



TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN
LA REGULACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A
TRAVÉS DE AMPK**

Ánxela María Estévez Salguero

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA



SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA REGULACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A TRAVÉS DE AMPK

D./Dña. Ánxela María Estévez Salguero

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 1 de Julio de 2021.



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A TRAVÉS DE AMPK

D. Miguel Antonio López Pérez

D. Carlos Diéguez González

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Ánxela María Estévez Salguero**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 1 de Xullo de 2021

Fdo. D. Miguel Antonio López Pérez



Fdo. D. Carlos Diéguez González



DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESE

PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA A TRAVÉS DE AMPK

D./Dña. Ánxela María Estévez Salguero

Declaro no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral. Para que así conste, firmo el presente documento:

A 12 de Noviembre de 2021 en Santiago de Compostela,



Resumo

Os astrocitos amosáronse sempre como células auxiliares no sistema nervioso central, pero nos últimos anos adquiriron unha relevancia especial debido á súa participación na detección e regulación de determinados metabolitos e hormonas relacionadas coa homeostase enerxética. A pesar disto, moitos dos mecanismos polos que os astrocitos participan nesta regulación aínda se descoñecen. A proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) é un sensor celular especialmente importante na regulación central do equilibrio enerxético, especialmente a nivel hipotalámico. Por iso, o traballo desta tese consistiu en investigar o papel de AMPK en astrocitos e o súa posible implicación na homeostase enerxética. Os nosos resultados mostran que a eliminación xenética de AMPK α 1, selectivamente nos astrocitos que expresan a proteína gliofibrilar acídica (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), provoca un aumento do peso corporal e unha diminución da termoxénese do tecido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*), só nos ratos femia. Ademais, estas femias mostran un aumento dos niveis de aromatasa no núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*) e no núcleo ventromedial (VMH, *ventromedial nucleus*) do hipotálamo. Polo tanto, estes datos mostran que os astrocitos teñen un claro dimorfismo sexual no que participa AMPK. **Palabras clave:** AMPK, astrocitos, hipotálamo, BAT, estróxenos.

Resumen

Los astrocitos se han mostrado siempre como células únicamente de sostén pero, en los últimos años, han adquirido especial relevancia por su participación en la detección y regulación de ciertos metabolitos y hormonas relacionadas con la homeostasis energética. A pesar de ello, aún se desconocen muchos de los mecanismos por los cuales los astrocitos participan en esta regulación. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) es un sensor celular especialmente importante en la regulación central del balance energético, sobre todo a nivel hipotalámico. Por ello, el trabajo de esta tesis fue investigar la implicación de los astrocitos en la homeostasis energética a través de AMPK. Nuestros resultados muestran que la eliminación genética de AMPK α 1 en los astrocitos que expresan la proteína gliofibrilar acídica (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) provoca un aumento del peso corporal y una disminución de la termogénesis del tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*), únicamente en los ratones hembra. Además, estas hembras presentan un aumento de los niveles de aromatasa en el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*) y en el núcleo ventromedial (VMH, *ventromedial nucleus*) del hipotálamo. Por lo tanto, estos datos muestran que los astrocitos presentan un claro dimorfismo sexual en el cual participa AMPK. **Palabras clave:** AMPK, astrocitos, hipotálamo, BAT, estrógenos.

Abstract

Astrocytes have always been shown as supporting cells, but in recent years they have acquired special relevance due to their participation in the detection and regulation of certain metabolites and hormones related to energy homeostasis. Despite this, many of the mechanisms by which astrocytes participate in this regulation are still unknown. AMP-activated protein kinase (AMPK) is an important cellular sensor in the central regulation of energy balance, especially at the hypothalamic level. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the involvement of astrocytes in energy homeostasis through AMPK. Our results show that genetic ablation of AMPK α 1 in astrocytes expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP) increases in body weight and decreases brown adipose tissue (BAT) thermogenesis, exclusively in female mice. Furthermore, these female mice show increased levels of aromatase in the arcuate nucleus

(ARC) and ventromedial nucleus (VMH) of the hypothalamus. Therefore, these data show that astrocytes have a clear sexual dimorphism in which AMPK participates. **Key words:** AMPK, astrocytes, hypothalamus, BAT, estrogens.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	19
INTRODUCCIÓN.....	25
1 Obesidad	27
2 Homeostasis energética.....	28
2.1 Señales aferentes	30
2.1.1 Señales de saciedad	30
2.1.2 Señales de adiposidad.....	31
3 Gasto energético y termogénesis	33
4 Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética	38
4.1 Núcleo arcuato.....	39
4.1.1 Neuronas NPY/AgRP	40
4.1.2 Neuronas POMC/CART.....	40
4.2 Núcleo ventromedial	41
4.3 Núcleo dorsomedial.....	42
4.4 Núcleo paraventricular	43
4.5 Área lateral hipotalámica.....	43
4.5.1 Neuronas OX.....	44
4.5.2 Neuronas MCH.....	44
5 AMPK como sensor energético	45
5.1 Estructura y regulación de AMPK	46
5.1.1 Estructura.....	46
5.1.2 Regulación.....	46
5.2 AMPK en el hipotálamo.....	48
5.3 AMPK y gasto energético	49
6 Astrocitos	50
6.1 Astrocitos como sensores de nutrientes.....	51
6.2 Astrocitos como mediadores de las señales hormonales.....	52
6.3 Astrocitos y la obesidad inducida por dieta.....	53
6.4 Dimorfismo sexual de los astrocitos hipotalámicos	54
6.4.1 Estrógenos y sus implicaciones en la homeostasis energética	55
6.4.2 Astrocitos y estrógenos.....	56
HIPÓTESIS	57
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
7 Modelos animales	67

7.1	Legislación.....	67
7.2	Modelos animales	67
8	Anestesia y analgesia.....	68
9	Vías de administración de sustancias	68
9.1	Vía intraperitoneal (IP)	68
9.2	Vía intracerebroventricular (ICV)	68
10	Procedimientos no quirúrgicos	69
10.1	Generación de ratones <i>knockout</i> condicionales e inducibles GFAP-Cre AMPK α 1 ^{flox/flox} 69	
10.2	Monitorización de la ingesta y la masa corporal	70
10.3	Medición de la temperatura corporal	70
10.4	Medición de la temperatura del BAT	70
10.5	Test de tolerancia a glucosa e insulina.....	70
10.6	Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora 70	
11	Procedimientos quirúrgicos	71
11.1	Canulación intracerebroventricular (ICV)	71
11.2	Diseción y extracción de tejidos	71
12	Diseños experimentales	72
12.1	Administración central ICV de E2 en ratones	72
13	Técnicas analíticas.....	72
13.1	Análisis de proteínas por Western Blot	72
13.1.1	Extracción de proteína	72
13.1.2	Cuantificación de proteína	73
13.1.3	Western Blot	74
13.2	Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real	79
13.3	PCR para genotipado	83
13.4	Doble inmunofluorescencia	85
13.5	Medición de los niveles de la hormona luteinizante (LH, <i>Luteinizing hormone</i>).....	85
13.6	Inmunohistoquímica	87
14	Estadística.....	88
14.1	Test t de student	88
	RESULTADOS.....	89
1.	Eliminación postnatal de AMPK α 1 en los astrocitos	91
2.	La eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP aumenta el peso corporal en las hembras	92

3. Las hembras deficientes de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP presentan una disminución de la termogénesis del BAT.....	95
4. La eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP de las hembras aumenta el RQ 98	
5. La eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP provoca un incremento de los niveles de aromatasa en el MBH del hipotálamo	99
6. Las hembras deficientes de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP no responden a la administración central de E2	101
7. La eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP no afecta a la astrogliosis ni al estrés celular	103
DISCUSIÓN.....	107
CONCLUSIONES.....	113
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXOS	143

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AACS: acetoacetil-CoA sintetasa, *acetoacetyl-CoA synthetase*.

ACC: acetil-CoA carboxilasa, *acetyl-CoA carboxylase*.

AgRP: péptido relacionado con agutí, *agouti-related peptide*.

AMPK: proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated protein kinase*.

ApoE: apolipoproteína E.

β 3-AR: receptores β 3 adrenérgicos, *β 3-adrenergic receptor*.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

ARNm: ARN mensajero, *messenger RNA*.

ATGL: lipasa adipocítica de triglicéridos, *adipose triglyceride lipase*.

BAT: tejido adiposo pardo, *brown adipose tissue*.

BBB: barrera hematoendefálica, *blood brain barrier*.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, *brain-derived neurotrophic factor*.

BMP8B: proteína morfogenética ósea 8B, *bone morphogenetic protein 8B*.

BMR: tasa metabólica basal, *basal metabolic rate*.

BSA: albumina de suero bovino, *Albumin, from bovine serum*.

CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*.

CaMKK: calcio/calmodulina quinasa quinasa, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*.

CB1: receptor canabinoide 1, *cannabinoid receptor 1*.

Cbln1: cerebelin 1, *cerebellin 1*.

CBS: dominios de la cistationina β -sintasa, *cystathione β -synthase domains*.

CIDEA: efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*.

CKK: colecistoquinina, *cholecystokinin*.

CNS: sistema nervioso central, *central nervous system*.

CPT1a: carnitina palmitoiltransferasa 1a, *carnitine palmitoyltransferase 1a*.

CRH: hormona liberadora de corticotropina, *corticotrophin-releasing hormone*.

DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo, *dorsomedial nucleus of the hypothalamus*.

E₂: estradiol.

ER: retículo endoplasmático, *endoplasmic reticulum*.

- ER α : receptor de estrógenos α , *estrogen receptor α* .
- Er β : receptor de estrógenos β , *estrogen receptor β* .
- FAS: ácido graso sintasa, *fatty acid synthase*.
- G6Pase: glucosa 6 fosfatasa, *glucose-6-phosphatase*.
- GFAP: proteína gliofibrilar acídica, *glial fibrillary acidic protein*.
- GLP-1: péptido análogo de glucagón 1, *glucagon-like peptide 1*.
- GLUT4: transportador de glucosa 4 *glucosa transporter 4*.
- GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, *gonadotropin-releasing hormone*.
- GPR30: receptor acoplado a proteína G, *G protein-coupled receptor*.
- GRP: péptido liberador gástrico, *gastrin-releasing peptide*.
- GRP78: proteína regulada por glucosa 78, *glucose regulated protein 78*.
- GS: glucógeno sintasa, *glycogen synthase*.
- gWAT: tejido adiposo blanco gonadal, *gonadal white adipose tissue*.
- HFD: dieta alta en grasa, *high fat diet*.
- HSL: lipasa sensible a hormonas, *hormone-sensitive lipase*.
- IMC: índice de masa corporal.
- IP: intraperitoneal.
- IR: receptor de insulina, *insulin receptor*.
- KSR2: quinasa supresora de Ras, *kinase suppressor of Ras*.
- LepR: receptor de leptina, *leptin receptors*.
- LH: hormona luteinizante, *luteinizing hormone*.
- LHA: área lateral hipotalámica, *lateral hypothalamic area*.
- LKB1: quinasa hepática B1, *liver kinase B1*.
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno, *mitogen-activated protein kinase*.
- MBH: hipotálamo medio-basal, *mediobasal hypothalamus*.
- MC3R y MC4R: receptors de melanocortinas 3 y 4, *melanocortin receptors 3 and 4*.
- MCD: decarboxilasa malonil-CoA, *malonyl-CoA decarboxylase*.
- MCH: hormona concentradora de melanina, *melanin-concentrating hormone*.
- MCHR: receptores MCH, *MCH receptor*.
- MCT: transportadores de monocarboxilato, *monocarboxylate transporter*.
- MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.

- α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos alfa, *alpha melanocyte stimulating hormone*.
- NPY: neuropeptido Y, *neuropeptide Y*.
- NTS: núcleo del tracto solitario, *nucleus of the solitary tract*.
- OMS: organización mundial de la salud.
- OX: orexina, *orexin*.
- OX1R y OX2R: receptores de orexina 1 y 2, *orexin receptor 1 and 2*.
- p38 MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38, *p38 mitogen-activated protein kinase*.
- PEPCK: carboxiquinasa fosfoenolpiruvato, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*.
- PFA: área perifornical, *perifornical area*.
- PGC1 α : proteína 1 alpha coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha*.
- PKA: protein kinasa A, *protein kinase A*.
- POMC: proopiomelanocortina, *proopiomelanocortin*.
- PP2C α : proteína fosfatasa 2C α , *protein phosphatase 2C α* .
- PPAR γ : receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*.
- PR: receptor de progesterona, *progesteron receptor*.
- PRDM16: dominio PR que contiene 16, *PR domain containing 16*.
- PSNS: sistema nervioso parasimpático, *parasympathetic nervous system*.
- PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*.
- PYY₃₋₃₆: péptido tirosina tirosina 3-36, *peptide tyrosine-tyrosine (PYY)₃₋₃₆*.
- RIP140: proteína de interacción con receptores 140, *receptor-interacting protein 140*.
- RQ: cociente respiratorio, *respiratory quotient*.
- scWAT: tejido adiposo blanco subcutáneo, *subcutaneous white adipose tissue*.
- SEM: desviación estándar de la media, *standard error of the mean*.
- SF1: factor esteroideogénico 1, *steroidogenic factor 1*.
- SNS: sistema nervioso simpático, *sympathetic nervous system*.
- STD: dieta estándar, *standard diet*.
- TAK1: quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β , *transforming growth factor- β -activated kinase 1*.
- THs: hormonas tiroideas, *thyroid hormones*.
- TRH: hormona liberadora de tirotrópina, *tyrotrophin-releasing hormone*.

TSH: hormona estimuladora de la tiroides, *thyroid stimulating hormone*.

UCP1: proteína desacoplante 1, *uncoupling protein 1*.

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

visWAT: tejidos adiposo blanco visceral, *visceral white adipose tissue*.

WAT: tejido adiposo blanco, *white adipose tissue*.

ANGLICISMOS

Browning: pardeamiento.

Knockout: modificación genética en la cual se inactiva la expresión de un gen.

Upstream: más arriba (*referido a una vía de señalización*)

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

INTRODUCCIÓN

1 OBESIDAD

La obesidad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, con un alcance de proporciones pandémicas y con más de 2 millones de muertes al año, más incluso que las provocadas por desnutrición (O.M.S., 2020). Generalmente, se ha relacionado con un problema de los países de altos ingresos pero, en los últimos años, ha aumentado de manera considerable en los países de ingresos medios y bajos, especialmente en los entornos urbanos (O.M.S., 2017).

Los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud son bastante alarmantes. Desde 1975, la prevalencia de la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo llegando, en el 2016, a tener sobrepeso el 39% de las personas mayores de edad y a ser obesas el 13% (O.M.S., 2020). Además, la obesidad infantil ha aumentado de forma espectacular. En 2016, más del 18% de niños y adolescentes padecían sobrepeso u obesidad y más de 41 millones de niños menores de 5 años tenían problemas de obesidad o sobrepeso (O.M.S., 2020).

España no se queda atrás en este aspecto y se estima que más de la mitad de la población está por encima de su peso recomendado. Según la Encuesta Nacional de Salud de 2017, el 37% de la población adulta tenía sobrepeso y el 17% era obesa, siendo más prevalente en hombres que en mujeres (Ministerio de Sanidad, 2018). En cuanto a la obesidad infantil, en niños y adolescentes de 2 a 17 años, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad era del 18% y 10%, respectivamente (Ministerio de Sanidad, 2019).

La obesidad y el sobrepeso son definidos por la OMS como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (O.M.S., 2020). Para su identificación, se emplea el índice de masa corporal (IMC) el cual relaciona el peso con la altura. Su cálculo se realiza dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su altura en metros (kg/m^2), proporcionando una medida equivalente para ambos sexos y para adultos de distintas edades (O.M.S., 2020). En una persona adulta de peso normal, el IMC se encuentra entre 18,5 y 24,9, por lo que, un IMC superior o igual a 25 significaría que padece sobrepeso y uno igual o superior a 30 que padece obesidad. En la siguiente tabla se muestran los distintos grados de sobrepeso y obesidad en función del IMC (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios SEEDO para definir la obesidad en grados según el índice de masa corporal (IMC) en adultos.

Categoría	IMC
Peso insuficiente	<18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25-26,9
Sobrepeso grado II (preobeso)	27-29,9
Obesidad tipo I	30-34,9
Obesidad tipo II	35-39,9
Obesidad tipo III (mórbida)	40-49,9
Obesidad tipo IV (extrema)	>50

Esta ganancia de peso se debe principalmente a un desequilibrio entre las calorías consumidas y las gastadas. El consumo de alimentos pobres en nutrientes y con un alto valor calórico, junto con un descenso de la actividad física por el estilo de vida cada vez más sedentario, han propiciado este desequilibrio y el consecuente aumento del sobrepeso y la obesidad en la población (O.M.S., 2020).

Los problemas para la salud que acarrea tener un peso por encima del normal son de especial relevancia. De hecho, la obesidad se asocia con el denominado síndrome metabólico, cuyo diagnóstico está basado en un cluster entre los cuales se incluyen la hipertensión, los niveles bajos de HDL, la hipertriacilgliceridemia, la hiperglucemia y la obesidad visceral. Aún cuando no existe un criterio unánime, habitualmente se requiere que un determinado paciente exhiba al menos tres de los componentes antes citados. La razón de darle tanta relevancia es que los pacientes con este diagnóstico tienen un gran incremento en los factores de riesgo para toda una serie de patologías incluyendo infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares o diabetes tipo II (O.M.S., 2020).

Por todo esto, es necesario desarrollar estrategias que permitan evitar o mejorar la obesidad. La prevención, tanto primaria como secundaria, debe ser la primera medida a adoptar, fomentando una alimentación saludable y una actividad física adecuada. Sin embargo, está fuera de toda duda la necesidad de desarrollar tratamientos para al menos paliarla y así poder disminuir las patologías asociadas. Conocer como funcionan los mecanismos que modulan la ingesta, el gasto energético y el metabolismo en general, pueden llegar a proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Todos los seres vivos necesitan de energía para su supervivencia, pero, como nos indica el primer principio de la termodinámica, la energía ni se crea ni se destruye, por lo que, un organismo tiene que ser capaz de regular de manera efectiva su estado energético para llevar a cabo sus funciones vitales. Esta regulación es lo que se conoce como homeostasis energética y se produce a través del control del aporte de energía (ingesta) y del consumo de energía (gasto energético). El aporte energético proviene de las calorías asociadas a las proteínas, carbohidratos y grasas de los alimentos y bebidas, mientras que el gasto energético hace referencia a la tasa metabólica basal, a la termogénesis y a la actividad física.

El peso corporal va a depender de esta homeostasis energética y las alteraciones que se produzcan en la ingesta o en el gasto energético implicarán cambios en la masa corporal. Cuando el balance energético se mantiene en equilibrio, es decir, la ingesta es igual al gasto energético, el peso se mantiene estable (Imagen 1). Sin embargo, este equilibrio no siempre permanece estable y pueden generarse situaciones de desequilibrio que pueden ser debidas a diversos factores tanto intrínsecos (sexo, edad y genética) como extrínsecos (ambiente y estilo de vida) (Friedman, 2009; Kopelman, 2000). Así, si el balance es negativo, es decir, las calorías ingeridas son menores que las consumidas, se produce una pérdida de peso que puede generar delgadez. En cambio, si el balance es positivo, es decir, las calorías ingeridas son superiores a las consumidas, se produce un aumento de peso pudiendo llegar a situaciones de sobrepeso u obesidad (Hill et al., 2012).

BALANCE ENERGÉTICO

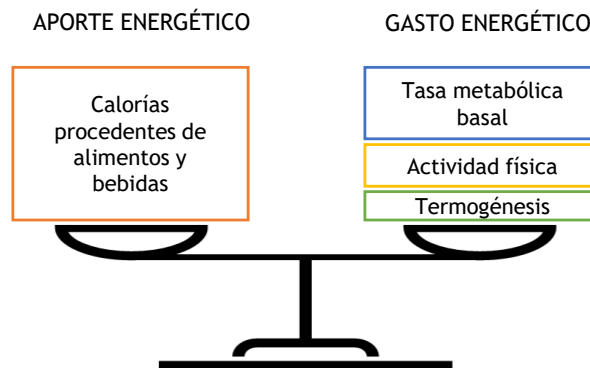


Imagen 1. Componentes de balance energético.

Esta regulación del balance energético se lleva a cabo a través de un sistema fisiológico complejo que incluye tanto señales aferentes como eferentes que afectan a la ingesta y al gasto energético (Hill et al., 2012). El sistema nervioso central (CNS, *central nervous system*) es el encargado de coordinar todas estas señales y de provocar efectos en el comportamiento, incluyendo el apetito y la actividad física, en la actividad del sistema nervioso autónomo que regula el gasto energético y otros aspectos del metabolismo, y en el sistema neuroendocrino mediante la secreción de hormonas (Spiegelman and Flier, 2001).

Una de las regiones cerebrales más importantes en esta regulación energética es el hipotálamo, el cual es capaz de integrar señales periféricas hormonales y neuronales correspondientes al estado nutricional, así como regular la absorción y utilización de nutrientes, el metabolismo lipídico periférico y la homeostasis de la glucosa (Spiegelman and Flier, 2001; Williams, 2012) (Imagen 2). Además del hipotálamo, existen otras zonas cerebrales como la corteza cerebral, las áreas olfativas y algunas áreas del tronco encefálico implicadas en el control del apetito y el equilibrio energético (Dietrich and Horvath, 2009; Spiegelman and Flier, 2001).

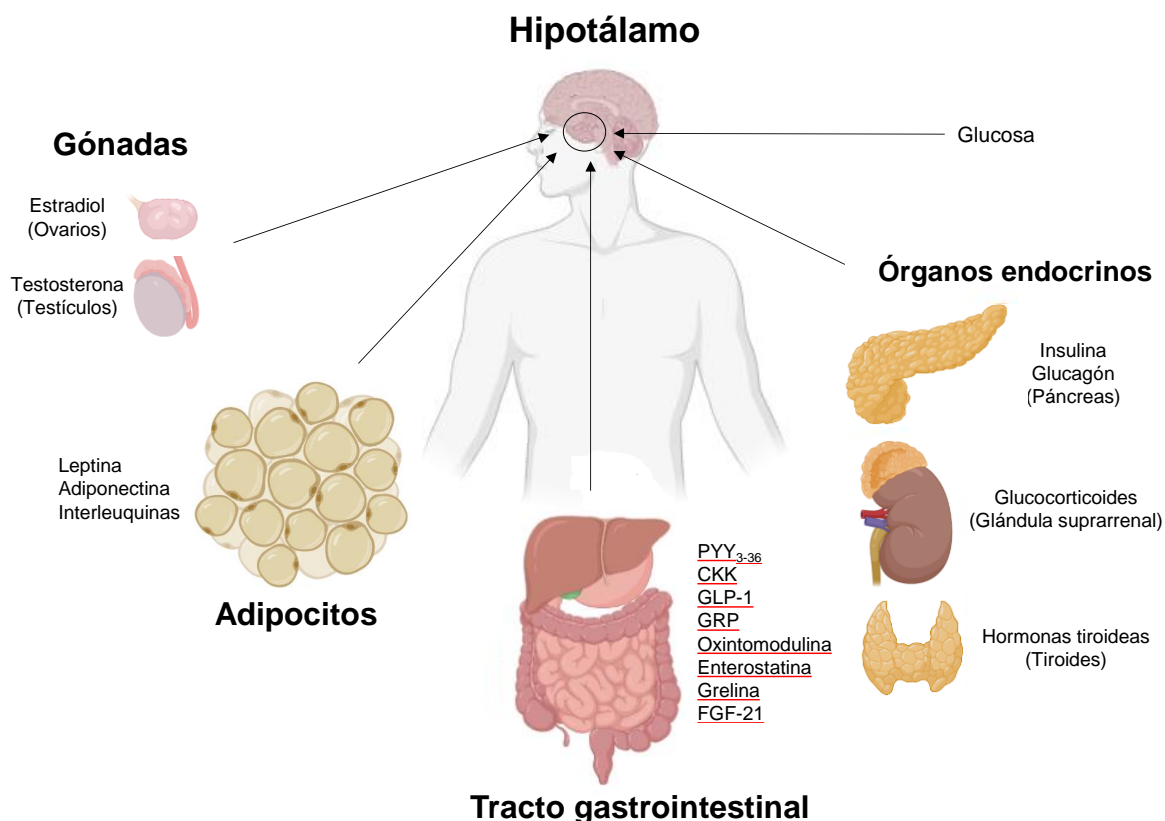


Imagen 2. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, órganos endocrinos y gónadas. Creado con Biorender.com.

2.1 SEÑALES AFERENTES

Para una correcta regulación de la homeostasis energética, el cerebro necesita conocer las necesidades energéticas del organismo. Para ello, los tejidos periféricos van a producir señales endocrinas en respuesta al metabolismo de los nutrientes que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*) e informar al cerebro del estado nutricional.

Las señales aferentes que influyen en la ingesta y el gasto energético pueden clasificarse en dos grupos: señales de saciedad y señales de adiposidad (Schwartz et al., 2000; Woods, 2005; Woods et al., 1998). Mientras que en la primera categoría se incluyen señales generadas durante las comidas, que contribuyen a la decisión de terminar de comer y prolongar el tiempo entre una comida y otra; en la segunda categoría se incluyen hormonas cuya secreción es proporcional a la cantidad de grasa corporal.

2.1.1 Señales de saciedad

El tracto gastrointestinal no solamente es importante en la digestión y absorción de nutrientes, sino que también juega un papel crucial en la regulación de la ingesta, controlando la cantidad de alimento ingerido. El CNS recibe señales del tracto gastrointestinal a través de

nervios sensoriales, ubicados a lo largo de todo el tracto, y de la circulación, por la llegada de señales hormonales secretadas por éste.

El tracto gastrointestinal se encuentra inervado por el nervio vago que expresa mecanorreceptores y quimiorreceptores sensibles tanto a cambios de volumen y presión del estómago e intestino como a cambios en la composición de los nutrientes, osmolaridad y pH, respectivamente (Ahima and Antwi, 2008; Strader and Woods, 2005). Este nervio vago trasmite las señales hasta el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus of the solitary tract*) (Claret et al., 2011), el cual proyecta finalmente a los núcleos del hipotálamo, al núcleo central de la amígdala y al núcleo del lecho de la estría terminal (Ahima and Antwi, 2008).

Además, el tracto gastrointestinal es capaz de secretar señales hormonales en respuesta a las propiedades fisicoquímicas de los alimentos ingeridos. Estas señales hormonales son principalmente péptidos, que pueden, por un lado, interaccionar con receptores localizados en las terminaciones del nervio vago y activar el NTS (Strader and Woods, 2005), o pueden, por el otro lado, entrar al torrente sanguíneo y actuar directamente sobre áreas cerebrales como el hipotálamo (Currie et al., 2005; Lopez et al., 2008) o sobre el área postrema, que trasmite estas señales al tronco encefálico y el prosencéfalo donde se incluye el hipotálamo (Ahima and Antwi, 2008). También son capaces de difundir a través del fluido extracelular y actuar de manera paracrina en órganos cercanos, como el hígado y páncreas, contribuyendo a la digestión y absorción de los nutrientes (Strader and Woods, 2005; Woods et al., 2000).

Entre estas señales hormonales encontramos principalmente señales anorexigénicas, es decir, que reducen el apetito, como son el péptido tirosina-tirosina péptido tirosina tirosina 3-36 (PYY₃₋₃₆, *peptide tyrosine-tyrosine (PYY)₃₋₃₆*), la colescistoquinina (CKK, *cholecystokinin*), el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1, *glucagon-like peptide-1*), el péptido liberador gástrico (GRP, *gastrin-realising peptide*), la oxintomodulina y la enterostatina (Woods, 2005), entre otras muchas. Solamente una de las hormonas gastrointestinales, la grelina, tiene el efecto contrario y se comporta como una señal orexigénica, es decir, aumenta el apetito (Tabla 2) (Woods, 2005).

Tabla 2. Efecto de las principales señales gastrointestinales sobre la ingesta.

Hormona gastrointestinal	Efecto sobre la ingesta
PYY ₃₋₃₆	Inhibición
CKK	Inhibición
GLP-1	Inhibición
GRP	Inhibición
Oxintomodulina	Inhibición
Enterostatina	Inhibición
Grelina	Estimulación



2.1.2 Señales de adiposidad

Las señales de adiposidad hacen referencia a aquellas señales que se producen en relación con el contenido de grasa corporal. Entre ellas encontramos a la leptina, cuyos niveles están relacionados con el grado de adiposidad. Asimismo, destacaremos el papel de la insulina dado

que en sujetos con obesidad puede estar elevada debido a la insulino-resistencia, aunque en estadios avanzados puede estar disminuida. (Schwartz et al., 2000).

Leptina

La leptina es uno de los principales factores encargados de la regulación de la homeostasis energética. Secretada principalmente por los adipocitos, es capaz de disminuir el apetito e incrementar el gasto energético (Ahima and Flier, 2000). Sus niveles en sangre son proporcionales al contenido de grasa corporal, por lo que, en personas obesas, se encuentra elevada (Galic et al., 2010), aunque ha de tenerse en cuenta que su paso a través de la BBB es saturable y eso hace que sus niveles plasmáticos y en líquido cefalorraquídeo no sean concordantes. Además, varía en función de la ingesta de alimentos, aumentando después de comer y disminuyendo en los periodos de ayuno (Saper et al., 2002).

La leptina atraviesa la BBB y regula la ingesta a través de receptores localizados en zonas hipotalámicas del cerebro, como el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*), incrementando la expresión de neuropéptidos anorexigénicos o de sus precursores, como la proopiomelanocortina (POMC, *proopiomelanocortin*) y disminuyendo los neuropéptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) y péptido relacionado con agutí (AgRP, *agouti-related peptide*) (Coll et al., 2007). También participa en el control del gasto energético a través de la activación del tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) estimulando el sistema nervioso simpático (SNS, *sympathetic nervous system*) y la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*) (Dodd et al., 2015; Wang et al., 2020b). Por lo tanto, la deficiencia de leptina en humanos o ratones ob/ob, causa obesidad con una marcada hiperfagia y una reducción del gasto energético (Friedman, 2016; Galic et al., 2010).

Insulina

La insulina ejerce su regulación en el balance energético, principalmente a través del control de la ingesta de alimentos. Es producida por el páncreas, concretamente por las células β de los islotes de Langerhans, y juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa. Es la principal hormona que permite la captación de glucosa en otros tejidos, como el músculo y el tejido adiposo, e inhibe la producción de glucosa por el hígado (Saltiel and Kahn, 2001). También promueve el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas en el tejido adiposo, el hígado y el músculo por estimulación de la lipogénesis, la síntesis de proteínas y glucógeno y por inhibición de la lipólisis, glucogenólisis y de la degradación proteica (Saltiel and Kahn, 2001; Saltiel and Pessin, 2002). Su secreción es directamente proporcional a los niveles de glucosa en sangre y a su sensibilidad periférica relacionada tanto con las reservas totales de grasa como con su distribución (Porte et al., 2002). Esto conlleva que en personas obesas sea necesario un incremento de los niveles de insulina, sin embargo, si las células β pancreáticas no logran este incremento adaptativo o si existe una resistencia a la acción de la insulina en los tejidos, se dará lugar a una hiperglucemia, y al desarrollo de diabetes tipo 2, íntimamente asociada a la obesidad (Schwartz et al., 1997; Schwartz et al., 2000).

Al igual que la leptina, la insulina atraviesa la BBB y, a través de receptores localizados en el hipotálamo, principalmente en el ARC, promueve la supresión de la ingesta, estimulando la producción y expresión de POMC y disminuyendo la de NPY (Porte et al., 2005). Por lo tanto, la deficiencia de insulina provoca hiperfagia pero sin producir obesidad, dado que las células adiposas no son capaces de almacenar grasa en su ausencia (Schwartz et al., 2000).

3 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

El gasto energético está compuesto por tres factores: la tasa metabólica basal (BMR, *basal metabolic rate*), la actividad física y la termogénesis. La BMR hace referencia a la energía necesaria para el mantenimiento de la homeotermia y el metabolismo celular. La actividad física, por su parte, incluye la actividad tanto intencionada como no intencionada y la postura bípeda. El último factor, la termogénesis, se corresponde con la producción de calor que no está relacionada con la actividad física (Landsberg et al., 2009). En personas sedentarias, el 80% del gasto de energía se produce por la BMR, el 10% por la actividad física y el otro 10% por la termogénesis. En contraste, en personas activas, la actividad física, junto con la termogénesis, pueden alcanzar el 44% del gasto total de energía mientras que la BMR constituiría el 56% (Doucet et al., 2003; Landsberg et al., 2009).

La termogénesis es esencial para los organismos homeotermos porque permite mantener su temperatura corporal estable. Se pueden diferenciar dos tipos de termogénesis: la termogénesis obligatoria y la termogénesis adaptativa. La termogénesis obligatoria es necesaria para el mantenimiento de la temperatura en estado de reposo en condiciones de termoneutralidad y se relaciona con las reacciones del metabolismo energético esenciales del organismo y con la regulación del efecto térmico que produce la ingesta de alimentos. (Himms-Hagen, 1989a). Este tipo de termogénesis puede englobarse en la BMR puesto que no se producen grandes variaciones en ella. La termogénesis adaptativa, por el contrario, se corresponde con procesos metabólicos que pueden ser rápidamente activados o suprimidos en respuesta a estímulos externos como el frío o una dieta hipercalórica. En ella se incluyen la energía disipada en forma de calor a través del movimiento de temblor del músculo esquelético o a través de la activación del BAT (Himms-Hagen, 1989a, b).

La termogénesis del BAT es especialmente relevante en pequeños mamíferos puesto que les permite generar calor independientemente de la termogénesis mediada por temblor del músculo esquelético, lo cual posibilita sobre todo exposiciones a frío prolongadas (Cannon and Nedergaard, 2004). El BAT es un órgano especializado en la generación de calor y, en roedores, se localiza en las regiones interescapular, subescapular, axilar, perirrenal y periaórtica (Cannon and Nedergaard, 2004). Hasta hace pocos años, se consideraba que el BAT era solo relevante en mamíferos hibernantes, roedores y humanos recién nacidos (Cannon and Nedergaard, 2004; Whittle et al., 2011) pero, mediante tomografía por emisión de positrones se han encontrado regiones de BAT funcional en humanos adultos localizadas de manera dispersa pero definidas en la zona supraclavicular, el cuello, áreas intercostales, región perirrenal y periaórtica (Cypess et al., 2009; Nedergaard et al., 2010). La termogénesis de BAT en humanos puede llegar a contribuir en un 5% al gasto energético (van Marken Lichtenbelt and Schrauwen, 2011). Por ello, se ha postulado como un recurso adicional en las estrategias de tratamiento de la obesidad (Whittle et al., 2011).

Aunque el BAT está compuesto por adipocitos, denominados adipocitos marrones, éstos presentan características tanto anatómicas como funcionales muy diferentes a los adipocitos blancos del tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*). Los adipocitos marrones tienen forma poligonal con gotas lipídicas multiloculares y numerosas mitocondrias que contienen citocromos con hierro otorgando la coloración marrón al tejido (Contreras et al., 2015; Labbe et al., 2015). En cambio, los adipocitos blancos son principalmente depósitos de grasa con muy

pocas mitocondrias y una única gota lipídica de gran tamaño donde se almacena el exceso de energía (Contreras et al., 2015; Labbe et al., 2015). Además, proceden de células precursoras distintas puesto que se ha visto que, antes de su diferenciación, ya expresan diferentes genes (Sanchez-Gurmaches and Guertin, 2014; Seale et al., 2008; Shan et al., 2013).

Los adipocitos marrones están especializados en la disipación de energía en forma de calor gracias a la presencia de la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*) en las mitocondrias (Kozak et al., 1988; Nicholls et al., 1978). En el proceso de fosforilación oxidativa de las mitocondrias, la cadena de transporte electrónico produce un gradiente de protones que son utilizados por la ATP sintasa para dar lugar a ATP a partir de ADP. Sin embargo, en las mitocondrias de estos adipocitos, este proceso se ve modificado por UCP1, la cual permite una vía de paso opcional a estos protones, eludiendo la ATP sintasa y produciendo calor (Silva, 2006; Zingaretti et al., 2009).

Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de adipocito, denominado adipocito beige, que pueden aparecer en el WAT en respuesta a un estímulo termogénico, proceso denominado *browning*, y que tiene capacidad termogénica (Contreras et al., 2014; Young et al., 1984) (Imagen 3). Este tipo de adipocitos deriva de células precursoras distintas de los adipocitos marrones pero cercanas al linaje de los adipocitos blancos (Wu et al., 2012). Pese a ello, presentan las mismas características morfológicas y moleculares de los adipocitos marrones y actúan como tal, aunque su poder termogénico *in vivo* es mucho menor que el de los adipocitos marrones (Petrovic et al., 2010; Shabalina et al., 2013). De hecho, se ha visto que, en humanos, el BAT localizado en la zona supraclavicular presenta un perfil de biomarcadores más similar al de los adipocitos beige que al de los adipocitos marrones (Jespersen et al., 2013; Wu et al., 2012).

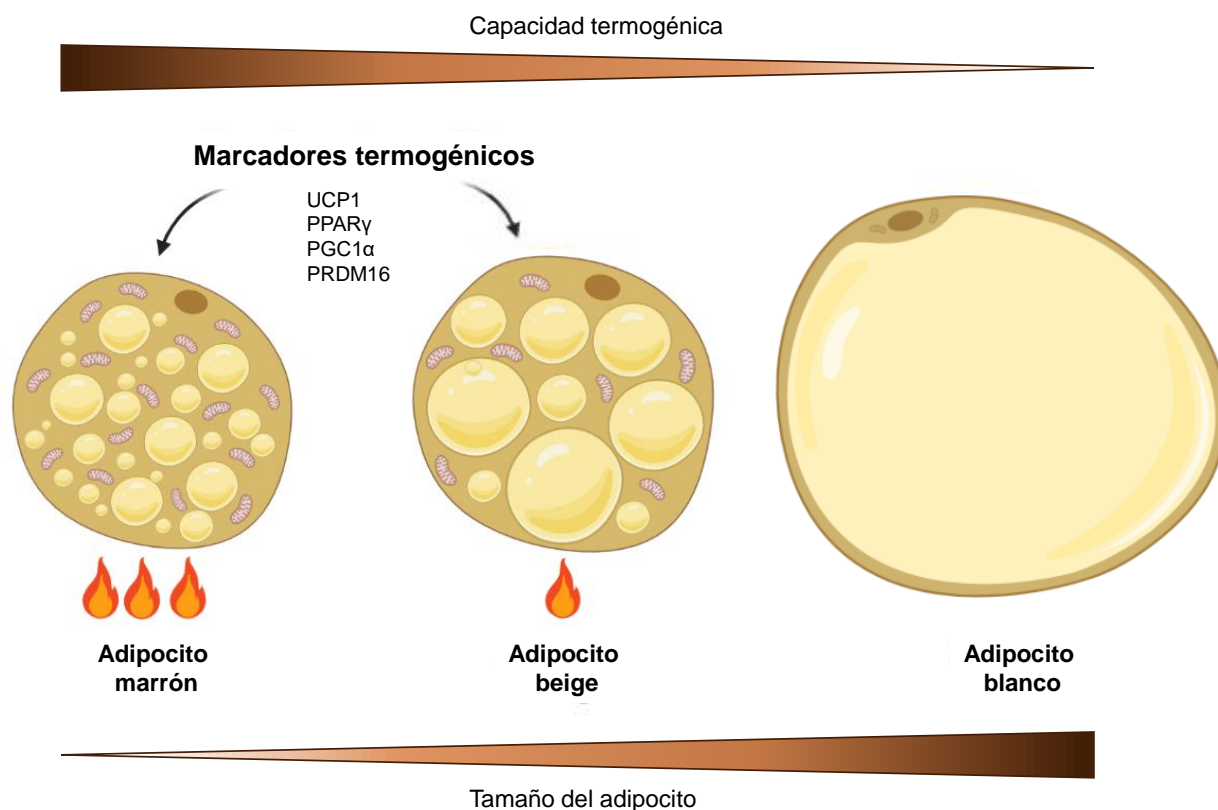


Imagen 3. Adipocitos marrones, beige y blancos. Creado con Biorender.com.

Para que se produzca el fenómeno de *browning*, existen varios factores que son imprescindibles. Entre ellos, los más relevantes son la expresión del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16, *PR domain containing 16*), la proteína 1 alfa coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α , *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*) y la proteína de interacción con receptores 140 (RIP140, *receptor-interacting protein 140*). Estos factores junto con UCP1 se emplean como marcadores de termogénesis tanto del *browning* del WAT como del BAT (Contreras et al., 2015). PPAR γ es un factor de transcripción esencial para la supervivencia de los adipocitos marrones y blanco (Spiegelman et al., 2000) y además promueve la formación de adipocitos beige induciendo la expresión de UCP1 y PGC1 α a través de la activación de PRDM16 (Ohno et al., 2012; Petrovic et al., 2010; Seale, 2010; Seale et al., 2008). PGC1 α controla la biogénesis mitocondrial y factores respiratorios mitocondriales lo que la hace esencial para el correcto funcionamiento de la termogénesis (Puigserver et al., 1998; Uldry et al., 2006; Wu et al., 1999). PRDM16, al igual que PPAR γ , está implicado en la regulación de genes del BAT y WAT (Fruhbeck et al., 2009), siendo necesaria su asociación con PGC1 α para estimular genes específicos del BAT (Kajimura et al., 2008). Por el otro lado, está la proteína RIP140, un receptor nuclear que ejerce una función opuesta puesto que suprime la expresión de UCP1 e inhibe la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo implicado en la termogénesis (Christian et al., 2005; Leonardsson et al., 2004; Powelka et al., 2006). Por ello,

su eliminación en el WAT favorece la formación de adipocitos beige (Christian et al., 2005; Leonardsson et al., 2004).

Tanto el BAT como el WAT se encuentran inervados por fibras del SNS, el cual promueve la termogénesis del BAT y la movilización de lípidos del WAT (Bartness et al., 2014; Brito et al., 2008; Cannon and Nedergaard, 2004; Villarroya and Vidal-Puig, 2013; Whittle et al., 2011) gracias a la presencia de receptores β_3 adrenérgicos al menos en roedores (β_3 -AR; β_3 -adrenergic receptor) (Carpéné et al., 1998; Collins et al., 2004; Cypess et al., 2015). La administración de agonistas adrenérgicos estimula la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT, mientras que la administración subcutánea de antagonistas de los β_3 -AR disminuyen la termogénesis del BAT y el *browning* el WAT (Bartness et al., 2010; Contreras et al., 2017b; Giralt and Villarroya, 2013; Lage et al., 2016; Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014). El tipo de receptores que se expresa en BAT en humanos todavía no está claro (Riis-Vestergaard et al., 2019).

El SNS es esencial para la activación de la termogénesis del BAT. Cuando aumenta el tono de los nervios simpáticos que inervan el BAT, se produce la liberación de norepinefrina (NE, *norepinephrine*) en las terminaciones que activan los β_3 -AR. Estos receptores están acoplados a proteínas G que activan la adenilato ciclasa (AC, *adenylate cyclase*) y desencadenan una elevación del adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Este aumento del cAMP activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), la cual promueve la termogénesis y la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK, *p38 mitogen-activated protein kinase*) (Cannon and Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015). PKA tiene efectos agudos y crónicos en el BAT. Entre los efectos agudos cabe destacar el incremento de la lipólisis de los ácidos grasos gracias a la activación de la lipasa sensible a hormona (HSL, *hormone sensitive lipase*), la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) y la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*) que hidrolizan estos ácidos grasos dando lugar a la liberación y elevación de ácidos grasos libres en el citosol. Estos ácidos grasos libres son importados al interior de la mitocondria por la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a *carnitine palmitoyltransferase 1a*) donde se oxidan para dar lugar a NADH y FADH, los cuales también se oxidan en la cadena de transporte electrónico (Cannon and Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015; Holm et al., 1987; Morimoto et al., 2001). Esta oxidación genera un gradiente de protones que son después desacoplados por UCP1 para producir calor. En cuanto a los efectos crónicos de la estimulación del BAT, se encuentra el incremento de UCP1 a través de p38 MAPK así como la estimulación de la biogénesis mitocondrial, hiperplasia e hipertrófica del BAT (Cannon and Nedergaard, 2004; Cao et al., 2001; Contreras et al., 2015; Lowell and Spiegelman, 2000) (Imagen 4).

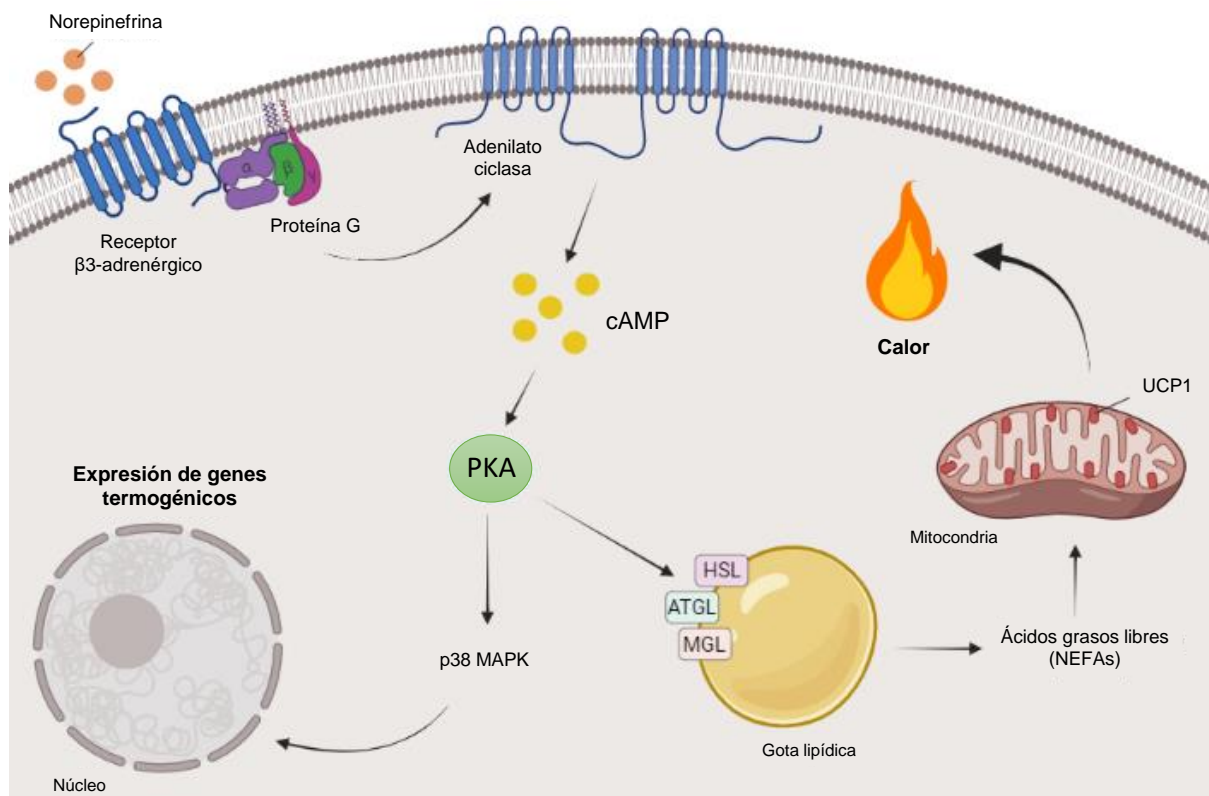


Imagen 4. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. Creado con Biorender.com.

Sin embargo, este modelo no explica por completo la activación de la termogénesis. En el modelo estándar, UCP1 se encuentra inhibido por la unión de ADP y ATP pero esta inhibición es anulada por los ácidos grasos libres que se liberan de la gota lipídica por la acción de la ATGL (Cannon and Nedergaard, 2017). Diversos estudios han demostrado que, en ausencia de ATGL o enzimas activadas por ésta, es posible la termogénesis puesto que el BAT es capaz de captar ácidos grasos libres liberados por el WAT (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017). En este modelo, los ácidos grasos libres actuarían como sustratos y activadores de UCP1 sin que el SNS estuviera implicado en la activación de la termogénesis. No obstante, se cree que en este modelo aún se necesitaría de un activador para UCP1, procedente de la estimulación del SNS, para que estos ácidos grasos libres que provienen del WAT tuvieran efecto, ya que muchos estudios han demostrado que el SNS es esencial para la activación de la termogénesis (Cannon and Nedergaard, 2017). Por lo tanto, el BAT no solo es capaz de aumentar el gasto energético sino que también es capaz de disminuir la concentración de lípidos y glucosa del plasma gracias a su captación y utilización como sustratos de la termogénesis (Bartelt et al., 2011; Contreras et al., 2015; Meyer et al., 2010).

La termogénesis del BAT está regulada por distintos estímulos y hormonas periféricas que, a través de la integración de sus señales, principalmente en los núcleos del hipotálamo, controlan la activación del SNS hacia el BAT. Así, las hormonas tiroideas (THs, *thyroid hormones*), el estradiol (E₂), el GLP-1, la proteína morfogenética del hueso 8b (BMP8b; *bone morphogenetic protein 8B*) y la nicotina entre otras muchas, son capaces de activar la termogénesis del BAT (Beiroa et al., 2014; Contreras et al., 2015; Gonzalez-Garcia et al., 2018;

Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014; Martinez de Morentin et al., 2012; Whittle et al., 2012).

4 HIPOTÁLAMO Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El CNS es el encargado de recoger todas las señales periféricas para integrarlas y regular la homeostasis energética mediante un proceso complejo que involucra varias regiones del encéfalo que van desde la corteza hasta el tronco encefálico, siendo el hipotálamo una de las regiones más relevantes en esta regulación (Williams et al., 2001). El hipotálamo desempeña un papel fundamental en la integración de señales aferentes que llegan al CNS, puesto que recoge la información, “la compara” con los niveles fisiológicos y posteriormente activa respuestas autónomas, endocrinas y conductuales para mantener la homeostasis (Saper and Lowell, 2014). Se encuentra situado debajo del tálamo y contiene circuitos neuronales altamente conservados que controlan funciones básicas como el metabolismo energético (Lopez et al., 2007b; Saper and Lowell, 2014), el balance hídrico y electrolítico, la termorregulación, las respuestas a estrés, la reproducción y los ciclos de vigilia y sueño (Saper and Lowell, 2014).

El hipotálamo se puede dividir en tres partes desde la zona rostral a la caudal. La parte rostral, o área preóptica, se encuentra encima de los quiasmas ópticos y contiene circuitos claves para la termorregulación, la fiebre, el balance electrolítico, los ciclos de vigilia y sueño, los ritmos circadianos y el comportamiento sexual. La parte media, también denominada área tuberal, incluye tanto circuitos integradores para la termorregulación e ingesta como circuitos de respuesta para el comportamiento sexual, la agresividad y muchas otras respuestas autónomas y endocrinas. La parte posterior, o área posterior, juega un papel importante en la regulación de la vigilia y las respuestas a estrés, puesto que proyecta al hipocampo y al sistema de excitación (Saper and Lowell, 2014).

Las distintas áreas del hipotálamo están organizadas en grupos poblacionales de neuronas definidos anatómicamente, denominados núcleos hipotalámicos, que forman circuitos neuronales interconectados entre sí a través de proyecciones axonales. Estos núcleos regulan la expresión de distintos neurotransmisores y neuromoduladores específicos en función a las señales periféricas (Lopez et al., 2007b). Dentro de estos núcleos, algunos de los más relevantes en la regulación de la homeostasis energética son: el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*), el núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular nucleus*), el núcleo dorsomedial (DMH *dorsomedial hypothalamic nucleus*), el núcleo ventromedial (VMH *ventromedial hypothalamic nucleus*) y el área lateral hipotalámica (LHA, *lateral hypothalamic area*) (Imagen 5).

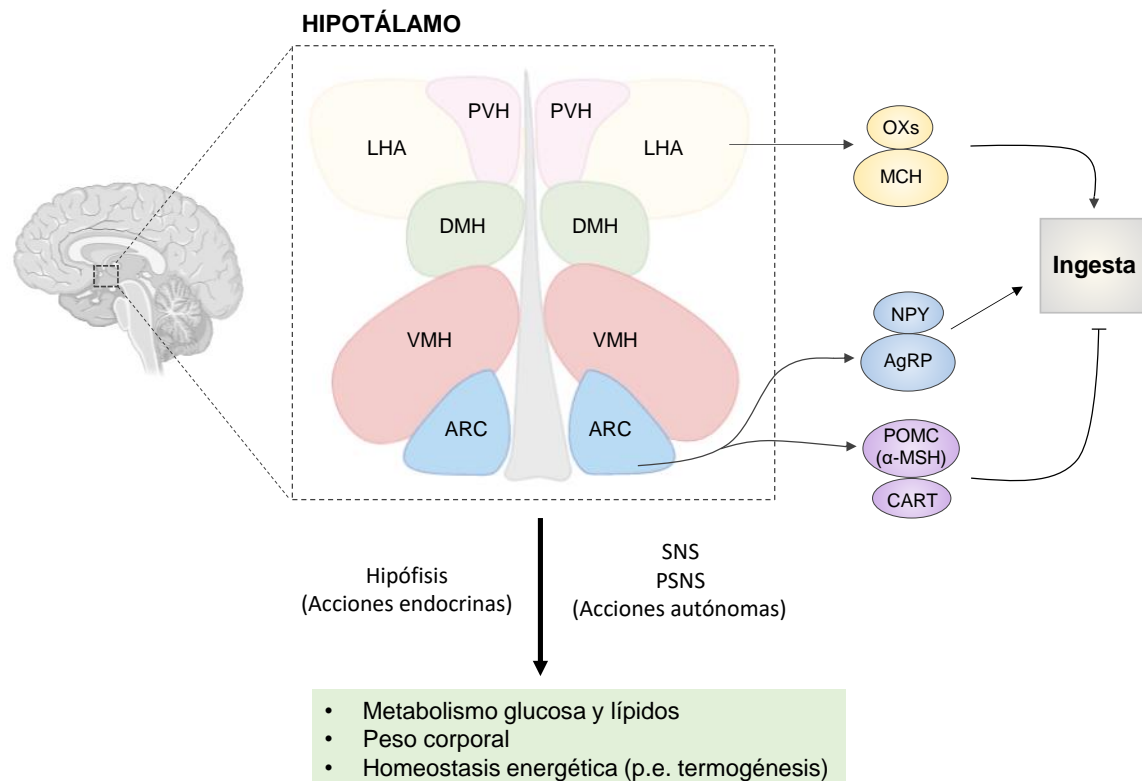


Imagen 5. Núcleos del hipotálamo. Creado con Biorender.com.

4.1 NÚCLEO ARCUATO

El ARC es uno de los núcleos del hipotálamo más importantes en la regulación de la ingesta. Se localiza en la parte inferior del hipotálamo, alrededor del tercer ventrículo e inmediatamente por encima de la eminencia media, la cual no se encuentra totalmente aislada de la circulación por la BBB y por lo tanto permite el paso de señales periféricas como la insulina, la leptina, la glucosa y la grelina, entre otras (Palkovits, 2003; Simpson et al., 2009; Williams et al., 2001). Esta posición estratégica hace del ARC el lugar perfecto para integrar estas señales de manera rápida.

Dentro del ARC, encontramos dos poblaciones neuronales muy heterogéneas que se encargan del control de la ingesta de manera opuesta. La primera población se localiza en la parte media del núcleo y corresponde con neuronas que estimulan la ingesta a partir de la expresión de neuropéptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) y péptido relacionado con agutí (AgRP, *agouti-related peptide*). La segunda población de neuronas se encuentra en la parte lateral del núcleo y se encarga del efecto contrario, de disminuir la ingesta, a través de la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como la proopiomelanocortina (POMC, *proopiomelanocortin*) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*). Estas dos poblaciones no solo son capaces de interactuar entre sí, sino que también proyectan sus axones a neuronas de

segundo orden localizadas principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH) (Lopez et al., 2007a; Palkovits, 2003; Simpson et al., 2009; Valassi et al., 2008).

4.1.1 Neuronas NPY/AgRP

El neuropéptido NPY está compuesto por 36 aminoácidos y se expresa ampliamente en todo el CNS, sin embargo la mayoría de las neuronas que lo expresan se encuentran en el ARC (Gehlert et al., 1987). NPY es un gran regulador del balance energético puesto que su administración central es capaz de incrementar la ingesta (Clark et al., 1984; Stanley et al., 1986) y de reducir la termogénesis del BAT (Egawa et al., 1991; Shi et al., 2013). NPY actúa a través de 5 tipos de receptores (Y1-Y5), pero principalmente ejerce sus acciones orexigénicas a través del Y1 y el Y5 (Nguyen et al., 2012). El 90% de las neuronas que expresan este neuropéptido en el ARC también coexpresan el neuropéptido AgRP (Valassi et al., 2008). Este neuropéptido se considera otro de los neuropéptidos orexigénicos más potentes puesto que, su administración central o su sobreexpresión génica, llevan a un incremento crónico de la ingesta y una disminución el gasto energético (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Small et al., 2003).

Estas neuronas expresan receptores para las señales hormonales aferentes, lo que permite este control de la homeostasis energética. Así, leptina e insulina inhiben la expresión de estos péptidos (Schwartz et al., 1992; Wang et al., 1997) mientras que la grelina es capaz de aumentar su expresión (Kamegai et al., 2001). Además, estas neuronas tienen proyecciones que alcanzan neuronas localizadas en el PVH, LHA, VMH, DMH y el área perifornical (PFA; *perifornical area*) (Simpson et al., 2009; Valassi et al., 2008).

4.1.2 Neuronas POMC/CART

POMC es un precursor polipeptídico, que una vez escindido por una enzima prohormona convertasa, da lugar a una serie de hormonas entre las que se encuentra la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH, *alpha melanocyte stimulating hormone*), uno de los principales reguladores del balance energético (Valassi et al., 2008). Esta melanocortina ejerce sus efectos a través de receptores acoplados a proteína G, denominados receptores de melanocortina, dentro de los cuales los receptores 3 y 4 (MC3R y MC4R, *melanocortin receptors 3 and 4*) se localizan en el cerebro y, concretamente, MC4R se expresa en el hipotálamo, sobre todo en el PVH (Kishi et al., 2003; Mountjoy et al., 1994; Simpson et al., 2009). La unión de α -MSH al receptor MC4R inhibe la ingesta, por lo que la deficiencia de MC4R o el uso de antagonistas causa obesidad e hiperfagia (Cone, 2006; Huszar et al., 1997). Estudios recientes en humanos han demostrado que mutaciones en el MC4R están asociadas con obesidad, validando la importancia del sistema de melanocortinas en la regulación de la homeostasis energética (Farooqi et al., 2003).

La mayoría de las neuronas POMC en el ARC coexpresan también CART. CART es un precursor de péptidos inhibidores de la ingesta como han demostrado diversos estudios en los que se ha administrado centralmente (Kristensen et al., 1998; Thim et al., 1998), siendo incluso capaz de modular los efectos producidos por NPY, disminuyéndolos (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998; Wang et al., 2000). También modula el gasto energético, estimulando la termogénesis en el BAT (Kotz et al., 2000).

La expresión de estos dos péptidos también está regulada por las señales hormonales periféricas, como es el caso de la leptina. Así, al aumentar la leptina circulante, se activa la

expresión de los péptidos POMC y CART (Elias et al., 1999; Elias et al., 1998; Schwartz et al., 1997).

4.2 NÚCLEO VENTROMEDIAL

El VMH es un núcleo altamente conservado en las especies que está formado por células bilaterales y que se encuentra situado en la base del hipotálamo, al lado del tercer ventrículo y por encima del ARC (McClellan et al., 2006). Juega un papel muy importante en la regulación de homeostasis energética como han demostrado diversos estudios en los que, lesiones en esta región, llevaban al desarrollo de un fenotipo obeso (Hetherington and Ranson, 1940; Shimizu et al., 1987). También es un núcleo importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa debido a la alta expresión de los receptores de leptina (LepR, *leptin receptor*) e insulina (IR, *insulin receptor*) (Elmqvist et al., 1998; Minokoshi et al., 1999; Paranjape et al., 2011; Song et al., 2001) y en la regulación del gasto energético través de la termogénesis del BAT (Holt et al., 1987; Hugie et al., 1992). Además, está implicado en procesos como el comportamiento sexual femenino y la función cardiovascular (McClellan et al., 2006; Shimogawa et al., 2014).

En el VMH se pueden diferenciar distintos tipos neuronales en función de su expresión génica. Así, encontramos la expresión del factor esteroideogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*), el receptor canabinoide 1 (CB1, *cannabinoid receptor 1*), cerebelin 1 (Cbln1, *cerebellin 1*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), el receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*) y el receptor de estrógenos alfa (ER α , *estrogen receptor alpha*), entre otros (Choi et al., 2013; Segal et al., 2005). De todos ellos, SF1 es el único gen expresado exclusivamente del VMH en todo el CNS (Ikeda et al., 1995), siendo esencial para el correcto desarrollo del núcleo (Davis et al., 2004; Kurrasch et al., 2007) y para la modulación del balance energético ya que su delección da lugar a un fenotipo obeso (Majdic et al., 2002). Además, estas neuronas que expresan SF1 contienen una elevada expresión de los LepR (Dhillon et al., 2006). El BDNF también es otro factor que se expresa altamente en el VMH y está relacionado con el control de la masa corporal (Lyons et al., 1999; Rios et al., 2001; Wang et al., 2020b) y con los efectos anorexigénicos de la leptina, la cual aumenta la expresión de este factor (Komori et al., 2006).

El VMH tiene muchas conexiones con otras áreas cerebrales implicadas en la homeostasis energética entre las cuales se encuentran tanto otras regiones del hipotálamo como el DMH, LHA y PVH como regiones extrahipotalámicas como el tronco cerebral, la amígdala y la eminencia media (Palkovits, 2003; Renaud and Martin, 1975; Seoane-Collazo et al., 2015; Wang et al., 2007). El VMH también recibe proyecciones neuronales de otras áreas como el ARC procedentes de las neuronas NPY, AgRP y POMC (Simpson et al., 2009) y para las cuales expresa los receptores Y1, Y5 y MC4R (Li and Davidowa, 2004; Lopez-Valpuesta et al., 1996).

La relevancia del núcleo VMH en la homeostasis de la glucosa se demostró por primera vez en estudios de estimulación eléctrica. En ellos, al estimular eléctricamente el VMH, se produce un aumento de la glucosa en sangre debido a una activación de la glucogenólisis en el hígado (Shimazu et al., 1966). Esta hiperglucemia producida por la estimulación del VMH está mediada por hormonas gluconeogénicas como el glucagón y por la inervación simpática del hígado (Shimazu and Amakawa, 1968; Shimazu and Fukuda, 1965; Shimazu and Minokoshi, 2017). Por otro lado, y en contraste con estos resultados, el VMH también aumenta la captación de glucosa en tejidos periféricos como el BAT, corazón y músculo esquelético (Shimazu et al., 1991; Sudo et al., 1991). La administración de leptina en este núcleo aumenta esta captación por los tejidos periféricos y es suprimida al denervar el SNS, poniendo de manifiesto la

importancia de la leptina y del eje VMH-SNS en la regulación de la homeostasis de la glucosa por el VMH (Minokoshi et al., 1999; Minokoshi et al., 1986).

Otro pilar de la homeostasis energética es el gasto energético, donde el VMH es considerado uno de los principales reguladores gracias a la modulación de la termogénesis del BAT y la estimulación del *browning* en el WAT (Contreras et al., 2016). La estimulación eléctrica del VMH produce un aumento de la temperatura del BAT, efecto que se inhibe con el bloqueo de los β 3-AR (Perkins et al., 1981) poniendo de nuevo de manifiesto la importancia del eje VMH-SNS en la modulación de los tejidos periféricos. Diversas señales periféricas actúan a través de este eje modulando la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT como son las hormonas tiroideas (THs, *thyroid hormones*) (Alvarez-Crespo et al., 2016; Lopez et al., 2010b; Martínez-Sánchez et al., 2017a), BMP8B (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012), la leptina (Tanida et al., 2013), el E₂ (Gonzalez-García et al., 2018; Gonzalez-García et al., 2017; Martínez de Morentin et al., 2014; Tanida et al., 2013), los análogos de GLP-1 (Beiroa et al., 2014) y drogas como la nicotina (Martínez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014). Además, lípidos complejos como las ceramidas, también están implicados en la regulación de la termogénesis en este núcleo. La acumulación de ceramidas en el VMH provoca lipotoxicidad que da lugar a un aumento del estrés del retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*) y a una reducción del tono simpático del BAT, disminuyendo la termogénesis (Contreras et al., 2014). Así, la sobreexpresión de la proteína regulada por glucosa 78 (GRP78, *glucose regulated protein 78*), también conocida como BiP, específicamente en el VMH reduce el estrés de ER, favoreciendo la termogénesis en el BAT y el *browning* del WAT (Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2017a; Linares-Pose et al., 2018).

4.3 NÚCLEO DORSOMEDIAL

El DMH se localiza a ambos lados del tercer ventrículo, dorsalmente al VMH, y está implicado en procesos fisiológicos tales como el apetito, el estrés, la termorregulación y los ritmos circadianos (Schneeberger et al., 2014). Además, tiene la capacidad de integrar las señales hipotalámicas puesto que recibe numerosas proyecciones de los demás núcleos hipotalámicos como, por ejemplo, de las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC y, a su vez, envía proyecciones a otros núcleos como el PVH y el VMH (Palkovits, 2003; Thompson et al., 1996).

Diversos estudios revelaron la importancia del DMH en la regulación de la homeostasis energética. Lesiones en el DMH producían a una disminución de la ingesta y del peso corporal (Bernardis and Bellingher, 1987) mientras que su activación provocaba un aumento del gasto energético a través de un incremento de la termogénesis (Dimicco and Zaretsky, 2007). Dentro del DMH, se expresan una serie de neuropéptidos y receptores que están implicados en este control del balance energético entre los cuales encontramos el NPY y el LepR (Bi et al., 2001; Mercer et al., 1996). La deficiencia del LepR en el DMH lleva a una reducción de la termogénesis del BAT, incrementando la masa corporal, y la administración de leptina en este núcleo provoca un aumento de la termogénesis del BAT y de la temperatura corporal (Contreras et al., 2014; Enriori et al., 2011; Rezai-Zadeh et al., 2014). Por otro lado, el neuropéptido NPY tiene efecto sobre la ingesta pero, a diferencia del ARC, su expresión es independiente de la leptina (Bi et al., 2003). La sobreexpresión de este neuropéptido en el DMH provoca un aumento de la ingesta y por lo tanto un incremento del peso corporal (Yang et al., 2009). Además, influye en el gasto energético puesto que su ausencia en este núcleo promueve un aumento del *browning* del WAT y la termogénesis del BAT (Chao et al., 2011).

4.4 NÚCLEO PARAVENTRICULAR

El PVH se localiza en el hipotálamo anterior, a ambos lados del tercer ventrículo, y juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética ya que integra numerosas aferencias de otras regiones hipotalámicas y del tronco cerebral, así como señales del estado fisiológico del organismo (Sutton et al., 2016). Además, es el principal núcleo del hipotálamo que envía proyecciones a regiones extrahipotalámicas del cerebro como el NTS, al nervio vago y a la médula espinal (Palkovits, 1999). Por ello, lesiones en el PVH dan lugar a un incremento de la ingesta, con el consecuente desarrollo de obesidad (Aravich and Sclafani, 1983; Tokunaga et al., 1986).

La función del PVH se encuentra estrechamente ligada con la ruta de las melanocortinas puesto que posee una alta expresión de los receptores MC3R y MC4R (Kishi et al., 2003; Sutton et al., 2014) y axones procedentes de neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC (Cowley et al., 1999). Gracias a ello, es capaz de mediar los efectos en la ingesta de señales como la leptina. La leptina estimula la secreción de α -MSH por las neuronas POMC/CART del ARC, que activa los receptores de melanocortinas del PVH inhibiendo la ingesta (Qin et al., 2018). Así, la expresión de MC4R en ratones obesos deficientes de MC4R revertía su hiperfagia a niveles basales (Balthasar et al., 2005). Además, la administración de agonistas de los receptores de melanocortinas en este núcleo aumenta el gasto energético (Cowley et al., 1999), posiblemente a través de un incremento de la termogénesis del BAT (Song et al., 2008).

El PVH se divide en dos grandes regiones neuronales, la parvocelular y la magnocelular. Las neuronas magnocelulares liberan vasopresina y oxitocina al sistema circulatorio para regular el balance hídrico y el eje reproductor (Hill, 2012). La oxitocina también está implicada en la regulación de la ingesta, inhibiéndola (Arletti et al., 1990), y está regulada estrechamente por neuronas AgRP del ARC, las cuales pueden potenciar la ingesta a través de la inhibición de la liberación de oxitocina por el PVH (Atasoy et al., 2012).

Las neuronas parvocelulares son las principales neuronas encargadas de proyectar sus axones al NTS, el nervio vago y la médula espinal, lo que les permite controlar directamente la termogénesis, la secreción pancreática, el flujo de glucosa hepática y la captación de glucosa periférica (Geerling et al., 2010; Hill, 2012). Estas neuronas envían axones a la eminencia media donde liberan hormonas que regulan la síntesis de hormonas hipofisarias. Estas hormonas son la hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotrophin-releasing hormone*) y hormona liberadora de tirotropina (TRH, *thyrotropin-releasing hormone*). Ambas son también importantes en la regulación del balance energético, reduciendo la ingesta y activando la termogénesis del BAT (Arase et al., 1988; Hill, 2012), y están reguladas por las neuronas del ARC, siendo estimuladas por las neuronas POMC/CART e inhibidas por las neuronas NPY/AgRP (Pandit et al., 2011; Schwartz et al., 2000). Además, la TRH estimula la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid stimulating hormone*), por parte de la hipófisis, y de las THs por la tiroides, las cuales juegan un papel muy importante en el mantenimiento del balance energético (Hill, 2012; Martínez-Sánchez et al., 2014).

4.5 ÁREA LATERAL HIPOTALÁMICA

El LHA es otro de las áreas hipotalámicas que participa en la regulación de la ingesta. La estimulación de este núcleo da lugar a un incremento de la ingesta mientras que su lesión provoca una disminución, llegando incluso a anularla y, por consiguiente, disminuyendo el peso corporal (Anand and Brobeck, 1951; Delgado and Anand, 1953). Además, las lesiones en LHA

también dan lugar a alteraciones metabólicas y endocrinas como problemas de crecimiento y de la homeostasis de la glucosa (Bernardis et al., 1992; Bernardis and Bellinger, 1996).

Numerosas señales, entre las que se incluyen estímulos metabólicos procedentes de otras áreas cerebrales, llegan al LHA donde se integran para regular la actividad, la ingesta y el estado de alerta según las condiciones nutricionales y ambientales (Goforth et al., 2014; Saper et al., 2002). De hecho, el LHA recibe muchas proyecciones del ARC y contiene una gran cantidad de receptores Y5 que son los responsables de los efectos del NPY sobre la ingesta (Broberger et al., 1998; Hu et al., 1996). También contiene un número alto de neuronas sensibles a glucosa que responden a los niveles plasmáticos por medio de vías aferentes procedentes del hipotálamo (Bernardis and Bellinger, 1996). Asimismo, las neuronas del LHA proyectan a otros núcleos hipotalámicos como el ARC y al sistema mesolímbico, responsable del control hedónico del comportamiento de la ingesta (Pandit et al., 2011; Saper et al., 2002).

El LHA está formado por una población grande y difusa de neuronas pero, entre ellas, se encuentran subpoblaciones definidas que expresan neuropéptidos orexigénicos como la hormona concentradora de melanina (MCH, *melanin-concentrating hormone*) y las orexinas o hipocretinas (OX, *orexin*) que estimulan la ingesta (Broberger et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Terminaciones de las neuronas del ARC, NPY/AgRP y POMC/CART están en contacto con estas neuronas MCH y OX.

4.5.1 Neuronas OX

La OX presenta dos isoformas que proceden del mismo precursor. Éstas son la OX-A y OX-B que actúan a través de dos receptores de OX, el receptor de OX 1 y el receptor de OX 2 (OX1R y OX2R, *orexin receptor 1 and 2*) (Lopez et al., 2010a). Estados de ayuno aumentan la expresión de OX y su administración central, aumenta la ingesta a través de la activación de OX1R y OX2R (Sakurai et al., 1998). La leptina también se considera un modulador importante de la expresión de las OX puesto que inactiva estas neuronas, disminuyendo su expresión (Lopez et al., 2000; Yamanaka et al., 2003). Otra acción de las OX es la regulación del ciclo sueño/vigilia, en donde su ausencia provoca narcolepsia, efecto que puede estar relacionado con la influencia de las OX en la ingesta que provocan estados de excitación y disminución del sueño (Chemelli et al., 1999; Hagan et al., 1999; Nishino et al., 2000). Las OX también participan de la modulación del gasto energético, aumentando la tasa metabólica y la actividad física y estimulando la termogénesis (Martins et al., 2016; Nixon et al., 2012; Tupone et al., 2011). Muchas de estas acciones de las OX se deben gracias a las proyecciones que poseen estas neuronas tanto hacia otros núcleos del hipotálamo como el ARC, VMH y el PVH, como hacia regiones extrahipotalámicas como el NTS y áreas cerebrales implicadas en la regulación de la temperatura y consciencia (Peyron et al., 1998).

4.5.2 Neuronas MCH

Las neuronas que expresan MCH se localizan principalmente en el LHA y presentan numerosas proyecciones a otras áreas cerebrales (Bittencourt et al., 1992). Al igual que las OX, su expresión se ve aumentada en estados de ayuno y su administración específica en el LHA da lugar a un aumento de la ingesta, además de provocar un aumento de la lipogénesis hepática y de la deposición de grasa en el WAT a través del sistema nervioso parasimpático (PSNS, *parasympathetic nervous system*) y el SNS, respectivamente (Imbernon et al., 2013; Qu et al., 1996). Asimismo, la sobreexpresión de MCH induce obesidad y resistencia a insulina (Ludwig et al., 2001). Sus acciones en la homeostasis energética se llevan a cabo a través de receptores

MCH (MCHR, *MCH receptor*). En humanos se han descubiertos dos receptores, MCHR1 y MCHR2, mientras que en roedores solamente se ha identificado MCHR1 (Simpson et al., 2009). La deficiencia de MCHR1 en ratones resulta en una resistencia a la obesidad inducida por dieta y a un aumento del gasto energético y de la actividad física (Chen et al., 2002).

5 AMPK COMO SENSOR ENERGÉTICO

El mantenimiento de la homeostasis energética de un organismo es un proceso complejo y muchos son los factores y señales que influyen en su regulación. A nivel celular, también es necesario que se mantenga el balance energético. La energía liberada en las células por biomoléculas es almacenada como ATP y los procesos metabólicos que necesitan de energía emplean este ATP. El consumo de ATP da lugar a sus precursores ADP y AMP, por lo que las ratios AMP:ATP y ADP:ATP aumentan en procesos de consumo de energía (Lopez et al., 2016). La generación de ATP necesita permanecer en equilibrio con el consumo de ATP para que se puedan mantener las funciones celulares, con lo cual, las proteínas que sean capaces de monitorizar las ratios AMP:ATP y ADP:ATP son esenciales.

Una de las proteínas capaces de responder a estas ratios es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), considerada el principal sensor y regulador de la homeostasis energética de las células eucariotas (Carling et al., 1987; Hardie, 2007). AMPK se expresa en diferentes tejidos incluyendo el cerebro, el hígado y el músculo esquelético. Es activada por fosforilación en respuesta a incrementos de AMP:ATP y ADP:ATP y restablece el balance energético inhibiendo procesos anabólicos que consumen ATP mientras promueve procesos catabólicos que generan ATP (Garcia and Shaw, 2017).

AMPK participa principalmente en la regulación del metabolismo de lípidos y en la homeostasis de la glucosa. La regulación del metabolismo lipídico por vía de la AMPK tiene especial relevancia en el hígado y el hipotálamo. La activación de AMPK disminuye la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS, *fatty acid synthase*), fosforila e inhibe la acetil-CoA carboxilasa (ACC, *acetyl-CoA carboxylase*), la cual cataliza la carboxilación del acetil-CoA para producir malonil-CoA, resultando en una disminución del malonil-CoA, y activa la descarboxilasa malonil-CoA (MCD, *malonyl-CoA decarboxylase*). Esto provoca una reducción de los sustratos de la vía anabólica de ácidos grasos y, por lo tanto, una inhibición de la síntesis de ácidos grasos. Además, también activa la oxidación de ácidos grasos por la reducción de los niveles de malonil-CoA, el cual es un inhibidor alostérico de la CPT1, enzima que importa ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria para su oxidación (Kahn et al., 2005; Lopez et al., 2007a). AMPK también ejerce un potente efecto en el metabolismo de la glucosa, especialmente en el músculo y el hígado. En el músculo, la activación de AMPK incrementa la traslocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4, *glucosa transporter 4*) a la membrana celular, favoreciendo el aumento de la captación de glucosa (Holmes et al., 1999) y fosforila la glucógeno sintasa (GS, *glycogen synthase*), reduciendo su actividad y disminuyendo la síntesis de glucógeno (Wojtaszewski et al., 2002). En el hígado, regula la gluconeogénesis por inhibición de la carboxiquinasa fosfoenolpiruvato (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*) y la glucosa 6 fosfatasa (G6Pase, *glucose-6-phosphatase*) (Lochhead et al., 2000). Por lo tanto, la activación de AMPK provoca una inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la gluconeogénesis mientras activa la oxidación de ácidos grasos y aumenta la

expresión de genes glucolíticos (Berasi et al., 2006; Clarke and Hardie, 1990; Horman et al., 2002; Marsin et al., 2000; Marsin et al., 2002; Muoio et al., 1999). AMPK también participa en procesos celulares como la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular, la biogénesis mitocondrial y la autofagia, entre otros (Carling and Viollet, 2015; Domenech et al., 2015). Además, AMPK regula el metabolismo y la homeostasis energética de todo el organismo, principalmente a través de sus efectos en el hipotálamo, puesto que integra señales hormonales y nutricionales que le permiten regular la respuesta neuronal para el control de la ingesta, el gasto energético y los ritmos circadianos (Bass and Takahashi, 2010; Kim and Lee, 2005; Lopez et al., 2016; Minokoshi et al., 2004). Por todo ello, alteraciones en la función de AMPK están implicadas en una diversidad de patologías entre las que se incluyen la obesidad, diabetes, resistencia a insulina, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kahn et al., 2005; Lage et al., 2008; Namkoong et al., 2005; Qi and Young, 2015; Wang et al., 2016).

5.1 ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE AMPK

5.1.1 Estructura

AMPK es una serotonina/treonina quinasa heterotrimérica ampliamente conservada en todas las especies eucariotas. Está compuesta por tres subunidades: una catalítica, la subunidad α , y dos subunidades reguladoras, β y γ . En mamíferos, cada subunidad es codificada por múltiples genes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) que resultan en 12 posibles combinaciones de complejos AMPK con distintas distribuciones en los tejidos y órganos (Lopez et al., 2016). La subunidad α contiene un dominio quinasa N-terminal, un dominio autoinhibitorio y un dominio regulador C-terminal que es necesario para la interacción con las subunidades β y γ . La subunidad β actúa como unión entre la subunidad α y la γ a través de su dominio C-terminal y contiene un dominio de unión a glucógeno (Huynh et al., 2016). La subunidad γ contiene cuatro dominios de la cistationina β -sintasa (CBS; *cystathione β -synthase domains*) que permiten la unión de los nucleótidos adenina AMP, ADP y ATP, actuando como reguladores alostéricos (Gowans et al., 2013; Hardie et al., 2012).

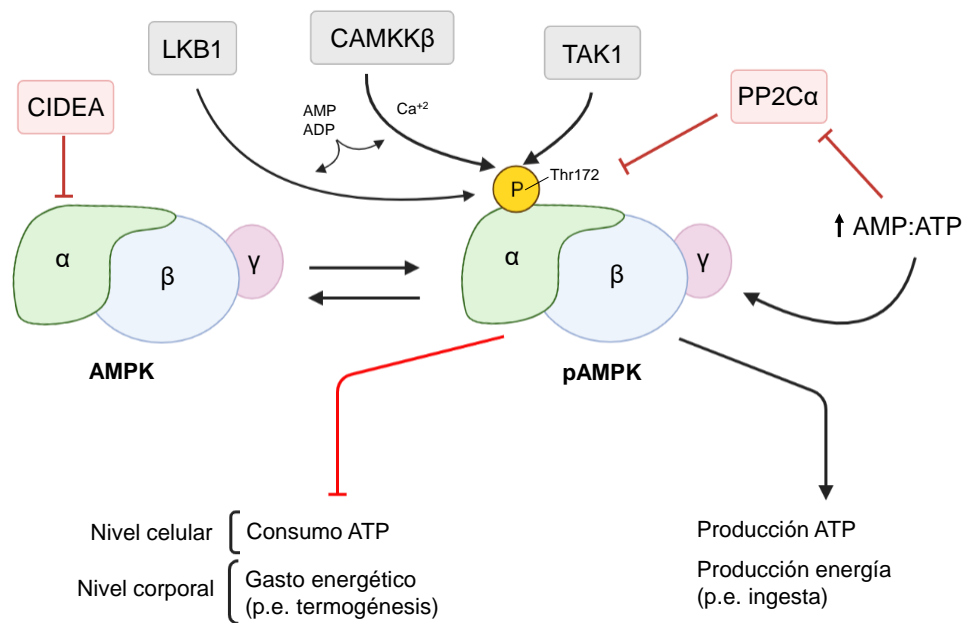
5.1.2 Regulación

La fosforilación es el principal mecanismo de activación de AMPK, concretamente en la treonina 172 (Thr-172) que se encuentra en la subunidad catalítica α (Hawley et al., 1996). Este proceso está alostéricamente regulado por AMP y ADP y catalizado por varias quinasas *upstream* (Lopez et al., 2016). Su actividad también se encuentra regulada por la desfosforilación y la degradación por ubiquitinación, que provocan la disminución de su actividad (Davies et al., 1995; Qi and Young, 2015; Qi et al., 2008).

La activación alostérica de AMPK está mediada por AMP y ADP, siendo AMP diez veces más potente que ADP y, además, también intervienen alostericamente en la inhibición de la desfosforilación por fosfatasas (Gowans et al., 2013; Oakhill et al., 2011; Ross et al., 2016). Esta activación alostérica promueve la fosforilación de AMPK por las quinasas *upstream*. Entre estas quinasas cabe destacar dos principalmente: la quinasa hepática B1, un supresor tumoral, (LKB1, *liver kinase B1*) y las calcio/calmodulina quinasa quinasa (CaMKK, *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*) CaMKK α o CaMKK β (Carling 2008). LKB1 es una quinasa que se encuentra constitutivamente activa y es la principal quinasa que fosforila AMPK bajo condiciones de estrés energético, puesto que es necesaria para la

activación de AMPK en condiciones de AMP elevado (Claret et al., 2011; Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003). Las CaMKK también fosforilan a AMPK en la Thr172, siendo la CaMKK β la más relevante en esta función (Anderson et al., 2008; Hawley et al., 2005; Hurley et al., 2005; Woods et al., 2005). Estas quinasas son activadas con incrementos en el calcio (Ca²⁺) intracelular, independientemente de AMP (Martinez de Morentin et al., 2016). Existen otras quinasas que también activan a AMPK a través de la fosforilación, como la quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1, *transforming growth factor- β -activated kinase 1*) y la quinasa supresora de Ras (KSR2, *kinase suppressor of Ras*) (Costanzo-Garvey et al., 2009; Momcilovic et al., 2006; Xie et al., 2006). Por otro lado, la desfosforilación de AMPK mediante fosfatasa como la proteína fosfatasa 2C α (PP2C α , *protein phosphatase 2C α*) provocan su inhibición (Salminen et al., 2016; Steinberg et al., 2006).

En base a todo esto, se ha propuesto un modelo de la regulación de la actividad de AMPK en el que participan varios mecanismos: 1) un mecanismo dependiente de AMP por el cual el incremento en AMP inhibe a la fosfatasa PP2C α permitiendo que LKB1 que se encuentra constitutivamente activa incremente la fosforilación en la Thr172 de AMPK y su consecuente activación, 2) un mecanismo dependiente de Ca²⁺ e independiente de AMP en el cual, al incrementar el Ca²⁺ se activa la CaMKK β , incrementando la fosforilación de AMPK (Lage et al., 2008; Sanders et al., 2007) y 3) un mecanismo independiente de AMP y de la fosforilación o desfosforilación que conlleva la disminución de la actividad AMPK por la formación de un complejo con el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*) que permite la ubiquitinación y su posterior degradación (Lage et al., 2008; Qi et al., 2008) (Imagen 6).



5.2 AMPK EN EL HIPOTÁLAMO

AMPK está altamente expresada en el hipotálamo donde las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ se encuentran en los núcleos ARC, VMH, PVH y LHA (Lopez et al., 2016). Muchas hormonas y señales nutricionales que afectan a la ingesta y el gasto energético lo hacen vía activación o inhibición de AMPK en el hipotálamo, por lo que tiene un papel clave en la regulación de la homeostasis energética (Huynh et al., 2016) (Imagen 7).

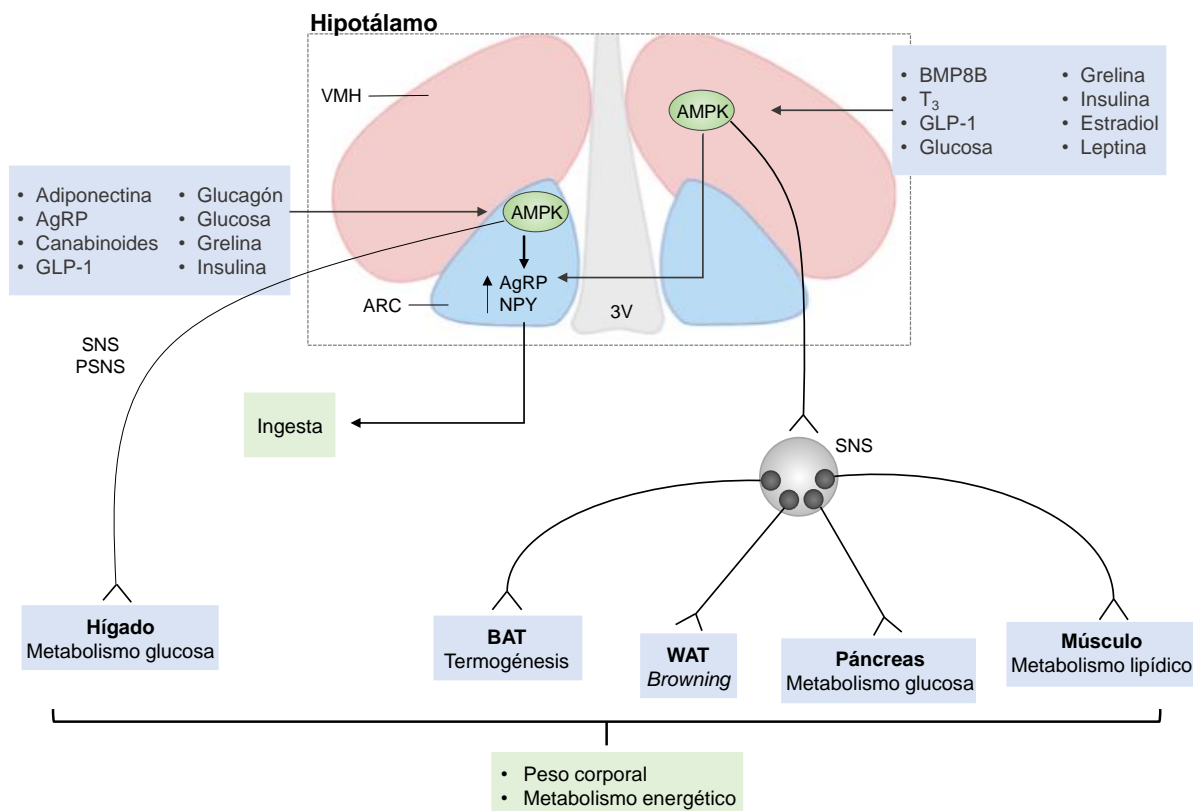


Imagen 7. Modulación del balance energético por AMPK en el hipotálamo. Creado con Biorender.com.

En estados de ayuno se incrementa la actividad de AMPK y en la ingesta se reduce. Esto es debido a que tanto hormonas orexigénicas como anorexigénicas son capaces de modular la actividad de AMPK. Así, hormonas orexigénicas como la grelina, la adiponectina, los glucocorticoides, los canabinoides y neuropéptidos como el AgRP promueven la activación de AMPK mientras que, hormonas anorexigénicas como la leptina, la insulina, el glucagón, el GLP1, el E₂ y la CKK, la inhiben (Andersson et al., 2004; Lopez et al., 2008; Lopez et al., 2016; Martinez de Morentin et al., 2014; Minokoshi et al., 2004; Minokoshi et al., 2002; Namkoong et al., 2005; Quinones et al., 2015). Además, numerosos metabolitos también regulan la función de AMPK. Entre ellas se encuentran la glucosa, el ácido lipoico, los ácidos grasos, el citrato, el lactato y aminoácidos que disminuyen la actividad de AMPK en el hipotálamo (Lopez et al., 2016).

La activación de AMPK provoca un incremento de la ingesta y de la masa corporal mientras que la inhibición produce hipofagia y pérdida de masa corporal (Andersson et al., 2004; Lopez et al., 2008; Minokoshi et al., 2004). Esto se produce, en parte, debido a que AMPK es capaz

de regular la expresión de neuropéptidos en el hipotálamo. La sobreexpresión de AMPK aumenta la expresión de AgRP y NPY en el ARC y de MCH en el LHA durante el ayuno mientras que, la disminución de la expresión mediante isoformas dominantes negativas, disminuye la expresión de AgRP y NPY en el ARC (Minokoshi et al., 2004). Además, la modulación de AMPK presenta un efecto núcleo específico. En ratones deficientes de la isoforma $\alpha 2$ en las neuronas POMC se produce hiperfagia y, en consecuencia, obesidad. En cambio, la deficiencia de esta isoforma en neuronas AgRP da lugar a un fenotipo delgado dependiente, además, de la edad (Claret et al., 2007).

También se ha visto que agentes farmacológicos que provocan una reducción de la ingesta, como agonistas de los receptores de melanocortinas, el C75 (un inhibidor de FAS) y la nicotina lo hacen a través de AMPK hipotalámica, inhibiéndola (Kim et al., 2004a; Martinez de Morentin et al., 2012; Minokoshi et al., 2004). Por el contrario, fármacos que estimulan la ingesta como la olanzapina, activan AMPK en el hipotálamo (He et al., 2014; Skrede et al., 2014).

Otro papel fundamental que ejerce AMPK en el hipotálamo es el de la regulación de la homeostasis de la glucosa en el CNS, donde la principal fuente de energía es la glucosa, y lo protege de condiciones hipoglucémicas. De esta manera, la administración intracerebroventricular de glucosa disminuye la actividad hipotalámica de AMPK mientras que, la inhibición de la utilización de la glucosa intracelular, la aumenta (Alquier et al., 2007; Kim et al., 2004b). Una de las funciones más importantes de AMPK en la hipoglucemia es la participación en la respuesta contrarreguladora de señales como el glucagón, la corticosterona y la epinefrina (Alquier et al., 2007; Fan et al., 2009; Han et al., 2005; McCrimmon et al., 2008). La inhibición de AMPK en el área mediobasal del hipotálamo da lugar a una disminución en la secreción de estas señales provocando una hipoglucemia grave y prolongada (Han et al., 2005; McCrimmon et al., 2008). Además, ratones deficientes en la isoforma $\alpha 2$ de AMPK en las neuronas POMC, presentan una ineficiente regulación de la homeostasis de la glucosa (Claret et al., 2007).

AMPK también media las acciones de otras señales implicadas en el control de la producción de energía, como son la leptina, la cual es capaz de normalizar los niveles de glucosa en sangre en modelos de roedores de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 y en pacientes con lipodistrofia (Coppari and Bjorbaek, 2012; Morton and Schwartz, 2011; Tanida et al., 2015; Tanida et al., 2013), y la fructosa, que incrementa la gluconeogénesis hepática en roedores (Kinote et al., 2012).

5.3 AMPK Y GASTO ENERGÉTICO

En los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de AMPK en la regulación de la termogénesis del BAT a través del SNS. De hecho, en estudios con ratones deficientes de la isoforma $\alpha 2$ se producía un incremento de los niveles de secreción urinaria de catecolaminas, lo que indicaba una hiperactivación del SNS (Viollet et al., 2003) mientras que, en otro estudio con ratones deficientes de tirosina fosfatasa 1B, un inhibidor de la señalización de los IR y los LepR, se observó que la disminución de peso y la resistencia a la obesidad inducida por dieta de estos ratones estaba asociada a la inhibición de la isoforma $\alpha 2$, posiblemente por un aumento de la termogénesis, de la biogénesis mitocondrial y la oxidación muscular (Xue et al., 2009).

Puesto que AMPK media muchas de las acciones de las hormonas implicadas en el balance energético, los efectos sobre la termogénesis del BAT de muchas de ellas también se encuentran regulados a través de AMPK. Así, las THs regulan la termogénesis a través del VMH por inhibición de AMPK, (Lopez et al., 2010b; Martinez-Sanchez et al., 2017a). De la misma manera, la activación de la termogénesis producida por el E₂ está mediada por AMPK en el VMH. (Martinez de Morentin et al., 2014). Por el contrario, la sobreexpresión de AMPK en animales tratados con E₂ centralmente da lugar a una disminución de la termogénesis y, por lo tanto, previene de la pérdida de peso (Martinez de Morentin et al., 2014). Otras señales como BMP8B también inducen la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT a través de la inhibición AMPK en el VMH el hipotálamo (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012). Todos estos hallazgos muestran al eje AMPK(VMH)-SNS-BAT como un mecanismo canónico de modulación del gasto energético (Contreras et al., 2015; Lopez et al., 2016). A través de este eje también actúa la nicotina, que aumenta la termogénesis mediante la inhibición de AMPK en el hipotálamo y provoca una pérdida de peso (Martinez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014). Del mismo modo, el fármaco liraglutide, un análogo de GLP-1 utilizado para el tratamiento de la obesidad, también inhibe la AMPK hipotalámica dando lugar a una activación del BAT y del *browning* de WAT (Beiroa et al., 2014).

6 ASTROCITOS

Las células gliales son células no excitables localizadas en todo el sistema nervioso que han sido consideradas durante mucho tiempo como el “pegamento” celular del cerebro, con un papel pasivo, fundamentalmente actuando como soporte para las neuronas. Sin embargo, en los últimos años, se ha visto que están implicadas en numerosos aspectos de la función neuronal entre las que se incluyen regulación del metabolismo neuronal, neurogénesis, neuroprotección, sinaptogénesis y neurotransmisión (Barres, 1991; Fields and Stevens-Graham, 2002; García-Cáceres et al., 2019; Tasker et al., 2012; Tsacopoulos and Magistretti, 1996). La glía es el tipo celular más abundante en el cerebro y se puede clasificar en dos tipos: (i) microglía y (ii) macroglía, donde se incluyen astrocitos, oligodendrocitos y tanicitos. La microglía es considerada como los macrófagos cerebrales puesto que actúan como la primera línea de defensa en el CNS en procesos como la inflamación y el daño cerebral (Loane and Kumar, 2016). Por otro lado, dentro de la macroglía, los astrocitos son considerados el tipo de célula glial más abundante del cerebro (Camandola, 2018). La gran mayoría posee una forma estrellada con múltiples prolongaciones que irradian del cuerpo celular y que terminan en forma de pie en los vasos sanguíneos o en contacto con otros astrocitos, con el soma de las neuronas o con las sinapsis. Muchos de ellos presentan una proteína denominada proteína gliofibrilar ácida (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) que actúa como un filamento intermedio (García-Cáceres et al., 2019; Garcia-Caceres et al., 2012). Además, poseen receptores, transportadores y enzimas que son capaces de responder a hormonas y factores metabólicos por lo que la producción, entrega y almacenamiento de energía en el cerebro depende en gran medida de ellos (Camandola, 2018; Levin et al., 2011; Zhou, 2018).

Las células gliales también participan en la respuesta a lesiones o enfermedades gracias a que son capaces de activarse. Esta activación es un proceso por el cual la glía desarrolla un fenotipo hipertrófico o reactivo denominado como gliosis (Garcia-Caceres et al., 2012) el cual

está caracterizado por un aumento de proteínas estructurales específicas como GFAP y la vimentina (Ridet et al., 1996). Esta gliosis conduce a cambios funcionales que resultan en efectos beneficiosos sobre las neuronas, como la eliminación de células dañadas o muertas (Kreutzberg, 1996) o la reducción del estrés oxidativo (Lucius and Sievers, 1996). Sin embargo, una activación a largo plazo de estas células gliales puede desencadenar efectos perjudiciales, aumentando el daño tisular por la liberación de factores inflamatorios como las especies reactivas de oxígeno y las citoquinas (Johnstone et al., 1999; Sheng et al., 1996). Así, diversos estudios han indicado que la activación de células gliales hipotalámicas en respuesta a dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) está implicada en la inflamación central y en la resistencia a insulina. De hecho, la inflamación hipotalámica es un proceso importante tanto en el desarrollo como en la perpetuación de la obesidad donde las células gliales juegan un papel fundamental en estos procesos inflamatorios (Dong and Benveniste, 2001; Streit et al., 2004).

6.1 ASTROCITOS COMO SENSORES DE NUTRIENTES

La barrera hematoencefálica se encuentra rodeada casi completamente por astrocitos, lo que permite su participación en la comunicación entre la periferia y el CNS. Por ello, los astrocitos juegan un papel crucial en la absorción, metabolización y almacenamiento de metabolitos procedentes de la sangre. Además, se encuentra estrechamente conectados entre sí por uniones gap por lo que son capaces de transmitir selectivamente nutrientes y moléculas señalizadoras (Camandola, 2018). Así, metabolitos como la glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos dependen en gran medida de los astrocitos. Esto permite que también participen en la modulación del entorno local de las neuronas especializadas del hipotálamo que son capaces de detectar nutrientes.

La glucosa es la principal fuente de energía del cerebro y las concentraciones de glucosa a nivel central juegan un papel crítico en la regulación del metabolismo energético (Pénicaud et al., 2002). Aunque existen neuronas sensoras de glucosa capaces de regular la glucemia, muchas de ellas localizadas en el hipotálamo, no actúan de manera solitaria sino que reciben ayuda de los astrocitos que también participan en el transporte y metabolismo de la glucosa (Levin et al., 2011; Pellerin, 2005), y entonces en la modulación de la glucemia (Lam et al., 2005), además de proporcionar glucosa al espacio extracelular del cerebro para su captación por las neuronas. Los astrocitos cooperan junto con las neuronas glucosensoras para la detección de los niveles de glucosa, gracias a la expresión de receptores de glucosa como GLUT1 y GLUT2. Así, se ha visto que, en roedores, la hiperglucemia reduce la expresión de GLUT1 en astrocitos hipotalámicos provocando una alteración de la detección de glucosa que lleva a la incapacidad de reducir la producción de glucosa sistémica (Chari et al., 2011). Esta alteración era restaurada con la sobreexpresión de GLUT-1 en astrocitos del hipotálamo (Chari et al., 2011). Además, a través de estos receptores captura y almacena glucosa en forma de glucógeno a partir del cual producen lactato que es transferido a las neuronas como sustrato energético (García-Caceres et al., 2012). El lactato es transportado a través de transportadores de monocarboxilato (MCT, *monocarboxylate transporter*) dentro de los cuales MCT-1 y MCT-4 se expresan en los astrocitos. Esto permite que los astrocitos también participen en la regulación de la concentración de lactato (Bergersen, 2007). De hecho, se ha visto que las neuronas OX utilizan específicamente el lactato derivado de los astrocitos y su actividad depende en gran medida de estas concentraciones de lactato (Parsons and Hirasawa, 2010).

Cuando existe una baja disponibilidad de glucosa, es necesario la utilización de los ácidos grasos y cuerpos cetónicos para mantener la homeostasis metabólica. La homeostasis lipídica es esencial para el correcto funcionamiento de las neuronas y es principalmente controlada por

los astrocitos (Pfrieger, 2003). Esto es gracias a que producen uno de los transportadores lipídicos más abundantes del cerebro como es la apolipoproteína E (ApoE) (Boyles et al., 1985; Shen et al., 2009). Esta ApoE no solo se encarga del transporte de lípidos, sino que también actúa como un factor de saciedad. Así, la administración central de ApoE reduce la ingesta, mientras que la neutralización de la ApoE endógena con anticuerpos anti-ApoE, la estimula (Shen et al., 2008). Además, la ApoE también está ligada a la señalización de la leptina a nivel central. En estados de ayuno y obesidad, la ApoE se encuentra reducida, pero aumenta con el tratamiento con leptina (Shen et al., 2009). Por otro lado, los cuerpos cetónicos son también una fuente importante de energía en situaciones hipoglucémicas. Los cuerpos cetónicos no solo se obtienen de la circulación sino que también pueden ser sintetizados a través de la oxidación de los ácidos grasos en los astrocitos, siendo las únicas células del cerebro capaces de hacerlo (Edmond, 1992). Esta cetogénesis en astrocitos es un proceso flexible y está mediada, en parte, por AMPK, donde su activación estimula la producción de cuerpos cetónicos por parte de los astrocitos (Blázquez et al., 1999). De hecho, AMPK podría estar desempeñando un papel protector en situaciones de estrés, como por ejemplo en estados de hipoxia, aumentando el aporte de cuerpos cetónico a las neuronas (Blázquez et al., 1999). Además, esta cetogénesis también podría impedir los efectos perjudiciales provocados por la síntesis y acumulación de ceramidas en el cerebro que dan lugar a la apoptosis (Blázquez et al., 2000). En el hipotálamo, la producción de cuerpo cetónicos es relativamente elevada en comparación con otras regiones del cerebro (Hawkins and Biebuyck, 1979; Taib et al., 2013) llegando incluso a ser importantes mediadores de la ingesta. Altos niveles de cuerpos cetónicos en el ARC y el VMH indican que existe un aumento de la ingesta de grasas y, por lo tanto, se reduce la ingesta de calorías (Le Foll et al., 2014).

6.2 ASTROCITOS COMO MEDIADORES DE LAS SEÑALES HORMONALES

Al igual que las neuronas, los astrocitos poseen una amplia gama de receptores que les permiten responder a numerosas hormonas que participan de la regulación del balance energético. De esta manera, los astrocitos pueden estar jugando un papel relevante en el control de la homeostasis energética, siendo de especial relevancia los astrocitos que se localizan en el hipotálamo. Entre los receptores que poseen se incluyen receptores para leptina, insulina, grelina, GLP-1 y THs, entre otros. La respuesta a estas hormonas provoca, en muchos casos, cambios morfológicos y bioquímicos en los astrocitos hipotalámicos. Por ejemplo, se ha visto que cambios en los niveles circulantes de leptina modifican tanto la expresión de transportadores de glucosa y glutamato en los astrocitos como las extensiones que revierten a los contactos sinápticos de las neuronas adyacentes (Fuente-Martin et al., 2012; Garcia-Caceres et al., 2011). Así, la ablación de los receptores de leptina en los astrocitos hipotalámicos lleva a una disminución de las proyecciones de los astrocitos sobre las neuronas POMC, además de a una modulación de la actividad eléctrica de las neuronas POMC y AgRP, ocasionando una respuesta anorexigénica atenuada (Kim et al., 2014). Por otro lado, la obesidad inducida por dieta da lugar a una respuesta en los astrocitos opuesta a la que se da en las neuronas puesto que aumenta la expresión de receptores de leptina en los astrocitos (Hsuchou et al., 2009). Además, sorprendentemente, la eliminación de este receptor en dietas altas en grasas no lleva al desarrollo de obesidad que sí se produce con la supresión del receptor en las neuronas (Jayaram et al., 2013). Esto sugiere que la capacidad de respuesta hormonal puede ser bastante diferente en astrocitos y en neuronas.

Otra de las hormonas cuya respuesta ha sido estudiada en los astrocitos, es la grelina. La estimulación de los astrocitos por la grelina aumenta la expresión de transportadores de

glutamato y su captación por los astrocitos mientras que reduce la expresión de GLUT2 y la captación de glucosa (Fuente-Martin et al., 2016). Además, la acción de la grelina en el aumento de la ingesta puede suprimirse por la liberación de adenosina por parte de los astrocitos que, a través de los receptores de adenosina, inhibe a las neuronas AgRP del ARC (Yang et al., 2015). Esto sugiere la participación de los astrocitos en la regulación de la ingesta.

Recientemente, también se ha demostrado la participación de los astrocitos en la respuesta a insulina, regulando la detección de glucosa por parte del hipotálamo y el metabolismo de la glucosa a nivel sistémico. La pérdida de los receptores de insulina en los astrocitos hipotalámicos modifica su morfología, la función mitocondrial y la conectividad resultando en una reducción de la activación dependiente de glucosa de las neuronas POMC y una reducción de captación de glucosa (García-Caceres et al., 2016). Esto origina una deficiencia en la respuesta a las fluctuaciones de la glucemia y, por lo tanto, perjudica al control de la homeostasis sistémica de la glucosa (García-Caceres et al., 2016).

6.3 ASTROCITOS Y LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

Uno de los efectos que provoca la obesidad inducida por dieta, es promover una inflamación crónica de bajo grado, no solo en tejidos periféricos sino también a nivel central, incluyendo el hipotálamo, que puede resultar en alteraciones en la sensibilidad a leptina e insulina (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009; Velloso et al., 2008). En los últimos años, se ha demostrado que esta respuesta inflamatoria también está mediada por la microglía y los astrocitos.

Diversos estudios han observado que en dietas HFD se incrementa el número y tamaño de las células gliales (gliosis) (Thaler et al., 2012), se reduce la neurogénesis (Lee and Ahima, 2012; McNay et al., 2012; Moraes et al., 2009) y se promueve el revestimiento de ciertas poblaciones neuronales y de los vasos sanguíneos en el hipotálamo por parte de los astrocitos (Horvath et al., 2010), lo que posiblemente altere el paso de ciertos factores circulantes desde el torrente sanguíneo al CNS (Imagen 7). De hecho, la activación de los astrocitos ocurre de manera temprana, a partir de las primeras 24 horas, después del consumo de dietas HFD (Buckman et al., 2015; Thaler et al., 2012). Recientemente, se ha visto que la activación de los astrocitos, como consecuencia de una dieta HFD, puede ser inducida directamente por los ácidos grasos saturados procedentes de este tipo de dieta (Gupta et al., 2012). Además, dentro de los primeros días de consumo de HFD y previo al aumento de peso, también se desarrolla inflamación hipotalámica (Thaler et al., 2012), en la cual participan los astrocitos. Los astrocitos activados son capaces de producir mediadores de la inflamación que pueden afectar a células vecinas, como neuronas y microglía, controlando así la inflamación cerebral y las reacciones inmunitarias (García-Caceres et al., 2013). Este resultado de gliosis e inflamación podría funcionar como método preventivo contra el daño neuronal y un intento de mantener la homeostasis energética. Sin embargo, la exposición crónica a HFD podría exceder esta capacidad protectora y dar lugar a daño neuronal (Moraes et al., 2009; Thaler et al., 2012). Por otro lado, dado que los astrocitos son capaces de responder a hormonas como la leptina (Kim et al., 2014; Shen et al., 2009), esta inflamación y astrogliosis podría desencadenar en una resistencia a leptina y por lo tanto perpetuar el desarrollo de la obesidad y de sus patologías asociadas, aunque esto todavía está por demostrar.

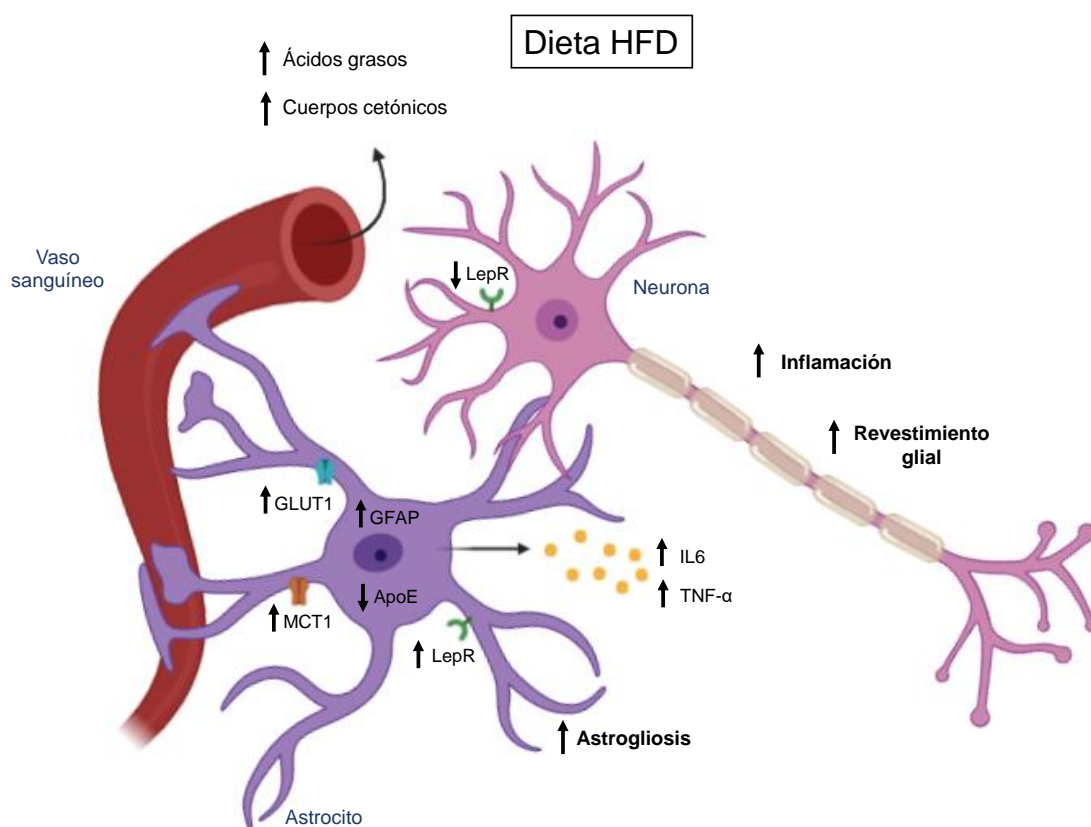


Imagen 7. Cambios de los astrocitos hipotalámicos en respuesta a dietas HFD. Creado con Biorender.com.

6.4 DIMORFISMO SEXUAL DE LOS ASTROCITOS HIPOTALÁMICOS

Muchas de las enfermedades neurodegenerativas y neurológicas se caracterizan por tener diferencias en la incidencia o severidad y progresión de la patología dependiendo del sexo. Este dimorfismo sexual se ha visto en diferentes áreas del cerebro, incluido el córtex, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo tanto a nivel morfológico como fisiológico (Chowen et al., 1995; Goldstein et al., 2001). En el hipotálamo estos cambios se aprecian particularmente en los astrocitos y se relacionan con la presencia de receptores para estrógenos, andrógenos y progesterona (Melcangi et al., 2001). De hecho, las hembras presentan unos astrocitos con una morfología más bipolar que la forma estrellada típica que se encuentra en los machos (Mong et al., 1999). Además, la señalización de esteroides gonadales como los estrógenos en los astrocitos modula la actividad de ciertas neuronas. Este es el caso de las neuronas que secretan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, *gonadotropin-releasing hormone*), las cuales están íntimamente asociadas con la glía (Witkin et al., 1991). Se ha visto que, después de una ovariectomía, aumenta el revestimiento de las células gliales al soma de estas neuronas, lo que provoca una disminución de los contactos sinápticos de las neuronas GnRH, y que se revierte con la administración de estrógenos (Witkin et al., 1991). Además, en respuesta a estrógenos, los astrocitos liberan una serie de factores que controlan la actividad de las neuronas GnRH (Dhandapani et al., 2003; Melcangi et al., 2002). Por otro lado, es posible que los esteroides sexuales también participen en la diferente respuesta de los astrocitos observada en machos y hembras como consecuencia de la ganancia de peso o obesidad (Chowen et al., 2018).

6.4.1 Estrógenos y sus implicaciones en la homeostasis energética

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas ampliamente conocidas por su papel en la reproducción, pero, además, también están implicados en la homeostasis energética. Esta regulación se produce principalmente a través de dos receptores de estrógenos: el receptor de estrógenos α (ER α) y el receptor de estrógenos β (ER β , *estrogen receptor β*), que actúan como receptores nucleares y, por lo tanto, ejercen como factores de transcripción y regulan la expresión de numerosos genes (Welboren et al., 2009; Younes and Honma, 2011). Además de esta acción como factores de transcripción por parte de los estrógenos, sus efectos también se atribuyen a un receptor extranuclear asociado a proteína G (GPR30, *G protein-coupled receptor*), el cual participa en cascadas de fosforilación rápidas (Filardo et al., 2002).

De este modo, los estrógenos actúan sobre el peso corporal y la adiposidad (López and Tena-Sempere, 2015; Mauvais-Jarvis et al., 2013) ejerciendo un papel de protección contra la obesidad. La disminución de los niveles circulantes de E₂, la principal forma fisiológica de los estrógenos, en la menopausia o después de una ovariectomía, están asociados con un incremento de la ingesta y una reducción del gasto energético, lo que conlleva a un aumento de peso (Asarian and Geary, 2006; Gonzalez-Garcia et al., 2017; Martinez de Morentin et al., 2014; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Rogers et al., 2009). Además, esta pérdida de E₂ está asociada a un incremento de la adiposidad (Carr, 2003; Cooke and Naaz, 2004; D'Eon et al., 2005). Todos estos efectos pueden revertirse con el tratamiento con E₂ (Carr, 2003; Dubuc, 1985; Martinez de Morentin et al., 2014; Palmer and Gray, 1986). La producción de estrógenos no está limitada únicamente a las gónadas, siendo éste el principal sitio de síntesis, sino que a nivel central también existe una producción endógena de E₂ gracias a la presencia de la enzima aromatasas que cataliza el último paso de la síntesis de estrógenos, aromatizando los andrógenos, como la testosterona, a estrógenos. Así, la inactivación de la aromatasas provoca un incremento de adiposidad, con una reducción de la actividad física y un incremento de los niveles de colesterol y leptina circulantes (Jones et al., 2001; Jones et al., 2000). Además de estas patologías asociadas a los niveles de E₂, la incorrecta señalización de los estrógenos también lleva al desarrollo de un fenotipo obeso. Se ha demostrado que la pérdida de la función del ER α en ratones conlleva al desarrollo de obesidad como consecuencia de la hiperfagia y del hipometabolismo, siendo incapaces de revertir estos efectos con la administración de E₂ (Geary et al., 2001; Heine et al., 2000; Xu et al., 2011).

Muchos de los efectos de los estrógenos en la homeostasis energética se producen a través de los ERs en el hipotálamo, los cuales están altamente expresados en esta zona del cerebro (Shughrue et al., 1997). El E₂ actúa en el hipotálamo a través de los ER α y ER β , siendo ER α mucho más abundante y más relevante para la regulación de la homeostasis energética, puesto que su mutación da lugar a obesidad (Musatov et al., 2007; Xu et al., 2011). Su acción en el hipotálamo se da principalmente en dos núcleos, ARC y VMH, e interesantemente con una acción núcleo-específica. El silenciamiento de ER α en las neuronas SF1 del VMH da lugar a una reducción del gasto energético, disminuyendo la termogénesis, y aumento de adiposidad pero sin un incremento de la hiperfagia mientras que, la deficiencia de ER α en las neuronas POMC del ARC, da lugar a un aumento de la ingesta sin una disminución del gasto energético ni un incremento de la adiposidad (Xu et al., 2011). Además, se ha demostrado que el E₂ es capaz de controlar la termogénesis del BAT a través de ER α por inhibición de AMPK en el VMH y por lo tanto, actuando sobre el eje AMPK (VMH)-SNS-BAT (Lopez and Tena-Sempere, 2017; Martinez de Morentin et al., 2014).

6.4.2 Astrocitos y estrógenos

Dada las observaciones previamente descritas sobre el dimorfismo sexual de los astrocitos y los efectos de los estrógenos, conocer cómo los astrocitos son capaces de responder a los estrógenos podría aportar nuevos conocimientos en la regulación de la homeostasis energética.

Los astrocitos responden a los estrógenos gracias a la presencia de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPR30, de los cuales, al igual que en las neuronas, ER α parece ser el principal responsable de la señalización de los estrógenos en los astrocitos (Acáz-Fonseca et al., 2014; Fuente-Martin et al., 2013; Pawlak et al., 2005). La mayoría de los estudios se han centrado en las acciones antiinflamatorias que puedan ejercer los estrógenos en los astrocitos. Así, se ha visto que los estrógenos desempeñan un papel de neuroprotección en los astrocitos, controlando la gliosis y la expresión de proteínas inflamatorias, además de regular la modulación que ejercen los astrocitos sobre la liberación de factores neurotróficos y otras moléculas de neuroprotección por las neuronas (Acáz-Fonseca et al., 2014; Arevalo et al., 2010; García-Ovejero et al., 2005; Spence et al., 2013). Este papel de neuroprotección en los astrocitos, puede ser uno de los motivos por el cual existe diferente respuesta a la obesidad inducida por dieta en machos y hembras. De hecho, se ha observado que la resistencia de las hembras a dietas altas en grasa se asocia con un incremento del ER α en los astrocitos junto con una reducción de la inflamación hipotalámica (Morselli et al., 2016). Además, los astrocitos también poseen la capacidad de expresar la enzima aromatasa y por lo tanto contribuir a la producción de estrógenos a nivel central. En condiciones de estrés o de daño cerebral los astrocitos son capaces de inducir la expresión de aromatasa para producir E₂, contribuyendo a su papel de neuroprotección (Azcoitia et al., 2003; García-Ovejero et al., 2005). Pese a todos estos avances, aún se desconoce bastante de la implicación de los estrógenos sobre los astrocitos y su posible participación en el control del metabolismo.

HIPÓTESIS

Las evidencias actuales sobre la participación de los astrocitos tanto en la detección y señalización de nutrientes y hormonas implicadas en la homeostasis energética, así como en la regulación de fenómenos relacionados con la obesidad, como la inflamación hipotalámica, han llevado a un interés creciente de la implicación de los astrocitos en el balance energético. En la regulación de este balance juega un papel muy importante la proteína quinasa AMPK, especialmente a nivel hipotalámico, ya que modula tanto el gasto energético y la ingesta como la homeostasis de la glucosa. Por ello, en esta tesis postulamos que los astrocitos podrían estar regulando la homeostasis energética a través de AMPK.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- 1) Estudiar el impacto de la delección de la subunidad AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la regulación del balance energético.
- 2) Estudiar si el efecto de esta delección de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP sobre el balance energético podría estar relacionado con las acciones centrales de los estrógenos sobre el balance energético

MATERIALES Y MÉTODOS

7 MODELOS ANIMALES

7.1 LEGISLACIÓN

Durante la realización de esta tesis doctoral, los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales fueron realizados bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela, con el número de procedimiento ID 15010/14/006 y como responsable final Miguel Antonio López Pérez, siendo aprobados previamente por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de A Coruña, órgano competente para dictar dicha resolución.

Además, se ha actuado siempre dentro de los marcos de la legislación vigente:

- Orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el “Comité de Bioética da Consellería Rural”.
- Ley estatal 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Se tuvo en especial consideración el artículo 4 del Real Decreto 53/2013, que corresponde al principio de reemplazo, reducción y refinamiento, cuyo objetivo final es asegurar el mínimo número de animales posibles en los procedimientos y que no se cause dolor innecesario. En consecuencia, se evitó la duplicación innecesaria de experimentos y se redujo el número experimental en cada grupo sin comprometer la finalidad del estudio, además de poner especial atención al bienestar animal reduciendo, en la medida de lo posible, el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en los animales.

7.2 MODELOS ANIMALES

Para el desarrollo de esta tesis, se utilizaron ratones macho y hembra *knockout* para el gen AMPK α 1 en astrocitos que expresan GFAP (ver en detalle en Procedimientos no quirúrgicos).

Los animales se estabularon en condiciones estables de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas-20:00 horas). Además, antes de la realización de cualquier experimento, se llevaron a cabo períodos de aclimatación a las instalaciones de unos 7 días aproximadamente.

Durante todos los procedimientos, los animales se mantuvieron en condiciones de acceso libre a dieta estándar (STD, *standard diet*) (STD, SAFE A04: 3,1% fat, 59,9% carbohydrates,

16,1% proteins, 2.791 kcal/g; Scientific Animal Food & Engineering; Nantes, Francia) y a agua, con excepción de aquellos procedimientos experimentales en los que se especifique. También fueron monitorizados periódicamente para verificar su bienestar, mediante un seguimiento de la masa corporal, una valoración del aspecto físico y acostumbándolos al manejo por el personal de laboratorio para mitigar, en la medida de lo posible, el estrés causado durante los experimentos llevados a cabo.

En la mayoría de los procedimientos, los animales fueron estabulados de manera colectiva. Sin embargo, en algunos procedimientos, se requirió de su estabulación individual. Para ello se tuvo en cuenta su comportamiento social y la individualización nunca fue por períodos superiores a 10 días.

8 ANESTESIA Y ANALGESIA

Antes de comenzar con los procedimientos quirúrgicos, se suministró anestesia general a los animales de experimentación a través de una inyección intraperitoneal (IP). La dosis administrada fue de 100 µl/10g de masa corporal, con una composición de 13,8% de ketamina, 3,45% de xilacina y 82,75% de suero salino. Para verificar la efectividad de la anestesia, se consideró como referencia la pérdida del reflejo podal y palpebral, lo cual indica que el procedimiento quirúrgico puede ser llevado a cabo.

Como analgésico, se administró ketoprofeno (*ketoprofeno-Orudis 100 mg*, Sanoli aventis, Barcelona, España) por vía subcutánea (SC), con una dosis 2,5 mg/Kg de masa corporal, a la finalización del procedimiento.

9 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

9.1 VÍA INTRAPERITONEAL (IP)

La administración de sustancias por la vía IP no requiere de anestesia y se realiza en la parte ventro-caudal del animal. Es necesario inmovilizar al animal y para ello se sujeta al animal por la espalda, asegurándonos de la que parte de la cabeza tenga la menor movilidad posible. Se inclina al animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en las vísceras y posteriormente insertamos la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm*, BD Medical Surgicals Systems), acoplada a una jeringa jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe*, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems), en el costado derecho del animal en un ángulo aproximado de 45 grados respecto al vientre.

9.2 VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Esta vía de administración consiste en la inyección de una sustancia a través de una cánula fijada al cráneo del animal y que conecta con el tercer ventrículo del cerebro (*Ver canulación intracerebroventricular en Materiales y Métodos*). Para llevar a cabo esta administración se

inmoviliza el animal con la ayuda de un trapo agarrándolo por el cuerpo sin ejercer demasiada presión y dejando sobresalir la cabeza. Antes de la primera inyección, se retira el sellado de la cánula y seguidamente se inserta una jeringuilla Hamilton (*Model 1702N 22s*, Hamilton, Reno, NV, EEUU) introduciendo el líquido lentamente. Finalmente, se retira la jeringa con cuidado para que no se desplace. Este procedimiento no requiera de anestesia una vez implantada la cánula y puede repetirse durante varios días consecutivos.

10 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

10.1 GENERACIÓN DE RATONES *KNOCKOUT* CONDICIONALES E INDUCIBLES GFAP-CRE AMPK α 1^{FLOX/FLOX}

Para generar el ratón *knockout* de AMPK α 1 específico en los astrocitos positivos para la proteína gliofibrilar ácida (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), se cruzaron ratones hGFAP-CreER^{T2} (proporcionados por Cristina García Cáceres, Helmholtz Diabetes Center) con ratones AMPK α 1 floxeados (AMPK α 1^{flox/flox}) (*Prkaa1^{tm1.1Sjm}/J*; stock: 014141; The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, USA), ambos bajo un fondo genético C57BL/6J.

Los ratones hGFAP-CreER^{T2} son ratones transgénicos inducibles, puesto que cuentan con una secuencia promotora de la proteína gliofibrilar ácida humana (hGFAP) que dirige la expresión de la proteína de fusión Cre-ER^{T2}. Esta proteína de fusión consiste en una recombinasa Cre fusionada con una forma mutante del receptor de estrógeno humano que no se une a su ligando natural (17 β -estradiol) a concentraciones fisiológicas, pero sí a los ligandos sintéticos del receptor de estrógenos, como el tamoxifeno (Martinez-Sanchez et al.). Esto permitirá que la recombinasa Cre solamente se exprese en aquellos astrocitos positivos para GFAP cuando se administre el tamoxifeno. Los animales empleados de esta línea son ratones hemocigotos, totalmente viables y fértiles y sin ninguna anomalía física o de comportamiento grave.

Los ratones AMPK α 1 floxeados presentan sitios loxP que flanquean al exón 3 del gen de la subunidad catalítica alfa 1 (*Prkaa1*) de la proteína AMPK. Los animales empleados de esta línea son animales homocigotos para el inserto, viables y fértiles y sin ninguna anomalía física o de comportamiento grave.

Mediante el cruce de animales hGFAP-CreERT2 y AMPK α 1^{flox/flox} se obtienen ratones hGFAP-CreERT2 AMPK α 1^{flox/flox} (GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}). Para llevar a cabo la excisión del gen AMPK α 1 por la recombinasa Cre, se administra diariamente Tx vía intraperitoneal (100 mg/kg de peso corporal) a las 6 semanas de edad durante 5 días. El Tx (*Tamoxifen*, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) se disuelve en aceite de girasol (*Sunflower oil*; Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) a una concentración final e 10 mg/ml a 37 °C y es almacenado a 4°C en oscuridad durante 7 días. Su genotipado se realiza por PCR (*Ver PCR para genotipado en sección Materiales y Métodos*).

Para los estudios realizados en esta tesis se emplearon ratones KO machos y hembras y como controles se usaron sus hermanos de camada con el mismo fondo genético pero negativos para Cre.

10.2 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y LA MASA CORPORAL

Para determinar la masa corporal y la ingesta se usó una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*, RADWAG, Radom, Polonia). La masa corporal se registró semanalmente a partir de la sexta semana de vida de los animales (después de la administración de Tx) y hasta la semana 20 de vida. Para el control de la ingesta, los ratones se estabularon individualmente durante la semana 13 de vida y la ingesta se midió diariamente durante 7 días dejando 3 días de adaptación desde su puesta en individual. Las medidas tanto de la masa corporal como de la ingesta, se realizaron siempre en la misma franja horaria (entre las 17:00 y las 19:00 horas).

10.3 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

La temperatura corporal se registró con una sonda rectal conectada a un termómetro (*BAT-12 Microprobe-Thermometer*; Physitemp, Clifton, NJ). Durante la toma de medidas, los animales se encontraban despiertos y parcialmente inmovilizados.

10.4 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL BAT

La adquisición de imágenes de temperatura del BAT se realizó con una cámara infrarroja (*B335: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera*; FLIR; West Malling, Kent, UK) con la zona interescapular de los animales previamente afeitada un día antes. Las imágenes fueron analizadas con un software específico (*FLIR-Tools-Software*, FLIR; West Malling, Kent, UK) delimitando el área del BAT. Para el cálculo de la temperatura media del BAT se usaron 3 imágenes por animal.

10.5 TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA E INSULINA

Se realizaron test de tolerancia a glucosa e insulina para valorar el grado de tolerancia a glucosa y de resistencia a insulina y así conocer su capacidad metabólica. Para el test de tolerancia a glucosa los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 12 horas, pero no para test de tolerancia a insulina. Primero, se toman los valores basales de los animales mediante una muestra de sangre de la cola y usando un glucómetro con una tira reactiva conectada (*Glucocard sensor*; A.Menarini diagnostics, España). Posteriormente, se inyecta vía IP, en función del peso del animal, D-glucosa (D-glucose, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) (2 mg/kg) para el test de tolerancia a glucosa o insulina (Actrapid, Novo Nordisk, Dinamarca) (0.75U/kg) para el test de tolerancia a insulina. La glucosa circulante se mide a los 10, 20, 30, 60, 90, 120 minutos después de la inyección y a través de la cola de la misma manera que para la medición de los valores basales. Finalmente, se construye una curva con los datos obtenidos, calculando el Área Bajo la Curva (AUC) de los distintos grupos experimentales.

10.6 MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Para realizar el fenotipado metabólico se utilizó un sistema de calorimetría indirecto. Este sistema se compone de jaulas individuales que cuentan con un sistema de ventilación cerrado y con sensores que son capaces de registrar el gasto energético (EE, *energy expenditure*), la actividad locomotora (LA, *locomotor activity*) y el cociente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*) (*LabMaster*; TSE Systems; Bad Homburg, Germany). Para el calibrado se utilizaron los gases de referencia (20.9% O₂, 0.05% CO₂ y 79.05% N₂) y se introdujo a los animales en

una caja con temperatura controlada (24°C) en la que se bombeaba el aire. Los animales estuvieron en adaptación una semana antes de comenzar las mediciones. El EE, LA y RQ se registraron cada 30 min y la tasa metabólica se midió durante 2-3 días.

11 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

11.1 CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Para la preparación de las cánulas se emplearon tubos de polietileno (*BD Intradermic® Polyethylene tubing, Non-Sterile*, Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU) con 0,965mm de diámetro exterior y 0,58mm de diámetro interior para ratón (PE-50). Primeramente, se corta un fragmento del tubo de unos 2,5 cm. En uno de los extremos del tubo se corta un bisel con un ángulo de 45° aproximadamente y con una longitud e 0,5 mm. A una distancia de 2,5 mm del bisel, se coloca un tope para impedir que la cánula penetre más de lo debido en el cerebro. El otro extremo de la cánula se sella para que no entre suciedad antes de la administración del tratamiento.

Para la implantación de la cánula, con los animales previamente anestesiados, se realiza un corte transversal de aproximadamente 1,5 cm en la piel de la cabeza, perpendicular a la sutura sagital, entre los ojos y las orejas. Seguidamente, se separa el tejido subcutáneo del cráneo para dejar al descubierto el bregma, el cual se tomará como punto de referencia. A continuación, se realiza una perforación del cráneo en el lado izquierdo o derecho del bregma con una broca quirúrgica a una distancia de 1,2 mm de la sutura sagital y 0,6 mm posterior al bregma. Una vez realizada la perforación, se introduce la cánula en el orificio por el extremo biselado, de manera paralela al eje dorso-ventral del animal. Para finalizar, se fija la cánula al cráneo del animal con un adhesivo de cianocrilato (*SuperGlue-3, Loctite*). Los animales se estabulan de manera individual y se deja un período de recuperación de entre 3 a 4 días.

11.2 DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Los animales son sacrificados al terminar cada procedimiento experimental mediante luxación cervical y la posterior decapitación, según las leyes y normas de experimentación animal. De cada animal se extraen los siguientes tejidos: hipotálamo (ARC, VMH, PVN y LHA), corteza, BAT, tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), tejido adiposo subcutáneo (sWAT, *subcutaneus adipose tissue*), tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*), hígado, ovarios o testículos y músculo. Los tejidos se conservan a -80°C hasta su procesamiento y análisis. Se usó una lupa óptica de 20 aumentos en los casos en los que era necesario realizar una microdissección.

Para análisis inmunohistoquímicos e histológicos, las muestras fueron fijadas con formalina al 10% (Formalina 10% neutra tamponada, Bio-Optica, Italia) y posteriormente parafinadas.

12 DISEÑOS EXPERIMENTALES

12.1 ADMINISTRACIÓN CENTRAL ICV DE E2 EN RATONES

Los ratones AMPK α 1^{flox/flox} y GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} se les realiza una canulación ICV y después se alojan individualmente, dejándolos en reposo durante 3 días. A continuación, los animales son tratados con 2 μ L de tampón fosfato salino (*PBS*, phosphate buffered saline) durante 2 días. A continuación, se administra 17 β -estradiol durante 4 días a una concentración de 1nmol/día diluido en PBS con 10% de DMSO (E8875, , Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) Durante todo el proceso, se mide el peso corporal y la ingesta, y se toman imágenes termográficas de la zona del BAT Finalmente, los animales son sacrificados.

13 TÉCNICAS ANALÍTICAS

13.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

13.1.1 Extracción de proteína

Para realizar la extracción de proteína, se corta una porción del tejido a analizar, manteniéndolo siempre en hielo seco durante su manipulación. El resto del tejido se vuelve a guardar a -80°C. La porción cortada se introduce en un tubo de seguridad de 2 ml (*Safe-Lock Tubes 2,0 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) que contiene una bolita de acero y una cantidad determinada según el tejido (Tabla 4) de tampón de lisis (Tabla 3), el cual contiene inhibidor de proteasas (*Complete TM, Roche, Mannheim, Alemania*). Durante todo este proceso las muestras y el tampón de lisis se mantienen en hielo. Posteriormente, las muestras se homogenizan por un proceso de disgregación mecánico mediante un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, USA) durante unos 4 minutos a una frecuencia de 28 Hz. A continuación, se realiza una centrifugación a 13.200 rpm durante 30 minutos y se extrae el sobrenadante a un tubo de seguridad nuevo de 1,5 ml (*Safe-Lock Tubes 1,5 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), descartando el precipitado. Para el BAT, se centrifuga previamente durante 10 minutos para eliminar mejor la grasa.

Tabla 3. Composición del tampón de lisis

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad/Volumen</u>
<u>Tris-HCL pH 7,5</u>	<u>2,5 ml</u>
<u>EGTA 0,2 M (pH8)</u>	<u>2,5 ml</u>
<u>EDTA 0,2 M (pH8)</u>	<u>2,5 ml</u>
<u>Tritón X-100</u>	<u>5 ml</u>
<u>Ortavanadato Sódico 0,1 M</u>	<u>5 ml</u>
<u>Fluoruro Sódico</u>	<u>1 g</u>
<u>Pirofosfato Sódico</u>	<u>1,1 g</u>
<u>Sacarosa</u>	<u>46 g</u>
<u>Ajustar pH a 7,5 y H2O destilada hasta 500 ml</u>	
<u>Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 1 pastilla por cada 50 ml</u>	

Tabla 4. Volumen del tampón de lisis para cada tejido.

<u>Tejido</u>	<u>Volumen</u>
<u>BAT</u>	<u>180 µl</u>
<u>ARC</u>	
<u>VMH</u>	<u>0,6/1 ml</u>
<u>LHA</u>	<u>200 µl</u>
<u>PVH</u>	
<u>Hipotálamo</u>	<u>200 µl</u>

13.1.2 Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína se emplea el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (*Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

Primeramente, es necesario diluir la muestra por un factor de dilución de 1:26 en agua destilada. Para ello, se prepararon alícuotas con 250 µl de agua destilada a las que se les añadió 10 µl de muestras y se homogenizan muy bien. A su vez, se prepara una recta patrón con siete puntos de soluciones de albumina de suero bovino (BSA, *Albumin, from bovine serum, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA*) de las cuales se conoce su concentración de proteína (Tabla 5).

Se carga una placa para proceder a la lectura por un espectrofotómetro (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*). A cada pocillo de la placa se le añade 10 µl de cada punto de la recta patrón y de cada una de las muestras. A esto se le añade 250 µl del reactivo Bio-Rad Protein Assay, previamente diluido a un factor de 1:5 en agua destilada, incubado a 37°C durante 10 minutos y protegido de la luz. Se introduce la placa en el espectrofotómetro y se incuba la placa durante 5 min a 37°C. Se mide la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm y se cuantifica la concentración de proteína de cada muestra a través de la extrapolación de los valores de la recta patrón con el uso del software Magellan 6.

Tabla 5. Concentraciones de BSA de la recta patrón.

Punto	Concentración
Punto 1	0,03125 mg/ml
Punto 2	0,0625 mg/ml
Punto 3	0,125 mg/ml
Punto 4	0,25 mg/ml
Punto 5	0,5 mg/ml
Punto 6	0,7 mg/ml
Punto 7	1 mg/ml

13.1.3 Western Blot

Preparación de geles

La separación de las proteínas de las muestras se lleva a cabo en geles de electroforesis de Tris/glicina SDS-Poliacrilamida, la cual forma una malla que permite separar las proteínas por su tamaño. Para ello, es necesario montar primero el soporte de los geles, verificando que no exista pérdida de líquido.

Los geles constan de dos partes, una separadora y otra concentradora. La parte separadora va a encargarse de separar las proteínas por lo que tendrá distinto porcentaje de acrilamida en función del tamaño de la proteína de interés (Tabla 6) y la parte concentradora se encarga de agrupar las proteínas de la muestra por lo que su porcentaje de acrilamida es fijo (Tabla 7). Se añade primeramente el gel separador al soporte y se agrega isopropanol (2-Propanol, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) al 60% para eliminar las burbujas de la superficie y nivelar el borde superior. Cuando el gel está polimerizado, se retira el isopropanol y se lava con un poco de agua destilada. Después de secar el exceso de agua que pueda quedar, se añade el gel concentrador colocando los peines inmediatamente para formar los pocillos.

Tabla 6. Preparación de los geles separadores de electroforesis.

Reactivo	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%
	Volumen	Volumen	Volumen
H2O destilada	4,6 ml	4,0 ml	3,2 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida (30%)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS 10 %	0,1 l	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl

Tabla 7. Preparación del gel concentrador de electroforesis.

Reactivo	Volumen
H2O destilada	3,4 ml
Acrilamida/ Bisacrilamida (30%)	830 μ l
1,5M Tris (pH 8,8)	630 μ l
SDS 10 %	50 μ l
APS 10 %	50 μ l
TEMED	4 μ l

Preparación de las muestras para electroforesis

Una vez determinada la concentración de cada muestra, se preparan alícuotas de 16 μ l con una concentración determinada de proteína, buffer de lisis y tampón de carga al 1X (Tabla 8). Para cada tejido se ajusta la cantidad de proteína más adecuada para los análisis por western blot (Tabla 9).

Tabla 8. Composición del tampón de carga 5X.

Reactivo	Cantidad/Volumen
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
β -mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml
Ajustar pH a 6,8 y H2O miliQ hasta 1 L	

Tabla 9. Concentración de proteína de los distintos tejidos.

Tejido	Concentración
BAT	15 μ g
Hipotálamo	10 μ g
ARC	10 μ g
VMH	10 μ g
LHA	10 μ g
PVH	10 μ g

Electroforesis

Los geles se colocan en unas placas de electroforesis y después se montan en una carcasa de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra Cell*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se añade tampón de electroforesis a 1 X (100 ml de tampón de electroforesis al 5X (Tabla 10) en 400 ml de agua destilada) asegurando que los geles queden bien cubiertos por el tampón. Antes de introducir las alícuotas de las muestras en los pocillos, se calientan a 95°C durante 5 min y después se añaden 16 μ l de cada una a los pocillos del gel, dejando el primer pocillo para añadir 5 μ l de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein, cat 161-0374* Bio-Rad). Se coloca la tapa de la carcasa que contiene los electrodos y se conecta a una fuente de alimentación (voltaje

constante de 100V y amperaje de 180 mA). La electroforesis se detiene cuando el frente de migración llega a un 1 cm del borde inferior del gel.

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis 5X.

Reactivo	Cantidad
Glicina	72 g
Tris-HCl	15 g
SDS	5 g
Ajustar H2O destilada hasta 1 L	

Transferencia

Cuando finaliza la electroforesis, se realiza una transferencia de las proteínas a un medio sólido como una membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*, Millipore, Burlington, MA, USA) mediante el uso de un sistema de transferencia Trans-Blot Semy-dry Transference (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU). Las membranas se cortan con unas dimensiones (8,5x7,1 cm) proporcionales a las del gel y se activan sumergiéndolas en metanol, agua destilada y tampón de transferencia al 1X (Tabla 11) (Tabla 12), consecutivamente y durante 5 minutos en cada uno. Se corta también papel absorbente (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU) (10x7,5 cm) y se sumerge en tampón de transferencia 1X.

Una vez activadas las membranas, se coloca el papel absorbente húmedo en el Trans-Blot Semy-dry Transference, por encima se colocan las membranas de transferencia y después los geles. Seguidamente, se coloca otra pieza de papel absorbente húmedo sobre ellos. Es importante eliminar con un rodillo las burbujas de aire que se pueden formar en la colocación para que la transferencia se efectúe de manera correcta. Finalmente, se cierra el Trans-Blot y se conecta a una fuente de alimentación (voltaje 25V y amperaje 250 mA) durante 1 hora y 40 minutos.

Tabla 11. Composición del tampón de transferencia 25X.

Reactivo	Cantidad
Glicina	36,5 g
Tris-HCl	72,5 g
SDS	4,5 g
Ajustar H2O destilada hasta 500 ml	

Tabla 12. Composición del tampón de transferencia 1X.

Reactivo	Volumen
Tampón transferencia 25X	40 ml
Metanol	200 ml
Ajustar H2O destilada hasta 1 L	

Una vez finaliza la transferencia, se retiran las membranas y se bloquean con BSA al 3% (3 gr de BSA en 100 ml de TBS-TWEEN (Tabla 13) (Tabla 14)) durante 1 hora a temperatura

ambiente. Posteriormente, se corta la membrana tomando como referencia el marcador de peso molecular para aislar las distintas proteínas a analizar. Cada fragmento de la membrana se incubada con su correspondiente anticuerpo primario diluido en BSA 3% (Tabla 15) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C dependiendo de las especificaciones del anticuerpo.

Cuando termina el periodo de incubación del anticuerpo primario, se retira y se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN a temperatura ambiente. Seguidamente se incuban los fragmentos de las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:5000 en BSA 3% durante 1 hora. Finalmente, se elimina el anticuerpo secundario y se realizan de nuevo tres lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN.

Todo el proceso de inmunodetección se realiza en agitación suave.

Tabla 13. Composición del TBS 10X

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl	24,2 g
NaCl	80 g
Ajustar pH 7,6 y H ₂ O destilada hasta 1 L	

Tabla 14. Composición del TBS 1X

Reactivo	Volumen
TBS 10X	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 L	

Tabla 15. Relación de los anticuerpos utilizados y sus diluciones

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
α -tubulina	1:5000	Sigma	T5168; RRID: AB_330337
β -actina	1:5000	Sigma	A5316; RRID: AB_673047
Aromatasa	1:1000	Abcam	Ab18995; RRID: AB_444718
ER α	1:1000	Abcam	Ab32063; RRID: AB_732249
ER β	1:1000	Abcam	Ab288; RRID: AB_303379
GPR30	1:1000	Abcam	Ab39742; RRID: AB_1141090
IL-1 β	1:1000	Abcam	Ab9722; RRID: AB_308765
IL-6	1:1000	Abcam	Ab6672; RRID: AB_2127460
pIKK	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-23470; RRID: AB_2122159
TNF α	1:1000	Cell Signaling Technology	11948S; RRID: AB_2687962
ATF6 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-166659; RRID: AB_2058901
pPERK	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32577; RRID: AB_2293243
CHOP	1:1000	Cell Signaling Technology	5554S; RRID: AB_2293243

pIRE	1:1000	Abcam	Ab48187; AB_873899	RRID:
peIF2 α	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-101670; AB_2096507	RRID:
BIP	1:1000	Cell Signaling Technology	3183S; AB_10695864	RRID:
UCP1	1:10000	Abcam	ab10983; AB_631364	RRID:

Revelado

Para el revelado de las membranas se utiliza el sustrato de revelado ECL (*Pierce ECL Western Blotting substrate*, Thermo Scientific) en una dilución 1:1 de cada uno de los reactivos. Los fragmentos de membranas se sacan del TBS-TWEEN y se incuban en 1 mililitro de ECL durante 5 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se colocan los fragmentos en un casete de revelado (*Hypercassette*, Amersham biociencias GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) entre dos papeles de acetato y se eliminan las burbujas que se formen.

El revelado se realiza en una cámara oscura donde se coloca encima del papel de acetato una película de revelado sensible a la luz (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón). Se dejan exponer las películas durante un tiempo determinado según la proteína a estudiar. Una vez expuestas las películas, éstas se sumergen en un líquido de revelado (dilución 1:10) (*Developer G150*, AGFA Healthcare NV), seguidamente en un líquido fijador (dilución 1:5) (*Manual fixing bath*, AGFA Healthcare NV) y por último en agua para eliminar los restos de los líquidos. Cuando las películas están secas, se marcan los pesos moleculares del marcador en las películas para poder identificar las proteínas según el peso. Los fragmentos de la membrana se guardan en papel Whatman (*3MM Chromatography paper*, GE Healthcare 3030-931).

Cuantificación

La cuantificación se lleva a cabo mediante la medición de la densidad óptica de la señal. Para ello, las películas se escanean y se analizan con el software informático ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, EEUU). En la imagen escaneada, se selecciona un área fija rectangular en la cual quepan todas las señales de cada una de las muestras. Se mide la densidad óptica de cada una de las señales y se mide también, con la misma área, una zona limpia de la película a la que consideramos como fondo. Este fondo se resta a la medición de cada muestra para así obtener la señal real. Finalmente, la señal de cada una de las muestras es representada en relación a la señal obtenida para el control (α -tubulina o β -actina) de esa misma muestra.

Stripping

Para proteínas con un mismo peso molecular o muy similar, las cuales no podemos separarlas cortando la membrana, se realiza un *stripping* del fragmento de la membrana correspondiente. Con ello, se consigue eliminar el anticuerpo primario y secundario y poder incubarlo de nuevo ese fragmento con otro anticuerpo primario.

Para el *stripping*, se incuban las membranas a 55°C en una solución de *stripping* (Tabla 16) durante 40 minutos y posteriormente se realizan 3 lavados de 15 minutos con TBS-TWEEN en agitación fuerte. Una vez finalizado, se vuelve a bloquear la membrana.

Tabla 16. Composición de la solución de *stripping*.

Reactivo	Cantidad/Volumen
Tris-HCl	0,75 g
SDS	2 g
β -mercaptoetanol	0,7 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 100 ml	

13.2 ANÁLISIS DE ARNm MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

Extracción de ARNm

Para evitar la degradación del ARNm, las muestras se mantienen en todo momento en hielo y las centrifugaciones se realizan a 4°C.

En primer lugar, se corta un pequeño fragmento de las muestras congeladas y se homogeniza de manera mecánica con una bolita de acero en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 3 min (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, USA) a 28 Hz. Una vez finalizada, se centrifugan las muestras a 12.000 rcf durante 10 minutos y se aspira la fase intermedia. A esta fracción, se le añaden 200 μ l de cloroformo (*Chloroform*, Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) y se mezclan durante aproximadamente 15 segundos hasta que queda totalmente homogéneo. Se deja reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugan de nuevo a 12.000 rcf durante 15 minutos. Al finalizar la centrifuga, se forman dos fases: una fase superior acuosa donde se encuentra el ARNm y una fase inferior orgánica que contiene proteínas y lípidos. Entre ambas se encuentra una interfase donde se localiza el ADN. Se retira la fase superior acuosa, se añaden 500 μ l de 2-propanol y se mezclan hasta que quede homogéneo. Posteriormente, se dejan reposar durante 10 minutos a -20°C para que precipite el ARNm y se centrifugan de nuevo a 12.000 rcf durante 10 minutos. Una vez finalizada, se observa si se ha formado un pequeño precipitado y se elimina el sobrenadante. Se añade 1 ml de etanol (*Ethanol absolute PA*, Applichem/Pancreac, Darmstadt, Alemania) al 70% en agua DEPC, mezclándolo bien para lavar el precipitado. Se vuelve a centrifugar a 12.000 rcf durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante de nuevo y se realiza otra centrifuga durante 1 minuto a 16.100 rfc. Se retira el sobrenadante que quede con una pipeta para eliminar el posible etanol que quede en la muestra. Finalmente, el precipitado se resuspende en agua DEPC (agua destilada con dietilpirocarbonato al 0.1%) a 60°C durante 10 min.

Cuantificación del ARNm

Para llevar a cabo la cuantificación del ARNm de cada muestra, se emplea un espectrofotómetro (*Nanodrop 2000*, Fisher Scientific, New Hampshire, EEUU) ajustado a dos longitudes de onda: 260 nm, que proporciona la cantidad de ácidos nucleicos, y 280 nm, que corresponde con la cantidad de proteína. El grado de pureza viene dado por el ratio 260/280, considerándose los valores entre 1,8 y 2 como valores ideales de pureza. Una vez conocida la cantidad de ARNm de cada una de las muestras, se preparan alícuotas de una concentración de 500 ng/ μ l.

Retrotranscripción (RT)

Para realizar la retrotranscripción, se utiliza un volumen de 30 µl en eppendorf de 0,2 ml. Los componentes de la reacción de retrotranscripción son los siguientes:

- 6 µl de tampón de reversotranscripción (*5X first strand tampón*; 250 nM Tris-HCl, pH 8,3, 375nM KCl, 15mM MgCl, 50nM DDT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 6 µl de mezcla de dNTPs (*dTTP, dCTP, dGTP, dATP*, con una concentración de 10 mM de cada uno) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1,5 µl Mg2Cl 50 mM (*Mg2Cl 50 mM*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,17 µl de Random primers (*Random primers*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,25 µl inhibidor de RNasa (*RNaseOUT*, 40 U/µl Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1 µl de M-MLV reversotranscriptasa (*M-MLV*, 200 U/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 10 µl de muestra.
- Ajustar con agua DEPC para un volumen final de 30 µl.

Es necesario preparar un control negativo de la retrotranscripción (RT-), en el cual el volumen de la muestra se sustituye por agua MilliQ.

Posteriormente, las muestras se incuban en un termociclador con unos determinados parámetros (Tabla 17).

Tabla 17. Programa termociclador para RT

Tiempo	Temperatura
50 minutos	37°C
15 minutos	42°C
5 minutos	95°C

PCR en tiempo real (TaqMan)

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizan sondas Taqman las cuales se caracterizan por estar marcadas por fluoróforos. Estes fluoróforos permiten la detectar la cantidad de amplicones sintetizados gracias a la emisión de fluorescencia generada tras ser escindido por la polimerasa después de la hibridación de la sonda con el ADN. En este caso, el fluoróforo usado es FAM.

El volumen final de la reacción de PCR es de 12 µl y para cada uno de los genes a estudiar se emplean cebadores y sondas específicas (Tabla 18). Los componentes de la reacción son los siguientes:

- 2,92 µl de agua MilliQ.
- 0,36 µl de oligonucleótido sentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 0,36 µl de oligonucleótido antisentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 0,36 µl de sonda (5 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 6 µl Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).
- 2 µl de muestra de la RT.

Tabla 18. Genes y sondas específicas para la PCR en tiempo real.

ARNm	Gen Bank	Tipo	Secuencia
<i>Cidea</i>	NM_007702.2	Sentido	5'-CCTACGACATCCGATGCACAA-3'
		Antisentido	5'-TCTGTGCAGCATAGGACATAAACC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTTCAAGGCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'-TAMRA
<i>Hprt</i>	NM_012583	Sentido	5'-AGCCGACCGTTCTGTGCAT-3'
		Antisentido	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Sonda	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'-TAMRA
<i>Ppargc1a</i>	NM_031347	Sentido	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Antisentido	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT-3'
		Sonda	FAM-5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA-3'-TAMRA
<i>Ppargc1b</i>	NM_176075.2	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
<i>Ucp1</i>	NM_009463	Sentido	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GACCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGACGGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
<i>Prdm16</i>	NM_001177995.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Mm01266512_m1

Las muestras se cargan por duplicado en una placa de medición junto una curva patrón para el gen estudiado, el control negativo de la RT y un blanco. La curva patrón consta de 6 puntos que se obtienen de una dilución seriada (1:4) de una mezcla de todas las muestras de RT a estudiar (2 µl de cada una de ellas). La placa se introduce en un sistema de PCR en tiempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) con unas determinadas condiciones de amplificación (Tabla 19).

Tabla 19. Programa PCR en tiempo real

Tiempo	Temperatura
2 minutos	50°C
10 minutos	95°C
15 segundos	95°C
1 minuto	65°C
Se repite la secuencia durante 40 ciclos	

Para el análisis de los datos se compara el ratio entre un gen de referencia, en este caso, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) y el gen problema de cada una de las muestras.

Análisis Kiss1 por PCR en tiempo real

El análisis de *Kiss1* en el hipotálamo se realiza por medio de una RT y PCR en tiempo real distintas a las anteriormente mencionadas. Así, para llevar a cabo la RT del total del ARN total de muestras hipotalámicas se utiliza el kit de síntesis de ADNc iScript™, con las siguientes

condiciones: 0,2 µg de ARN de, 1 µl de transcriptasa inversa iScript y 4 µl de mezcla de reacción 5x iScript en un volumen final de 20 µl. Los controles negativos incluyen todos los reactivos excepto la muestra de ARN. Posteriormente la mezcla se incuba en un termociclador T100™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) con unas condiciones determinadas (Tabla 20). Una vez termina la reacción, el volumen de reacción se diluye en 80 µl de agua libre de nucleasas.

Tabla 20. Programa termociclador para RT

Tiempo	Temperatura
5 minutos	25°C
60 minutos	42°C
5 minutos	85°C

Para la PCR en tiempo real se utilizaron cebadores específicos para cada gen a estudiar (Tabla 21) y se prepara un volumen final de 15 µL con los siguientes componentes y cantidades:

- 5 µl de la muestra de la RT
- 0,5 µl de cebador directo específico (*Forward*)
- 0,5 µl de cebador inverso específico (*Reverse*)
- 6,25 µl de Go Taq qPCR Master mix
- 2,75 µl de agua libre de nucleasa

Las muestras se cargan por duplicado en una placa de medición junto una curva patrón, a la cual se compone de una dilución seriada de una mezcla de todas las muestras de RT a estudiar, el control negativo de la RT y un blanco. Los ciclos de amplificación y cuantificación se realizaron de la siguiente manera: 1 ciclo de activación Hot-Start a 95 ° C durante 2 min, seguido de 40 ciclos compuestos por 30s de desnaturalización a 95 ° C, 30s de hibridación a una temperatura específica dependiente del cebador (Tabla 21) y 20s de extensión a 72 ° C, y finalmente una extensión final de 72 ° C durante 10 min.

Tabla 21. Genes y cebadores específicos para la PCR en tiempo real.

ARNm	Gen Bank	Tipo	Secuencia	Temperatura hibridación (°C)
<i>Kiss1</i>	NM_178260.3	Directo	5'-GCTGCTGCTTCTCCTCTGTG-3'	60
		Inverso	5-TCTGCATACCGCGATTCCCTT-3'	
<i>S11</i>	NM_013725.4	Directo	5'-CATTGACGACGGAGCGTGCTTAC-3'	58
		Inverso	5'-TGCATCTTCATCTTCGTCAC -3'	

Para el análisis de los datos se normaliza el gen problema de cada una de las muestras con un gen de referencia, en este caso, proteína ribosómica S11. (*Protocolo experimental realizado por el Dr. Manuel Tena Sempere, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC)/Hospital Reina Sofía, Córdoba, 14004, España*)

13.3 PCR PARA GENOTIPADO

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utiliza una pequeña sección de la cola del ratón, aproximadamente de 2 o 3 milímetros. Se le añaden 600 μ l de NaOH a 0,6 M y se calientan a 100°C durante 15 min para que se degrade la cola. Posteriormente, se mantienen a temperatura ambiente durante 10 min y se le añaden 100 μ l de Tris-HCl.

Amplificación por PCR convencional

Para el genotipado se utiliza el método de PCR estándar. La región de ADN de interés se amplifica mediante un set específico de cebadores (Tabla 22) y unas condiciones de temperatura y números de ciclos determinados para el alelo a estudiar.

Tabla 22. Set de cebadores para el genotipado.

Alelo	Cebador	Secuencia
AMPKα1 loxP	Forward 11528	5'-CCCACCATCACTCCATCTCT-3'
	Reverse 11529	5'-AGCCTGCTTGGCACACTTAT-3'
GFAP Cre	Forward oIMR1084	5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3'
	Reverse oIMR1085	5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'
	Internal positive control Forward oIMR7338	5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'
	Internal positive control Reverse oIMR7339	5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'

Para el genotipado del alelo AMPK α 1 floxeados se usa un volumen final de 12 μ l con los siguientes componentes:

- 1,66 μ l de tampón de carga 5 mM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final de 0,69 mM.
- 0,96 μ l de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para una concentración final de 0,20 mM
- 1,2 μ l de tampón DreamTaq a 10X (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final de 1X.
- 0,6 μ l de cebador forward 11528 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,6 μ l de cebador reverse 11529 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,06 μ l de DreamTaq polimerasa a 5U/ μ l (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final de 0,03U/ μ l.
- 2 μ l de ADN.

Las condiciones de la PCR se detallan en la siguiente tabla (Tabla 23)

Tabla 23. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones AMPK α 1 floxeado.

Tiempo	Temperatura	Número de ciclos
3 minutos	94°C	1
30 segundos	94°C	35
30 segundos	62°C	35
30 segundos	72°C	35
2 minutos	72°C	1

Para el genotipado del alelo GFAP Cre se usa un volumen final de 12 μ l con los siguientes componentes:

- 1,2 μ l de tampón Dream Taq 10X (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final de 1X.
- 0,24 μ l de dNTPs a 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para una concentración final de 0,20 mM
- 0,6 μ l de cebador forward oIMR1084 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,6 μ l de cebador reverse oIMR1085 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,6 μ l del control positivo interno del cebador forward oIMR7338 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,6 μ l del control positivo interno del cebador reverse oIMR7339 a 20 μ M (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania) para una concentración final de 1 μ M
- 0,03 μ l de DreamTaq polimerasa a 5U/ μ l (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final de 0,01U/ μ l.
- 2 μ l de ADN.
- 6,13 μ l de agua ultrapura autoclavada.

Las condiciones de la PCR se detallan en la siguiente tabla (Tabla 24)

Tabla 24. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones GFAP Cre.

Tiempo	Temperatura	Número de ciclos
3 minutos	94°C	1
30 segundos	94°C	35
1 minuto	60°C	35
1 minuto	72°C	35
2 minutos	72°C	1

Al finalizar la PCR se añaden 3 μ l de tampón de carga 5 mM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para una concentración final 1mM.

Electroforesis de agarosa

La separación de los fragmentos amplificados se realiza a través de geles de agarosa (*Agarose*, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) . Dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados, la concentración de agarosa en el gel varía. Así, para los fragmentos de AMPK α 1 se utiliza una concentración de 1,5% de agarosa y para los de GFAP Cre de un 2%. La agarosa se disuelve en 100 ml de tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; Ácido acético 20mM

y EDTA 1mM) aplicando calor con un microondas poco a poco y, una vez disuelta, se le añaden 5 µl de *Red Safe* (iNtRON biotechnology, 21141). Seguidamente, se vierte en un molde para geles de agarosa y se coloca un peine para crear los pocillos. Cuando el gel se solidifica, se carga todo el volumen de cada una de las muestras y 5 µl de marcador de peso molecular (*Invitrogen*, 15628-019). La electroforesis del gel se realiza a un voltaje de 100V durante una hora y sumergido en tampón de electroforesis TAE.

Para la visualización de los fragmentos de ADN se utiliza un transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 1000 de BIO-RAD).

13.4 DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de la doble inmunofluorescencia, los animales son previamente anestesiados y perfundidos transcárdicamente con salino y seguidamente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez perfundidos, se extrae el cerebro y se fija durante toda la noche a 4°C en PFA al 4%. Posteriormente, se lavan con PBS para eliminar el exceso de la solución fijadora y se transfieren a una solución del 30% de sacarosa en PBS durante toda la noche a 4°C. A continuación, se congelan los cerebros a -80°C y luego se cortan en secciones de 30 mm de ancho en un criostato. Se seleccionan las secciones pertenecientes a la región del hipotálamo (entre -1,34 mm y -1,94 mm respecto del bregma) y se lavan con PBS tres veces durante 5 minutos para luego incubarlas con una solución de bloqueo (suero de burro (*donkey serum*) al 5% en PBS 0,1 M con 0,3% de Triton X-100) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, se lavan con PBS dos veces durante 5 minutos y se incuban con los anticuerpos primarios GFAP (Cell Signaling, 3670, dilución 1:200 en PBS) y AMPK α 1 (Abcam, ab320047, dilución 1:250 en PBS) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavan 3 veces con PBS durante 5 minutos y se incuban con los anticuerpos secundarios anti-ratón Cy-3 (*anti-mouse Cy-3*, Jackson InmunoResearch, dilución 1:1000 en PBS) y anti-conejo Alexa Fluor 488, (*anti-rabbit Alexa Fluor 488*, Jackson InmunoResearch, dilución 1:1000 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lavan las secciones con PBS y se montan con una solución de montaje que contiene DAPI (Vector Laboratories). Paralelamente, se realiza el mismo proceso pero sin el anticuerpo primario en los controles negativos para asegurarnos de que no existe señal de los anticuerpos secundarios Cy-3 y Alexa Fluor 488.

Las imágenes se adquieren usando un microscopio confocal (Leica TCS SP-5-X) con las mismas condiciones para todas ellas. Para las imágenes representativas, se utiliza el software ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, EEUU) para ajustar el brillo y contraste.

13.5 MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH, *LUTEINIZING HORMONE*)

La evaluación de los niveles circulantes de LH se realizó un ELISA tipo sándwich. Para ello, se realiza el recubrimiento de una microplaca (Corning® 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate) con 50 µL de anticuerpo anti-LH (*anti-bovine LH* β 518B7; Universidad de California, Davis) diluido 1: 1000 en PBS 0,1 M (Tabla 25) y se incubara durante toda la noche a 4 °C en una cámara humidificada.

Tabla 25. Composición del PBS 0,1 M.

Reactivo	Cantidad/Volumen
Na ₂ HPO ₄	1,09 g
NaH ₂ PO ₄	0,32 g
NaCl	9 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1000 ml, pH7,4	

Al día siguiente, la microplaca se bloquea con tampón de bloqueo compuesto por leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (Tabla 26) durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Para la curva estándar, se utiliza una dilución en serie de la preparación de referencia de LH de ratón (AFP5306A; proporcionada por el Dr. A.F. Parlow y el programa nacional de hormonas y péptidos) en PBS-T. Después de tres lavados con PBS-T, se incuban 50 µL de muestras de suero de los animales a analizar y los estándares de la curva de LH durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave.

Tabla 26. Composición de PBS-T.

Reactivo	Cantidad/Volumen
PBS-T	950 mL
Tween-20	50 mL
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1L	

Posteriormente, y después de realizar tres lavados con PBS-T, se incubaba la placa con 50µL de anticuerpo anti-LH (antisuero LH de conejo, AFP240580Rb; proporcionado por el Dr. AF Parlow y el programa National Hormone and Peptide) diluido 1: 10000 en tampón de bloqueo durante 90 min a temperatura ambiente en agitación. La placa se lava de nuevo tres veces con PBS-T y se incubaba con 50 µL de anticuerpo conjugado con peroxidasa (*horseradish peroxidase-conjugated antibody*, DakoCytomation) diluido 1: 1000 en solución compuesta por tampón de bloqueo y PBS a partes iguales durante 90 min a temperatura ambiente en agitación. Después de la incubación del anticuerpo conjugado con peroxidasa, se añadieron 100 µL de o-fenilendiamina (Invitrogen) diluidos en 48 mL de tampón citrato (Tabla 27) con 20 µL de una solución de H₂O₂ al 30% a cada uno de los pocillos y se incubaba durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y en un agitador orbital. Finalmente, la reacción se detiene con 50 µl de HCl 3 M.

Tabla 27. Composición del tampón citrato.

Reactivo	Cantidad/Volumen
Ácido cítrico monohidrato	19,12 g
Fosfato sódico	32,8 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1000 ml, pH5,0	



La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 490 nm y 650 nm usando un lector de placas de absorbancia (lector de absorbancia de microplacas iMark™) y la concentración de LH se determinó interpolando los valores de densidad óptica de las muestras analizadas frente a una regresión no lineal de la curva estándar de LH. (*Protocolo experimental realizado por el*

Dr. Manuel Tena Sempere, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC)/Hospital Reina Sofía, Córdoba, 14004, España)

13.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la realización de la inmunohistoquímica, los cerebros fueron previamente fijados durante toda la noche en PFA al 4% a 4 ° C y posteriormente equilibrados en una solución que contenía sacarosa al 30% en TBS. A continuación, se seccionan los cerebros en cortes coronales de 30 µm en un criostato (CM3050S; Leica, Alemania) y se escogen secciones de cerebro a lo largo de la parte medio-basal del hipotálamo (MBH, *mediobasal hypothalamus*). Las secciones de cerebro se lavan primero con TBS, después se bloquean con solución SUMI (Tabla 28) y se incuban durante la noche a 4°C con anticuerpo primario anti-GFAP (SAB2500462, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) en solución SUMI. Finalmente, se lavan las secciones de cerebro con TBS y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-cabra Alexa 488 (A21206, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluido en SUMI. Las secciones se lavan en TBS y se incuban con DAPI (D3571, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) disuelto en TBS. (*Protocolo experimental realizado por la Dra. Cristina García Cáceres, Division of Metabolic Diseases, Helmholtz Diabetes Center, Munich, 85764, Alemania*)

Tabla 28. Composición della solución SUMI.

Reactivo	Cantidad/Volumen
Gelatina porcina	25 g
Triton X-100	50 ml
Ajustar con TBS hasta 100 ml, pH 7,2	

Adquisición de imágenes y análisis de la morfología celular

Las imágenes se adquieren gracias a un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Alemania) con un objetivo 20x sumergido en glicerol y un tamaño de paso de 3 µm en la dirección z. Para procesar las imágenes adquiridas, se utiliza el programa ImageJ. Así, las cuantificacines se realizan en base a: a) la visualización de cuerpos celulares astrocíticos, b) la medición de la longitud de los procesos primarios desde el soma hasta el final del proceso y c) el número de procesos principalmente conectados al soma. Estos tres parámetros se analizan para cada animal utilizando dos secciones de la región hipotalámica anterior, medial y posterior, un total de 6 cortes por cada animal. La región de interés seleccionada fue el núcleo ARC del hipotálamo. (*Protocolo experimental realizado por la Dra. Cristina García Cáceres, Division of Metabolic Diseases, Technische Universität München, Helmholtz Diabetes Center (HDC), Múnich, 85764, Alemania*).



14 ESTADÍSTICA

La mayoría de los resultados obtenidos en los procedimientos experimentales se representan en porcentaje en función de su control donde el valor representado corresponde con la media y el error con la desviación estándar de la media (SEM). En los experimentos en los que se miden parámetros como la ingesta o la masa corporal de los animales, se representan los valores brutos sin realizar ningún tipo de relación. El número de muestras o de animales empleados en cada procedimiento se detalla en los pies de figura de los resultados.

Para determinar muestras y/o animales atípicos se utiliza el *GraphPad Software Outlier calculator*, en el cual emplea la prueba de Grubbs para determinar si alguno de los valores es un valor significativamente atípico. Además, si en algún procedimiento experimental se observa algún comportamiento anómalo de un animal como mal aspecto externo, estereotipias o presencia de algún tipo de dolor, también se excluye de los resultados.

Para determinar la normalidad de los resultados se emplea el test de normalidad de Shapiro-Wilks (Kao and Green, 2008). La normalidad de los resultados permite el uso de tests estadísticos paramétricos como el T-test.

14.1 TEST T DE STUDENT

El test t de Student compara las medias de dos poblaciones desapareadas que siguen una distribución normal gaussiana. Es considerado un estadístico robusto puesto que es capaz de comparar poblaciones con un número menor o igual a 5 (JC, 2013). En él se evalúa la desigualdad entre las medias de las poblaciones a analizar, donde las regiones de la cola inferior y superior de la distribución se corresponden con las regiones críticas del estadístico. Se utilizan test t de Student de una o dos colas, detallado en los pies de la figura de los resultados. Al estudiar variables donde no se conoce su efecto o no existe evidencia previa, se realiza un test t de Student de dos colas mientras que en variables donde se conoce su efecto previo se realiza utilizan test t de Student de una cola. El poder realizar t-test de una cola ofrece un estadístico más robusto al aumentar la sensibilidad a posibles efectos fisiológicos (Milton, 2007).

RESULTADOS

1. ELIMINACIÓN POSTNATAL DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS

Para poder llevar a cabo el estudio de este trabajo, primeramente, se generó una línea de ratón deficiente de AMPK α 1 en los astrocitos. Para ello, se utilizó un sistema Cre/lox que permite la eliminación de forma exclusiva AMPK α 1 en las células gliales que expresan hGFAP. Además, debido a que las células gliales actúan como progenitores neuronales durante el desarrollo del cerebro (Goldman, 2003), esta línea de ratón es inducible por tamoxifeno, para poder lograr la eliminación de AMPK α 1 en ratones adultos sin afectar al desarrollo neuronal.

La efectividad de la eliminación de AMPK α 1 en las células gliales hGFAP- positivas se demostró mediante una doble inmunofluorescencia (Figura 1A) en la cual se puede observar que, tras la administración i.p. de tamoxifeno, se produce de manera adecuada la recombinación y la eliminación de AMPK α 1 en los animales GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}.

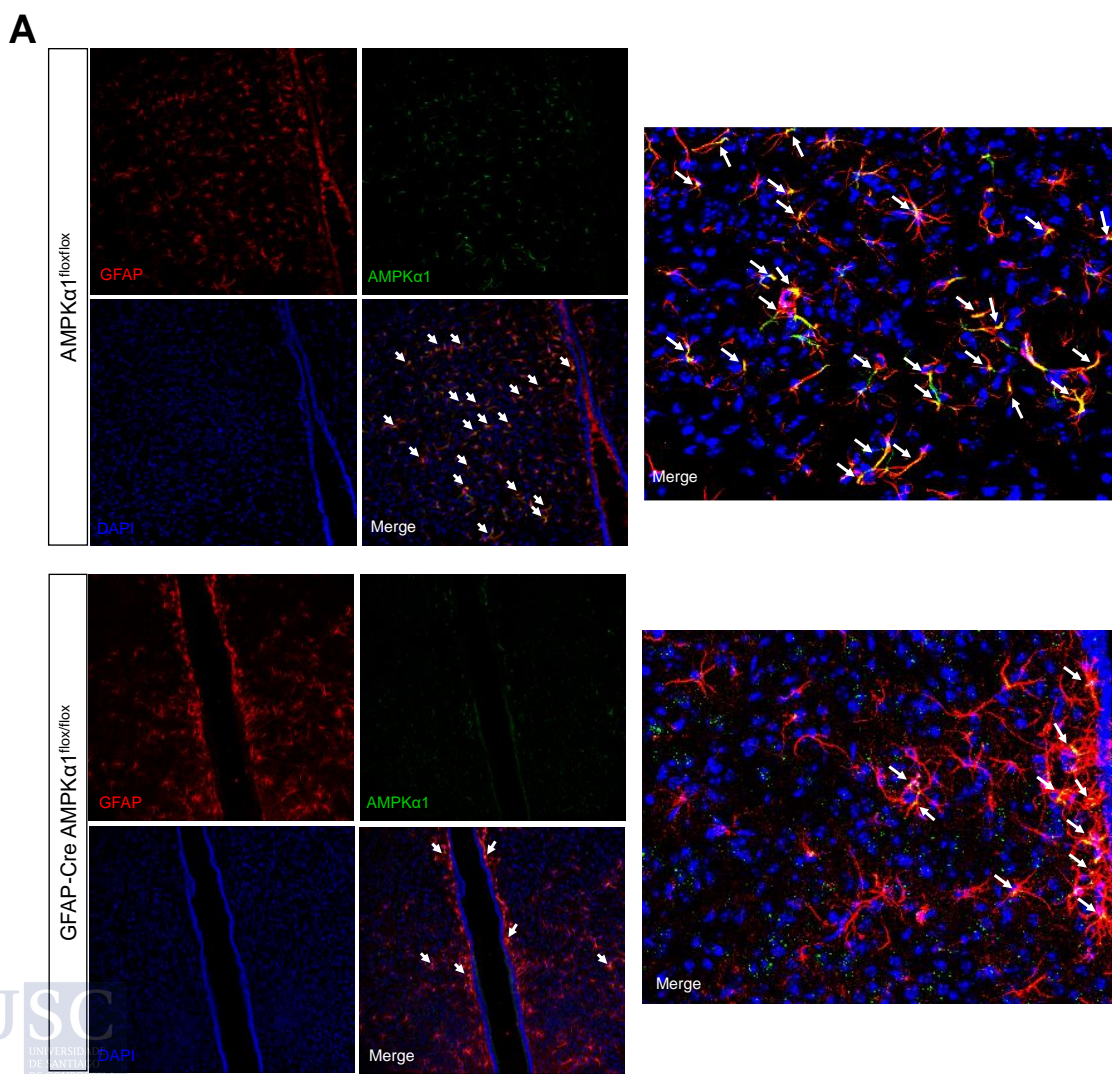


Figura 1. Eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP a través recombinación mediada por Cre dependiente de tamoxifeno. (A) Doble inmunofluorescencia de AMPK α 1 (verde)(Guerra et al.) y GFAP (rojo) en el hipotálamo de animales AMPK α 1^{flox/flox} o animales GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Las flechas blancas indican la presencia de colocalización.

2. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP AUMENTA EL PESO CORPORAL EN LAS HEMBRAS

El siguiente paso en este trabajo fue investigar si la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP provocaba algún efecto sobre el peso corporal en una dieta STD. Así, se observó que en los ratones hembra GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} se producía un aumento de peso (Figura 2A) independientemente de la ingesta (Figura 2B) con respecto a sus hermanos de camada mientras que en los machos no se observaba ninguna diferencia entre los GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} y sus hermanos de camada (Figura 3A-B).

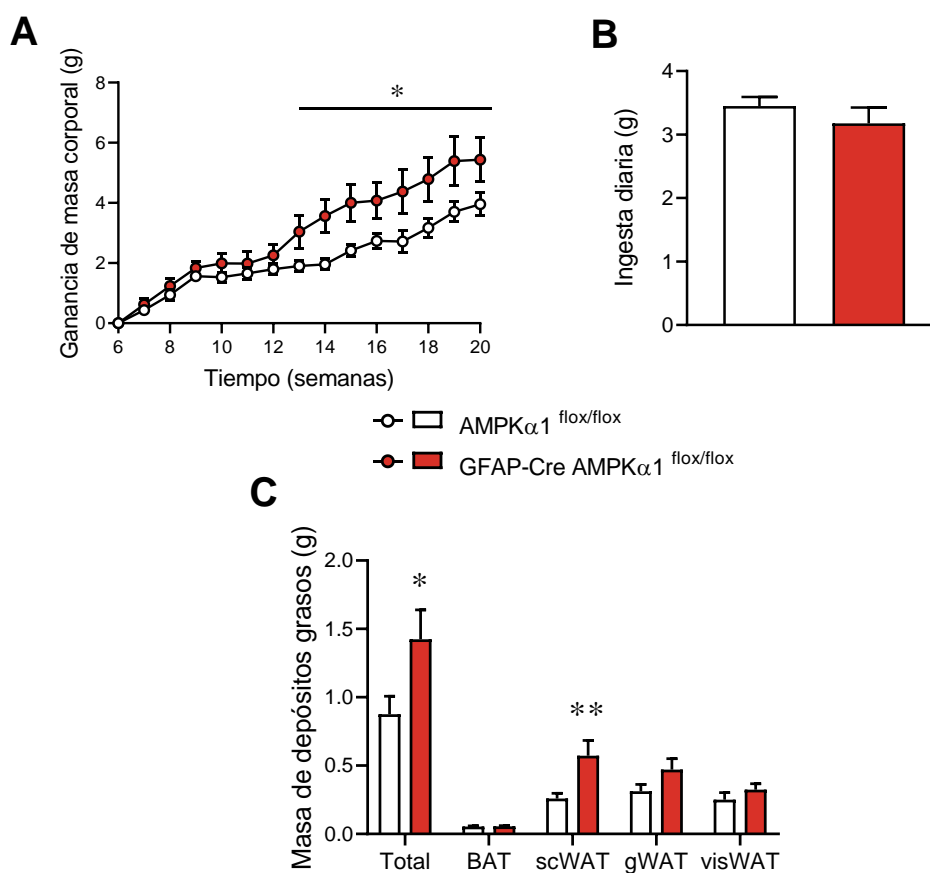


Figura 2. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en el balance energético de las hembras. (A) Ganancia de masa corporal (AMPK α 1^{flox/flox} n= 20, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 16), (B) Ingesta diaria (AMPK α 1^{flox/flox} n= 8, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 4) y (C) Masa de los depósitos de grasa (AMPK α 1^{flox/flox} n= 20, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 16). Test estadístico t de Student (2 colas), *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}, **P<0,01 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

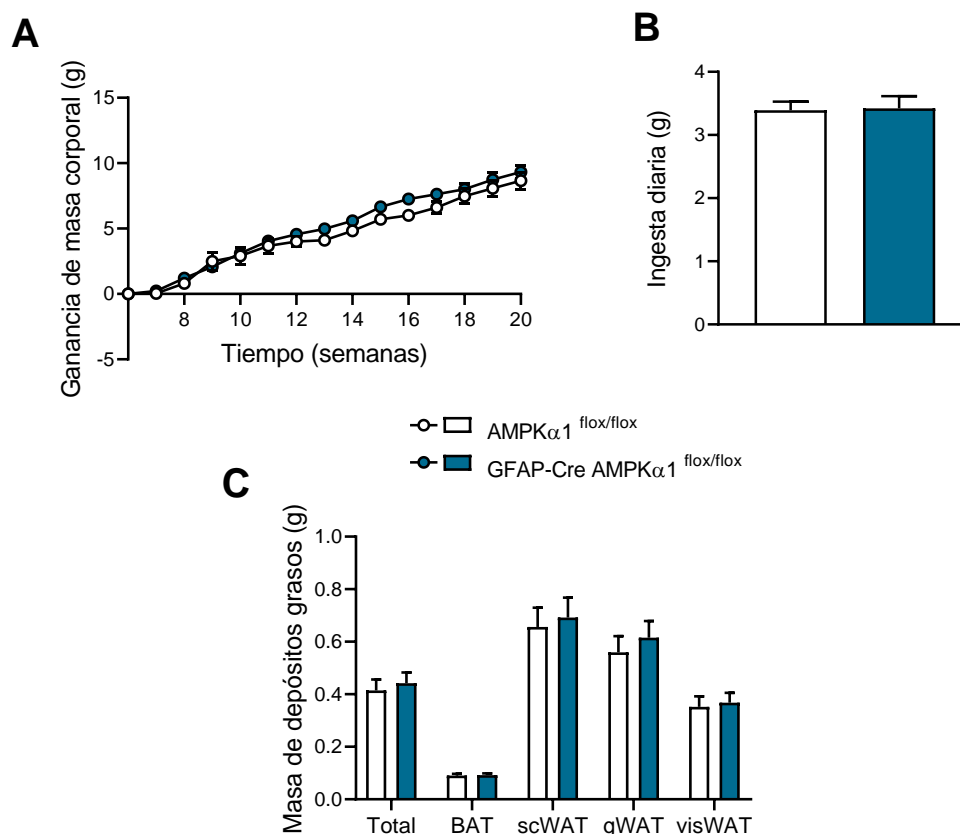


Figura 3. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en el balance energético de los machos. (A) Ganancia de masa corporal (AMPK α 1^{flox/flox} n= 10, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 15), (B) Ingesta diaria en hembras (AMPK α 1^{flox/flox} n= 8, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 4) y (C) Masa de los depósitos de grasa (AMPK α 1^{flox/flox} n= 22, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 17). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Este aumento de peso en las hembras estaba asociado con un aumento de la adiposidad, en concreto con un incremento de la grasa subcutánea sin observarse cambios en los otros depósitos grasos (Figura 2C). En los machos no observamos ningún cambio en la adiposidad (Figura 3C).

Puesto que AMPK está relacionada con la homeostasis de la glucosa, evaluamos el posible efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la regulación de la glucosa periférica y en la respuesta a insulina a través de tests de tolerancia a glucosa y de tolerancia a insulina, respectivamente. Pese a ello, no observamos ninguna diferencia, ni en los niveles de glucosa de las hembras o machos tanto alimentados *ad libitum* como en ayuno (Figuras 4A y 5A), ni en la tolerancia a glucosa (Figuras 4B-C y 5B-C) o a insulina (Figuras 4 D-Ey 5D-E).

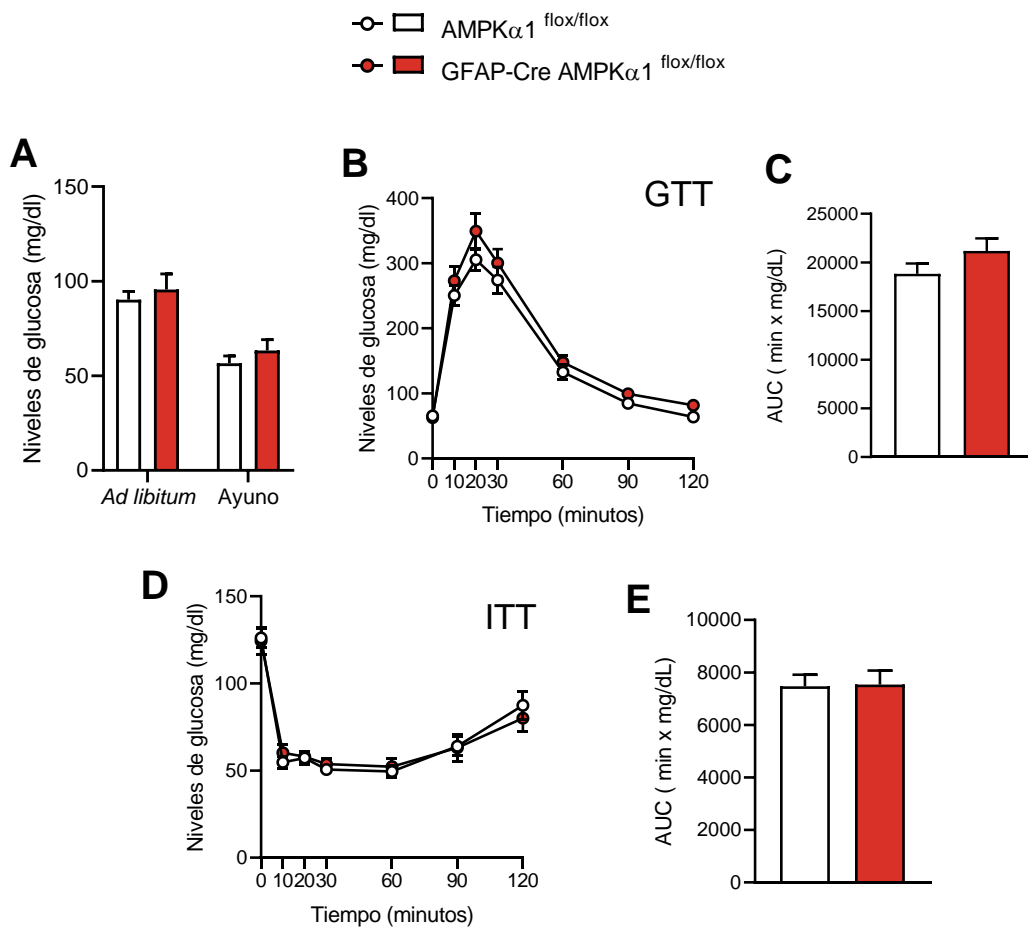


Figura 4. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la homeostasis de la glucosa en ratones hembra. (A) Niveles de glucosa circulantes (AMPK α 1^{flox/flox} n= 10, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=8), (B-C) test de tolerancia a la glucosa (GTT, glucose tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n= 14, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=10), (D-E) test de tolerancia a la insulina (ITT, insulin tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n= 14, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=12). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

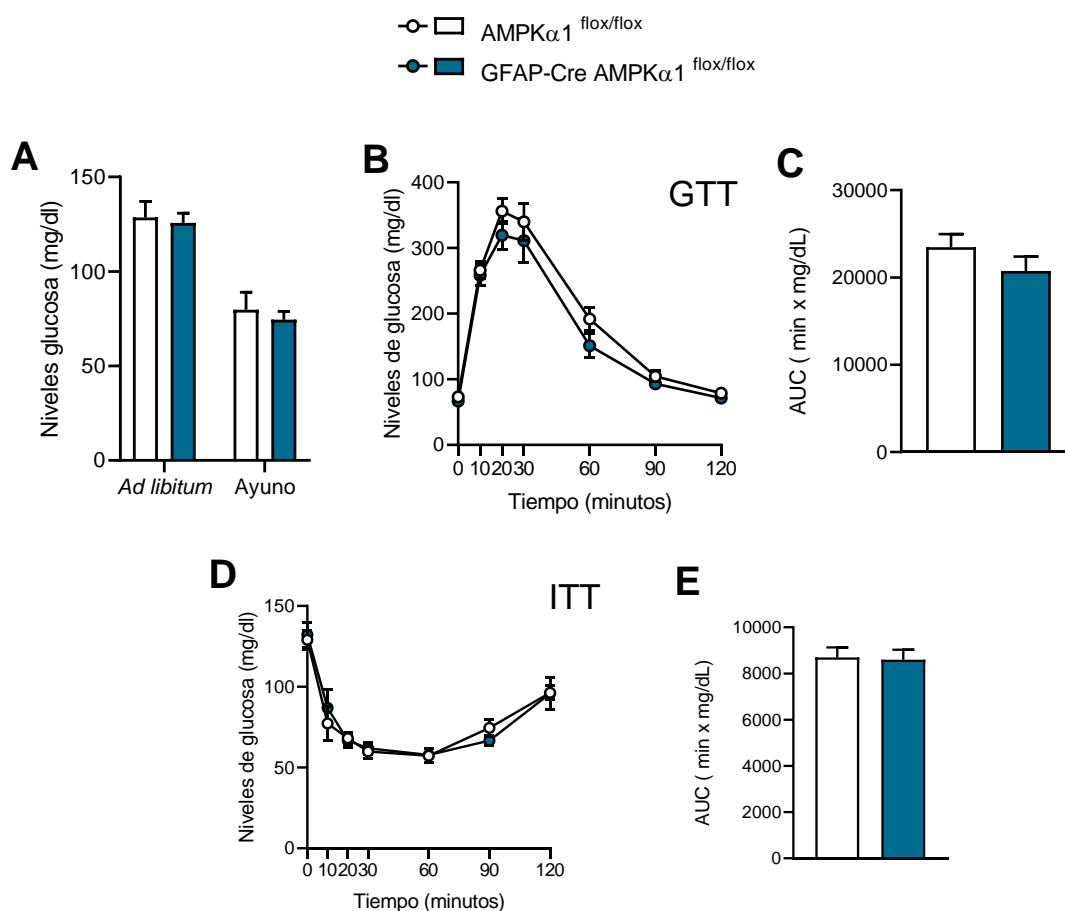


Figura 5. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la homeostasis de la glucosa en ratones macho. (A) Niveles de glucosa circulantes (AMPK α 1^{flox/flox} n= 10, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=8), (B-C) test de tolerancia a la glucosa (GTT, glucose tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n= 11, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=9), (D-E) test de tolerancia a la insulina (ITT, insulin tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n= 11, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=8). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

3. LAS HEMBRAS DEFICIENTES DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP PRESENTAN UNA DISMINUCIÓN DE LA TERMOGÉNESIS DEL BAT

Posteriormente, analizamos el efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP sobre el gasto energético, concretamente sobre la termogénesis del BAT. Observamos que las hembras presentan una disminución de la temperatura del BAT sin un descenso de la temperatura corporal (Figuras 6A-B). En concordancia con estos datos, al llevar a cabo el análisis molecular del BAT, se observó una disminución de los niveles de expresión de UCP1 y de otros marcadores termogénicos (Figuras 7A-B).

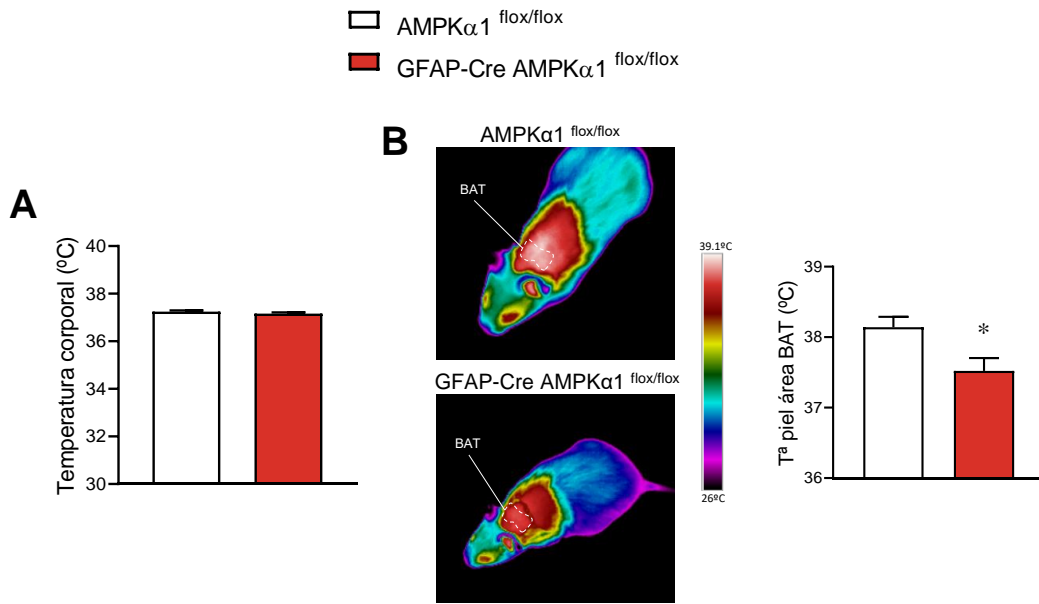


Figura 6. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la activación del BAT en ratones hembra. (A) Temperatura corporal y (B) temperatura del área del BAT (AMPK α 1^{flox/flox} n= 4, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=5). Test estadístico t de Student (2 colas). *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

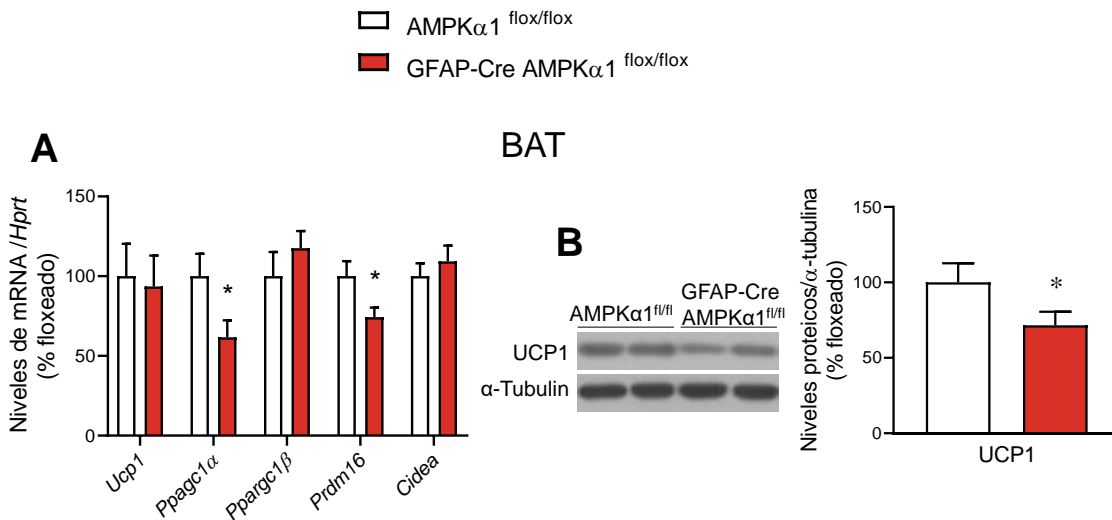


Figura 7. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la termogénesis del BAT en ratones hembra. (A) Niveles de mRNA (n=14 ratones/grupo), (B) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (AMPK α 1^{flox/flox} n=6, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=7). Test estadístico t de Student (2 colas). *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas del gel del panel B ha sido cortada del mismo gel original.



En cuanto a los machos, estas diferencias no fueron observadas ya que no presentaban distinta temperatura corporal ni del BAT (Figuras 8A-B) con respecto a sus hermanos de camada. Tampoco se observaron diferencias en el análisis molecular del BAT, donde tanto la expresión de UCP1 como los marcadores termogénicos (Figuras 9A-B) no mostraban cambios significativos.

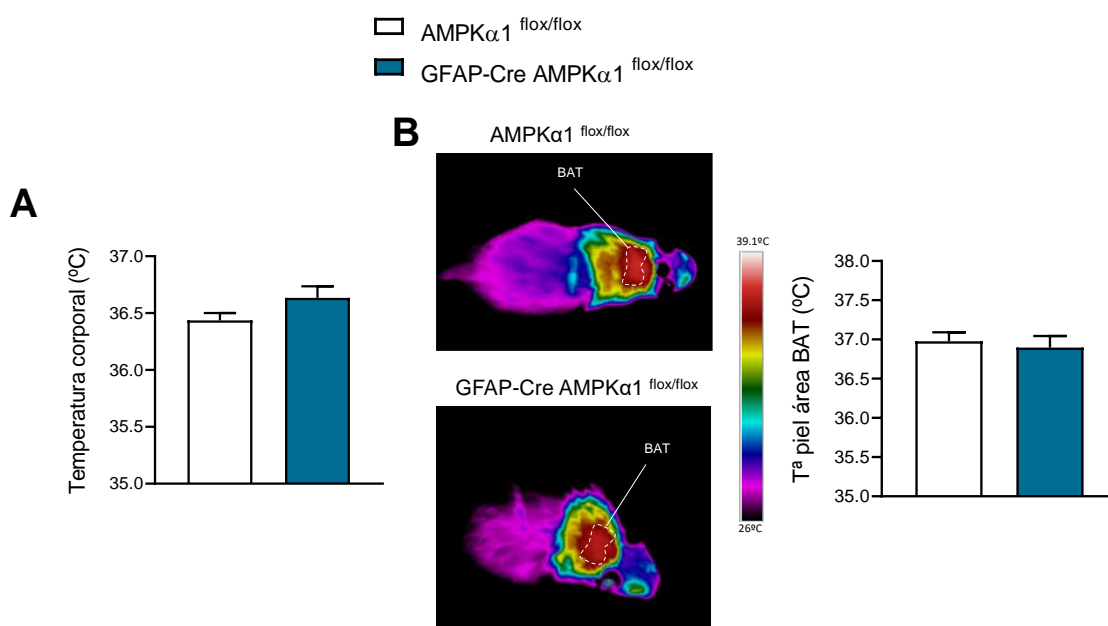


Figura 8. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la activación del BAT en ratones macho. (A) Temperatura corporal (AMPK α 1 flox/flox n= 16, GFAP-Cre AMPK α 1 flox/flox n=4) y (B) Temperatura del área del BAT (n= 8 ratones/grupo) Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

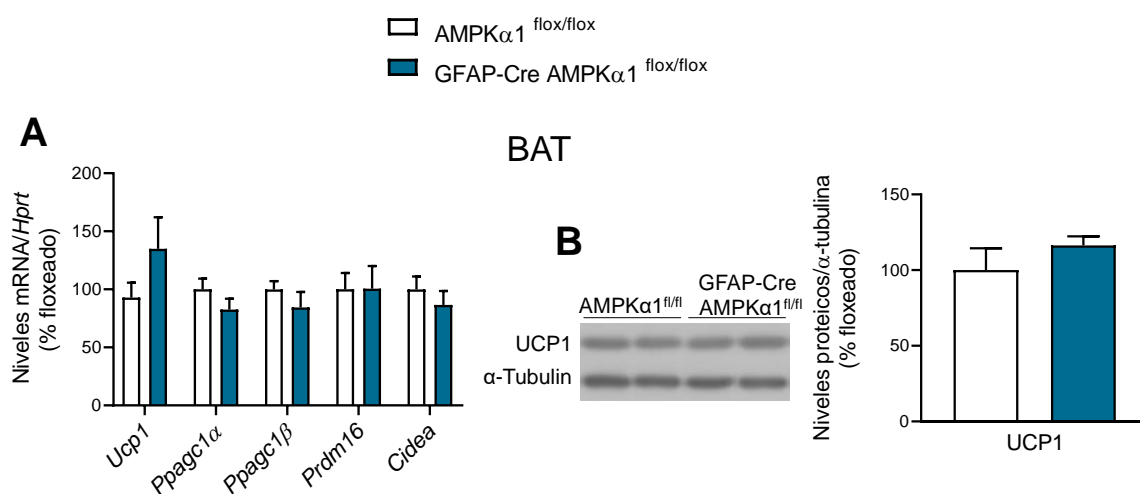


Figura 9. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la termogénesis del BAT en ratones macho. (C) Niveles de mRNA (n=13-14 ratones/grupo), (D) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (n= 7 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas del gel del panel B ha sido cortada del mismo gel original.

4. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP DE LAS HEMBRAS AUMENTA EL RQ

Seguidamente decidimos valorar si la ganancia de masa corporal observada en las hembras podía también estar relacionada con la disminución del gasto energético asociado con la actividad locomotora y el RQ. Los datos obtenidos mostraron que las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} en comparación con sus hermanas de camada no presentaban diferencias en el gasto energético ni en la actividad locomotora (Figuras 10 A-B), pero, en cambio, sí que presentaban diferencias en el RQ (Figura 11A). El RQ está relacionado de forma directa con el sustrato que se está metabolizando en un organismo en un determinado momento, y su valor oscila entre 0.7 y 1 según se estén metabolizando lípidos o carbohidratos. De este modo podemos inferir que las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} poseen un aumento de la oxidación de carbohidratos, frente a lípidos.

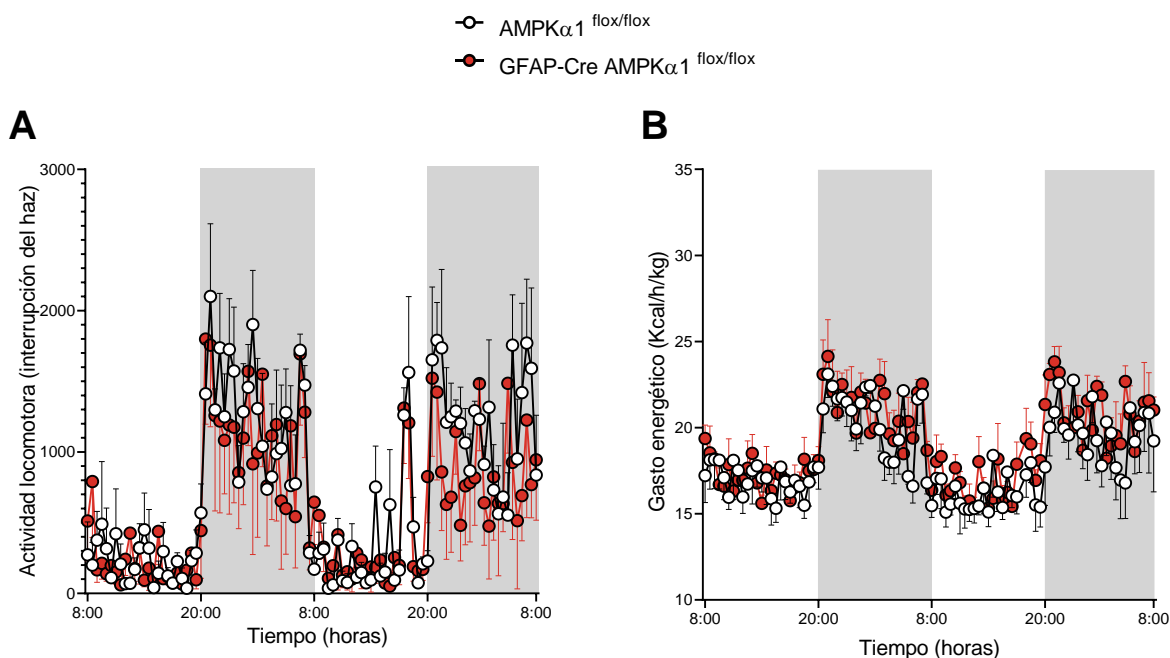


Figura 10. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la actividad locomotora y el gasto energético. (A) Actividad locomotora y (B) gasto energético (n= 4 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

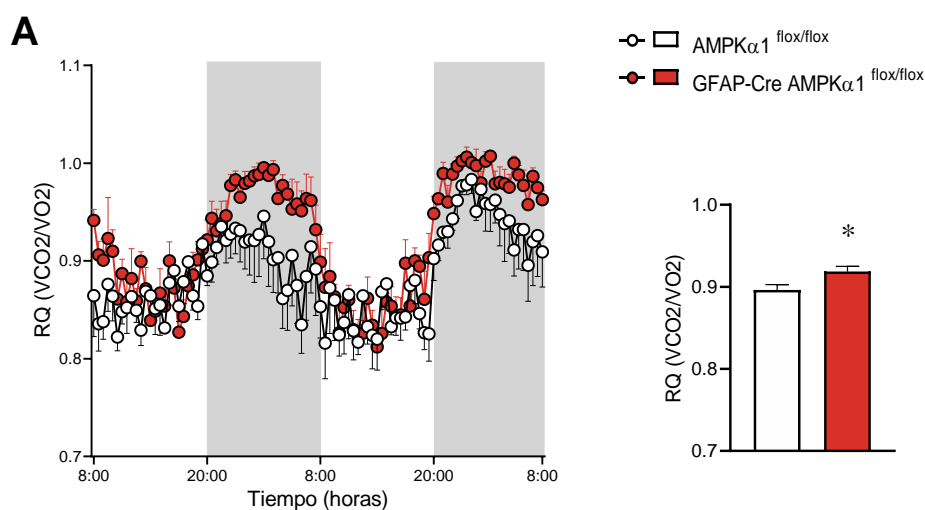


Figura 11. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en el cociente respiratorio. (A) Transcurso del cociente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*) en el panel izquierdo y cociente respiratorio total en el panel derecho (n= 4 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

5. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP PROVOCA UN INCREMENTO DE LOS NIVELES DE AROMATASA EN EL MBH DEL HIPOTÁLAMO

Dado el fenotipo observado en las hembras y no en los machos, consideramos que los estrógenos podrían estar implicados en este dimorfismo. Los estrógenos actúan como protectores contra la obesidad y, deficiencias en la señalización y síntesis de E₂, llevan a un fenotipo obeso (López and Tena-Sempere, 2015; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Xu et al., 2011). Parte de este fenotipo se debe a que modulan la termogénesis del BAT a través de la modulación de AMPK (Martinez de Morentin et al., 2014). Además, recientemente, se ha observado la participación de los astrocitos en la respuesta a estrógenos, gracias a la expresión de receptores de estrógenos (Fuente-Martin et al., 2013), y en la neuroesteroidogénesis por la expresión de aromatasa en situaciones de estrés neuronal (Azcoitia et al., 2003; Garcia-Ovejero et al., 2005).

Debido a esto, nuestro siguiente paso fue analizar los niveles de aromatasa y de los receptores de estrógenos en el hipotálamo medio-basal (MBH, *mediobasal hypothalamus*), una zona que engloba principalmente los núcleos ARC y VMH de especial relevancia en el balance energético. Interesantemente, encontramos que los niveles de aromatasa en el MBH estaban significativamente elevados (Figura 12A).

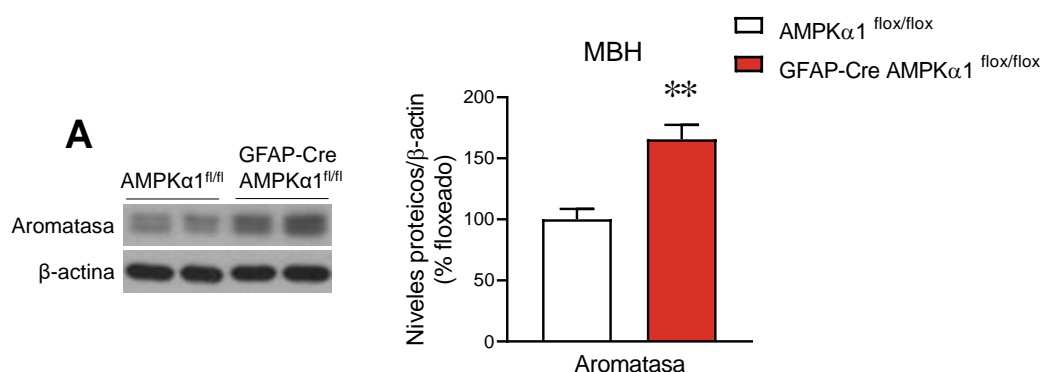


Figura 12. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en los niveles de Aromatasa. (A) Niveles proteicos de Aromatasa en el MBH (n= 7 ratones/grupo) (n= 6 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). **P<0,01 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los gels del panel A han sido cortadas del mismo gel original.

Además, también se muestran cambios significativos en algunos receptores de estrógenos como el receptor ER α y el receptor nuclear GPR30 (Figura 13A). Sin embargo, no se observaron diferencias en el receptor ER β (Figura 13A).

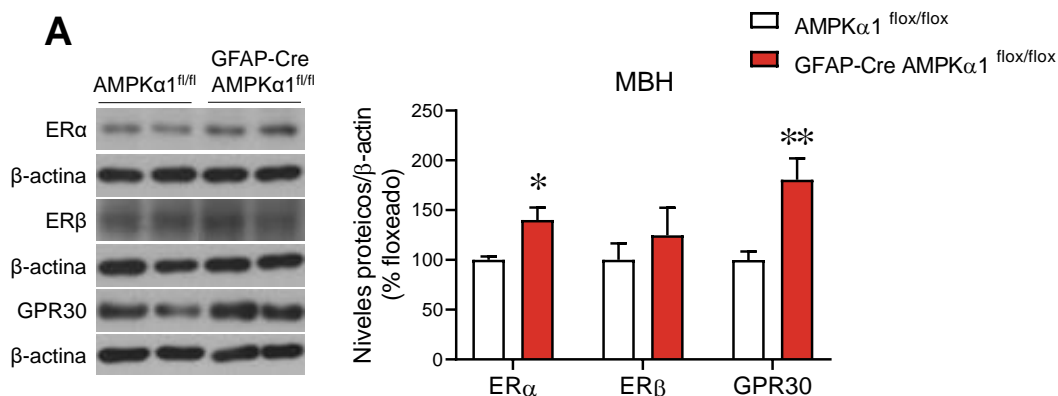


Figura 13. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en los niveles de receptores de estrógenos. (A) Niveles proteicos de los receptores de estrógenos en el MBH (n= 6 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas), *P<0.05, **P<0.01 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los gels del panel A han sido cortadas del mismo gel original.

Los astrocitos se han relacionado también con la regulación central del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal puesto que modulan la actividad de las neuronas GnRH (Witkin et al., 1991). Además, AMPK también está implicada tanto en regulación de las neuronas Kiss1 del hipotálamo (Roa et al., 2018), las cuales son capaces de activar a las neuronas GnRH, como en la modulación de las propias neuronas GnRH (Franssen et al., 2021).

En consecuencia, decidimos estudiar si los niveles circulantes de hormonas como la LH y la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo podrían estar afectadas por la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos de las hembras. Los datos observados no mostraron diferencias ni en los niveles séricos de LH de las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} ni en la expresión de *Kiss1* a nivel hipotalámico (Figuras 14A-B). Estos datos fueron obtenidos en colaboración con el grupo de Balance Energético y Función Reproductora del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología (Córdoba, España) dirigido por el Dr. Manuel Tena Sempere.

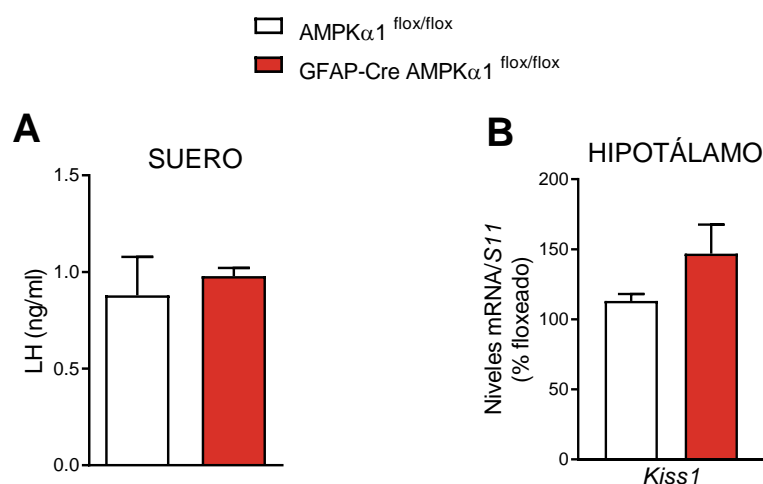


Figura 14. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en los niveles séricos de LH y en los niveles de mRNA de *Kiss1* en el hipotálamo. (A) Niveles séricos de LH (AMPK α 1^{flox/flox} n= 8, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=6), (B) niveles de mRNA de *Kiss1* en el hipotálamo (AMPK α 1^{flox/flox} n= 7, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=8). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

6. LAS HEMBRAS DEFICIENTES DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP NO RESPONDEN A LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE E2

Los resultados obtenidos en las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} parecen estar relacionados con una resistencia a nivel central de los estrógenos, por lo que se decidió comprobar si la administración a nivel central de E2 podía revertir el fenotipo observado o si por el contrario se producía una resistencia a los efectos de E2 tanto en relación con el peso corporal como con la activación del BAT.

Para investigar esta posibilidad, se llevó a cabo la administración de E2 vía ICV durante 4 días. Los resultados mostraron que, a diferencia de sus hermanas de camada, las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} no disminuían el peso corporal ni la ingesta (Figuras 15A-B).

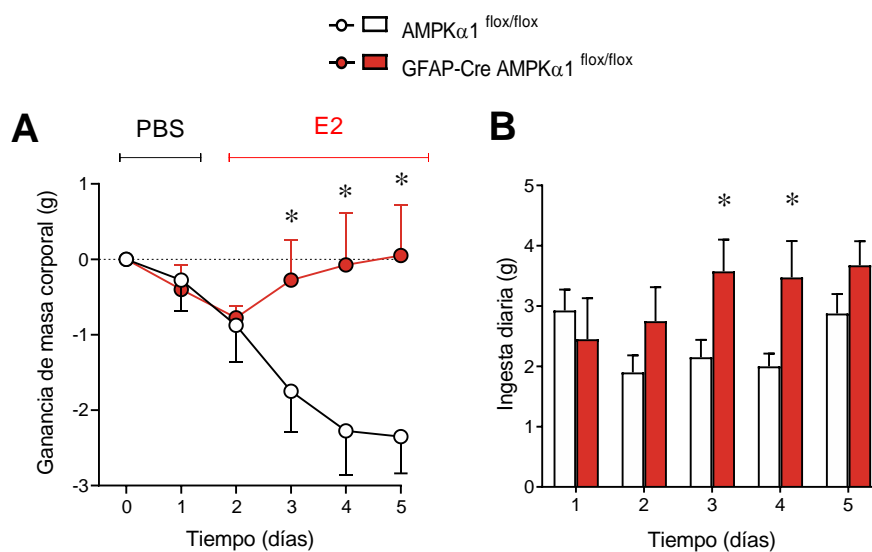


Figura 15. Efecto de la administración central de E2 en el balance energético de las hembras en GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. (A) Ganancia de masa corporal (n=4 ratones/grupo), (B) Ingesta diaria (n=4 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas), *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Esta ganancia de peso estaba asociada a una disminución de la temperatura del área del BAT (Figura 16A) y de los niveles de mRNA de marcadores termogénicos (Figura 16B). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión proteica de UCP1 aunque sí mostraba una tendencia a una disminución (Figura 16C).

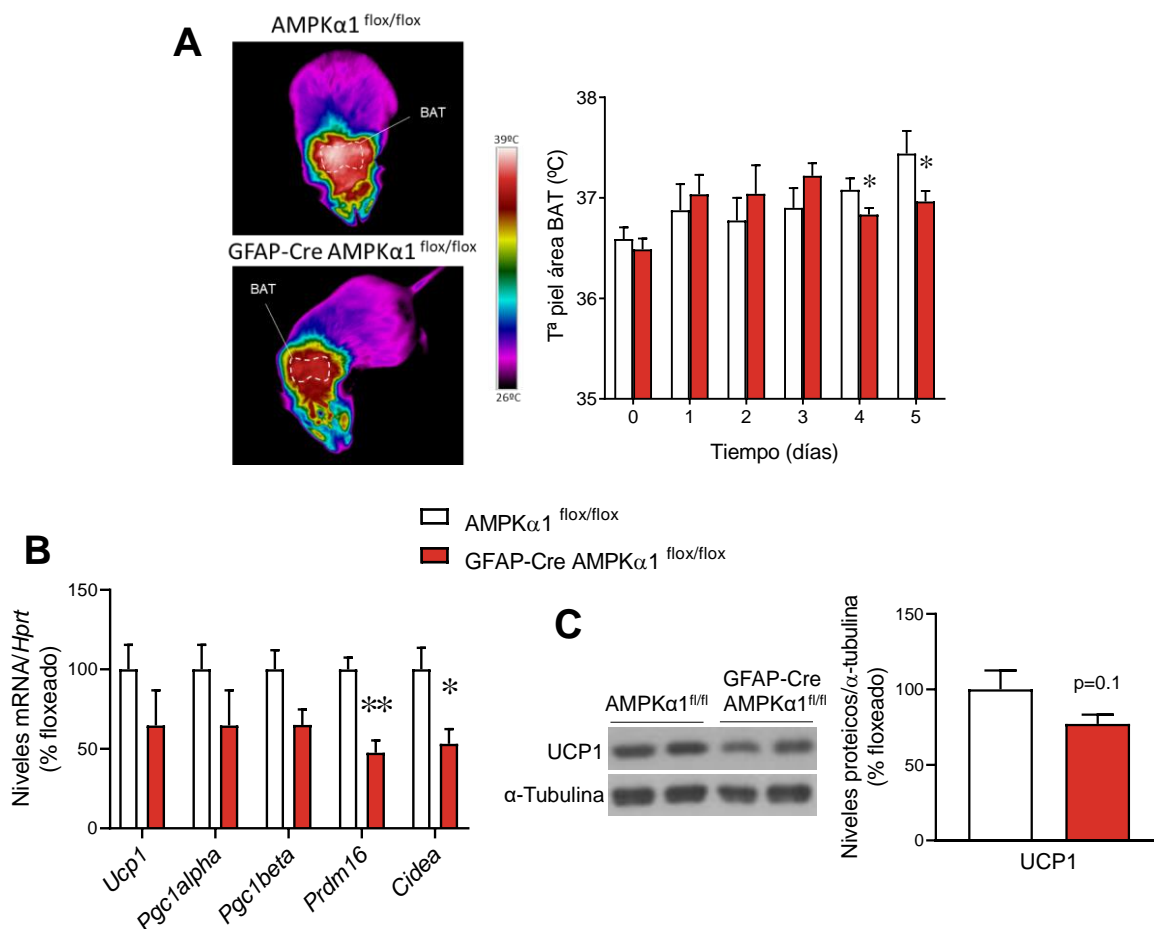


Figura 16. Efecto de la administración central de E2 en la termogénesis del BAT de las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. (A) Imagen representativa de la temperatura del BAT en el día 5 (a la derecha del panel) y temperatura del área del BAT (a la izquierda del panel) (n=4 ratones/grupo), (B) Niveles de mRNA (n=4 ratones/grupo) y (C) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (n=4 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas), *P<0,05, **P<0.01 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas del gel del panel C ha sido cortada del mismo gel original.

7. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LOS ASTROCITOS GFAP NO AFECTA A LA ASTROGLIOSIS NI AL ESTRÉS CELULAR

Estudios recientes han demostrado que un incremento de la inflamación y del estrés de ER en el hipotálamo inducen obesidad e inhiben la termogénesis del BAT (Ozcan et al., 2009; Schneeberger et al., 2013; Velloso et al., 2008; Zhang et al., 2008). Además, la lipotoxicidad, resultado de la acumulación de especies lipídicas reactivas como las ceramidas, puede ocurrir en el hipotálamo e inducir este estrés del ER, modulando así, el balance energético (Contreras et al., 2014; Martínez de Morentin et al., 2010). Estos procesos moleculares pueden ser modulados por los estrógenos los cuales reducen la inflamación y la lipotoxicidad provocando a su vez una disminución del ER stress (Gonzalez-Garcia et al., 2018; Monteiro et al., 2014). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que bajo situaciones de estrés, como dietas HFD, existe un incremento de la astrogliosis (Buckman et al., 2015) y que podría asociarse a un incremento de la inflamación a nivel hipotalámico, puesto que son capaces de producir factores inflamatorios tales como TNF- α , IL-1 β y IL-6 (Lee et al., 1993; Lieberman et al., 1989).

Además, también se ha visto que los estrógenos que derivan de los astrocitos gracias a la acción de la aromatasa, regulan la astrogliosis (Wang et al., 2020a).

Por esta relación entre los estrógenos con la inflamación, el estrés de ER y la lipotoxicidad así como con la astrogliosis, decidimos valorar si el fenotipo observado en las hembras deficientes de AMPK α 1 de los astrocitos GFAP estaba relacionado con estos procesos. Los datos obtenidos mostraron, sin embargo, que no existía un aumento de la astrogliosis en las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} (Figura 17A) con respecto a sus hermanos de camada ya que no se observó un aumento de las células positivas para GFAP (Figura 17B) ni un incremento de las proyecciones de los astrocitos (Figura 17C-D). Estos datos se obtuvieron en colaboración con la Dra. Cristina García Cáceres del grupo de *Astrocyte-Neuron Networks* del *Institute for Diabetes and Obesity (Helmholtz Diabetes Center, München, Alemania)*.

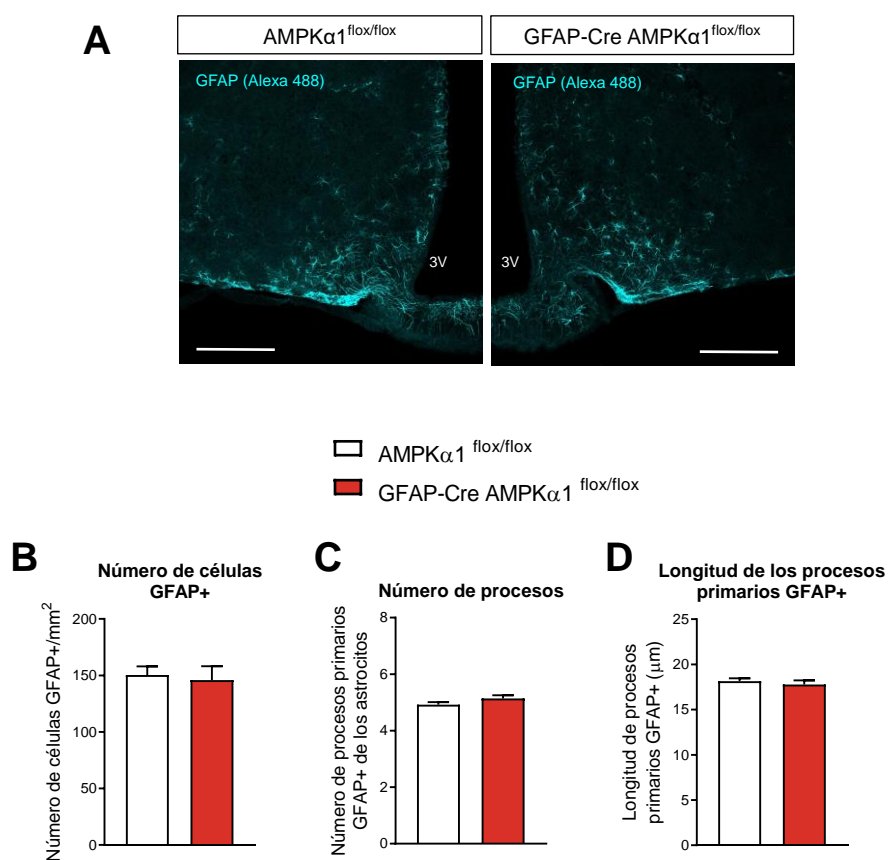


Figura 17. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en la morfología de los astrocitos GFAP positivos en el hipotálamo. (A) Inmunohistoquímica de los astrocitos GFAP+ en el hipotálamo de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. (B-D) Cuantificación del número de células positivas para GFAP (B), el número y procesos primarios de los astrocitos GFAP+ (C) y longitud de los procesos primarios GFAP+ (D) en el hipotálamo de los ratones AMPK α 1^{flox/flox} y GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} (AMPK α 1^{flox/flox} n= 6, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=3). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM.

Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias ni en la inflamación (Figura 18A), ni en el estrés del ER (Figura 19A) entre los grupos. En cuanto a la ruta de síntesis de las ceramidas, se obtuvo el mismo resultado, donde no se observaron diferencias en las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} con respecto a sus hermanos de camada (Figura 20A).

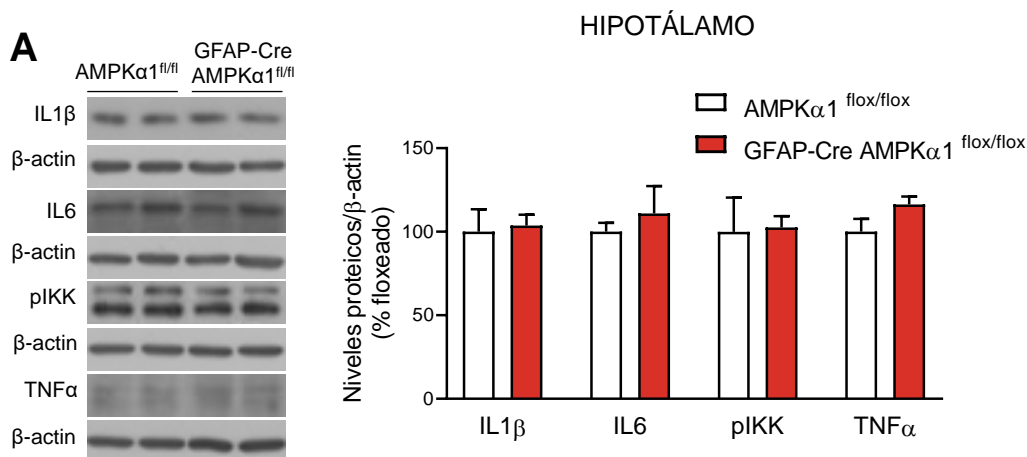


Figura 18. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la inflamación. (A) Niveles proteicos de los marcadores de inflamación en el hipotálamo (n= 7 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas del gel del panel A han sido cortadas del mismo gel original.

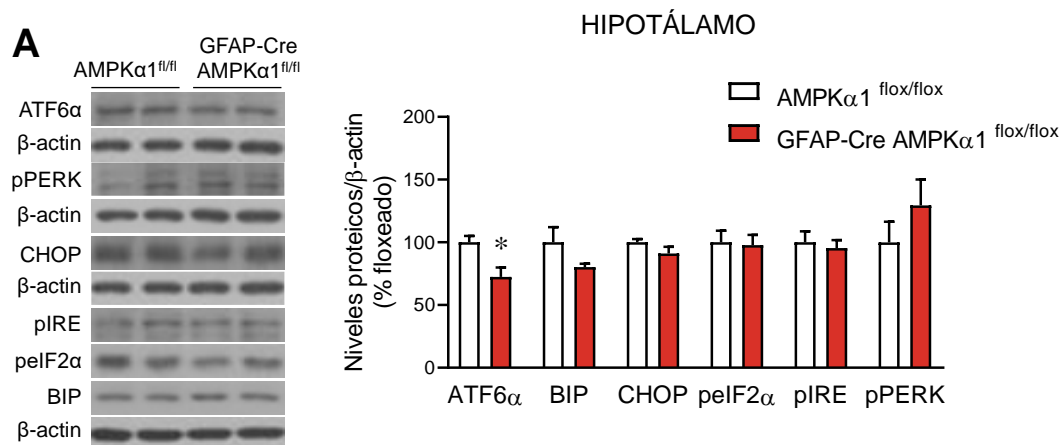


Figura 19. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en el estrés de ER. (A) Niveles proteicos de los marcadores de inflamación en el hipotálamo (n= 7 ratones/grupo, excepto ATF6 α AMPK α 1^{flox/flox} n= 7, GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=6). Test estadístico t de Student (2 colas). *P<0,05 vs AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas del gel del panel A han sido cortadas del mismo gel original.

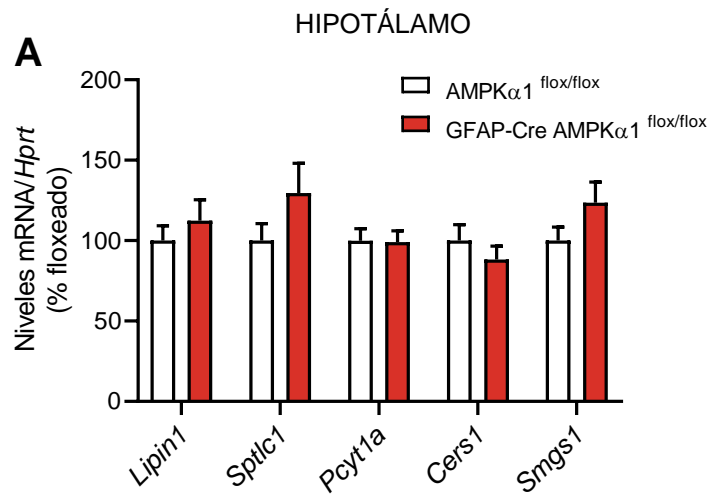


Figura 20. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP en la ruta de las ceramidas. (A) Niveles de mRNA de los marcadores del metabolismo de las ceramidas en el hipotálamo (n= 8 ratones/grupo). Test estadístico t de Student (2 colas). Los datos están expresados como media \pm SEM

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la obesidad se ha convertido en una de las mayores causas de mortalidad en el mundo debido a que supone un factor de riesgo para numerosas enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y algunas formas de cáncer (Friedman, 2009; Haslam and James, 2005; Kopelman, 2000; O.M.S., 2020). La obesidad se caracteriza por un aumento de peso derivado de un desequilibrio del balance energético de manera positiva, generalmente a causa de un aumento de la ingesta y una disminución del gasto energético. Muchos de los fármacos que se han desarrollado para combatir la obesidad se han centrado de forma exclusiva y directa en tratar el apetito, sin embargo, no han tenido mucho éxito, posiblemente por un mecanismo compensatorio de disminución del gasto energético (Dietrich and Horvath, 2012; Tschop et al., 2016). Por ello, es necesario profundizar aún más en cuales son los mecanismos capaces de modular la homeostasis energética.

El hipotálamo se ha mostrado como una de las principales zonas del cerebro que participan en el control la homeostasis energética, ya que es capaz de integrar señales periféricas, como hormonas y metabolitos, y generar una respuesta neuronal a ellas (Saper and Lowell, 2014). Así, el hipotálamo regula la ingesta de alimentos y el gasto energético, principalmente a través de la modulación de la termogénesis del BAT. A nivel molecular, los estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto la importancia de la enzima AMPK en la integración de las señales periféricas, presentando a AMPK como una vía canónica en la regulación del balance energético (Lopez et al., 2016). De hecho, la AMPK hipotalámica está implicada en la regulación de la ingesta, la termogénesis del BAT, el *browning* de WAT y la homeostasis de la glucosa y de lípidos (Alvarez-Crespo et al., 2016; Lopez et al., 2016; Lopez and Tena-Sempere, 2017), además de participar en la resistencia a la leptina inducida por la dieta (Dagon et al., 2012; Martin et al., 2006). Así, la inhibición de AMPK en el hipotálamo tiene un efecto anorexigénico y de pérdida de peso (Lopez et al., 2008; Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014; Minokoshi et al., 2004). Sin embargo, muchas de las funciones de AMPK se han estudiado en las neuronas de los distintos núcleos del hipotálamo (Claret et al., 2007; Seoane-Collazo et al., 2018), pero si es capaz de ejercerlas en otros tipos celulares del hipotálamo aún está por dilucidar.

A pesar de que los astrocitos son uno de los tipos celulares más abundantes en el cerebro, se han visto hasta hace poco únicamente como células de sostén. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que juegan un papel importante en la señalización y detección de ciertos metabolitos y hormonas, como leptina e insulina, alterando el metabolismo y actividad de las neuronas y, por consiguiente, participando en la regulación de la homeostasis energética (Fuente-Martin et al., 2012; Garcia-Caceres et al., 2016; Kim et al., 2014). Por ello, nuestro trabajo se centró en investigar si la inhibición de AMPK α 1 en los astrocitos podría, al igual que en las neuronas, afectar al balance energético. Para ello, usamos un sistema Cre-lox inducible por tamoxifeno, específico para astrocitos positivos para GFAP. En este modelo, gran parte de los astrocitos positivos para GFAP se localizan en el hipotálamo, lo que podría darnos un mejor conocimiento de la implicación de los astrocitos hipotalámicos en la regulación del balance energético. Nuestros datos muestran que la delección de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP (GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}), provocan un aumento de peso corporal en los ratones hembra pero no en los ratones macho y de manera independiente de la ingesta. Además, este aumento en el peso de las hembras se debe en gran medida al aumento de los depósitos de grasa subcutánea. Estos datos son interesantes porque muestran, por un lado, una distinta respuesta de la eliminación de AMPK α 1 en los astrocitos a la que se observa en las neuronas, como por ejemplo las neuronas SF1, donde la delección de AMPK α 1 protege de la ganancia de peso en

dietas HFD (Seoane-Collazo et al., 2018) y, por otro lado, presenta un dimorfismo sexual donde solamente se observan cambios en los ratones hembra. En los últimos años, se ha demostrado que los astrocitos presentan un claro dimorfismo sexual (Melcangi et al., 2001; Mong et al., 1999; Witkin et al., 1991) y como muestran nuestros datos, esto podría ser mediado, en parte, a través de AMPK α 1.

Puesto que se ha demostrado que los astrocitos participan en la detección y homeostasis de la glucosa, (Chari et al., 2011), y que AMPK también está implicada en la detección de la hipoglucemia y generación de una respuesta contrarreguladora (Fan et al., 2009; McCrimmon et al., 2008), consideramos la posibilidad de una desregulación de la homeostasis de la glucosa en estos animales. Sin embargo, no observamos diferencias en los niveles de glucosa *ad libitum* ni en ayuno de los ratones GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} hembras o macho y tampoco existían diferencias en la tolerancia a glucosa o a la sensibilidad a insulina en ninguno de los dos sexos. Por lo tanto, estos animales presentaban una correcta homeostasis de la glucosa, lo que podría significar que AMPK α 1 a través de los astrocitos no ejerce un papel demasiado relevante en la homeostasis de la glucosa a nivel periférico o que las neuronas glucosensoras localizadas en el hipotálamo y otras células gliales como los tanicitos (Levin et al., 2011) podrían ser capaces de contrarrestar la posible deficiencia en la detección de la glucosa en los astrocitos de los animales GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Otra posibilidad, dado que en hembras con adiposidad aumentada e hiperleptinemia, sería esperable cierto grado de insulino resistencia el hecho de no haberla podría ser debido a cambios en el control neurohormonal de la homeostasis de glucosa actuando de forma compensatoria.

AMPK es capaz de regular la termogénesis del BAT a través del SNS (Martinez de Morentin et al., 2014; Seoane-Collazo et al., 2018), de manera que, la inhibición AMPK aumenta la activación del BAT y, por lo tanto, el gasto energético (Martinez de Morentin et al., 2014; Seoane-Collazo et al., 2018). Nuestros datos muestran, sin embargo, que mientras que los ratones hembra GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} presentan una disminución de la termogénesis del BAT, consecuente con su aumento de peso, los ratones macho no muestran ninguna diferencia. Esto se observa por la disminución tanto de la temperatura del área del BAT en las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}, como de UCP1 y de los marcadores termogénicos en el BAT. Además, estas hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox}, presentan un aumento de la RQ, lo cual indica un alto metabolismo de los carbohidratos. Por lo tanto, los astrocitos, a través de AMPK α 1, influyen en la modulación de la termogénesis del BAT de manera dependiente del sexo. Estos datos contrastan de nuevo con los datos obtenidos en las neuronas SF1, donde la delección de AMPK α 1 aumenta la termogénesis (Seoane-Collazo et al., 2018), volviendo a poner de manifiesto la diferente respuesta de AMPK α 1 en neuronas y astrocitos a la modulación del balance energético.

El dimorfismo sexual que se ha observado en los últimos años en los astrocitos se debe en gran parte a la presencia de receptores de estrógenos, andrógenos y progesterona y a la expresión de enzimas implicadas en el proceso de producción de esteroides, como la aromatasas, la cual se expresa principalmente bajo condiciones de estrés (Azcoitia et al., 2003; Melcangi et al., 2001). Además, en respuesta a estrógenos, los astrocitos son capaces de controlar la actividad de ciertas neuronas (Melcangi et al., 2001; Witkin et al., 1991). Por ello, es posible que la resistencia al desarrollo de la obesidad que se da en las hembras con respecto a los machos pueda ser consecuencia de la diferente respuesta de los astrocitos a los esteroides sexuales (Chowen et al., 2018). Los estrógenos juegan un papel de protección contra la obesidad y muchas de sus acciones se modulan a través de los receptores de estrógenos localizados en el

hipotálamo y, además, con acción núcleo-específica, controlando, por un lado, la termogénesis y la adiposidad a través del VMH y, por el otro, modulando la ingesta a través del ARC (Musatov et al., 2007; Xu et al., 2011). De esta manera, fenotipos obesogénicos se desarrollan en animales ovariectomizados o deficientes de ER α (Gonzalez-Garcia et al., 2017; Martinez de Morentin et al., 2014; Mauvais-Jarvis et al., 2013). Asimismo, recientes estudios han demostrado la participación de AMPK en la modulación de la homeostasis energética por parte de los estrógenos, los cuales llevan a la inhibición de AMPK en el VMH, permitiendo un aumento de la termogénesis del BAT a través del SNS (Lopez and Tena-Sempere, 2017; Martinez de Morentin et al., 2014). Dado el grado de similitud de los resultados observado en las hembras con los modelos ovariectomizados o deficientes de ER α , es posible que el fenotipo de las hembras derive de una incorrecta señalización de los estrógenos o de su síntesis. Nuestros datos muestran que las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} no presentan una desregulación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal pero, sin embargo, sí que se observa un aumento de los niveles de aromatasa en el MBH. Esto puede ser debido a que los astrocitos no sean capaces de señalar correctamente los niveles de estrógenos circulantes y que por lo tanto necesiten contrarrestarlo con un aumento de la neuroesteroidogénesis. Además, también se ha visto que el aumento de la expresión de aromatasa en los astrocitos se da principalmente en situaciones de estrés, ejerciendo un papel neuroprotector (Azcoitia et al., 2003; Garcia-Ovejero et al., 2005). Por otro lado, los datos también muestran que existe un incremento de los niveles de los receptores de ER α y GPR30, pero no de ER β en el MBH del hipotálamo, lo cual puede estar relacionado nuevamente con la señalización incorrecta de los estrógenos, intentando contrarrestarlo con un incrementando el número de receptores disponibles. De hecho, y en consonancia con estos datos, al administrar E2 a nivel central, se observa que las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} no muestran una disminución del peso corporal ni un aumento de la termogénesis, poniendo de manifiesto la incapacidad de responder a los estrógenos de manera adecuada. Por otra parte no parece que todos los cambios puedan ser mediados por una alteración en los niveles de aromatasa dado que animales ko para aromatasa exhiben incremento adiposidad en ambos sexos (aunque de forma más tardía en machos) (ver Xu and Lopez 2018). Será necesario llevar a cabo estudios futuros con silenciamiento específico de la aromatasa en hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} en grupos neuronales específicos para esclarecer en detalle su contribución.

Los estrógenos participan en la modulación de otros procesos moleculares asociados con la obesidad como son el estrés de ER, la inflamación y la lipotoxicidad que pueden desencadenar en el desarrollo de numerosas patologías asociadas. La acumulación ectópica de lípidos, como las ceramidas, en los distintos tejidos puede derivar en lipotoxicidad, favoreciendo la resistencia a insulina, diabetes tipo 2, esteatosis hepática y insuficiencia cardíaca (Martínez de Morentin et al., 2010) y tanto la inflamación como el estrés de ER están íntimamente relacionados con la lipotoxicidad (Fu et al., 2012; Summers, 2006; Unger, 2002). De hecho, concentraciones elevadas de ceramidas en el hipotálamo dan lugar a un aumento del estrés de ER provocando un aumento de peso y disminución de la termogénesis del BAT (Contreras et al., 2017a). La obesidad también induce un estado de inflamación sistémica de bajo grado, siendo de especial relevancia la originada en el hipotálamo (De Souza et al., 2005; Milanski et al., 2009; Velloso et al., 2008). En el hipotálamo, el excesivo aporte calórico provoca una activación de las vías inflamatorias lo que lleva a una desregulación de la acción de la insulina periférica (Purkayastha et al., 2011) y una reducción de la termogénesis adaptativa (Arruda et al., 2011) por alteración de la señalización a través del SNS y los receptores β adrenérgicos (Jais and Brüning, 2017). Se ha visto que los estrógenos son capaces de modular todos estos procesos moleculares de manera que consiguen reducir la inflamación hipotalámica

(Monteiro et al., 2014) y los niveles de ceramidas en el hipotálamo que generan un descenso del estrés de ER (Gonzalez-Garcia et al., 2018). Además, la acción antiinflamatoria de los estrógenos también se da a través de los astrocitos, controlando la gliosis y la expresión de ciertas proteínas proinflamatorias (Acaz-Fonseca et al., 2014; Spence et al., 2013). Cabe de esperar, por lo tanto, que en nuestro modelo pueda existir un aumento de alguno de estos procesos, sin embargo, las hembras GFAP-Cre AMPK α 1^{flox/flox} no presentan un aumento ni de la gliosis ni de los marcadores de inflamación, así como tampoco de los marcadores de estrés de ER o del metabolismo de las ceramidas en el hipotálamo. Por ello, se deduce que estos mecanismos no están implicados en el fenotipo metabólico observado en las hembras por la delección de AMPK α 1 en los astrocitos.

En conclusión, nuestros datos muestran que la ablación de la isoforma AMPK α 1 en los astrocitos GFAP provoca un aumento del peso corporal independientemente de la ingesta, pero asociado con una disminución de la termogénesis del BAT solamente en los ratones hembra. Este dimorfismo sexual puede ser debido a una incapacidad de señalar los estrógenos de manera adecuada sin alterar otros mecanismos como la gliosis, la inflamación, el estrés de ER o el metabolismo de las ceramidas. Aunque es necesario profundizar más sobre el papel de los astrocitos en la homeostasis energética y principalmente en la regulación de los estrógenos, estos resultados sugieren que AMPK está desempeñando un papel importante en el balance energético a través de los astrocitos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis basados en la generación de un nuevo modelo animal mediante modificación genética nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- La delección de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP provocan un aumento del peso corporal y una disminución de la termogénesis del BAT únicamente en los ratones hembra.
- Este fenotipo se debe principalmente a una deficiencia en la acción central de los estrógenos.
- Estos efectos asociados a delección de AMPK α 1 en los astrocitos GFAP no se relacionan con una desregulación de la homeostasis de la glucosa o con un aumento de la astrogliosis, la inflamación, el estrés de ER o el metabolismo de las ceramidas en el hipotálamo.
- AMPK α 1 en los astrocitos GFAP juega un papel central en la regulación del balance energético mediado por estrógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M.A., and Garcia-Segura, L.M. (2014). Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17beta-estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol* 389, 48-57.
- Ahima, R.S., and Antwi, D.A. (2008). Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37, 811-823.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11, 327-332.
- Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., and Kahn, B.B. (2007). Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. *Endocrinology* 148, 1367-1375.
- Alvarez-Crespo, M., Csikasz, R.I., Martinez-Sanchez, N., Dieguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., and Lopez, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab* 5, 271-282.
- Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 77, 323-324.
- Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F., Muehlbauer, M.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., and Means, A.R. (2008). Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab* 7, 377-388.
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., and Small, C.J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279, 12005-12008.
- Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., Shargill, N., and Bray, G.A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255, E255-259.
- Aravich, P.F., and Sclafani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* 97, 970-983.
- Arevalo, M.A., Santos-Galindo, M., Bellini, M.J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L.M. (2010). Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 1800, 1106-1112.
- Arletti, R., Benelli, A., and Bertolini, A. (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav* 48, 825-830.
- Arruda, A.P., Milanski, M., Coope, A., Torsoni, A.S., Ropelle, E., Carvalho, D.P., Carnevali, J.B., and Velloso, L.A. (2011). Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 152, 1314-1326.
- Asarian, L., and Geary, N. (2006). Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1251-1263.
- Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172-177.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., and Garcia-Segura, L.M. (2003). Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann N Y Acad Sci* 1007, 298-305.
- Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., et al. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493-505.
- Barres, B.A. (1991). New roles for glia. *J Neurosci* 11, 3685-3694.

- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., et al. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* *17*, 200-205.
- Bartness, T.J., Liu, Y., Shrestha, Y.B., and Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol* *35*, 473-493.
- Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* *34 Suppl 1*, S36-42.
- Bass, J., and Takahashi, J.S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* *330*, 1349-1354.
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Ferno, J., Salvador, J., Escalada, J., et al. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* *63*, 3346-3358.
- Berasi, S.P., Huard, C., Li, D., Shih, H.H., Sun, Y., Zhong, W., Paulsen, J.E., Brown, E.L., Gimeno, R.E., and Martinez, R.V. (2006). Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *J Biol Chem* *281*, 27167-27177.
- Bergersen, L.H. (2007). Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* *145*, 11-19.
- Bernardis, L.L., Awad, A., Fink, C., and Bellinger, L.L. (1992). Metabolic and neuroendocrine indices one month after lateral hypothalamic area lesions. *Physiol Behav* *52*, 133-139.
- Bernardis, L.L., and Bellinger, L.L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res* *434*, 321-381.
- Bernardis, L.L., and Bellinger, L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* *20*, 189-287.
- Bi, S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *281*, R254-260.
- Bi, S., Robinson, B.M., and Moran, T.H. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *285*, R1030-1036.
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* *319*, 218-245.
- Blázquez, C., Galve-Roperh, I., and Guzmán, M. (2000). De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *Faseb j* *14*, 2315-2322.
- Blázquez, C., Woods, A., de Ceballos, M.L., Carling, D., and Guzmán, M. (1999). The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *J Neurochem* *73*, 1674-1682.
- Boyles, J.K., Pitas, R.E., Wilson, E., Mahley, R.W., and Taylor, J.M. (1985). Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* *76*, 1501-1513.
- Brito, N.A., Brito, M.N., and Bartness, T.J. (2008). Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *294*, R1445-1452.
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., and 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.
- Buckman, L.B., Thompson, M.M., Lippert, R.N., Blackwell, T.S., Yull, F.E., and Ellacott, K.L. (2015). Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Mol Metab* 4, 58-63.
- Camandola, S. (2018). Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis. *Cell Stress* 2, 246-252.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metab* 26, 697-698.
- Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W., and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276, 27077-27082.
- Carling, D., and Viollet, B. (2015). Beyond energy homeostasis: the expanding role of AMP-activated protein kinase in regulating metabolism. *Cell Metab* 21, 799-804.
- Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223, 217-222.
- Carpéné, C., Bousquet-Mélou, A., Galitzky, J., Berlan, M., and Lafontan, M. (1998). Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann N Y Acad Sci* 839, 186-189.
- Carr, M.C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404-2411.
- Chao, P.T., Yang, L., Aja, S., Moran, T.H., and Bi, S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab* 13, 573-583.
- Chari, M., Yang, C.S., Lam, C.K., Lee, K., Mighiu, P., Kokorovic, A., Cheung, G.W., Lai, T.Y., Wang, P.Y., and Lam, T.K. (2011). Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo. *Diabetes* 60, 1901-1906.
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., et al. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-451.
- Chen, Y., Hu, C., Hsu, C.K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H.M., Fox, N., Sliker, L.J., Yang, D.D., et al. (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* 143, 2469-2477.
- Choi, Y.H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., and Kim, K.W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front Neurosci* 7, 71.
- Chowen, J.A., Argente-Arizon, P., Freire-Regatillo, A., and Argente, J. (2018). Sex differences in the neuroendocrine control of metabolism and the implication of astrocytes. *Front Neuroendocrinol* 48, 3-12.
- Chowen, J.A., Busiguina, S., and García-Segura, L.M. (1995). Sexual dimorphism and sex steroid modulation of glial fibrillary acidic protein messenger RNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 69, 519-532.

- Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., and Parker, M.G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 25, 9383-9391.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., et al. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117, 2325-2336.
- Claret, M., Smith, M.A., Knauf, C., Al-Qassab, H., Woods, A., Heslegrave, A., Piipari, K., Emmanuel, J.J., Colom, A., Valet, P., et al. (2011). Deletion of *Lkb1* in pro-opiomelanocortin neurons impairs peripheral glucose homeostasis in mice. *Diabetes* 60, 735-745.
- Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., and Kalra, S.P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115, 427-429.
- Clarke, P.R., and Hardie, D.G. (1990). Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *Embo j* 9, 2439-2446.
- Coll, A.P., Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* 129, 251-262.
- Collins, S., Cao, W., and Robidoux, J. (2004). Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Mol Endocrinol* 18, 2123-2131.
- Cone, R.D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 27, 736-749.
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D.A., Serra, D., Gallego, R., Gonzalez, F., Casals, N., et al. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep* 9, 366-377.
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Seoane-Collazo, P., Martinez-Sanchez, N., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Ferno, J., Tena-Sempere, M., Casals, N., Dieguez, C., et al. (2017a). Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes* 66, 87-99.
- Contreras, C., Gonzalez, F., Ferno, J., Dieguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2015). The brain and brown fat. *Ann Med* 47, 150-168.
- Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Medina-Gomez, G., and Lopez, M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol Cell Endocrinol* 438, 107-115.
- Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Rahmouni, K., and Lopez, M. (2017b). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biol* 12, 854-863.
- Cooke, P.S., and Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 1127-1135.
- Coppari, R., and Bjorbaek, C. (2012). Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11, 692-708.
- Costanzo-Garvey, D.L., Pfluger, P.T., Dougherty, M.K., Stock, J.L., Boehm, M., Chaika, O., Fernandez, M.R., Fisher, K., Kortum, R.L., Hong, E.G., et al. (2009). KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 10, 366-378.

- Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., and Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* *24*, 155-163.
- Currie, P.J., Mirza, A., Fuld, R., Park, D., and Vasselli, J.R. (2005). Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *289*, R353-R358.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* *360*, 1509-1517.
- Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., et al. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* *21*, 33-38.
- D'Eon, T.M., Souza, S.C., Aronovitz, M., Obin, M.S., Fried, S.K., and Greenberg, A.S. (2005). Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* *280*, 35983-35991.
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., and Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab* *16*, 104-112.
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T.W., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2 α and native bovine protein phosphatase-2 α . *FEBS Letters* *377*, 421-425.
- Davis, A.M., Seney, M.L., Stallings, N.R., Zhao, L., Parker, K.L., and Tobet, S.A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol* *60*, 424-436.
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* *146*, 4192-4199.
- Delgado, J.M., and Anand, B.K. (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol* *172*, 162-168.
- Dhandapani, K.M., Mahesh, V.B., and Brann, D.W. (2003). Astrocytes and brain function: implications for reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)* *228*, 253-260.
- Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelman, E.A., et al. (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.
- Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2009). Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci* *30*, 1688-1696.
- Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2012). Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 675-691.
- Dimicco, J.A., and Zaretsky, D.V. (2007). The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *292*, R47-63.
- Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Munzberg, H., Zhang, Z.Y., Kahn, B.B., et al. (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* *160*, 88-104.

- Domenech, E., Maestre, C., Esteban-Martinez, L., Partida, D., Pascual, R., Fernandez-Miranda, G., Seco, E., Campos-Olivas, R., Perez, M., Megias, D., et al. (2015). AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* 17, 1304-1316.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Doucet, E., Imbeault, P., St-Pierre, S., Alméras, N., Mauriège, P., Després, J.P., Bouchard, C., and Tremblay, A. (2003). Greater than predicted decrease in energy expenditure during exercise after body weight loss in obese men. *Clin Sci (Lond)* 105, 89-95.
- Dubuc, P.U. (1985). Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 180, 468-473.
- Edmond, J. (1992). Energy metabolism in developing brain cells. *Can J Physiol Pharmacol* 70 *Suppl*, S118-129.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260, R328-334.
- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385.
- Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395, 535-547.
- Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Garcia Rudaz, C., and Cowley, M.A. (2011). Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci* 31, 12189-12197.
- Fan, X., Ding, Y., Brown, S., Zhou, L., Shaw, M., Vella, M.C., Cheng, H., McNay, E.C., Sherwin, R.S., and McCrimmon, R.J. (2009). Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1702-1708.
- Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T., and O'Rahilly, S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348, 1085-1095.
- Fields, R.D., and Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556-562.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., Jr., and Bland, K.I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16, 70-84.
- Franssen, D., Barroso, A., Ruiz-Pino, F., Vázquez, M.J., García-Galiano, D., Castellano, J.M., Onieva, R., Ruiz-Cruz, M., Poutanen, M., Gaytán, F., et al. (2021). AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in GnRH neurons links energy status and reproduction. *Metabolism - Clinical and Experimental* 115.
- Friedman, J. (2016). The long road to leptin. *J Clin Invest* 126, 4727-4734.
- Friedman, J.M. (2009). Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 459, 340-342.
- Fruhbeck, G., Sesma, P., and Burrell, M.A. (2009). PRDM16: the interconvertible adipomyocyte switch. *Trends Cell Biol* 19, 141-146.

- Fu, S., Watkins, S.M., and Hotamisligil, G.S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab* 15, 623-634.
- Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Argente-Arizon, P., Diaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-Gonzalez, D., Ceballos, M.L., Frago, L.M., Dickson, S.L., et al. (2016). Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci Rep* 6, 23673.
- Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Granado, M., de Ceballos, M.L., Sanchez-Garrido, M.A., Sarman, B., Liu, Z.W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizon, P., et al. (2012). Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest* 122, 3900-3913.
- Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Morselli, E., Clegg, D.J., Chowen, J.A., Finan, B., Brinton, R.D., and Tschop, M.H. (2013). Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 14, 331-338.
- Galic, S., Oakhill, J.S., and Steinberg, G.R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.X., Chowen, J.A., Verkhatsky, A., et al. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* 22, 7-14.
- Garcia-Caceres, C., Fuente-Martin, E., Argente, J., and Chowen, J.A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol Metab* 1, 37-46.
- Garcia-Caceres, C., Fuente-Martin, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L.M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., and Chowen, J.A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152, 1809-1818.
- Garcia-Caceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.X., et al. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166, 867-880.
- Garcia-Caceres, C., Yi, C.X., and Tschop, M.H. (2013). Hypothalamic astrocytes in obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42, 57-66.
- Garcia-Ovejero, D., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L., Melcangi, R.C., and Garcia-Segura, L.M. (2005). Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 273-286.
- Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* 66, 789-800.
- Geary, N., Asarian, L., Korach, K.S., Pfaff, D.W., and Ogawa, S. (2001). Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology* 142, 4751-4757.
- Geerling, J.C., Shin, J.W., Chimenti, P.C., and Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol* 518, 1460-1499.
- Gehlert, D.R., Chronwall, B.M., Schafer, M.P., and O'Donohue, T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* 1, 25-31.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154, 2992-3000.
- Goforth, P.B., Leininger, G.M., Patterson, C.M., Satin, L.S., and Myers, M.G., Jr. (2014). Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J Neurosci* 34, 11405-11415.

- Goldman, S. (2003). Glia as neural progenitor cells. *Trends in neurosciences* 26, 590-596.
- Goldstein, J.M., Seidman, L.J., Horton, N.J., Makris, N., Kennedy, D.N., Caviness, V.S., Jr., Faraone, S.V., and Tsuang, M.T. (2001). Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex* 11, 490-497.
- Gonzalez-Garcia, I., Contreras, C., Estevez-Salguero, A., Ruiz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Martinez de Morentin, P.B., Ferno, J., et al. (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Rep* 25, 413-423 e415.
- Gonzalez-Garcia, I., Tena-Sempere, M., and Lopez, M. (2017). Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1043, 315-335.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., and Hardie, D.G. (2013). AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* 18, 556-566.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., and Stark, K.L. (1997). Overexpression of *Agtr* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 17, 273-274.
- Guerra, C., Navarro, P., Valverde, A.M., Arribas, M., Bruning, J., Kozak, L.P., Kahn, C.R., and Benito, M. (2001). Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108, 1205-1213.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., and Bruce-Keller, A.J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of neurochemistry* 120, 1060-1071.
- Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., Evans, M.L., Wattam, T.A., Holmes, S., Benham, C.D., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., et al. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10911-10916.
- Han, S.M., Namkoong, C., Jang, P.G., Park, I.S., Hong, S.W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S.W., Park, J.Y., Lee, K.U., et al. (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 48, 2170-2178.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-785.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251-262.
- Haslam, D.W., and James, W.P. (2005). Obesity. *Lancet* 366, 1197-1209.
- Hawkins, R.A., and Biebuyck, J.F. (1979). Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 205, 325-327.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 27879-27887.
- Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9-19.

- He, M., Zhang, Q., Deng, C., Wang, H., and Huang, X.F. (2014). Olanzapine-activated AMPK signaling in the dorsal vagal complex is attenuated by histamine H1 receptor agonist in female rats. *Endocrinology* *155*, 4895-4904.
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., and Cooke, P.S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 12729-12734.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *78*, 149-172.
- Hill, J.O., Wyatt, H.R., and Peters, J.C. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation* *126*, 126-132.
- Hill, J.W. (2012). PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* *16*, S627-636.
- Himms-Hagen, J. (1989a). Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res* *28*, 67-115.
- Himms-Hagen, J. (1989b). Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can J Physiol Pharmacol* *67*, 394-401.
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., and Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep* *7*, 897-904.
- Holmes, B.F., Kurth-Kraczek, E.J., and Winder, W.W. (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* (1985) *87*, 1990-1995.
- Holt, S.J., Wheal, H.V., and York, D.A. (1987). Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. *Brain Res* *405*, 227-233.
- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoinnie, A., Hue, L., Proud, C., and Rider, M. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* *12*, 1419-1423.
- Horvath, T.L., Sarman, B., Garcia-Caceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 14875-14880.
- Hsueh, H., Pan, W., Barnes, M.J., and Kastin, A.J. (2009). Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* *30*, 2275-2280.
- Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B., Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang, P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., et al. (1996). Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem* *271*, 26315-26319.
- Hugie, T., Halvorson, I., and Thornhill, J. (1992). Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res* *575*, 57-62.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* *280*, 29060-29066.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131-141.

- Huynh, M.K., Kinyua, A.W., Yang, D.J., and Kim, K.W. (2016). Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast* 2016, 2754078.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H., and Parker, K.L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9, 478-486.
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vazquez, M.J., Morgan, D.A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., Diaz-Arteaga, A., Senra, A., Busquets, S., Velasquez, D.A., et al. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636-649 e636.
- Jais, A., and Brüning, J.C. (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 127, 24-32.
- Jayaram, B., Pan, W., Wang, Y., Hsueh, H., Mace, A., Cornelissen-Guillaume, G.G., Mishra, P.K., Koza, R.A., and Kastin, A.J. (2013). Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial rescue of leptin resistance in diet-induced obesity. *J Appl Physiol* (1985) 114, 734-741.
- JC, d.W. (2013). Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. (Practical Assessment, Research & Evaluation.).
- Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Dagaard, S., Homoe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., et al. (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17, 798-805.
- Johnstone, M., Gearing, A.J., and Miller, K.M. (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* 93, 182-193.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Misso, M.L., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., et al. (2001). Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79, 3-9.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S., et al. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12735-12740.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
- Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A., and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev* 22, 1397-1409.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438-2443.
- Kao, L.S., and Green, C.E. (2008). Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean? *J Surg Res* 144, 158-170.
- Kim, E.K., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., and Ronnett, G.V. (2004a). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279, 19970-19976.

- Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K., et al. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci* *17*, 908-910.
- Kim, M.S., and Lee, K.U. (2005). Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. *J Mol Med (Berl)* *83*, 514-520.
- Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., Jang, P.G., Ryu, J.W., Song, H.S., Yun, J.Y., Namgoong, I.S., Ha, J., Park, I.S., et al. (2004b). Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* *10*, 727-733.
- Kinote, A., Faria, J.A., Roman, E.A., Solon, C., Razolli, D.S., Ignacio-Souza, L.M., Sollon, C.S., Nascimento, L.F., de Araujo, T.M., Barbosa, A.P., et al. (2012). Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology* *153*, 3633-3645.
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Mountjoy, K.G., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* *457*, 213-235.
- Komori, T., Morikawa, Y., Nanjo, K., and Senba, E. (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* *139*, 1107-1115.
- Kopelman, P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* *404*, 635-643.
- Kotz, C.M., Wang, C.F., Briggs, J.E., Levine, A.S., and Billington, C.J. (2000). Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *278*, R494-498.
- Kozak, L.P., Britton, J.H., Kozak, U.C., and Wells, J.M. (1988). The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J Biol Chem* *263*, 12274-12277.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* *19*, 312-318.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* *393*, 72-76.
- Kurrasch, D.M., Cheung, C.C., Lee, F.Y., Tran, P.V., Hata, K., and Ingraham, H.A. (2007). The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci* *27*, 13624-13634.
- Labbe, S.M., Caron, A., Lanfray, D., Monge-Rofarello, B., Bartness, T.J., and Richard, D. (2015). Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst Neurosci* *9*, 150.
- Lage, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., and Lopez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* *14*, 539-549.
- Lage, R., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., and Lopez, M. (2016). Contribution of adaptive thermogenesis to the hypothalamic regulation of energy balance. *Biochem J* *473*, 4063-4082.
- Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Poci, A., and Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* *309*, 943-947.
- Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., and Kuhar, M.J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* *29*, 293-298.

- Landsberg, L., Young, J.B., Leonard, W.R., Linsenmeier, R.A., and Turek, F.W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism* 58, 871-876.
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A.A., Mizioroko, H.M., and Levin, B.E. (2014). Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes* 63, 1259-1269.
- Lee, E.B., and Ahima, R.S. (2012). Alteration of hypothalamic cellular dynamics in obesity. *J Clin Invest* 122, 22-25.
- Lee, S.C., Liu, W., Dickson, D.W., Brosnan, C.F., and Berman, J.W. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150, 2659-2667.
- Leonardsson, G., Steel, J.H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., So, P.W., Medina-Gomez, G., Vidal-Puig, A., White, R., et al. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8437-8442.
- Levin, B.E., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., and Le Foll, C. (2011). Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* 152, 2552-2557.
- Li, Y.Z., and Davidowa, H. (2004). Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J Neurosci Res* 77, 596-602.
- Lieberman, A.P., Pitha, P.M., Shin, H.S., and Shin, M.L. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6348-6352.
- Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Estevez-Salguero, A., Milbank, E., Gonzalez-Garcia, I., Rodriguez, C., Seoane-Collazo, P., Martinez-Sanchez, N., Nogueiras, R., Prieto, D., et al. (2018). Genetic Targeting of GRP78 in the VMH Improves Obesity Independently of Food Intake. *Genes (Basel)* 9.
- Loane, D.J., and Kumar, A. (2016). Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol* 275 Pt 3, 316-327.
- Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G., and Sutherland, C. (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49, 896-903.
- Lopez-Valpuesta, F.J., Nyce, J.W., Griffin-Biggs, T.A., Ice, J.C., and Myers, R.D. (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc Biol Sci* 263, 881-886.
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A.K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7, 389-399.
- Lopez, M., Lelliott, C.J., and Vidal-Puig, A. (2007a). Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 29, 248-261.
- Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 12, 421-432.
- Lopez, M., Seoane, L., Garcia, M.C., Lago, F., Casanueva, F.F., Senaris, R., and Dieguez, C. (2000). Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 41-45.
- Lopez, M., and Tena-Sempere, M. (2017). Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol Ther* 178, 109-122.
- López, M., and Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol Metab* 26, 411-421.

- Lopez, M., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2010a). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol* 31, 113-127.
- Lopez, M., Tovar, S., Vazquez, M.J., Williams, L.M., and Dieguez, C. (2007b). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66, 131-155.
- Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M.J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., et al. (2010b). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16, 1001-1008.
- Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Lucius, R., and Sievers, J. (1996). Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species (ROS)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res* 743, 56-62.
- Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107, 379-386.
- Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15239-15244.
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143, 607-614.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10, 1247-1255.
- Marsin, A.S., Bouzin, C., Bertrand, L., and Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277, 30778-30783.
- Martin, T.L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., and Kahn, B.B. (2006). Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281, 18933-18941.
- Martínez-Sánchez, N., Alvarez, C.V., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., and López, M. (2014). Hypothalamic effects of thyroid hormones on metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28, 703-712.
- Martinez-Sanchez, N., Moreno-Navarrete, J.M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Fernandez-Real, J.M., and Lopez, M. (2017a). Thyroid hormones induce browning of white fat. *J Endocrinol* 232, 351-362.
- Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buque, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T.C., Vazquez-Martinez, R., et al. (2017b). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* 26, 212-229 e212.
- Martinez de Morentin, P.B., Gonzalez-Garcia, I., Martins, L., Lage, R., Fernandez-Mallo, D., Martinez-Sanchez, N., Ruiz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D.A., Pinilla, L., et al. (2014).

- Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* 20, 41-53.
- Martinez de Morentin, P.B., Urisarri, A., Couce, M.L., and Lopez, M. (2016). Molecular mechanisms of appetite and obesity: a role for brain AMPK. *Clin Sci (Lond)* 130, 1697-1709.
- Martínez de Morentin, P.B., Varela, L., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., and López, M. (2010). Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801, 350-361.
- Martinez de Morentin, P.B., Whittle, A.J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., and Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 61, 807-817.
- Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Gonzalez, F., Zalvide, J., Gallego, R., Dieguez, C., Nogueiras, R., et al. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep* 16, 2231-2242.
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., and Hevener, A.L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* 34, 309-338.
- McClellan, K.M., Parker, K.L., and Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 27, 193-209.
- McCrimmon, R.J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M.C., Zhou, L., McNay, E.C., and Sherwin, R.S. (2008). Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444-450.
- McNay, D.E., Briançon, N., Kokoeva, M.V., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2012). Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122, 142-152.
- Melcangi, R.C., Magnaghi, V., Galbiati, M., and Martini, L. (2001). Glial cells: a target for steroid hormones. *Prog Brain Res* 132, 31-40.
- Melcangi, R.C., Martini, L., and Galbiati, M. (2002). Growth factors and steroid hormones: a complex interplay in the hypothalamic control of reproductive functions. *Prog Neurobiol* 67, 421-449.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., and Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387, 113-116.
- Meyer, C.W., Willershauser, M., Jastroch, M., Rourke, B.C., Fromme, T., Oelkrug, R., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R1396-1406.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29, 359-370.
- Milton, J.S. (2007). *Estadística para biología y ciencias de la salud*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L.).
- Ministerio de Sanidad, C.y.B.S. (2018). *Encuesta Nacional de Salud. España 2017*.
- Ministerio de Sanidad, C.y.B.S. (2019). *Prevalencia de sobrepeso y obesidad en España en el informe "The heavy burden of obesity" (OCDE 2019) y en otras fuentes de datos*.

- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougère, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* *428*, 569-574.
- Minokoshi, Y., Haque, M.S., and Shimazu, T. (1999). Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* *48*, 287-291.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Müller, C., Carling, D., and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* *415*, 339-343.
- Minokoshi, Y., Saito, M., and Shimazu, T. (1986). Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation. *Am J Physiol* *251*, R1005-1008.
- Momcilovic, M., Hong, S.P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* *281*, 25336-25343.
- Mong, J.A., Glaser, E., and McCarthy, M.M. (1999). Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J Neurosci* *19*, 1464-1472.
- Monteiro, R., Teixeira, D., and Calhau, C. (2014). Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm* *2014*, 615917.
- Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L., Saad, M.J., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* *4*, e5045.
- Morimoto, C., Kameda, K., Tsujita, T., and Okuda, H. (2001). Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res* *42*, 120-127.
- Morselli, E., Frank, A.P., Palmer, B.F., Rodriguez-Navas, C., Criollo, A., and Clegg, D.J. (2016). A sexually dimorphic hypothalamic response to chronic high-fat diet consumption. *Int J Obes (Lond)* *40*, 206-209.
- Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* *91*, 389-411.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* *8*, 1298-1308.
- Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A., and Coleman, R.A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* *338* (Pt 3), 783-791.
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Mobbs, C.V., Yang, X.J., Clegg, D.J., Kaplitt, M.G., and Ogawa, S. (2007). Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2501-2506.
- Namkoong, C., Kim, M.S., Jang, P.G., Han, S.M., Park, H.S., Koh, E.H., Lee, W.J., Kim, J.Y., Park, I.S., Park, J.Y., et al. (2005). Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes* *54*, 63-68.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2010). Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* *1212*, E20-36.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.C., Zolotukhin, S., et al. (2012). Y1 and Y5 receptors are both

- required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS One* 7, e40191.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S., and Heaton, G.M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* 32, 89-93.
- Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., Lammers, G.J., and Mignot, E. (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet* 355, 39-40.
- Nixon, J.P., Kotz, C.M., Novak, C.M., Billington, C.J., and Teske, J.A. (2012). Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handb Exp Pharmacol*, 77-109.
- O.M.S. (2017). 10 datos sobre la obesidad.
- O.M.S. (2020). Obesidad y sobrepeso.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., and Kemp, B.E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433-1435.
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B.M., and Kajimura, S. (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab* 15, 395-404.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.
- Palkovits, M. (1999). Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol* 20, 270-295.
- Palkovits, M. (2003). Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogy Sz* 56, 288-302.
- Palmer, K., and Gray, J.M. (1986). Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 37, 187-189.
- Pandit, R., de Jong, J.W., Vanderschuren, L.J., and Adan, R.A. (2011). Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. *Eur J Pharmacol* 660, 28-42.
- Paranjape, S.A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A.M., Grillo, C.A., Wilson, S., Reagan, L., and Sherwin, R.S. (2011). Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E978-983.
- Parsons, M.P., and Hirasawa, M. (2010). ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. *J Neurosci* 30, 8061-8070.
- Pawlak, J., Karolczak, M., Krust, A., Chambon, P., and Beyer, C. (2005). Estrogen receptor-alpha is associated with the plasma membrane of astrocytes and coupled to the MAP/Src-kinase pathway. *Glia* 50, 270-275.
- Pellerin, L. (2005). How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol* 32, 59-72.
- Pénicaud, L., Leloup, C., Lorsignol, A., Alquier, T., and Guillod, E. (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 539-543.
- Perkins, M.N., Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Stone, T.W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* 289, 401-402.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of

- thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285, 7153-7164.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., and Kilduff, T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18, 9996-10015.
- Pfrieger, F.W. (2003). Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25, 72-78.
- Porte, D., Jr., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 60, S20-29; discussion S68-84, 85-27.
- Porte, D., Jr., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264-1276.
- Powelka, A.M., Seth, A., Virbasius, J.V., Kiskinis, E., Nicoloso, S.M., Guilherme, A., Tang, X., Straubhaar, J., Cherniack, A.D., Parker, M.G., et al. (2006). Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest* 116, 125-136.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Purkayastha, S., Zhang, H., Zhang, G., Ahmed, Z., Wang, Y., and Cai, D. (2011). Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2939-2944.
- Qi, D., and Young, L.H. (2015). AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab* 26, 422-429.
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J.Z., Wu, J., Zhou, H.M., and Li, P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J* 27, 1537-1548.
- Qin, C., Li, J., and Tang, K. (2018). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 159, 3458-3472.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.
- Quinones, M., Al-Massadi, O., Gallego, R., Ferno, J., Dieguez, C., Lopez, M., and Nogueiras, R. (2015). Hypothalamic CaMKKbeta mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab* 4, 961-970.
- Renaud, L.P., and Martin, J.B. (1975). Electrophysiological studies of connections of hypothalamic ventromedial nucleus neurons in the rat: evidence for a role in neuroendocrine regulation. *Brain Res* 93, 145-151.
- Rezai-Zadeh, K., Yu, S., Jiang, Y., Laque, A., Schwartzenburg, C., Morrison, C.D., Derbenev, A.V., Zsombok, A., and Munzberg, H. (2014). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab* 3, 681-693.
- Ridet, J.L., Alonso, G., Chauvet, N., Chapron, J., Koenig, J., and Privat, A. (1996). Immunocytochemical characterization of a new marker of fibrous and reactive astrocytes. *Cell Tissue Res* 283, 39-49.
- Riis-Vestergaard, M.J., Richelsen, B., Bruun, J.M., Li, W., Hansen, J.B., and Pedersen, S.B. (2019). Beta-1 and Not Beta-3 Adrenergic Receptors May Be the Primary Regulator of

- Human Brown Adipocyte Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *105*, e994-e1005.
- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., and Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* *15*, 1748-1757.
- Roa, J., Barroso, A., Ruiz-Pino, F., Vázquez, M.J., Seoane-Collazo, P., Martínez-Sánchez, N., García-Galiano, D., Ilhan, T., Pineda, R., León, S., et al. (2018). Metabolic regulation of female puberty via hypothalamic AMPK–kisspeptin signaling. *115*, E10758-E10767.
- Rogers, N.H., Perfield, J.W., 2nd, Strissel, K.J., Obin, M.S., and Greenberg, A.S. (2009). Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. *Endocrinology* *150*, 2161-2168.
- Ross, F.A., Jensen, T.E., and Hardie, D.G. (2016). Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms. *Biochem J* *473*, 189-199.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* *92*, 1 page following 696.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2016). Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Res Rev* *28*, 15-26.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* *414*, 799-806.
- Saltiel, A.R., and Pessin, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* *12*, 65-71.
- Sanchez-Gurmaches, J., and Guertin, D.A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun* *5*, 4099.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* *403*, 139-148.
- Saper, C.B., Chou, T.C., and Elmquist, J.K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* *36*, 199-211.
- Saper, C.B., and Lowell, B.B. (2014). The hypothalamus. *Curr Biol* *24*, R1111-1116.
- Schneeberger, M., Gomis, R., and Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* *220*, T25-46.
- Schreiber, R., Diwoky, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., Kolb, D., Hoeks, J., Kershaw, E.E., Sedej, S., et al. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* *26*, 753-763 e757.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* *46*, 2119-2123.
- Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P., et al. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* *130*, 3608-3616.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* *404*, 661-671.

- Seale, P. (2010). Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond) 34 Suppl 1*, S17-22.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature 454*, 961-967.
- Segal, J.P., Stallings, N.R., Lee, C.E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., Harris, T.M., Soares, M.B., Childs, G., Elmquist, J.K., et al. (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci 25*, 4181-4188.
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine 50*, 276-291.
- Seoane-Collazo, P., Martinez de Morentin, P.B., Ferno, J., Dieguez, C., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2014). Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology 155*, 1679-1689.
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Linares-Pose, L., Beiroa, D., Ruiz-Pino, F., Lopez-Gonzalez, T., Morgan, D.A., Pardavila, J.A., Sanchez-Tapia, M.J., et al. (2018). SF1-Specific AMPK α 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes 67*, 2213-2226.
- Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M., Kalinovich, A.V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep 5*, 1196-1203.
- Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., and Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res 54*, 2214-2224.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A 101*, 3329-3335.
- Shen, L., Tso, P., Wang, D.Q., Woods, S.C., Davidson, W.S., Sakai, R., and Liu, M. (2009). Up-regulation of apolipoprotein E by leptin in the hypothalamus of mice and rats. *Physiol Behav 98*, 223-228.
- Shen, L., Tso, P., Woods, S.C., Clegg, D.J., Barber, K.L., Carey, K., and Liu, M. (2008). Brain apolipoprotein E: an important regulator of food intake in rats. *Diabetes 57*, 2092-2098.
- Sheng, J.G., Ito, K., Skinner, R.D., Mrak, R.E., Rovnaghi, C.R., Van Eldik, L.J., and Griffin, W.S. (1996). In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging 17*, 761-766.
- Shi, Y.C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.F., et al. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab 17*, 236-248.
- Shimazu, T., and Amakawa, A. (1968). Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta 165*, 335-348.
- Shimazu, T., and Fukuda, A. (1965). Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science 150*, 1607-1608.

- Shimazu, T., Fukuda, A., and Ban, T. (1966). Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* *210*, 1178-1179.
- Shimazu, T., and Minokoshi, Y. (2017). Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *J Endocr Soc* *1*, 449-459.
- Shimazu, T., Sudo, M., Minokoshi, Y., and Takahashi, A. (1991). Role of the hypothalamus in insulin-independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res Bull* *27*, 501-504.
- Shimizu, N., Oomura, Y., Plata-Salamán, C.R., and Morimoto, M. (1987). Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res* *416*, 153-156.
- Shimogawa, Y., Maekawa, F., and Yamanouchi, K. (2014). Unilateral lesion increases oestrogen receptor alpha expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats. *J Neuroendocrinol* *26*, 258-266.
- Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A.K.G., Jackson, R., Rumore, D., Xue, B., Shi, H., et al. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab* *26*, 764-777 e765.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., and Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* *388*, 507-525.
- Silva, J.E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* *86*, 435-464.
- Simpson, K.A., Martin, N.M., and Bloom, S.R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* *53*, 120-128.
- Skrede, S., Martins, L., Berge, R.K., Steen, V.M., Lopez, M., and Ferno, J. (2014). Olanzapine depot formulation in rat: a step forward in modelling antipsychotic-induced metabolic adverse effects. *Int J Neuropsychopharmacol* *17*, 91-104.
- Small, C.J., Liu, Y.L., Stanley, S.A., Connoley, I.P., Kennedy, A., Stock, M.J., and Bloom, S.R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord* *27*, 530-533.
- Song, C.K., Vaughan, C.H., Keen-Rhinehart, E., Harris, R.B., Richard, D., and Bartness, T.J. (2008). Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *295*, R417-428.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* *50*, 2673-2681.
- Spence, R.D., Wisdom, A.J., Cao, Y., Hill, H.M., Mongerson, C.R., Stapornkul, B., Itoh, N., Sofroniew, M.V., and Voskuhl, R.R. (2013). Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ER α signaling on astrocytes but not through ER β signaling on astrocytes or neurons. *J Neurosci* *33*, 10924-10933.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* *104*, 531-543.
- Spiegelman, B.M., Puigserver, P., and Wu, Z. (2000). Regulation of adipogenesis and energy balance by PPAR γ and PGC-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* *24 Suppl 4*, S8-10.
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* *7*, 1189-1192.

- Steinberg, G.R., Michell, B.J., van Denderen, B.J., Watt, M.J., Carey, A.L., Fam, B.C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Gorgun, C.Z., Carling, D., et al. (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4, 465-474.
- Strader, A.D., and Woods, S.C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128, 175-191.
- Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1, 14.
- Sudo, M., Minokoshi, Y., and Shimazu, T. (1991). Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats. *Am J Physiol* 261, E298-303.
- Summers, S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 45, 42-72.
- Sutton, A.K., Myers, M.G., Jr., and Olson, D.P. (2016). The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol* 78, 207-221.
- Sutton, A.K., Pei, H., Burnett, K.H., Myers, M.G., Jr., Rhodes, C.J., and Olson, D.P. (2014). Control of food intake and energy expenditure by *Nos1* neurons of the paraventricular hypothalamus. *J Neurosci* 34, 15306-15318.
- Taib, B., Bouyakdan, K., Hryhorczuk, C., Rodaros, D., Fulton, S., and Alquier, T. (2013). Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 288, 37216-37229.
- Tanida, M., Yamamoto, N., Morgan, D.A., Kurata, Y., Shibamoto, T., and Rahmouni, K. (2015). Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 35, 474-484.
- Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., and Rahmouni, K. (2013). Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS One* 8, e56660.
- Tasker, J.G., Oliet, S.H., Bains, J.S., Brown, C.H., and Stern, J.E. (2012). Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. *J Neuroendocrinol* 24, 566-576.
- Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122, 153-162.
- Thim, L., Nielsen, P.F., Judge, M.E., Andersen, A.S., Diers, I., Egel-Mitani, M., and Hastrup, S. (1998). Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 428, 263-268.
- Thompson, R.H., Canteras, N.S., and Swanson, L.W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376, 143-173.
- Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J.W., and Bray, G.A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol* 251, R1221-1227.
- Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 877-885.
- Tschop, M.H., Finan, B., Clemmensen, C., Gelfanov, V., Perez-Tilve, D., Muller, T.D., and DiMarchi, R.D. (2016). Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab* 24, 51-62.

- Tupone, D., Madden, C.J., Cano, G., and Morrison, S.F. (2011). An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *J Neurosci* *31*, 15944-15955.
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* *3*, 333-341.
- Unger, R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* *53*, 319-336.
- Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* *18*, 158-168.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *301*, R285-296.
- Velloso, L.A., Araújo, E.P., and de Souza, C.T. (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* *15*, 189-193.
- Villarroya, F., and Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* *17*, 638-643.
- Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., et al. (2003). The AMP-activated protein kinase α 2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* *111*, 91-98.
- Wang, C., Billington, C.J., Levine, A.S., and Kotz, C.M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* *11*, 3251-3255.
- Wang, C., Bomberg, E., Billington, C., Levine, A., and Kotz, C.M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *293*, R992-1002.
- Wang, J., Sareddy, G.R., Lu, Y., Pratap, U.P., Tang, F., Greene, K.M., Meyre, P.L., Tekmal, R.R., Vadlamudi, R.K., and Brann, D.W. (2020a). Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astrogliosis and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. *J Neurosci* *40*, 9751-9771.
- Wang, P., Loh, K.H., Wu, M., Morgan, D.A., Schneeberger, M., Yu, X., Chi, J., Kosse, C., Kim, D., Rahmouni, K., et al. (2020b). A leptin–BDNF pathway regulating sympathetic innervation of adipose tissue. *Nature* *583*, 839-844.
- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Tadayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., et al. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* *46*, 335-341.
- Wang, Z., Wang, N., Liu, P., and Xie, X. (2016). AMPK and Cancer. *Exp Suppl* *107*, 203-226.
- Welboren, W.J., Sweep, F.C., Span, P.N., and Stunnenberg, H.G. (2009). Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer* *16*, 1073-1089.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., et al. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* *149*, 871-885.
- Whittle, A.J., Lopez, M., and Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* *17*, 405-411.

- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., and Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74, 683-701.
- Williams, L.M. (2012). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 71, 521-533.
- Witkin, J.W., Ferin, M., Popilskis, S.J., and Silverman, A.J. (1991). Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129, 1083-1092.
- Wojtaszewski, J.F., Jørgensen, S.B., Hellsten, Y., Hardie, D.G., and Richter, E.A. (2002). Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* 51, 284-292.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13, 2004-2008.
- Woods, S.C. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav* 86, 709-716.
- Woods, S.C., Schwartz, M.W., Baskin, D.G., and Seeley, R.J. (2000). Food Intake and the Regulation of Body Weight. *51*, 255-277.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Jr., and Schwartz, M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378-1383.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Xie, M., Zhang, D., Dyck, J.R., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D.L., Taffet, G.E., Baldini, A., Khoury, D.S., et al. (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.
- Xu, Y., Nedungadi, T.P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B.G., Davis, K.E., Zhang, X., Zou, F., Gent, L.M., Hahner, L.D., et al. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* 14, 453-465.
- Xue, B., Pulinilkunnil, T., Murano, I., Bence, K.K., He, H., Minokoshi, Y., Asakura, K., Lee, A., Haj, F., Furukawa, N., et al. (2009). Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. *Mol Cell Biol* 29, 4563-4573.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K., Sugiyama, F., Goto, K., et al. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38, 701-713.
- Yang, L., Qi, Y., and Yang, Y. (2015). Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Rep* 11, 798-807.

- Yang, L., Scott, K.A., Hyun, J., Tamashiro, K.L., Tray, N., Moran, T.H., and Bi, S. (2009). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci* 29, 179-190.
- Younes, M., and Honma, N. (2011). Estrogen receptor β . *Arch Pathol Lab Med* 135, 63-66.
- Young, P., Arch, J.R., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 167, 10-14.
- Zhou, Y.D. (2018). Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1090, 105-121.
- Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 23, 3113-3120.

ANEXOS



RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2020/010
Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

Data de inicio do expediente: 26.10.2020
Procedemento: resolución de autorización

ANTECEDENTES

Anxo Vidal Figueroa, en representación do Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), presentou con data 26.10.2020 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2020/2052958), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: *Mecanismos neuroendocrinos de regulación do balance enerxético*

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela

Persoa responsable do proxecto: Miguel Anotnio López Pérez

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva cando este finalice.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

