer H** 1999 Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol* 277:E772-E777
260. **Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, Ruderman NB** 2000 Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta -D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275:24279-24283
261. **Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS** 2010 Targeting Intermediary Metabolism in the Hypothalamus as a Mechanism to Regulate Appetite. *Pharmacol Rev*
262. **Sul HS, Wang D** 1998 Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 18:331-351
263. **Ronnett GV, Kim EK, Landree LE, Tu Y** 2005 Fatty acid metabolism as a target for obesity treatment. *Physiol Behav* 85:25-35
264. **McGarry JD, Brown NF** 1997 The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244:1-14
265. **Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD** 1995 Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1984-1988
266. **Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD** 1993 Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem* 268:5817-5822
267. **Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H** 1995 High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett* 363:41-45
268. **Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Yamanaka Y, Terada H** 1996 Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta* 1307:157-161
269. **Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J** 2004 Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 25:495-520
270. **Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD** 2007 Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun* 359:469-474
271. **Sierra AY, Gratacos E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N** 2008 CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* 283:6878-6885
272. **Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA** 1997 Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 323 (Pt 3):711-718

273. **Zammit VA** 1999 The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J* 343 Pt 3:505-515
274. **Zammit VA, Price NT, Fraser F, Jackson VN** 2001 Structure-function relationships of the liver and muscle isoforms of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem Soc Trans* 29:287-292
275. **Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, WAKIL SJ** 2005 Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12011-12016
276. **Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF** 2004 Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:1070-1079
277. **Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, WAKIL SJ** 2001 Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291:2613-2616
278. **Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, WAKIL SJ** 2003 Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10207-10212
279. **Olson DP, Pulinilkunnit T, Cline GW, Shulman GI, Lowell BB** 2010 Gene knockout of Acc2 has little effect on body weight, fat mass, or food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7598-7603
280. **Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA** 2000 Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3450-3454
281. **Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP** 2000 Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288:2379-2381
282. **Thupari JN, Landree LE, Ronnett GV, Kuhajda FP** 2002 C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9498-9502
283. **Chakravarthy MV, Zhu Y, Lopez M, Yin L, Wozniak DF, Coleman T, Hu Z, Wolfgang M, Vidal-Puig A, Lane MD, Semenkovich CF** 2007 Brain fatty acid synthase activates PPARalpha to maintain energy homeostasis. *J Clin Invest* 117:2539-2552
284. **Wolfgang MJ, Cha SH, Millington DS, Cline G, Shulman GI, Suwa A, Asami M, Kurama T, Shimokawa T, Lane MD** 2008 Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight. *J Neurochem* 105:1550-1559
285. **Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, McOsker CC, Seeley RJ** 2002 Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes* 51:3196-3201

286. **Shimokawa T, Kumar MV, Lane MD** 2002 Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:66-71
287. **Gao S, Lane MD** 2003 Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5628-5633
288. **Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L** 2003 Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9:756-761
289. **Aguilar E, Duran JM, Solis RA, Marin B** 1972 Oxidative metabolism of the limbic system in prepuberal rats. *Experientia* 28:1490-1491
290. **Marin B, Aguilar E, Schiaffini O** 1972 Oxidative metabolism of the limbic system in androgenized rats. *Experientia* 28:350-351
291. **Steinberg GR, Watt MJ, Fam BC, Proietto J, Andrikopoulos S, Allen AM, Febbraio MA, Kemp BE** 2006 Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147:3906-3914
292. **Wolfgang MJ, Cha SH, Sidhaye A, Chohnan S, Cline G, Shulman GI, Lane MD** 2007 Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19285-19290
293. **Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, Ronnett GV, Tu Y, Birnbaum MJ, Lopaschuk GD, Moran TH** 2007 Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17358-17363
294. **Seo S, Ju S, Chung H, Lee D, Park S** 2008 Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr J* 55:867-874
295. **Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG** 2003 A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13:861-866
296. **Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S** 2003 The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111:91-98
297. **Villena JA, Viollet B, Andreelli F, Kahn A, Vaulont S, Sul HS** 2004 Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase-alpha2 subunit. *Diabetes* 53:2242-2249
298. **Sangiao-Alvarellos S, Varela L, Vazquez MJ, Da BK, Saha AK, Cordido F, Dieguez C, Lopez M** 2010 Influence of Ghrelin and growth hormone deficiency on AMP-activated protein kinase and hypothalamic lipid metabolism. *J Neuroendocrinol* 22:543-556

299. **Lage R, Vazquez MJ, Varela L, Saha AK, Vidal-Puig A, Nogueiras R, Dieguez C, Lopez M** 2010 Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *FASEB J*
300. **Kola B, Hubina E, Tucci SA, Kirkham TC, Garcia EA, Mitchell SE, Williams LM, Hawley SA, Hardie DG, Grossman AB, Korbonits M** 2005 Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:25196-25201
301. **Cremona M, Colombo E, Andreazzoli M, Cossu G, Broccoli V** 2004 Bsx, an evolutionary conserved Brain Specific homeobox gene expressed in the septum, epiphysis, mammillary bodies and arcuate nucleus. *Gene Expr Patterns* 4:47-51
302. **Sakkou M, Wiedmer P, Anlag K, Hamm A, Seuntjens E, Ettwiller L, Tschop MH, Treier M** 2007 A role for brain-specific homeobox factor Bsx in the control of hyperphagia and locomotory behavior. *Cell Metab* 5:450-463
303. **Nogueiras R, Lopez M, Lage R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Mendieta-Zeron H, Sakkou M, Wiedmer P, Benoit SC, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman M, Vidal-Puig A, Horvath T, Treier M, Dieguez C, Tschop MH** 2008 Bsx, a novel hypothalamic factor linking feeding with locomotor activity, is regulated by energy availability. *Endocrinology* 149:3009-3015
304. **Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Viollet B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ** 2007 AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117:2325-2336
305. **Hu Z, Dai Y, Prentki M, Chohnan S, Lane MD** 2005 A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. *J Biol Chem* 280:39681-39683
306. **He W, Lam TK, Obici S, Rossetti L** 2006 Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci* 9:227-233
307. **Wolfgang MJ, Lane MD** 2008 Hypothalamic malonyl-coenzyme A and the control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22:2012-2020
308. **Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH** 1994 RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35-43
309. **Schmelzle T, Hall MN** 2000 TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262
310. **Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ** 2006 Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930
311. **Woods SC, Seeley RJ, Cota D** 2008 Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr* 28:295-311
312. **Vary TC, Deiter G, Lynch CJ** 2007 Rapamycin limits formation of active eukaryotic initiation factor 4F complex following meal feeding in rat hearts. *J Nutr* 137:1857-1862

313. **Lynch CJ** 2001 Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. *J Nutr* 131:861S-865S
314. **Jacinto E, Hall MN** 2003 Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:117-126
315. **Villanueva EC, Munzberg H, Cota D, Leshan RL, Kopp K, Ishida-Takahashi R, Jones JC, Fingar DC, Seeley RJ, Myers MG, Jr.** 2009 Complex regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 in the basomedial hypothalamus by leptin and nutritional status. *Endocrinology* 150:4541-4551
316. **Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G** 2004 Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431:200-205
317. **Morrison CD, Xi X, White CL, Ye J, Martin RJ** 2007 Amino acids inhibit *Agrp* gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E165-E171
318. **TATA JR, ERNSTER L, SURANYI EM** 1962 Interaction between thyroid hormones and cellular constituents. I. Binding to isolated sub-cellular particles and sub-particulate fractions. *Biochim Biophys Acta* 60:461-479
319. **TATA JR** 1963 Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin. *Nature* 197:1167-1168
320. **Krotkiewski M** 2002 Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 440:85-98
321. **Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P** 2008 Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts* 1:71-79
322. **Brunova J, Bruna J, Joubert G, Koning M** 2003 Weight gain in patients after therapy for hyperthyroidism. *S Afr Med J* 93:529-531
323. **Dale J, Daykin J, Holder R, Sheppard MC, Franklyn JA** 2001 Weight gain following treatment of hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:233-239
324. **Lechan RM, Fekete C** 2004 Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *J Endocrinol Invest* 27:105-119
325. **De Groot LJ** 1999 Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 84:151-164
326. **Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A, Goglia F** 2005 Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand* 184:265-283
327. **Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR** 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89

328. **St Germain DL, Galton VA** 1997 The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7:655-668
329. **Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC** 2000 Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 141:4309-4312
330. **Diano S, Leonard JL, Meli R, Esposito E, Schiavo L** 2003 Hypothalamic type II iodothyronine deiodinase: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 976:130-134
331. **Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR, Bianco AC** 2003 Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem* 278:1206-1211
332. **Bianco AC, Kim BW** 2006 Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116:2571-2579
333. **Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM** 1997 Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138:3359-3368
334. **Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, Bauer K** 2005 The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146:1701-1706
335. **Wu Y, Koenig RJ** 2000 Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 11:207-211
336. **Evans RM** 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895
337. **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM** 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
338. **Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD** 1995 The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 46:443-453
339. **Glass CK** 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407
340. **Zhang J, Lazar MA** 2000 The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62:439-466
341. **Lechan RM, Qi Y, Jackson IM, Mahdavi V** 1994 Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 135:92-100

342. **Puymirat J, Miehé M, Marchand R, Sarlieve L, Dussault JH** 1991 Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid* 1:173-184
343. **Alkemade A, Friesema EC, Unmehopa UA, Fabriek BO, Kuiper GG, Leonard JL, Wiersinga WM, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E** 2005 Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4322-4334
344. **Lazar MA** 1993 Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14:184-193
345. **Chiamolera MI, Wondisford FE** 2009 Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150:1091-1096
346. **Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z, Demeneix BA** 2006 In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neurosci Lett* 406:240-243
347. **Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE** 2001 Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* 107:1017-1023
348. **Harris AR, Fang SL, Azizi F, Lipworth L, Vagenakis AG, Barverman LE** 1978 Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. *Metabolism* 27:1074-1083
349. **Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van TH, van Haasteren GA, Klootwijk W, Visser TJ** 1992 Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56:348-353
350. **Danforth E Jr, Burger AG** 1989 The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu Rev Nutr* 9:201-227
351. **Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL** 1991 Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129:2714-2718
352. **Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL** 1998 Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139:2879-2884
353. **Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS** 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
354. **Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM** 1997 Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138:2569-2576
355. **Coppola A, Meli R, Diano S** 2005 Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146:2827-2833

356. **Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL** 1998 Segregation of the intra- and extrahypothalamic neuropeptide Y and catecholaminergic inputs on paraventricular neurons, including those producing thyrotropin-releasing hormone. *Regul Pept* 75-76:117-126
357. **Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM** 1998 Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 68:89-97
358. **Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* 105:1005-1011
359. **Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S** 2003 Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 78:321-330
360. **Lopez M, Seoane L, Tovar S, Senaris RM, Dieguez C** 2002 Thyroid status regulates CART but not AgRP mRNA levels in the rat hypothalamus. *Neuroreport* 13:1775-1779
361. **Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, Dhillon WS, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR** 2004 Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology* 145:5252-5258
362. **Escobar-Morreale HF, Escobar del RF, Morreale de EG** 1997 Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138:4485-4488
363. **Fain JN, Coronel EC, Beauchamp MJ, Bahouth SW** 1997 Expression of leptin and beta 3-adrenergic receptors in rat adipose tissue in altered thyroid states. *Biochem J* 322 (Pt 1):145-150
364. **Syed MA, Thompson MP, Pachucki J, Burmeister LA** 1999 The effect of thyroid hormone on size of fat depots accounts for most of the changes in leptin mRNA and serum levels in the rat. *Thyroid* 9:503-512
365. **Valcavi R, Zini M, Peino R, Casanueva FF, Dieguez C** 1997 Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1632-1634
366. **Corbetta S, Englaro P, Giambona S, Persani L, Blum WF, Beck-Peccoz P** 1997 Lack of effects of circulating thyroid hormone levels on serum leptin concentrations. *Eur J Endocrinol* 137:659-663
367. **Sreenan S, Caro JF, Refetoff S** 1997 Thyroid dysfunction is not associated with alterations in serum leptin levels. *Thyroid* 7:407-409
368. **Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T** 1998 Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48:299-302

369. **Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, Mohamed-Ali V** 1998 Leptin and the pituitary-thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:583-588
370. **Sesnilo G, Casamitjana R, Halperin I, Gomis R, Vilardell E** 1998 Role of thyroid hormones on serum leptin levels. *Eur J Endocrinol* 139:428-430
371. **Leonhardt U, Ritzel U, Schafer G, Becker W, Ramadori G** 1998 Serum leptin levels in hypo- and hyperthyroidism. *J Endocrinol* 157:75-79
372. **Ozata M, Ozisik G, Bingol N, Corakci A, Gundogan MA** 1998 The effects of thyroid status on plasma leptin levels in women. *J Endocrinol Invest* 21:337-341
373. **Zimmermann-Belsing T, Dreyer M, Holst JJ, Feldt-Rasmussen U** 1998 The relationship between the serum leptin concentrations of thyrotoxic patients during treatment and their total fat mass is different from that of normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:589-595
374. **Diekman MJ, Romijn JA, Endert E, Sauerwein H, Wiersinga WM** 1998 Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations in thyrotoxic and hypothyroid women. *Thyroid* 8:1081-1086
375. **Song YM, Sheu WH, Lee WJ, Wu CJ, Kao CH** 1999 Plasma leptin concentrations are related to body fat mass and gender but not to thyroid dysfunction. *Kaohsiung J Med Sci* 15:119-126
376. **Miyakawa M, Tsushima T, Murakami H, Isozaki O, Takano K** 1999 Serum leptin levels and bioelectrical impedance assessment of body composition in patients with Graves' disease and hypothyroidism. *Endocr J* 46:665-673
377. **Matsubara M, Yoshizawa T, Morioka T, Katayose S** 2000 Serum leptin and lipids in patients with thyroid dysfunction. *J Atheroscler Thromb* 7:50-54
378. **Chen MD, Song YM, Tsou CT, Lin WH, Sheu WH** 2000 Leptin concentration and the Zn/Cu ratio in plasma in women with thyroid disorder. *Biol Trace Elem Res* 75:99-105
379. **Simo R, Hernandez C, Zafon C, Galofre P, Castellanos JM, Mesa J** 2000 Short-term hypothyroidism has no effect on serum leptin concentrations. *Diabetes Obes Metab* 2:317-321
380. **Ozata M, Uckaya G, Bolu E, Corapcioglu D, Bingol N, Ozdemir IC** 2001 Plasma leptin concentrations in patients with Graves' disease with or without ophthalmopathy. *Med Sci Monit* 7:696-700
381. **Seven R** 2001 Thyroid status and leptin in Basedow-Graves and multinodular goiter patients. *J Toxicol Environ Health A* 63:575-581
382. **Hsieh CJ, Wang PW, Wang ST, Liu RT, Tung SC, Chien WY, Lu YC, Chen JF, Chen CH, Kuo MC** 2002 Serum leptin concentrations of patients with sequential thyroid function changes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57:29-34

383. **Wahrenberg H, Wennlund A, Hoffstedt J** 2002 Increased adipose tissue secretion of interleukin-6, but not of leptin, plasminogen activator inhibitor-1 or tumour necrosis factor alpha, in Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol* 146:607-611
384. **Iglesias P, Alvarez FP, Codoceo R, Diez JJ** 2003 Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:621-629
385. **Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, Giannetti M, Centoni R, Vitti P, Pinchera A** 2004 Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest* 27:RC5-RC7
386. **Yaturu S, Prado S, Grimes SR** 2004 Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem* 93:491-496
387. **Baig M, Azhar A, Zaidi P, Kamal S, Karira K** 2005 Serum leptin level in hypothyroid males. *J Coll Physicians Surg Pak* 15:757-760
388. **Oge A, Bayraktar F, Saygili F, Guney E, Demir S** 2005 TSH influences serum leptin levels independent of thyroid hormones in hypothyroid and hyperthyroid patients. *Endocr J* 52:213-217
389. **Botella-Carretero JI, Alvarez-Blasco F, Sancho J, Escobar-Morreale HF** 2006 Effects of thyroid hormones on serum levels of adipokines as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma during thyroxine withdrawal. *Thyroid* 16:397-402
390. **Korbonits M** 1998 Leptin and the thyroid--a puzzle with missing pieces. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:569-572
391. **Iglesias P, Diez JJ** 2007 Influence of thyroid dysfunction on serum concentrations of adipocytokines. *Cytokine* 40:61-70
392. **Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Ishikawa SE** 2005 Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism* 54:1461-1466
393. **Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Panidis D** 2005 Resistin levels in hyperthyroid patients before and after restoration of thyroid function: relationship with body weight and body composition. *Eur J Endocrinol* 153:217-221
394. **Yu H, Yang Y, Zhang M, Lu H, Zhang J, Wang H, Cianflone K** 2006 Thyroid status influence on adiponectin, acylation stimulating protein (ASP) and complement C3 in hyperthyroid and hypothyroid subjects. *Nutr Metab (Lond)* 3:13
395. **Altinova AE, Toruner FB, Akturk M, Bukan N, Cakir N, Ayvaz G, Arslan M** 2006 Adiponectin levels and cardiovascular risk factors in hypothyroidism and hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:530-535
396. **Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Kaltsas T** 2006 Resistin levels are normal in hypothyroidism and remain unchanged after attainment of euthyroidism: relationship with insulin levels and anthropometric parameters. *J Endocrinol Invest* 29:606-612

397. **Kaptein EM, Beale E, Chan LS** 2009 Thyroid hormone therapy for obesity and nonthyroidal illnesses: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3663-3675
398. **Galofre JC, Fruhbeck G, Salvatore D** 2010 **Obesity and Thyroid Function: Pathophysiological and Therapeutic**. *Hot Thyroidology* July , HT 6/10:
399. **Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ** 2006 Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126:789-799
400. **Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH** 2000 The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology* 141:3057-3064
401. **Grover GJ, Egan DM, Sleph PG, Beehler BC, Chiellini G, Nguyen NH, Baxter JD, Scanlan TS** 2004 Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 145:1656-1661
402. **Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS** 1998 A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol* 5:299-306
403. **Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, Ribeiro MO, Bianco AC, Gouveia CH** 2007 Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol* 193:21-29
404. **Grover GJ, Mellstrom K, Malm J** 2005 Development of the thyroid hormone receptor beta-subtype agonist KB-141: a strategy for body weight reduction and lipid lowering with minimal cardiac side effects. *Cardiovasc Drug Rev* 23:133-148
405. **Amorim BS, Ueta CB, Freitas BC, Nassif RJ, Gouveia CH, Christoffolete MA, Moriscot AS, Lancelloti CL, Llimona F, Barbeiro HV, de Souza HP, Catanozi S, Passarelli M, Aoki MS, Bianco AC, Ribeiro MO** 2009 A TRbeta-selective agonist confers resistance to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 203:291-299
406. **Borngraeber S, Budny MJ, Chiellini G, Cunha-Lima ST, Togashi M, Webb P, Baxter JD, Scanlan TS, Fletterick RJ** 2003 Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15358-15363
407. **Berkenstam A, Kristensen J, Mellstrom K, Carlsson B, Malm J, Rehnmark S, Garg N, Andersson CM, Rudling M, Sjoberg F, Angelin B, Baxter JD** 2008 The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:663-667
408. **Goldman S, McCarren M, Morkin E, Ladenson PW, Edson R, Warren S, Ohm J, Thai H, Churby L, Barnhill J, O'Brien T, Anand I, Warner A, Hattler B, Dunlap M, Erikson J, Shih MC, Lavori P** 2009 DITPA (3,5-Diiodothyropropionic Acid), a thyroid hormone analog to treat heart failure: phase II trial veterans affairs cooperative study. *Circulation* 119:3093-3100

409. **Ladenson PW, McCarren M, Morkin E, Edson RG, Shih MC, Warren SR, Barnhill JG, Churby L, Thai H, O'Brien T, Anand I, Warner A, Hattler B, Dunlap M, Erikson J, Goldman S** 2010 Effects of the thyromimetic agent diiodothyropropionic acid on body weight, body mass index, and serum lipoproteins: a pilot prospective, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1349-1354
410. **Silva JE, Rabelo R** 1997 Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136:251-264
411. **Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F** 2003 Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* 543:5-10
412. **Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, Brent GA** 2001 Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* 108:97-105
413. **Bianco AC, Sheng XY, Silva JE** 1988 Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem* 263:18168-18175
414. **Silva JE** 2006 Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 86:435-464
415. **de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC** 2001 The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108:1379-1385
416. **Cassard-Doulier AM, Gelly C, Bouillaud F, Ricquier D** 1998 A 211-bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP-1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue. *Biochem J* 333 (Pt 2):243-246
417. **Rabelo R, Schifman A, Rubio A, Sheng X, Silva JE** 1995 Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* 136:1003-1013
418. **Rabelo R, Reyes C, Schifman A, Silva JE** 1996 Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 137:3478-3487
419. **Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M** 1997 Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem* 272:24129-24132
420. **Lanni A, De FM, Lombardi A, Moreno M, Fleury C, Ricquier D, Goglia F** 1997 Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS Lett* 418:171-174
421. **Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Goglia F** 1999 Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 444:250-254
422. **de LP, Lanni A, Beneduce L, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Goglia F** 2001 Uncoupling protein-3 is a molecular determinant for the regulation of resting metabolic rate by thyroid hormone. *Endocrinology* 142:3414-3420

423. **Moreno M, Lombardi A, Beneduce L, Silvestri E, Pinna G, Goglia F, Lanni A** 2002 Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143:504-510
424. **Blennemann B, Moon YK, Freake HC** 1992 Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology* 130:637-643
425. **Blennemann B, Leahy P, Kim TS, Freake HC** 1995 Tissue-specific regulation of lipogenic mRNAs by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 110:1-8
426. **Park SH, Paulsen SR, Gammon SR, Mustard KJ, Hardie DG, Winder WW** 2002 Effects of thyroid state on AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase expression in muscle. *J Appl Physiol* 93:2081-2088
427. **Irrcher I, Walkinshaw DR, Sheehan TE, Hood DA** 2008 Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* 104:178-185
428. **Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S** 2008 Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul Pept* 151:164-169
429. **Kelly JF, Elias CF, Lee CE, Ahima RS, Seeley RJ, Bjorbaek C, Oka T, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK** 2004 Ciliary neurotrophic factor and leptin induce distinct patterns of immediate early gene expression in the brain. *Diabetes* 53:911-920
430. **Halatchev IG, Cone RD** 2005 Peripheral administration of PYY(3-36) produces conditioned taste aversion in mice. *Cell Metab* 1:159-168
431. **Coya R, Carro E, Mallo F, Dieguez C** 1997 Retinoic acid inhibits in vivo thyroid-stimulating hormone secretion. *Life Sci* 60:L-50
432. **Dieguez C, Foord SM, Peters JR, Hall R, Scanlon MF** 1985 The effects of thyroid hormone deprivation in vivo and in vitro on growth hormone (GH) responses to human pancreatic (tumor) GH-releasing factor (1-40) by dispersed rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 116:1066-1070
433. **George Paxinos, Charles Watson** 1998 "The Rat Brain in stereotaxic coordinates". Fourth Edition ed. Academic Press:
434. **Bieber LL, Abraham T, Helmrath T** 1972 A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem* 50:509-518
435. **ELLMAN GL** 1959 Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77
436. **McGarry JD, Stark MJ, Foster DW** 1978 Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 253:8291-8293
437. **Saha AK, Kurowski TG, Ruderman NB** 1995 A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effects of insulin, glucose, and denervation. *Am J Physiol* 269:E283-E289

438. **Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG, Alessi DR** 2004 Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E310-E317
439. **Dale S, Wilson WA, Edelman AM, Hardie DG** 1995 Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett* 361:191-195
440. **Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A** 2007 PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 3:e64
441. **Yetukuri L, Katajamaa M, Medina-Gomez G, Seppanen-Laakso T, Vidal-Puig A, Oresic M** 2007 Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Syst Biol* 1:12
442. **Yetukuri L, Ekroos K, Vidal-Puig A, Oresic M** 2008 Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol Biosyst* 4:121-127
443. **Silva JE** 2003 The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med* 139:205-213
444. **Tong Q, Ye C, McCrimmon RJ, Dhillon H, Choi B, Kramer MD, Yu J, Yang Z, Christiansen LM, Lee CE, Choi CS, Zigman JM, Shulman GI, Sherwin RS, Elmquist JK, Lowell BB** 2007 Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab* 5:383-393
445. **Alton S, O'Malley BP** 1985 Dietary intake in thyrotoxicosis before and after adequate carbimazole therapy; the impact of dietary advice. *Clin Endocrinol (Oxf)* 23:517-520
446. **Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, Boom H, Schoemaker RC, Cohen AF, Burggraaf J, Meinders AE** 2001 Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5848-5853
447. **Silva JE** 1995 Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481-492
448. **Silva JE** 2001 The multiple contributions of thyroid hormone to heat production. *J Clin Invest* 108:35-37
449. **Plum L, Lin HV, Dutia R, Tanaka J, Aizawa KS, Matsumoto M, Kim AJ, Cawley NX, Paik JH, Loh YP, DePinho RA, Wardlaw SL, Accili D** 2009 The obesity susceptibility gene *Cpe* links FoxO1 signaling in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons with regulation of food intake. *Nat Med* 15:1195-1201
450. **Belgardt BF, Husch A, Rother E, Ernst MB, Wunderlich FT, Hampel B, Klockener T, Alessi D, Kloppenburg P, Bruning JC** 2008 PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 7:291-301

-
451. **Pocai A, Lam TK, Obici S, Gutierrez-Juarez R, Muse ED, Arduini A, Rossetti L** 2006 Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest* 116:1081-1091
 452. **Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA** 2005 Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep* 25:191-208
 453. **Lopez M, Varela L, Vazquez MJ, Rodriguez-Cuenca S, Gonzalez CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Dieguez C, Vidal-Puig A** 2010 Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16:1001-1008