



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Verónica
Rivas Limeres

Tesis doctoral

Papel de los receptores de
hormonas tiroideas en la
regulación hipotalámica del
balance energético

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LOS RECEPTORES DE
HORMONAS TIROIDEAS EN LA
REGULACIÓN HIPOTALÁMICA
DEL BALANCE ENERGÉTICO**

Autor

Verónica Rivas Limeres

Directores: Miguel Antonio López Pérez e Ismael González García

Tutor/a: Miguel Antonio López Pérez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

A mis hermanos
A mis padres



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

**Papel de los receptores de hormonas tiroideas en la regulación
hipotalámica del balance energético**

Dña. Verónica Rivas Limeres

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

En Santiago de Compostela a 2 de mayo de 2024

RESUMO

A obesidade emerxeu como un problema de saúde pública global, afectando a persoas de toda as idades e clases sociais. Este fenómeno definido como unha acumulación excesiva ou anormal de masa graxa, foi considerada pola Organización Mundial da Saúde (OMS) como a pandemia do século XXI. Dende 1975, os casos de obesidade triplicáronse en todo mundo, sendo especialmente relevantes nos países desenvolvidos ou en vías de desenvolvemento. Tanto a obesidade como o sobrepeso asociáronse cun maior risco ao desenvolvemento doutras patoloxías non transmisibles como hipertensión, dislipemia, diabetes tipo 2, fígado graxo, accidentes cardiovasculares e algúns tipos de cancro (Aaseth et al., 2021; Blüher et al., 2023; De Fano et al., 2022; Lette et al., 2016). Por outra banda, a obesidade non só conleva a un aumento no risco de desenvolver enfermidades metabólicas senón tamén a unha maior prevalencia de enfermidades psicolóxicas como a depresión ou a ansiedade, o cal conleva a un gran sobrecusto no gasto sanitario (Westbury et al., 2013). As comorbilidades asociadas a esta patoloxía non tan só repercuten na calidade de vida dos pacientes, senón que tamén conleva a unha menor esperanza de vida. Estímase que o sobrepeso reduce en catro anos e medio a esperanza de vida (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019)

O impacto da obesidade e as súas comorbilidades na poboación non só se limita unicamente a un problema sanitario, senón que tamén ten un forte impacto na economía ou gasto sanitario do país. Estímase que os países gastan ao redor do 8% do seu orzamento en tratar o sobrepeso e as súas comorbilidades (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019). É por iso polo que a intervención na prevención e tratamento do sobrepeso é crucial para reducir a carga sobre os pacientes e sobre a sociedade. Nas últimas décadas desenvolvéronse diferentes terapias para o tratamento da obesidade, pero os seus custos, seguridade e necesidade de uso crónico limitaron o seu éxito. Ademais disto, ningún destes tratamentos tratan a orixe da obesidade, cuxas bases fisiopatolóxicas son aínda descoñecidas. Pero ningunha delas tivo un gran éxito. Por iso, segue sendo imperativo investigar novas dianas terapéuticas que permitan facer fronte a esta nova pandemia.

Nos últimos anos, fíxose evidente que o sistema nervioso central e, en particular, o hipotálamo, xoga un papel importante na regulación do apetito e do gasto enerxético (Amin et al., 2011). Aínda que os diferentes núcleos hipotalámicos parecen ter algunha implicación na regulación da termoxénese, o VMH emerxeu como un importante núcleo regulador deste proceso no tecido adiposo pardo (BAT) (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017). A evidencia xenética demostrou que a eliminación do factor esteroideoxénico 1 (SF1) nas poboacións neuronais deste núcleo leva a unha diminución do gasto enerxético e a expresión de UCP1 no BAT. Por outra banda, demostrouse que diferentes sinais hormonais, entre eles as hormonas tiroideas, son capaces de activar a resposta termoxénica do BAT a través do VMH, aumentando así a termoxénese (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017). En 2017, Martínez-Sánchez et al. demostraron que a administración de T3 no VMH provocaba unha diminución de AMPK que, á súa vez, levou á diminución da concentración de ceramidas hipotalámicas e a posterior redución do estrés do retículo endoplasmático, aumentando o ton

simpático sobre o BAT e consecuentemente a un aumento da termoxénese (López et al., 2010 Martínez-Sánchez et al., 2017). Aínda que se sabe que as accións de TH sobre o BAT están mediadas por ambos os receptores das hormonas tiroideas (TR α e TR β), ata a data descoñeciase cal dos dous receptores, se non ambos, estaba implicado neste proceso.

O obxectivo desta tese foi aclarar cal dos dous receptores das hormonas tiroideas está implicado na regulación da termoxénese a nivel central. Para iso, xeráronse varios modelos animais con modificacións específicas nos receptores das hormonas tiroideas nas neuronas SF1 do VMH. Estes modelos incluíron ratos cunha mutación dominante-negativa en ratos TR α 1, TR β 1 knockout (KO) e ratos que combinaban ambas modificacións, o que funcionalmente é un dobre KO. Despois do fenotipado metabólico destes animais en condicións de dieta estándar e estudando a expresión de xenes e proteínas, observouse que a expresión do receptor negativo dominante para TR α 1 nas neuronas SF1 do VMH leva a un menor gasto enerxético, asociado a unha diminución da termoxénese no BAT e pardeamento ou *browning* do WAT, o que resulta nun aumento da masa corporal independentemente da inxesta. Observáronse resultados paralelos ao combinar as modificacións en ambos receptores (dobre KO), mostrando estes animais un marcado aumento dos depósitos de graxa corporal xunto cunha caída dos marcadores termoxénicos no tecido adiposo pardo. Non obstante, estes cambios non se observaron en animais knockout para TR β 1.

En resumo, neste estudo demostramos por primeira vez que os efectos sobre a termoxénese BAT a nivel central están exclusivamente mediados polo TR α presente na poboación neuronal SF1, observándose unha maior masa corporal no modelo TR α AMI SF1 ligada a unha menor activación do BAT e menor gasto enerxético, independentemente da inxesta, datos que non se observaron en animais KO para TR β 1. Así mesmo, os datos obtidos mostran que a regulación do pardeamento na graxa subcutánea e gonadal está mediada polo TR α 1 e non polo TR β 1.

RESUMEN

La obesidad ha emergido como un problema de salud pública global, afectando a personas de todas las edades y clases sociales. Este fenómeno definido como una acumulación excesiva o anormal de masa grasa, ha sido considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la pandemia del siglo XXI. Desde 1975, los casos de obesidad se han triplicado en todo mundo, siendo especialmente relevantes en los países desarrollados o en vías de desarrollo. Tanto la obesidad como el sobrepeso se han asociado con un mayor riesgo al desarrollo de otras patologías no transmisibles como hipertensión, dislipemia, diabetes tipo 2, hígado graso, accidentes cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Aaseth et al., 2021; Blüher et al., 2023; De Fano et al., 2022; Lette et al., 2016). Por otro lado, la obesidad no solo conlleva a aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas sino también a una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, osteoarticulares, psicológicas y determinados tipos de cáncer lo cual conlleva a un gran sobre coste en el gasto sanitario (Westbury et al., 2013). Las comorbilidades asociadas a esta patología no tan solo repercuten en la calidad de vida de los pacientes, sino que también conlleva a una menor esperanza de vida. En este sentido se estima que el sobrepeso reduce en cuatro años y medio la longevidad (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019).

El impacto de la obesidad y sus comorbilidades en la población no solo se limita únicamente a un problema sanitario, sino que también tienen un fuerte impacto en la economía o gasto sanitario de un país. Se estima que los países gastan alrededor de 8% de su presupuesto en tratar el sobrepeso y sus comorbilidades (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019). Es por ello, que la intervención en la prevención y tratamiento del sobrepeso es crucial para reducir la carga sobre los pacientes y la sociedad. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes terapias para el tratamiento de la obesidad, pero sus costes, seguridad y necesidad de uso crónico han limitado su éxito. Además de esto, ninguno de estos tratamientos trata el origen de la obesidad, cuyas bases fisiopatológicas son aún desconocidas. Por ello, sigue siendo imperativo investigar nuevas dianas terapéuticas que permitan hacer frente a esta nueva pandemia.

En los últimos años se evidenció que el sistema nervioso central y, en particular el hipotálamo, juega un papel importante en la regulación del apetito y el gasto energético (Amin et al., 2011). Pese a que los diferentes núcleos hipotalámicos parecen tener cierta implicación en la regulación de la termogénesis, el VMH se ha alzado como un importante núcleo regulador de este proceso en el tejido adiposo marrón (BAT) (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017).. Evidencias genéticas han demostrado que la delección del factor esteroideogénico 1 (SF1) en las poblaciones neuronales de este núcleo conducen a una disminución del gasto energético y de la expresión de UCP1 en el BAT (Schulz et al., 2013; Seale et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que diferentes señales hormonales, entre ellas las hormonas tiroideas, son capaces de activar la respuesta termogénica del BAT a través del VMH, incrementando así la termogénesis (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017). En 2017, Martínez-Sánchez et al. demostraron que la administración de T3 en el VMH provocaba una disminución de AMPK que, a su vez, conducía a la disminución de la

concentración de ceramidas hipotalámicas y la posterior reducción del estrés del retículo endoplasmático, aumentando el tono simpático sobre el BAT y la termogénesis (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Pese a que se conoce que las acciones de las TH en el BAT están mediadas por ambos receptores de hormonas tiroideas (TR α y TR β), hasta la fecha se desconocía cuál de ambos receptores, si no ambos, estaba involucrado en este proceso.

El objetivo de esta tesis ha sido esclarecer cuál de los dos receptores de hormonas tiroideas está implicado en la regulación de la termogénesis a nivel central. Para ello se generaron varios modelos animales con modificaciones específicas en los receptores de hormonas tiroideas en las neuronas SF1 del VMH. Estos modelos incluyeron ratones con una mutación dominante negativa en TR α 1, ratones *knockout* (KO) para TR β 1, y ratones que combinan ambas modificaciones que funcionalmente es un doble KO. Tras el fenotipado metabólico de estos animales bajo condiciones de dieta estándar y mediante el estudio de la expresión génica y proteica, se observó que la expresión del receptor dominante negativo para TR α 1 en las neuronas SF1 del VMH conduce a un menor gasto energético, asociado a una disminución de la actividad termogénica del BAT y del *browning* del WAT, resultando en un aumento de la masa corporal independiente de la ingesta. Resultados paralelos se observaron al combinar las modificaciones en ambos receptores (doble KO), mostrando estos animales un marcado aumento de los depósitos de grasa corporal junto con una caída de los marcadores termogénicos en el tejido adiposo marrón. Sin embargo, estos cambios no se observaron en los animales *knockout* para TR β 1.

En resumen, en este estudio hemos demostrado por primera vez que los efectos sobre la termogénesis del BAT a nivel central están mediados exclusivamente por el TR α presente en la población neuronal SF1, observándose una mayor masa corporal en el modelo TR α AMI SF1 ligada a una menor activación del BAT y menor gasto energético, independiente de la ingesta, datos que no se observaron en los animales KO para TR β 1. Así mismo, los datos obtenidos arrojan que la regulación del *browning* en la grasa subcutánea y gonadal está mediada por TR α 1 y no por TR β 1.

ABSTRACT

Obesity has emerged as a global public health problem, affecting people of all ages and social classes. This phenomenon, defined as an excessive or abnormal accumulation of fat mass, has been considered by the World Health Organisation (WHO) as the pandemic of the 21st century. Since 1975, cases of obesity have tripled worldwide, being especially relevant in developed and developing countries. Both obesity and overweight have been associated with an increased risk for the development of other non-communicable diseases such as hypertension, dyslipidaemia, type 2 diabetes, fatty liver disease, cardiovascular accidents and some cancers (Aaseth et al., 2021; Blüher et al., 2023; De Fano et al., 2022; Lette et al., 2016). On the other hand, obesity not only leads to an increased risk of developing metabolic diseases but also to a higher prevalence of cardiovascular, inflammatory, osteoarticular, psychological diseases and certain types of cancer leading to a high cost burden on healthcare expenditure (Westbury et al., 2014). The comorbidities associated with this pathology not only have an impact on the quality of life of patients, but also lead to a shorter life expectancy. It is estimated that being overweight reduces longevity by four and a half years (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019).

The impact of obesity and its comorbidities on the population is not only limited to a health problem, but also has a strong impact on a country's economy or health expenditure. It is estimated that countries spend around 8% of their budget on treating overweight and its comorbidities (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019). Therefore, intervention in the prevention and treatment of overweight is crucial to reduce the burden on patients and society. Different therapies have been developed for the treatment of obesity in recent decades, but their costs, safety and need for a chronic use have limited their success. Moreover, none of these treatments addresses the origin of obesity, the pathophysiological basis of which is still unknown. Therefore, it remains imperative to investigate new therapeutic targets to address this new pandemic.

In recent years it has become evident that the central nervous system, and in particular the hypothalamus, plays an important role in the regulation of appetite and energy expenditure (Amin et al., 2011). Despite the fact that different hypothalamic nuclei seem to have some involvement in the regulation of thermogenesis, the VMH has emerged as an important regulatory nucleus of this process in brown adipose tissue (BAT) (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017). Genetic evidence has shown that deletion of steroidogenic factor 1 (SF1) in neuronal populations of this nucleus lead to decreased energy expenditure and UCP1 expression in BAT (Schulz et al., 2013; Seale et al., 2011). On the other hand, it has been shown that different hormonal signals, including thyroid hormones, are able to activate the thermogenic response of the BAT through the VMH, thus increasing thermogenesis (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017). In 2017, Martínez-Sánchez et al. demonstrated that T3 administration into the VMH caused a decrease in AMPK which, in turn, led to a decrease in hypothalamic ceramide concentration and subsequent reduction in endoplasmic reticulum stress, increasing sympathetic tone over the BAT and thermogenesis (Lopez et al., 2010; Martínez-Sánchez et al., 2017). Despite the fact that the actions of THs on

BAT are known to be mediated by both thyroid hormone receptors ($TR\alpha$ and $TR\beta$), to date it was unknown which of the two receptors, if not both, was involved in this process.

The aim of this thesis was to clarify which of the two thyroid hormone receptors is involved in the regulation of thermogenesis at the central level. For this purpose, several animal models with specific modifications in the thyroid hormone receptors in the SF1 neurons of the VMH were generated. These models included mice with a dominant negative mutation in $TR\alpha1$, knockout (KO) mice for $TR\beta1$, and mice combining both modifications which functionally is a double KO. After metabolic phenotyping of these animals under standard dietary conditions and by studying gene and protein expression, it was observed that expression of the dominant negative receptor for $TR\alpha1$ in SF1 neurons of the VMH leads to lower energy expenditure, associated with decreased thermogenic activity of BAT and browning of WAT, resulting in an increase in body mass independent of intake. Parallel results were observed when combining the modifications in both receptors (double KO), showing these animals a marked increase in body fat stores together with a fall in thermogenic markers in brown adipose tissue. However, these changes were not observed in animals knockout for $TR\beta1$.

In summary, in this study we have demonstrated for the first time that the effects on thermogenesis of BAT at the central level are mediated exclusively by $TR\alpha$ present in the SF1 neuronal population, observing a greater body mass in the $TR\alpha$ AMI SF1 model linked to a lower activation of BAT and lower energy expenditure, independent of intake, data that were not observed in KO animals for $TR\beta1$. Likewise, the data obtained yield that browning regulation in subcutaneous and gonadal fat is mediated by $TR\alpha1$ and not by $TR\beta1$.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. LA OBESIDAD.....	25
1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.....	25
1.2. ETIOPATOGENIA DE LA OBESIDAD.....	26
2. REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.....	27
2.1. NÚCLEO ARCUATO.....	29
2.2. NÚCLEO VENTROMEDIAL.....	30
2.2.1. Neuronas SF1.....	33
2.3. NÚCLEO PARAVENTRICULAR.....	35
2.4. OTROS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS.....	36
3. TEJIDO ADIPOSO.....	36
3.1. TERMOGÉNESIS.....	38
4. HORMONAS TIROIDEAS.....	41
4.1. RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS.....	43
4.2. ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS. 44	
4.3. MODIFICACIONES DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS.....	47
4.4. PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL CEREBRO.....	49
4.5. PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	52
4.5.1. Papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la termogénesis.....	53
4.5.2. Papel de las hormonas tiroideas en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico.....	54
HIPÓTESIS.....	57
5. HIPÓTESIS.....	59
OBJETIVOS.....	61
6. OBJETIVOS.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
7. LEGISLACIÓN.....	67
8. MODELOS ANIMALES.....	67
9. ANALGESIA Y ANESTESIA.....	68
10. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS.....	68
10.1. VÍA INTRAPERITONEAL.....	68

10.2.	VÍA SUBCUNTÁNEA	69
10.3.	VÍA NÚCLEO ESPECÍFICA O ESTEREOTAXIA	69
11.	PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS	69
11.1.	GENERACIONES DE RATONES	69
11.2.	MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y LA MASA CORPORAL.....	71
11.3.	MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA	71
11.4.	DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.....	72
11.5.	MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL Y DEL BAT	72
11.6.	EXPOSICIÓN AL FRÍO.....	72
11.7.	INDUCCIÓN DE HIPERTIROIDISMO	72
11.8.	TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA INSULINA	73
12.	PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	73
12.1.	ESTEREOTAXIA	73
12.2.	DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS.....	73
13.	DISEÑO EXPERIMENTAL	74
13.1.	INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS ASOCIADOS TR α 1VP16 EN LOS RATORES TR α AMI SF1	74
13.2.	EXPOSICIÓN A FRÍO EN LOS RATORES TR α AMI SF1 Y TR β ^{KO} SF1.....	75
13.3.	INDUCCIÓN DE HIPERTIROIDISMO	76
14.	TECNICAS ANALÍTICAS	77
14.1.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	77
14.1.1.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.....	77
14.1.2.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	77
14.1.3.	WESTERN BLOT	78
14.1.3.1.	Preparación de los geles	78
14.1.3.2.	Preparación de las muestras para electroforesis.....	79
14.1.3.3.	Electroforesis	79
14.1.3.4.	Transferencia del gel de electroforesis a una membrana	80
14.1.3.5.	Inmunodetección.....	80
14.1.3.6.	Revelado	81
14.1.3.7.	Cuantificación	81
14.2.	ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO	82
14.2.1.	Extracción de ARNm	82
14.2.2.	Cuantificación de ARNm	82
14.2.3.	Retrotranscripción	82
14.2.4.	PCR en tiempo real (Taqman)	83
14.3.	PCR PARA GENOTIPADO.....	84

14.3.1. Extracción de ADN	84
14.3.2. Amplificación por PCR	85
14.3.3. Electroforesis de agarosa.....	85
14.4. INMUNOHISTOQUÍMICA	86
14.4.1. Tinción hematoxilina/eosina	86
14.5. OIL-RED.....	86
14.6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO	87
15. ESTADÍSTICA	87
RESULTADOS.....	89
16. RESULTADOS	91
16.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE TR α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH.....	91
16.2. EFECTO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DEL RECEPTOR ALFA DE HORMONAS TIROIDEAS (TR α 1) EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.	93
16.2.1. La ablación del efecto de las hormonas tiroideas sobre el receptor alfa afecta tanto al peso corporal como al gasto energético.	93
16.2.2. Los animales TR α AMI SF1 presentan una disminución en la termogénesis en el BAT y menor browning en el tejido adiposo blanco.....	97
16.2.3. Los animales TR α AMI SF1 presentan una peor adaptación al frío.	101
16.2.4. Los animales TR α AMI SF1 no presentan diferencias en la regulación de la glucemia.	102
16.2.5. Los animales TR α AMI SF1 no presentan diferencias en la lipogénesis hepática.....	104
16.2.6. Los animales TR α AMI SF1 no presentan diferencias en la ruta de AMPK en el VMH.	105
16.2.7. La inducción del hipertiroidismo en los animales carentes del receptor TR α 1 en el VMH no se presenta de forma paralela a sus controles.	106
16.2.8. El tratamiento con adenovirus asociados que expresan un receptor TR α 1 dominante positivo rescata parcialmente el fenotipo de los ratones TR α AMI.....	107
16.3. EFECTO DE LA ABLACIÓN DEL RECEPTOR BETA 1 DE HORMONAS TIROIDEAS (TR β 1) EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.	108
16.3.1. Caracterización de la eliminación de TR β 1 en las neuronas SF1 del VMH.	108
16.3.2. La ablación del efecto de las hormonas tiroideas sobre el receptor beta no afecta ni al peso corporal ni al gasto energético.	109
16.3.3. Los animales TR β SF1 no presentan cambios en la termogénesis en el BAT ni en el browning en el tejido adiposo blanco.	113
16.3.4. Los animales TR β KO SF1 no presentan diferencias en la adaptación al frío.....	117
16.3.5. La ablación del receptor TR β en las neuronas SF1 no afecta a la regulación de la glucemia.	119
16.3.6. Los animales TR β KO SF1 no presentan diferencias en la lipogénesis hepática.	120
16.3.7. Los animales TR β KO SF1 no presentan diferencias en la ruta de AMPK en el VMH.....	122

16.3.8. La ablación del receptor TR β 1 en las neuronas SF1 no modifica la respuesta al hipertiroidismo inducido de forma periférica.....	123
16.4. EFECTO DE LA ABLACIÓN DEL RECEPTOR TR β 1 Y LA INCORPORACIÓN DE UN RECEPTOR DOMINANTE NEGATIVO PARA TR α 1 EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.	125
DISCUSIÓN	127
17. DISCUSIÓN	129
CONCLUSION	135
18. CONCLUSIONES.....	137
19. BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXOS.....	165
FE DE ERRATAS.....	174

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- AACS: acetoacetyl-CoA sintetasa, *acetoacetyl-CoA synthetase*.
- ACC: acetyl-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*.
- 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*.
- SNC: sistema nervioso central.
- 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*.

FAS: ácido graso sintasa, *fatty acid synthase*.

G6Pase: glucosa 6 fosfatasa, *glucose-6-phosphatase*.

GLP-1: péptido análogo de glucagón 1, *glucagon-like peptide 1*.

GLUT4: transportador de glucosa 4, *glucose transporter 4*.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina, *gonadotropin-releasing hormone*.

GRP: péptido liberador gástrico, *gastrin-releasing peptide*.

GS: glucógeno sintasa, *glycogen synthase*.

gWAT: tejido adiposo blanco gonadal, *gonadal white adipose tissue*.

HSL: lipasa sensible a hormonas, *hormone-sensitive lipase*.

IMC: índice de masa corporal.

IP: intraperitoneal.

IR: receptor de insulina, *insulin receptor*.

LepR: receptor de leptina, *leptin receptor*.

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: receptores 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: transportador de monocarboxilato, *monocarboxylate transporter*.

MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.

α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos alfa, *alpha melanocyte stimulating hormone*.

NAFLD: esteatohepatitis no alcohólica, *nonalcoholic fatty liver disease*.

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*.

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*.

PPAR γ : receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome proliferatoractivated receptor gamma*.

PRDM16: dominio PR que contiene 16, *PR domain containing 16*.

SNP: sistema nervioso parasimpático.

PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*.

PYY3–36: péptido tirosina tirosina 3-36, *peptide tyrosine-tyrosine (PYY) 3–36*.

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 esteroidogénico 1, *steroidogenic factor 1*.

SNS: sistema nervioso simpático.

TG: Triglicéridos.

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 delecciona una parte o la totalidad de un gen.

Knockin: modificación genética en la cual se introduce un cDNA (ADN complementario) en un locus particular del cromosoma del organismo.

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. LA OBESIDAD

1.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La obesidad, va más allá de una simple acumulación de peso. Es una enfermedad crónica y multifactorial que involucra factores genéticos, ambientales, metabólicos y de comportamiento (Lin & Li, 2021). Pese a ello, el principal factor causante de esta enfermedad es un desequilibrio continuado entre el consumo y el gasto energético, que conlleva a un exceso de energía que se traduce en un aumento del tejido adiposo (*White adipose tissue*, WAT) y, por tanto, a un aumento de peso. En aquellos casos en los que el consumo de calorías es muy elevado, la capacidad del WAT para acumular energía puede llegar a saturarse y, este exceso de grasa ser dirigido a otros órganos periféricos, dónde se produce una acumulación ectópica de grasa. Al principio los tejidos periféricos intentan acumular este exceso de grasa en forma de triglicéridos (TG), pero dada su baja capacidad para acumular lípidos, se saturan y este exceso pasa a rutas no oxidativas que producen especies lipídicas reactivas que inducen toxicidad en el tejido (P. B. Martínez de Morentin et al., 2010). Este proceso, denominado lipotoxicidad, contribuye a la resistencia a la insulina, esteatosis hepática o hígado graso no alcohólico (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) y fallo cardíaco. La lipotoxicidad se considera uno de los mayores factores de riesgo asociados con la obesidad y el síndrome metabólico (P. B. Martínez de Morentin et al., 2010).

En las últimas décadas, la obesidad ha experimentado un aumento alarmante en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 650 millones de adultos y 340 millones de niños y adolescentes presentaban obesidad en 2016. Estas cifras representan más del doble de prevalencia de obesidad respecto a 1980. Este aumento drástico se atribuye a una combinación de modificaciones en el estilo de vida, factores genéticos y factores socioeconómicos. Estos cambios, caracterizados por una disponibilidad excesiva de alimentos altos en calorías y bajos en nutrientes, así como la promoción de estilos de vida sedentarios, se le ha denominado como “entorno obesogénico”, y contribuye significativamente a la epidemia de obesidad.

En clínica, se considera que una persona es obesa cuando su índice de masa corporal [IMC (kg/m^2)] es mayor o igual a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ y, que tiene sobrepeso, cuando el IMC se encuentra entre $25,0$ - $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ (X. Lin & Li, 2021; Ruze et al., 2023). Se ha observado que existe una asociación positiva entre el aumento del IMC y el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, metabólicas, osteoarticulares y incluso algunos tipos de cáncer.

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según el IMC. Adaptado de la guía NICE, 2014 (<https://www.nice.org.uk/guidance/cg189>).

	Riesgo de comorbilidad		
	IMC (Kg/m ²)	Circunferencia cintura <102/88	>102/88
Normopeso	18,5-24,9		Aumentado
Sobrepeso (obesidad grado I)	25-29,9	Aumentado	Alto
Obesidad Clase I	30-34,9	Alto	Alto
Obesidad Clase II	35-39,9	Muy Alto	Muy Alto
Obesidad Clase III	≥40	Extremadamente alto	Extremadamente alto

El IMC es el parámetro antropométrico más utilizado para definir si una persona tiene sobrepeso u obesidad. Sin embargo, el IMC no informa de la distribución de la grasa corporal, no diferencia entre masa magra y grasa, y es poco fiable en sujetos de baja estatura, edad avanzada, abundante musculatura o con una estructura corporal de tipo atlético, personas con retención hidrosalina o mujeres gestantes (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; Engin & Engin, 2017). Es por ello, que actualmente este tipo de mediciones para caracterizar la obesidad empiezan a cuestionarse. Por eso, otro parámetro a tener en cuenta a la hora de diagnosticar la obesidad es el diámetro abdominal. Esta es una medida indirecta del tejido adiposo visceral que permite categorizar la obesidad según la distribución de la grasa corporal, pues además del exceso de grasa, la distribución de esta constituye un predictor independiente de riesgo y morbilidad. Aun así, el perímetro de la cintura no se considera útil cuando el IMC ≥ 35 kg/m² (Lecube et al., 2017). Otros parámetros que también se han utilizado para cuantificar la obesidad han sido el índice cintura-cadera, el grosor de los pliegues cutáneos y, la composición corporal medida por ultrasonidos. Esta última ofrece información sobre la ratio masa magra/masa grasa, así como su distribución.

1.2. ETIOPATOGENIA DE LA OBESIDAD

La obesidad es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales (Wright & Aronne, 2012). Aunque los factores genéticos influyen en la susceptibilidad a la obesidad, no pueden explicar el incremento de su prevalencia en las últimas décadas. Sin embargo, los cambios en la actividad física y la dieta son el foco para explicar esta tendencia adversa (Congdon, 2019; Ruze et al., 2023). A su vez, los factores ambientales también influyen de manera importante en los niveles cambiantes de actividad física y en los comportamientos dietéticos a lo largo de la vida. Estos factores están, a su vez, fuertemente asociados al nivel socioeconómico, al origen étnico y a la localización geográfica (Congdon, 2019).

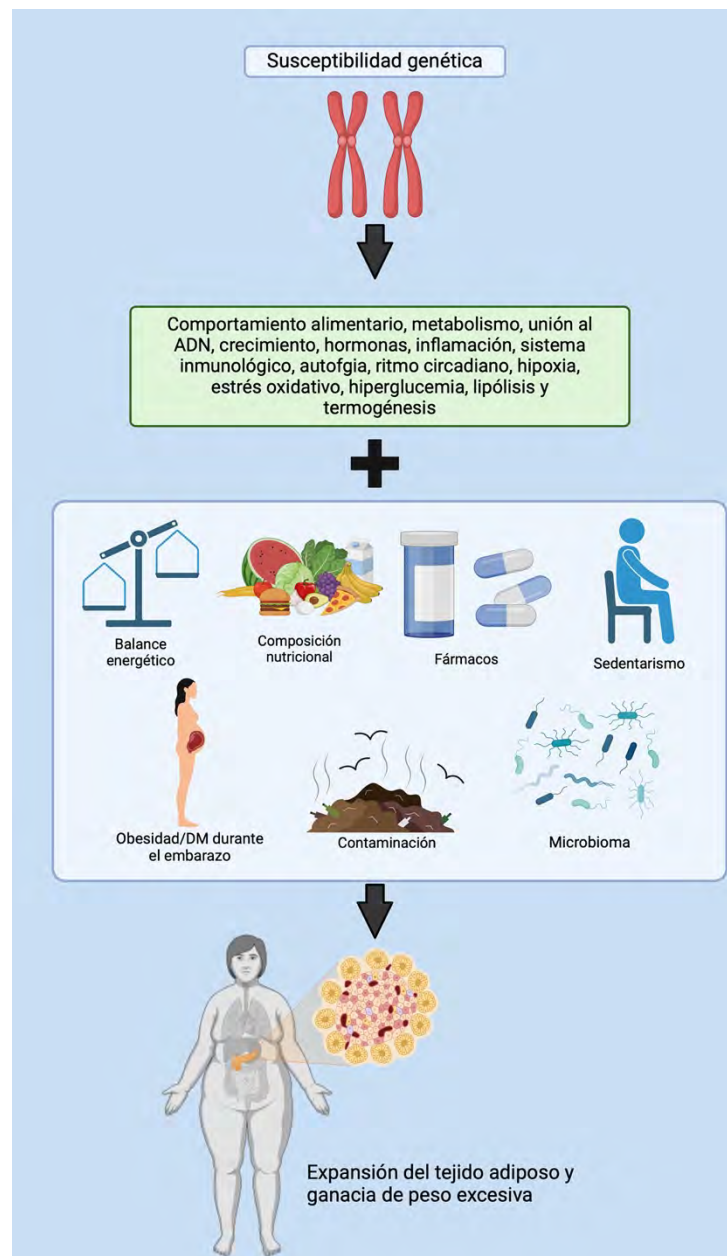


Figura 1. Factores genéticos y ambientales que afectan en el desarrollo de la obesidad. Creado con Biorender.com.

2. REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO

El mantenimiento de las funciones vitales del organismo requiere de un equilibrio en el balance energético. El balance energético hace referencia a los flujos de calorías en el organismo. Esto es la ingesta, el gasto energético y el almacenamiento de energía (Hill et al., 2012). Cuando se produce un desequilibrio en el balance energético, se produce un cambio en el peso corporal. Es decir, cuando la ingesta supera al gasto se habla de un balance positivo que

conlleva a un aumento de la masa corporal y, ocurre lo contrario cuando el balance es negativo (Heindel et al., 2024). Mientras que la ingesta calórica, en forma de proteínas, carbohidratos y grasas, depende tanto de factores individuales como ambientales, el gasto energético depende de la tasa metabólica en reposo, de la termogénesis adaptativa, del efecto termogénico de los alimentos (coste energético de absorber y metabolizar los alimentos consumidos) y de la actividad física (Basolo et al., 2022; Hill et al., 2012).

La homeostasis energética es el resultado de un complejo equilibrio entre el consumo de alimentos y el gasto de energía. La regulación de este equilibrio conlleva un complejo sistema fisiológico que integra tanto señales aferentes como eferentes y está controlado por el sistema nervioso central (SNC) (Farias et al., 2017). Entre las señales aferentes que proceden de la periferia y, permiten a nuestro SNC conocer las necesidades metabólicas, se encuentran aquellas que informan sobre saciedad y señales de adiposidad (M. W. Schwartz et al., 2000; Woods & D'aleccio, 2008). Entre las señales de saciedad se encuentran péptidos y hormonas secretadas por las células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal en respuesta a la digestión y absorción de las comidas. Entre estas moléculas, que ejercen mayormente un efecto anorexigénico reduciendo el apetito, se encuentran el péptido tirosina tirosina 3-36 (*peptide tyrosine-tyrosine (PYY) 3–36*, PYY3-36), la colescistoquinina (*cholecystokinin*, CKK), el péptido-1 similar al glucagón (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1), el péptido liberador gástrico (*gastrin-releasing peptide*, GRP), la oxintomodulina y la enterostatina (Woods & D'aleccio, 2008), entre otras. Únicamente la grelina, una hormona liberada por las células del estómago y el duodeno ejerce un efecto orexigénico y es capaz de estimular el apetito (Woods & D'aleccio, 2008).

Por otro lado, existen otro tipo de señales hormonales que informan tanto de los depósitos grasos del organismo como de los niveles de glucosa. Entre ellas encontramos a la insulina y a la leptina. Por un lado, la insulina secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre, induce la incorporación de la glucosa plasmática, ácidos grasos y aminoácidos en los tejidos periféricos para su almacenamiento (Niswender, 2011). Además de sus acciones a nivel periférico, la insulina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica desde la circulación y actuar a nivel central reduciendo el apetito (Woods & D'aleccio, 2008). La leptina es secretada principalmente por los adipocitos blancos en proporción a los depósitos grasos, actuando como el principal regulador de la ingesta y la homeostasis energética a nivel central (F. Zhang et al., 2005).

En la regulación de la ingesta y balance energético juega un papel importante el hipotálamo, que es capaz de integrar la información central y de los tejidos periféricos relativa a la ingesta de alimentos y al estado energético del cuerpo. Una vez integrada esta información, y a través de respuestas neuronales y endocrinas, el hipotálamo regula el balance energético a largo y corto plazo mediante la regulación de la ingesta, gasto energético en el tejido adiposo marrón (*Brown adipose tissue*, BAT) y el metabolismo de los lípidos y de la glucosa (Martínez de Morentin et al., 2012; B. Wang & Cheng, 2018). El hipotálamo se organiza en grupos de neuronas definidos anatómicamente y denominados núcleos, que se encuentran interconectados a través de proyecciones axonales formando circuitos neuronales. Estos núcleos ejercen diversas funciones relativas al control de la ingesta y el gasto energético. Entre ellos destacan: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVH), el núcleo ventromedial (VMH) y el núcleo dorsomedial (DHM), así como el área hipotalámica lateral (LHA) (González-García, Fernø, et al., 2017; D. H. Kim et al., 2012; B. Wang & Cheng, 2018).

2.1. NÚCLEO ARCUATO

El ARC, situado en el hipotálamo mediobasal, adyacente al tercer ventrículo (L. Wang et al., 2021); es el principal centro regulador de la ingesta (Roh et al., 2016; Stanley et al., 2005). Esta área es capaz de integrar señales hormonales periféricas puesto que presenta una barrera hematoencefálica fenestrada (L. Wang et al., 2021). Este núcleo está compuesto, entre otras, por dos poblaciones neuronales con efectos opuestos sobre la ingesta: las neuronas NPY/AgRP y las neuronas POMC/CART (Nillni, 2018; Roh et al., 2016; Stanley et al., 2005; Vohra et al., 2022). Ambas forman parte del sistema de melanocortinas, ya que sus proyecciones van a afectar a una amplia red de neuronas postsinápticas que expresan el receptor de melanocortina 4 (MC4R, melanocortin 4 receptor).

Las neuronas POMC/CART co-expresan los neuropéptidos anorexigénicos proopiomelanocortina (POMC), precursor de la hormona alfa-estimulante de melanocitos (α -MSH), y el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART), que reducen la ingesta y aumentan el gasto energético (González-García, Fernø, et al., 2017). α -MSH, inhibe la ingesta mediante la unión a los receptores MCR3 y MCR4 presentes en el PVH y promoviendo el gasto energético actuando sobre el núcleo del tracto solitario (NTS), en el tronco cerebral (Roh et al., 2016; Rui, 2013.; Si et al., 2022; Simpson et al., 2009; Stanley et al., 2005; Stark et al., 2013; B. Xu & Xie, 2016). También se ha descrito, un rol en la regulación de la homeostasis glucémica, ya que su inhibición farmacogenética disminuye los niveles de glucosa en sangre, y su capacidad para detectar glucosa se altera en condiciones de HFD.

Por otro lado, las neuronas NPY/AgRP co-expresan los neuropéptidos orexigénicos AgRP (proteína relacionada con agutí) y NPY (neuropéptido Y). Estos péptidos estimulan el apetito e inhiben el gasto energético (González-García, Fernø, et al., 2017). El neuropéptido NPY actúa como ligando de los receptores Y-1 (Y-1R) y Y-5 (Y-5R), mientras que AgRP actúa como un antagonista endógeno de los receptores MC3-R y MC4-R (L. Wang et al., 2021). Estas neuronas proyectan a otros núcleos hipotalámicos como el PVH, DMN y LHA. Por otro lado, las neuronas NPY/AgRP liberan localmente ácido γ -aminobutírico (GABA) para inhibir las neuronas POMC adyacentes, lo cual estimula el apetito y el metabolismo (Si et al., 2022).

Tanto las neuronas AgRP/NPY como POMC/CART expresan receptores para señales periféricas (González-García et al., 2017), actuando como neuronas de primer orden. Estas neuronas expresan receptores para hormonas periféricas como la leptina, insulina, ghrelin, glucocorticoides, hormonas tiroideas e incluso nutrientes (Woods & D'alessio, 2008). La leptina e insulina, indicadores de un estado energético positivo, actúan en el ARC inhibiendo las neuronas NPY/AgRP y estimulando las neuronas POMC/CART; mientras que la grelina, hormona cuya liberación por el estómago se estimula durante el ayuno, inhibe las neuronas POMC/CART a través de la liberación de GABA por las neuronas AgRP/NPY (Cowley et al., 2003). Estas poblaciones neuronales, a su vez, proyectan sus axones a núcleos hipotalámicos secundarios o neuronas de 2º orden, tales como DMH, LHA, VMH y PVH, y no hipotalámicos como el NTS (García-Cáceres et al., 2019; L. Wang et al., 2021), regulando el apetito y el balance energético. Además de proyectar a otros núcleos hipotalámicos, el ARC recibe proyecciones de otras áreas hipotalámicas, entre ellas la señal excitatoria del glutamato procedente de las neuronas SF1 del hipotálamo ventromedial (VMH), que estimula las neuronas POMC e inhibe la ingesta de alimento (Rau & Hentges, 2021; Sternson et al., 2005) (Figura 2).

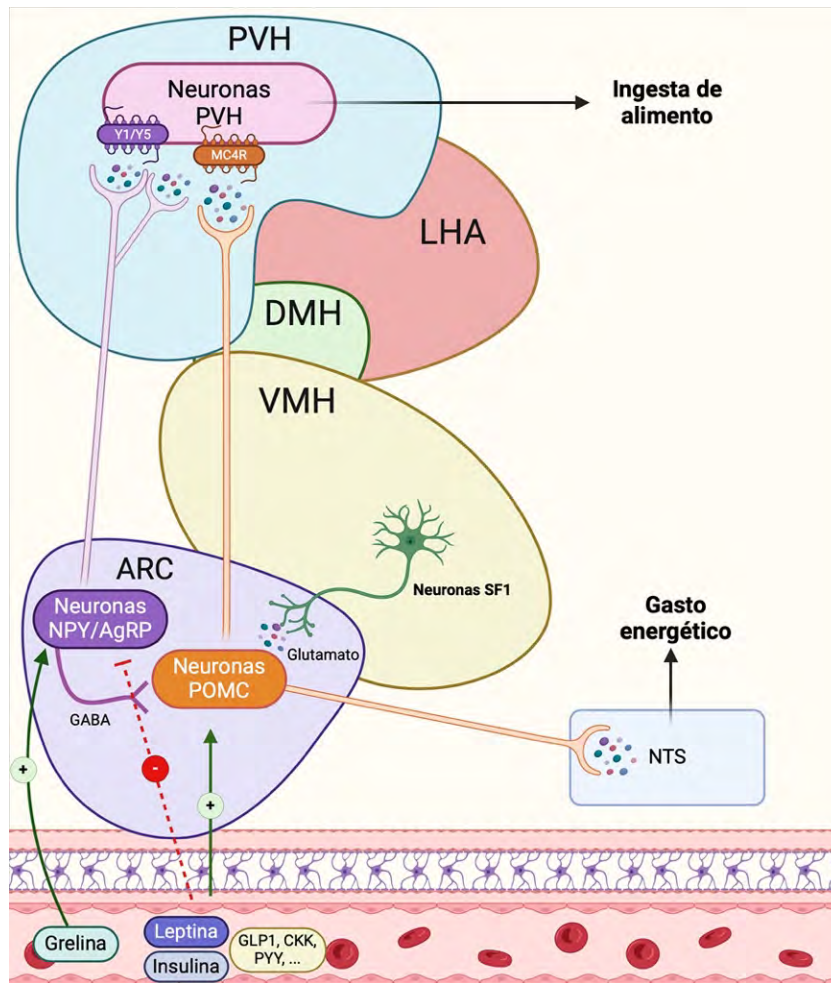


Figura 2. Circuitos hipotalámicos que regulan el apetito. Creado con biorender.com.

2.2. NÚCLEO VENTROMEDIAL

El VMH, localizado en el hipotálamo mediobasal, adyacente al tercer ventrículo, fue descrito inicialmente como el “centro de la saciedad” debido a que en los primeros estudios se observó que las lesiones en esta área hipotalámica desencadenaban en hiperfagia y obesidad, mientras que su estimulación resultaba en una disminución de la ingesta de alimentos (Hetherington & Ranson, 2009; King, 2006; L. Wang et al., 2021). Actualmente se sabe que el VMH juega un papel importante en el metabolismo energético más allá de su implicación en la ingesta de alimentos (Hirschberg et al., 2020a; L. Wang et al., 2021). Además, este núcleo también se ha relacionado con un gran número de funciones homeostáticas y conductuales, como son la regulación del comportamiento sexual femenino (Cohen & Pfaff, 1992), la regulación de la glucosa, el control de la termogénesis en el BAT y la función cardiovascular (Khodai & Luckman, 2021; MCCLELLAN et al., 2006; Shimogawa et al., 2014).

En cuanto a citoarquitectura, el VMH es muy heterogéneo y, pese a que la mayoría de las neuronas sean glutamérgicas (Ziegler et al., 2002), está formado por diferentes tipos neuronales que se diferencian según los genes que expresan. Entre ellos encontramos células positivas para el receptor canabinoide 1 (*cannabinoid receptor 1*, CB1), el polipéptido activador

del adenilato ciclasa hipofisaria (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*, PACAP), la óxido nítrico sintasa (NOS1, nitric oxide synthase) el factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), cerebelina 1 (*cerebellin 1*, Cbln1), el receptor de estrógenos alfa (ER α), receptor de leptina (LepR), el receptor de insulina (IR), células positivas para la glucoquinasa (GK), células y células positivas para el receptor de progesterona (PR), entre otros (Khodai & Luckman, 2021) (Figura 3). Sin embargo, la mayoría de las células del VMH, especialmente aquellas en región dorsomedial de este núcleo, expresan el factor esteroideogénico 1 (SF1), también conocido como NR5A1 (codificado por el gen *Nr5a1*). SF1 es un factor de transcripción, es decir un receptor nuclear, “huérfano” (sin ligando de alta afinidad) que promueve la transcripción de una serie de genes diferentes implicados en el desarrollo endocrino, la estereoidogénesis y el metabolismo (Achermann, 2024).

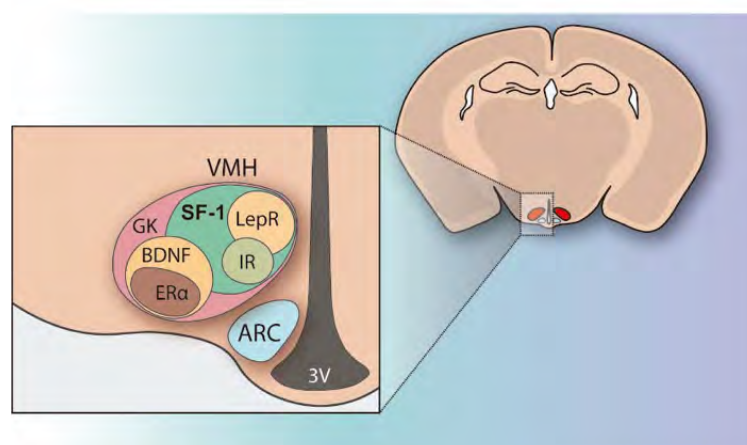


Figura 3. Estructura de los principales genes manifestados en el VMH. Reproducido con permiso de Creative Commons (Fosch et. al, 2021).

El VMH es un centro integrador clave que responde a múltiples señales fisiológicas relacionadas con el metabolismo y la ingesta de alimentos. Desde la detección de glucosa hasta la acción de hormonas como la leptina e insulina, orquestando respuestas adaptativas para mantener la homeostasis energética. Al mismo tiempo, el VMH también recibe proyecciones desde otras áreas cerebrales (González-García, Fernø, et al., 2017; Stark et al., 2013).

El papel del VMH en la regulación del apetito y del peso corporal está firmemente establecido. Este núcleo recibe señales desde el ARC, entre otros núcleos como el PVN y LHA, mediante los diferentes receptores que presenta en su núcleo (Yousefvand & Hamidi, 2021). Desde el ARC, recibe proyecciones de las neuronas NPY, AgRP, y POMC. Estas actúan sobre los receptores Y1, Y5 y MC4R presentes en esta región (Kumarnsit et al., 2003; Yousefvand & Hamidi, 2021). Estudios recientes relacionan los efectos de las neuronas POMC en la supresión de la ingesta con la activación de las neuronas BDNF a través de los receptores MC4R (B. Xu et al., 2003). La delección selectiva de BDNF resultó en obesidad (Unger et al., 2007).

Estudios de ratas con lesiones en este núcleo mostraban una rápida aparición de obesidad ligada a una mayor ingesta de alimentos y a una reducción del tono simpático (Hetherington & Ranson, 1942). Del mismo modo, los ratones KO para SF1 o aquellos a los que se les eliminaba la expresión del receptor de leptina (LepR) en las células SF1, mostraron un aumento en el peso corporal y en la adiposidad. Esta condición se vio exacerbada cuando los animales se alimentaron con una dieta alta grasa, lo cual sugiere que las neuronas SF1 son más importantes en

la adaptación a un entorno obesogénico que en el mantenimiento del peso corporal normal (Khodai & Luckman, 2021). Además de las señales previamente mencionadas, el VMH recibe otras señales orexigenicas entre las que se encuentran orexina, endocannabinoides, glutamato y ghrelin. Y señales anorexigénicas para reducir la ingesta de alimentos: MSH, CRF, urocortina, leptina, insulina, histamina y dopamina (Yousefvand & Hamidi, 2021).

Como se comentaba previamente, además de su papel en la regulación de la ingesta, el VMH juega un rol en el comportamiento social. La estimulación eléctrica del VMH, concretamente la región ventrolateral (vVMH), en ratas conducía a un comportamiento de ataque en estos animales (Lammers et al., 1988). Del mismo modo, la introducción de un intruso macho en la jaula conducía a una fuerte inducción de c-fos en esta región (D. Lin et al., 2011). No ocurría lo mismo cuando el intruso era una hembra. Dado que las principales poblaciones del vVMH son neuronas que expresan ER α y PR, los estudios en roedores en los que se inhibió de forma quimiogénica u optogénica ER α (Sano et al., 2013) y PR (C. F. Yang et al., 2013) mostraron una reducción de en el comportamiento agresivo.

Por otro lado, las lesiones en el VMH mostraron estar involucradas en la regulación del comportamiento sexual en hembras (Mathews & Edwards, 1977), mostrando en papel crucial que ejerce este núcleo en la modulación del reflejo de lordosis de los machos, necesario para el éxito del apareamiento (Pfaff & Sakuma, 1979). En cambio, en los machos se observó que el VMH es vital para comportamientos sociosexuales (Harding & McGinnis, 2003, 2005). También se ha demostrado que el VMH es capaz de regular la actividad locomotora, esta regulación se ha relacionado con la acción de los estrógenos en este mismo núcleo (W. C. Krause et al., 2021; Narita et al., 2016).

Como se comentaba previamente, el VMH es capaz de detectar las concentraciones extracelulares de glucosa e insulina y, está bien establecido que este núcleo juega un papel en la respuesta contrarreguladora (CRR) a la hipoglucemia (Fioramonti et al., 2011). La CRR es un reflejo neuro-endocrino que restaura los niveles de glucosa. Esta respuesta implica la liberación de hormonas (p.e. glucagón, adrenalina, corticosterona o cortisol) que restauran los niveles de glucosa inhibiendo la captación de glucosa por tejidos periféricos y estimulando la producción de glucosa por el hígado. Estas acciones se llevan a cabo gracias a la existencia de un tipo de células especializadas en la detección de glucosa, conocidas como neuronas sensibles a la glucosa (*glucosa-sensing neurons*, GSNs), cuya actividad eléctrica esta modulada en respuesta a las concentraciones de glucosa, es decir, las GSNs no usan solo la glucosa como combustible si no también como un modulador de su propia actividad (Hirschberg et al., 2020b). Existen dos tipos de GSNs: las neuronas excitadas por glucosa (glucosa-excited, GE) y las inhibidas por glucosa (glucosa-inhibited, GI). En el VMH, la hipoglucemia despolariza las neuronas GI mediante el cierre del canal de cloruro a través de un mecanismo mediado por la kinasa activada por AMP (AMPK) (Quenneville et al., 2020) y el óxido nítrico (Fioramonti et al., 2011). Diversos estudios han demostrado que la estimulación eléctrica del VMH conduce a una mayor producción de glucosa a través de una mayor degradación del glucógeno hepático como a una mayor absorción de glucosa por los tejidos periféricos (p.e. tejido adiposo marrón, corazón y músculo esquelético), a través de la activación simpática; ligado a una disminución de los niveles circulantes de insulina y a un aumento del glucagón (Hirschberg et al., 2020c; Routh, 2010; L. Tu et al., 2022). Esta gluco-regulación parece estar controlada mediante las neuronas SF1 glutamatérgicas (Tong et al., 2007). La alteración genética de este subconjunto neuronal altera la respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia inducida por insulina y la glucopenia central. Por otro lado, la inhibición de las neuronas SF1 en ratones no altera la

concentración de glucosa en sangre en ayunas, pero perjudica drásticamente la capacidad de recuperarse de la hipoglucemia inducida por insulina al bloquear el aumento de glucagón y corticosterona (Meek et al., 2016).

Además de su papel en la regulación de la ingesta, comportamiento y en la regulación de la glucosa, el VMH juega un rol primordial en la regulación del gasto energético mediante la activación del tejido adiposo marrón (BAT). En 1981, Perkins et al. demostraron que la estimulación eléctrica de esta área hipotalámica se traduciría en un aumento de la termogénesis en el BAT mediante la activación de los receptores β -adrenérgicos de este tejido (Perkins et al., 1981). Además, lesiones en este núcleo daban lugar a una ausencia en el aumento de actividad característico de los nervios que inervaban el BAT durante la exposición a frío (Nijima et al., 1984). Se ha establecido que varias hormonas como la leptina, las hormonas tiroideas, el estradiol (E2), la proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B) y el péptido similar al glucagón (GLP-1), así como otras moléculas como la nicotina, ejercen sus efectos termogénicos a través del VMH (Beiroa et al., 2014; González-García, Fernø, et al., 2017; P. B. Martínez de Morentin et al., 2014; Whittle et al., 2012a). Estudios recientes, han demostrado que la inhibición de la señalización de AMPK en el VMH induce una activación de la termogénesis en el BAT a través de la estimulación del sistema nervioso simpático, que a su vez se traduce en un aumento de la pérdida de peso (López et al., 2010; Martínez De Morentin et al., 2014; P. B. Martínez de Morentin et al., 2012; Whittle et al., 2012b). Seoane-Collazo et al. demostraron que la activación de la maquinaria termogénica en el BAT a través del VMH se debe a la inhibición de la isoforma $\alpha 1$ de AMPK (AMPK $\alpha 1$) y no AMPK $\alpha 2$, específicamente en las neuronas SF1 (Seoane-Collazo et al., 2018). La eliminación específica de la isoforma AMPK $\alpha 1$ en las neuronas SF1, da lugar a un fenotipo termogénico tanto en condiciones de HFD como en STD, protegiendo a estos animales de la obesidad (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Recientemente, esta inhibición de AMPK $\alpha 1$ se ha conseguido también mediante la administración de nanopartículas dirigidas específicamente a las neuronas SF1. La administración de vesículas extracelulares cargadas con un plásmido predominantemente negativo para AMPK $\alpha 1$ (SF1-DN- AMPK $\alpha 1$) y dirigidas de forma específica a las neuronas SF1, mostraron una disminución de la masa corporal ligada a un aumento de la termogénesis del BAT y del tono simpático al inhibir AMPK $\alpha 1$ en estas neuronas (Milbank et al., 2021). La misma aproximación en animales carentes del receptor de leptina (*db/db*) mostró una marcada pérdida de peso y masa grasa independiente de la ingesta y, asociada, al incremento del tono simpático, termogénesis del BAT y el *browning* del tejido adiposo blanco (Milbank et al., 2023).

2.2.1. Neuronas SF1

Como se comentaba previamente, las neuronas SF1 son una población de neuronas del VMH, con una especial importancia en el balance energético. La expresión del gen *Nr5a1* que codifica para la proteína SF1, se expresa de forma exclusiva en el VMH, dentro del encéfalo. Fuera del SNC, su expresión es elevada en glándulas adrenales y gónadas, con funciones relevantes durante el desarrollo (Hatano et al., 1996; Hoivik et al., 2010). Se ha demostrado que SF1 es necesario para el correcto desarrollo del VMH, el mantenimiento de su citoarquitectura, así como para su diferenciación y anatomía final como núcleo (Kurrasch et al., 2007). Además, se ha demostrado que SF1 es esencial para la diferenciación terminal y el mantenimiento de las poblaciones neuronales del VMH (A. M. Davis et al., 2004; McClellan et al., 2006). La pérdida

de SF1 también provoca una disminución de las proyecciones eferentes a la amígdala (Tran et al., 2003) y la alteración de las proyecciones aferentes del área preóptica al VMH (Büdefeld et al., 2011). Además, también se ve afectada la expresión de varios marcadores tempranos en el VMH, como *Fezf1*, *Nkx2-2*, *Nptx2* *A2bp1*, que presentan sitios de unión en su promotor para SF1 (Kurrasch et al., 2007). En consonancia con este papel de las neuronas SF1 en el VMH, su eliminación específica en ratones (*Sfl Nestin:Cre*) altera la integridad de este núcleo hipotalámico y provoca diversos déficits metabólicos, termogénicos, reproductivos y de ansiedad (K. W. Kim et al., 2010, 2011; Zhao et al., 2008).

Con el fin de comprender mejor la función de SF1 in vivo, se han llevado a cabo manipulaciones tanto optogénicas como quimiogénicas de estas neuronas en el VMH. Las aproximaciones optogénicas consistieron en el uso de receptores fotoquímicos de rodopsina modificados. Estos permitieron controlar, mediante el uso de luz, la activación o inhibición de las neuronas SF1 (Viskaitis et al., 2017; J. Zhang et al., 2020). Se ha visto que la respuesta de estas neuronas era dependiente de la frecuencia de activación. Mientras que a altas frecuencias (>20 Hz) conducían a una profunda respuesta defensiva, como congelamiento e intentos de escape; la activación de baja frecuencia (2 Hz) suprimía la alimentación después del ayuno (Viskaitis et al., 2017). Esto confirmó que las neuronas SF1 modulan las conductas relacionadas con la alimentación y la ansiedad. Por otro lado, la modulación quimiogénica de las neuronas SF1 utilizando tecnología *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADDs), ha permitido excitar o inhibir a estas neuronas en respuesta a clozapina o diclorhidrato de JHU37160 (J60). La activación de estas neuronas mediante DREADDs conduce a una disminución de la ingesta, mientras que la inhibición, también mediante DREADDs, la aumentaba (Viskaitis et al., 2017). Estas mismas estrategias se emplearon para demostrar el rol de las neuronas SF1 en la regulación de la homeostasis glucídica. Mientras que la inhibición selectiva de las neuronas SF1 bloqueaba la recuperación de la hipoglucemia inducida por insulina, su activación provocaba hiperglucemia (Meek et al., 2016).

Además de las técnicas previamente mencionadas, varios grupos han generado diferentes líneas transgénicas SF1/Cre para la delección de genes implicados en la obesidad y diabetes. Entre los genes delecionados se encuentran: receptores de hormonas, sensores nutricionales, receptores glutaminérgicos y receptores sinápticos y moduladores de autofagia, mitocondrial, etc. (Fosch et al., 2021). La delección del receptor de leptina (*LepR*), mostró un aumento en la masa corporal de forma independiente a la ingesta y mostrando, además, la incapacidad de estos animales a adaptar su gasto energético, ante un consumo de dieta alta en grasa (Dhillon et al., 2006). Posteriormente, la eliminación de *SOCS3* (un regulador negativo en la señalización de leptina) en neuronas SF1, mostró que estos animales presentaban una mayor sensibilidad a la leptina, una menor ingesta y, aunque no presentaban cambios en la masa corporal, presentaban una mejor homeostasis de la glucosa (R. Zhang et al., 2008). Entre otros de los receptores de hormonas que se han eliminado mediante el sistema *cre/loxP* en las neuronas SF1 ha sido el receptor de insulina (*IR*). Los ratones carentes de *IR* no mostraron diferencias en la masa corporal en condiciones estándar, sin embargo cuando fueron alimentados con HFD, presentaron resistencia a la insulina, con una menor masa corporal y adiposidad, una mejor sensibilidad a la leptina y homeostasis de la glucosa (Klöckener et al., 2011). Entre otras hormonas importantes en el balance energético, se encuentran los estrógenos. La eliminación de *ER α* en las neuronas SF1 da lugar a fenotipos obesos, debido a un menor gasto energético y a una menor capacidad termogénica del BAT, de forma exclusiva en hembras (Y. Xu et al., 2011a).

Además de la eliminación de los receptores previamente mencionados, cabe destacar la eliminación de sensores nutricionales como la sirtuina 1 (SIRT1, *sirtuin 1*) y AMPK. La eliminación de SIRT1 en las neuronas SF1 se asoció con una mayor susceptibilidad a la dieta alta en grasa debido a una reducción del gasto energético, la actividad locomotora y a una elevada resistencia a insulina en el músculo esquelético (Ramadori et al., 2011). Sin embargo, la sobreexpresión de SIRT1 en estas neuronas da lugar a una resistencia a obesidad inducida por dieta y al desarrollo de resistencia a la insulina (Ramadori et al., 2011). Por otro lado, la eliminación de la isoforma catalítica de AMPK, da lugar a una disminución en la masa corporal, sin afectar a la ingesta y con un incremento en el gasto energético y la termogénesis en el BAT (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Estos ratones presentan además una mayor captación de glucosa por el BAT (medida mediante 18-fluorodeoxiglucosa), así como un incremento de los marcadores termogénicos y del tono simpático. Ante una exposición a HFD, estos animales presentaban una disminución de la masa corporal de forma independiente a la ingesta, siendo resistentes al desarrollo de obesidad. Esto se debía a un aumento del gasto energético y de la termogénesis en el BAT, así como de browning en el WAT. Por último, estos animales también presentaban una mejor homeostasis de la glucemia, pero sin cambios en la sensibilidad a la insulina en condiciones de HFD (Seoane-Collazo et al., 2018).

Estos estudios permitieron esclarecer el papel que juegan las neuronas SF1 en el balance energético y la homeostasis de la glucosa, sobre todo en condiciones de dieta alta en grasa (Fosch et al., 2021).

2.3. NÚCLEO PARAVENTRICULAR

El PVH, localizado en la parte superior del tercer ventrículo (L. Wang et al., 2021), es un centro con importantes funciones endocrinas, autónomas y conductuales (Richard, 2015; Webber et al., 2015). Este núcleo se encuentra inervado por axones de las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART procedentes del ARC y es, además, sensible a numerosos neuropéptidos relacionados con el control del apetito (Richard, 2015; L. Wang et al., 2021; Webber et al., 2015). A su vez, este núcleo presenta una gran cantidad de receptores MCR3/MCR4, lo cual indica que sufre un importante control por sistema de melanocortina y que sea un centro clave en la regulación del equilibrio energético. A su vez, las neuronas del PVH proyectan a otros núcleos hipotalámicos y al tronco encefálico, donde controla las respuestas simpáticas relacionadas con el metabolismo y gasto energético periférico. Estas poblaciones neuronales son además dianas de las hormonas homeostáticas leptina (Gautron & Elmquist, 2011) y grelina (Mason et al., 2014).

El PVH, se compone de neuronas parvocelulares heterogéneas, neuronas magnocelulares y neuronas de proyección larga (Qin et al., 2018). Las neuronas parvocelulares envían axones a la eminencia media y secretan principalmente TRH y CRH en la vasculatura portal para iniciar el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo (HPT) y el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), respectivamente (Swanson & Sawchenko, 1983). En el eje HPA, la CRH estimula la secreción de ACTH en la hipófisis anterior, promoviendo la secreción de glucocorticoides en la glándula suprarrenal. Estos glucocorticoides, actúan principalmente como respuesta al estrés fisiológico (Isaksson, 2004; McEwen, 2007) y también inhiben la respuesta inmunitaria (Isaksson,

2004). Además de su papel como regulador del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal, la CRH, promueve la anorexia y activa el sistema nervioso simpático (SNC) (Woods & D'aleccio, 2008). (Woods & D'aleccio, 2008). Los axones de las neuronas magnocelulares, junto con los del núcleo supraóptico, constituyen el infundíbulo y la parte nervosa de la neurohipófisis y liberan vasopresina y oxitocina a la circulación sistémica. Las neuronas PVH de proyección larga proyectan a localizaciones lejanas, como las neuronas simpáticas preganglionares de la médula espinal.

Por otro lado, las neuronas TRH estimulan la secreción de TSH en la hipófisis anterior, que a su vez promueve la secreción de hormonas tiroideas en la glándula tiroides. Estas neuronas reciben proyecciones de los núcleos ARC y DMH del hipotálamo y de neuronas catecolaminérgicas del tronco encefálico (Fekete & Lechan, 2007). Tanto las neuronas POMC como las neuronas AgRP, inervan las neuronas TRH+ del PVH (Fekete et al., 2000; Légrádi & Lechan, 1999). Estudios recientes han demostrado que NPY reduce la expresión y liberación de TRH, mientras que la leptina, la α -MSH y el CART aumentan directamente su expresión (Diano et al., 1998; Ghamari-Langroudi et al., 2010; Vella et al., 2011). Por otro lado, las neuronas TRH+ proyectan sus axones al tronco encefálico y la médula espinal (Swanson et al., 1980). Estas proyecciones activan la proteína desacoplante-1 (UCP1) en el tejido adiposo marrón, que, junto con las THs, regula la temperatura corporal. Así mismo, las neuronas TRH son inervadas tanto por las neuronas adrenérgicas como las noradrenérgicas del tronco encefálico para inducir la termogénesis en ambientes fríos (Füzesi et al., 2009).

2.4. OTROS NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS

Otros núcleos que forman el hipotálamo son el DMH y el LHA. El DMH está altamente conectado con otras áreas hipotalámicas (es decir, recibe proyecciones del ARC y las envía al PVH y al LHA), así como con el troncoencefalo. Este núcleo desempeña un papel clave en la respuesta fisiológica al estrés y regula procesos como el ritmo circadiano, el apetito y la termogénesis (González-García, Fernø, et al., 2017).

EL LHA, en cambio, está compuesto por 2 conjuntos de neuronales: uno de ellos secreta las orexinas (OX-A y OX-B) mientras que el otro grupo de neuronas se encarga de la secreción de la hormona concentradora de melanina (MCH). Las orexinas estimulan ingesta de alimentos además de la modulación de respuestas conductuales como excitación, mantenimiento de la vigilia, motivación y recompensa (González-García, Fernø, et al., 2017). De manera similar a las orexinas, la expresión de MCH se incrementa en estado de ayuno para producir una acción orexigénica.

3. TEJIDO ADIPOSO

Tradicionalmente se ha considerado al tejido adiposo como un reservorio pasivo de almacenaje de energía. No fue hasta la década de los 90 cuando se estableció al tejido adiposo como un órgano endocrino con múltiples funciones (Kershaw & Flier, 2004). Este órgano expresa y secreta diversos péptidos bioactivos conocidos como adipocinas, por ejemplo, la leptina y la diponectina, que actúan tanto a nivel local, sobre el propio tejido como en órganos adyacentes (autocrino/paracrino), como a nivel sistémico (endocrino) actuando sobre órganos

como el hígado, el músculo, el páncreas, las glándulas suprarrenales y el sistema nervioso (Kershaw & Flier, 2004; Marcelin et al., 2022).

En los mamíferos, existen dos tipos de tejido adiposo que se diferencian tanto morfológica como funcionalmente: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón (Yau & Yen, 2020a). A nivel celular, el WAT es un tejido muy heterogéneo que no únicamente está formado por los adipocitos blancos, sino también por células del sistema inmune (macrófagos), células madre mesenquimales, células endoteliales y matriz extracelular. Los adipocitos blancos se caracterizan por la presencia de una gran gota lipídica unilocular que ocupa el 90% del volumen celular y que funciona como un compartimento de almacenamiento para los triglicéridos (Torres et al., 2015; van der Vaart et al., 2021). Durante épocas de exceso calórico, los adipocitos blancos secuestran ácidos grasos libres de la circulación y los almacenan como triglicéridos. El WAT representa el mayor porcentaje de la masa de tejido adiposo en humanos y tiene dos reservorios principales, a nivel subcutáneo, que se conoce como tejido adiposo subcutáneo (scWAT) y alrededor de los órganos internos, que se conoce como tejido adiposo visceral (vWAT) (Torres et al., 2015). Las funciones fisiológicas del WAT son el aislamiento y el almacenamiento de energía. Además, los adipocitos blancos también están involucrados en funciones como la secreción de hormonas y la función inmune. En momentos de necesidad calórica, los adipocitos blancos proporcionan un combustible metabólico a largo plazo a través de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos.

Como se comentaba anteriormente, este tejido ha sido reconocido como un órgano endocrino, ya que los adipocitos, las células precursoras, las endoteliales e inmunes, los fibroblastos y otras contribuyen a la liberación de moléculas fisiológicamente activas como adiponectina, leptina y resistina, así como adipocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, IL-33, IL-34 y IL-1F6), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , citoquina oncostatina M (oncosatin-M, OSM), interferon (IFN)- α , y ciertas quimioquinas (Kershaw & Flier, 2004; Torres et al., 2015; Trayhurn & Beattie, 2001). Estos productos de secreción contribuyen a nivel sistémico a la regulación del apetito y la saciedad, la distribución de grasa, la secreción y sensibilidad a la insulina, el gasto energético, la función endotelial, la inflamación, la presión arterial y la hemostasia. Asimismo, contribuyen a modular la adipogénesis, la migración de células inmunitarias al tejido adiposo, la inflamación, la angiogénesis, el metabolismo y la función de los adipocitos (Hotamisligil, 2006; Ouchi et al., 2011; Rosen & Spiegelman, 2006; Trayhurn & Wood, 2005). Por lo tanto, las alteraciones en la secreción de adipocinas relacionan la obesidad con sus comorbilidades inflamatorias, metabólicas y cardiovasculares.

Por otro lado, el BAT, a diferencia del tejido adiposo blanco se caracteriza por presentar un elevado número de mitocondrias (Caprio et al., 2020). Esta particularidad, junto con la presencia de la proteína desacopladora 1 (UCP1), capaz desacoplar el metabolismo de la producción de ATP, permite al tejido adiposo marrón ser capaz de disipar energía en forma de calor, en un proceso denominado termogénesis (López et al., 2013; Silva, 2006). Durante décadas se pensó que el BAT únicamente estaba presente en neonatos, roedores y animales que hibernan. Sin embargo, durante la última década se demostró que este tejido también se localiza en humanos adultos, aunque en menor proporción que en neonatos. En humanos, representa aproximadamente 4% de la grasa total en adultos y se encuentra en varias regiones corporales, predominantemente en la región cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal, para-aórtica y suprarrenal (Roh et al., 2016). La capacidad del BAT para disipar energía en forma de

calor desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la temperatura corporal y no se activa únicamente por el frío, sino que también es capaz de ser activado por el ejercicio físico y la alimentación (Caprio et al., 2020).

3.1. TERMOGÉNESIS

La termogénesis es un mecanismo de supervivencia en especies homeotermas (López et al., 2013; Mullur, Liu, Brent, et al., 2014; Silva, 2006). La termogénesis basal es suficiente para mantener la temperatura corporal en estados de termoneutralidad. Cuando la temperatura ambiente desciende por debajo de la termoneutralidad, se recurre a mecanismos termogénicos adaptativos (también conocidos como facultativos). La termogénesis por escalofríos aumenta la producción de calor en respuesta al frío mediante la contracción del músculo esquelético (Blondin & Haman, 2018). Sin embargo, carece de sostenibilidad a largo plazo es inviable, pudiendo comprometer, además, la función muscular. Por el contrario, la termogénesis sin escalofríos se produce principalmente en el BAT, que es capaz de oxidar lípidos y disipar energía en forma de calor, y es importante para la producción de calor durante la exposición prolongada al frío (Yau & Yen, 2020b).

La termogénesis se facilita mediante el desacoplamiento de la respiración mitocondrial de la producción de ATP, mediada por la proteína desacopladora 1 (UCP1), también llamada termogenina, que se encuentra en la membrana mitocondrial interna donde facilita el transporte de protones hacia la matriz mitocondrial (Contreras et al., 2015). En este proceso, el BAT utiliza los ácidos grasos almacenados en forma de triglicéridos como sustratos para producir calor o, en casos de termogénesis sostenida/crónica, los procedentes de la circulación. Por tanto, la energía que se utiliza para fosforilar el ADP a ATP, procede del gradiente de protones que se genera entre la matriz y la membrana interna mitocondrial gracias a los protones donados por los cofactores reducidos NADH y FADH₂ a la cadena de transporte de electrones (Krauss et al., 2005; Ricquier, 2000). Estos cofactores reducidos se obtienen a partir de moléculas oxidables como los carbohidratos, lípidos y proteínas. En el BAT este gradiente energético no es empleado únicamente para la síntesis de ATP, sino que también se emplea para generar calor (Busiello et al., 2015; Krauss et al., 2005; Reitman et al., 1999; Rousset et al., 2004). Los principales estímulos que activan la termogénesis en el BAT son el frío, las dietas hipercalóricas, y hormonas con acción termogénica, como las hormonas tiroideas (Azzu et al., 2010; Puigserver et al., 1998; Stock, 1986; Vaitkus et al., 2015; J. Wu et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado la respuesta termogénica frente al frío no está mediada únicamente por UCP1 sino que en ella también participa la creatina quinasa B (*creatine kinase B*, CKB), promoviéndose de este modo la disipación de energía inducida por frío (Rahbani et al., 2024).

Cuando los adipocitos son activados, la liberación de noradrenalina (NA) en las terminaciones nerviosas activan los receptores β -adrenérgicos (β -AR), que inervan al BAT. Estos receptores, en el caso del BAT, del subtipo β_3 (β_3 -AR), son receptores acoplados a proteínas G. Cuando son activados, la proteína G asociada activa el adenilato ciclasa (AC), aumentando así los niveles de AMP cíclico (AMPc). A su vez, el AMPc activa la proteína quinasa A (PKA), desencadenando la termogénesis y mediante la fosforilación y activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (*p38 mitogen-activated protein kinase*, MAPK) y el factor de transcripción CREB (*transcription factor CREB*) (Contreras et al., 2015; Tabuchi

& Sul, 2021). La respuesta aguda de PKA se caracteriza por un aumento de la lipólisis, generando un aumento en los ácidos grasos libres (AGL) en el citosol. Este proceso se lleva a cabo mediante la activación secuencial del triglicérido lipasa adiposa (*adipose triglyceride lipase*, ATGL), la lipasa sensible a hormonas (*Hormone-sensitive lipase*, HSL) y la monoacilglicerol lipasa (*Monoacylglycerol lipase*, MGL), las cuales hidrolizan secuencialmente los triglicéridos liberando ácidos grasos libres. Posteriormente, la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a) transporta los ácidos grasos libres unidos a coenzima A (FFA-CoA) a las mitocondrias, donde la oxidación de los ácidos grasos produce NADH y FADH que pasan a la cadena de transporte de electrones (Contreras et al., 2015; González-García et al., 2020; Seoane-Collazo et al., 2020; Tabuchi & Sul, 2021).

Además de esta regulación, PKA también ejerce un efecto a nivel transcripcional. En este sentido y como se comentaba previamente, PKA activa a p38/MAPK induciendo la transcripción de UCP1. Esto lo consigue a través de la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (*AMP response element-binding protein*, CREB), la activación del factor de transcripción 2 (*activating transcription factor 2*, ATF2) y el coactivador 1a del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1a*, PGC1 α) (W. Cao et al., 2004). Por un lado, p38 promueve la transcripción de PGC1 α mediante la fosforilación de ATF2 y CREB, que unen a homodímeros de elementos de respuesta a AMPc (CRE) en el promotor de PGC1 (W. Cao et al., 2004; Leiva et al., 2020). Además, p38 activa directamente a PGC1 α mediante fosforilación. Cuando es fosforilado, PGC1 α interactúa con diferentes dímeros de los receptores activados por el proliferador de peroxisoma alfa (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPAR α) y gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ), del receptor de retinoide X, del receptor de ácido retinoico y factores de transcripción del receptor tiroideo (Lowell & Spiegelman, 2000; Y. Zhang et al., 2016), regulando la transcripción de UCP1 además de la suya propia (Y. Zhang et al., 2016). Además de regular la expresión de PGC1 α , la fosforilación de ATF2 y CREB mediada por p38 también permite que estos factores de transcripción se unan a los sitios CRE en el promotor UCP1, aumentando la expresión de esta (W. Cao et al., 2004) (Figura 4).

Además de esta regulación a nivel transcripcional, la actividad de UCP1 está regulada por los nucleótidos de GDP y ADPN, y los ácidos grasos. En condiciones de reposo, estos nucleótidos se unen a UCP1, inhibiéndola. En cambio, en presencia de ácidos grasos, estos desplazan a GDP y ADPN aumentando la actividad de la UCP1 (Seoane-Collazo et al., 2020; Yoneshiro et al., 2020).

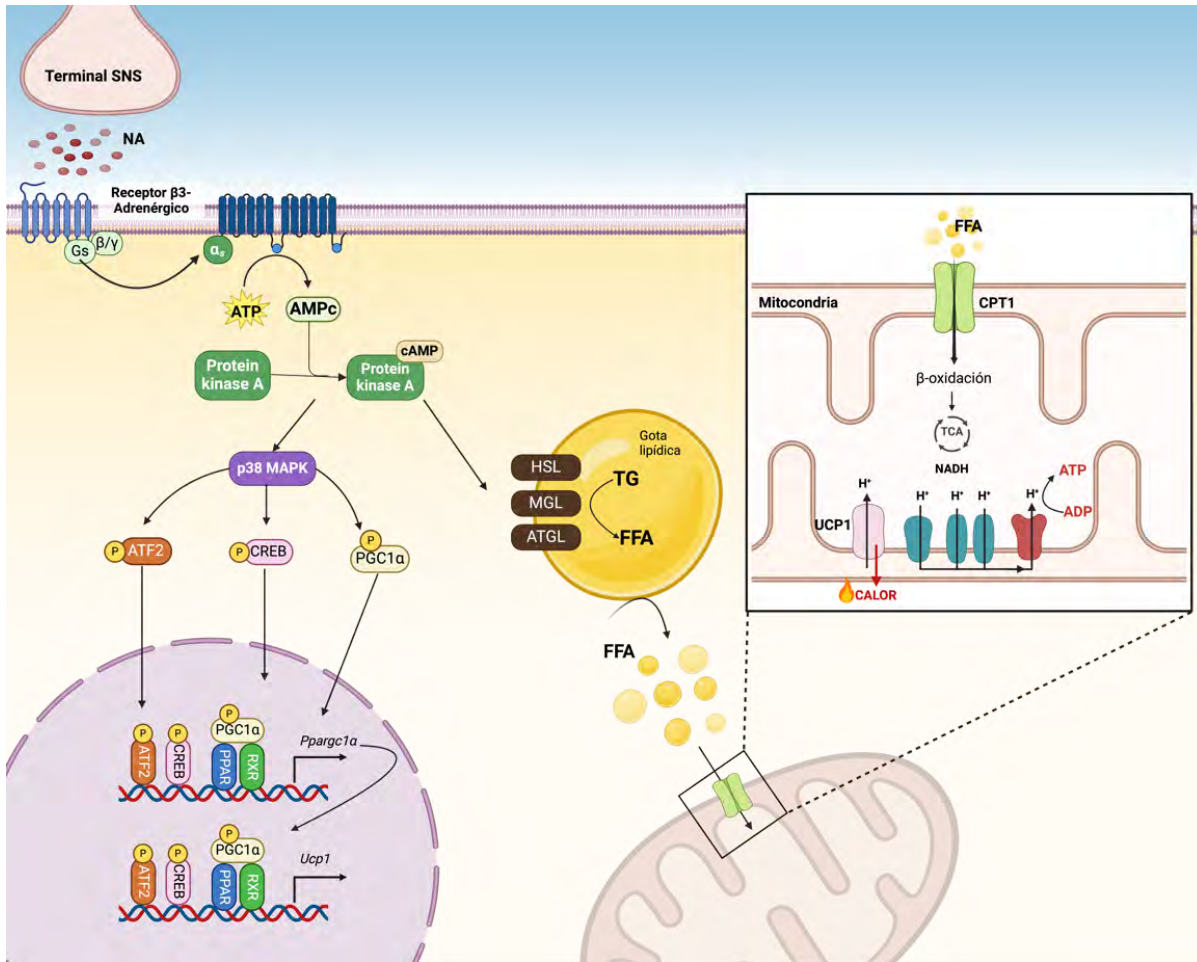


Figura 4. Mecanismo molecular de la termogénesis en el BAT. Creada con biorender.com.

Diversos estudios han demostrado la capacidad de las células progenitoras, así como de los adipocitos maduros, para diferenciarse a otros adipocitos que presenta similitudes con los adipocitos marrones (Machado et al., 2022). Durante este fenómeno, denominado pardeamiento del WAT o *browning*, los adipocitos del WAT muestran un mayor número de mitocondrias, un mayor gasto de energía y una mayor expresión de genes termogénicos, como PPAR α , PPAR γ , del dominio PR que contiene 16 (*PR domain containing 16*, PRDM16), coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PGC1 α), del efector A similar al factor de fragmentación del ADN que induce la muerte celular (*cell death activator CIDE-A*, CIDEA) y de UCP1 (Machado et al., 2022) (Figura 5). Este proceso de diferenciación se encuentra coordinado por los miembros de la familia de factores de transcripción c/EBP (*CCAAT-enhancer-binding proteins*, C/EBPs) y PPAR γ . Por un lado, la proteína de unión potenciadora de CCAAT- β (CEBP- β) y CEBP- δ forman un heterodímero que activa transcripcionalmente a PPAR γ . Tras su activación, PPAR γ activa la transcripción de CEBP- α y muchos otros genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, el almacenamiento de lípidos y el metabolismo de la glucosa (Rosen & MacDougald, 2006). Así mismo, PPAR γ se encuentra regulada por PRDM16 (Contreras et al., 2015). Esta coactivación de PPAR γ por PRDM16 es necesaria para la adipogénesis, donde PRDM16 induce la expresión de marcadores específicos para células de grasa parda como UCP1, PGC1, Elov13 y Cidea (Seale et al., 2011).

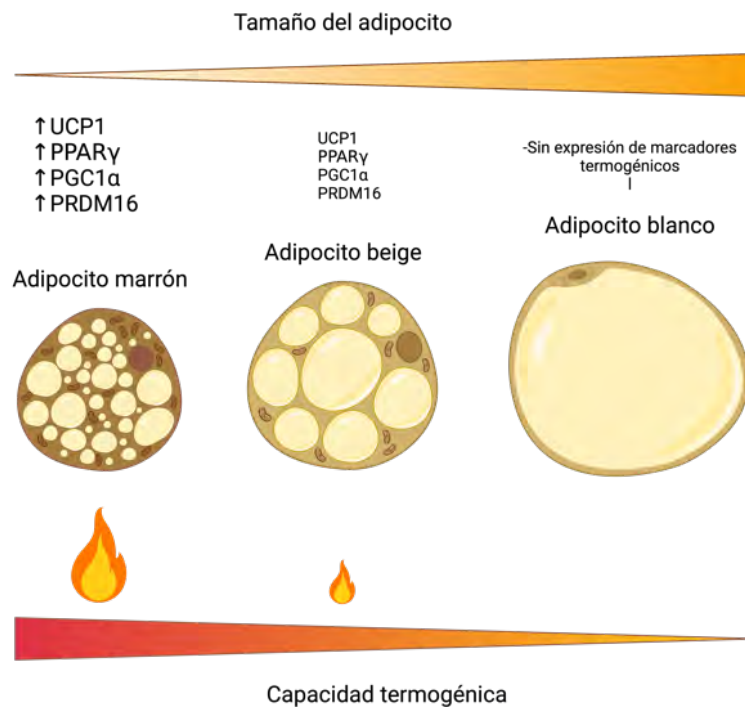


Figura 5. Diferencias en cuanto a la capacidad termogénica de los adipocitos marrones, beige y blancos. Creado con Biorender.com. Adaptado de Contreras, et. al., 2016)

En resumen, tanto la termogénesis en el BAT como el *browning* en el WAT se ven incrementados frente a ciertos estímulos como el frío, las hormonas tiroideas, la dieta, los péptidos natriuréticos, diversos fármacos y el ejercicio. Por lo tanto, dado que el balance energético total es el resultado de la contribución relativa de la ingesta y el gasto energético, la estimulación conjunta del BAT y el *browning* influye en el balance energético a largo plazo y, por ende, esto altera el peso corporal.

4. HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (THs), la tiroxina (3,3',5,5' tetrayodotiroxina o T4) y la triyodotironina (3,3',5-Triyodotironina, o T3) son hormonas derivadas del aminoácido tirosina, que ejercen un amplio espectro de funciones en el crecimiento, desarrollo neuronal, reproducción y regulación del metabolismo energético (Y. Wang et al., 2023). La síntesis de THs se produce a través de la yodación de los residuos de tirosina contenidos en una proteína de gran tamaño denominada tiroglobulina. Para ello, es necesaria la captación de yoduro por transporte activo a las células foliculares de la glándula tiroidea, la biosíntesis de la tiroglobulina, la oxidación del ión yoduro a yodo y su posterior unión a tiroglobulina y el acoplamiento oxidativo de dos yodotirosinas para formar yodotironinas. Tanto la síntesis como la posterior secreción de TH a la circulación sistémica está regulada por el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo (HPT). Desde el PVH se secreta la TRH, la cual estimula la liberación de

la hormona estimulante de la tiroides (*thyroid-stimulating hormone*, TSH) por la hipófisis anterior. Ésta, a su vez, estimula el crecimiento de las células foliculares tiroideas y la liberación a sangre de T3 y T4 (Brown et al., 2023). Por otro lado, las THs inhiben la síntesis y secreción de TRH y TSH regulando negativamente su propia producción (Brent, 2012; Mullur, Liu, & Brent, 2014) (Figura 6).

La hormona principal liberada por la glándula tiroides es la T4. En humanos aproximadamente el 80% de las THs secretadas es en forma de T4, mientras que T3 representa solo el 20% de las hormonas secretadas (Luiza Maia et al., 2005). La T4 presenta una menor actividad metabólica, por lo cual es necesario convertirla periféricamente a T3, la hormona más activa desde el punto de vista fisiológico (Brent, 2012; Cheng et al., 2010; Warner & Mittag, 2012). Esta última, tiene una afinidad cien veces mayor por los receptores de hormonas tiroideas (van der Spek et al., 2017). Este metabolismo adicional es llevado a cabo por un grupo de enzimas conocidas como desiodinasas. La desiodinización, implica la eliminación estereoespecífica de un átomo de yodo de la T4, T3 y/o sus metabolitos, y es catalizada por tres desiodinasas (DIOs) diferentes (Figura 9). Estas enzimas, incluyen a DIO1 (activadora o inhibidora) y DIO2 (activadora), así como DIO3 (inactivadora). Estas enzimas se expresan de manera ubicua y diferencial en todos los tejidos, tanto en desarrollo como en adultos (Mullur, Liu, & Brent, 2014).

Como se comentaba previamente la glándula tiroides secreta principalmente T4 y sólo cantidades reducidas de T3, siendo esta última generada principalmente por la desiodinación periférica del anillo externo a partir de T4. La conversión de T4 a T3 tiene lugar en tejidos periféricos, como el hígado, los riñones por acción de la D1. Por otro lado, la D2 es capaz de convertir T4 en T3 directamente en tejidos como el SNC, la hipófisis, el tejido adiposo y la placenta, permitiendo una regulación más localizada de la actividad tiroidea. La presencia de D2 en estos tejidos específicos sugiere una regulación finamente sintonizada de las respuestas tiroideas según las necesidades metabólicas locales. Finalmente, la D3, es la responsable de la conversión de T4 y T3 en formas inactivas, como la reverse T3 (rT3) y la 3,3'-diyodotironina (3,3'-T2) respectivamente y se expresa en SNS, placenta, piel e hígado (Arrojo E Drigo & Bianco, 2011).

Tanto la T3 como la T4 son hormonas altamente hidrofóbicas, por lo que circulan en forma de moléculas unidas a proteínas plasmáticas (por ejemplo, globulina fijadora de tiroxina, transtiretina y albúmina) (Norman & Henry, 2015) Haga clic o pulse aquí para escribir texto., y están en equilibrio con sus respectivas fracciones libres (entorno al 0,02-0,2%) (Norman & Henry, 2015), que son las únicas biológicamente activas (Mendoza & Hollenberg, 2017). A su vez, los receptores de hormonas tiroideas se encuentran en el interior de la célula, por lo que las TH necesitan transportadores específicos para poder acceder al interior de la célula (Mendoza & Hollenberg, 2017). Se conocen varios tipos de transportadores para estas hormonas, las proteínas de transporte de monocarboxiladas 8 y 10 (*monocarboxylate transporter*, MCT8 y MCT10), la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos 1 (*organic anion-transporting polypeptide*, OATP1) y el translocador de ácidos grasos 1 y 2 (*fatty acid translocase*, LAT1 y LAT2) (Mendoza & Hollenberg, 2017; Visser et al., 2008). Todos estos transportadores tienen otros ligandos, a diferencia de MCT8, que es específico de THs (Grijota-Martínez et al., 2020; Rodrigues et al., 2014; Thomas et al., 1234). Este transportador, tiene preferencia por T3, mientras que T4 y rT3 se transportan preferencialmente por OATP1C1 (Mendoza & Hollenberg, 2017).

En resumen, la acción de las THs no sólo depende de su tasa de secreción y niveles circulantes, sino también de una variedad de vías subsiguientes que rigen tanto su biodisponibilidad sérica como tisular específica, incluyendo la unión a proteínas séricas, la metabolización circulante y tisular (es decir, activación e inactivación), la actividad de los transportadores de membrana celular, la expresión tisular de isoformas TR y la actividad de correpresores y coactivadores transcripcionales (Brent, 2012; Mullur, Liu, & Brent, 2014).

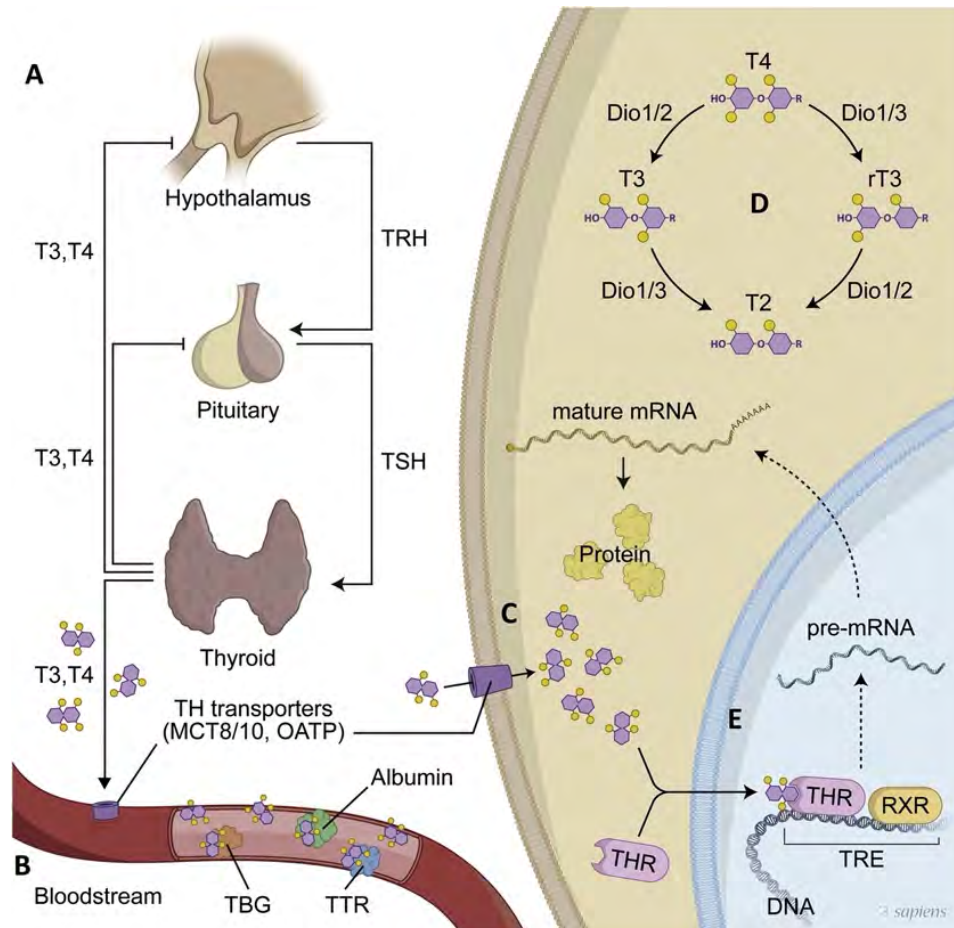


Figura 6. Representación gráfica del eje Hipotálamo-Hipofisario-Tiroideo (HPT), transporte sanguíneo de THs y acción de las THs en la célula diana. Reproducida con permiso de Creative Commons

4.1. RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS

Una vez en la célula, las TH ejercen sus efectos genómicos a través de la unión de la T3 a los receptores de hormonas tiroideas (TR). Estos receptores forman parte de la familia de receptores nucleares, como los receptores esteroideos, los del ácido retinoico y los de las vitaminas A y D (Kumar & Thompson, 1999), que están formados por diferentes dominios que permiten la fijación del ligando, la dimerización y la fijación al ADN.

Existen dos isoformas de los TR, TR α y TR β , que están codificados por los genes THRA y THRB, respectivamente. A su vez, los transcritos primarios de TR α y TR β generan por procesamiento alternativo numerosas isoformas, pero las mejor estudiadas son las isoformas TR α 1, TR β 1 y TR β 2 (Lazcano et al., 2019). Por un lado, el gen de TR α da lugar a 7 isoformas

diferentes, pero únicamente la isoforma TR α 1 es capaz de unirse al ligando (Flamant & Quignodon, 2008), mientras que las demás isoformas no se unen al ligando, pero mantienen capacidades de unión al ADN, a pesar de que su función no está todavía clara. Por otro lado, el gen THRA codifica a su vez dos receptores de localización mitocondrial: TR α -p43 y TR α -p28. TR α -p43 posee un sitio de unión al ADN y está implicado en la regulación del genoma mitocondrial. Sin embargo, la función exacta de TR α -p28 sigue siendo desconocida (Incerpi et al., 2018).

Los transcritos del gen THRB da lugar a tres isoformas del receptor (TR β 1-3). Las isoformas TR β 1 y TR β 2 se caracterizan por una región C-terminal conservada que incluye dominios de unión a ADN y ligando, pero difieren en las porciones N-terminales. Sin embargo, la isoforma TR β 3 es incapaz de unirse al DNA. Las TR β participan en la regulación de los niveles circulantes de T4 y T3, inhibiendo la expresión de los genes que codifican la TSH (Forrest et al., 1996).

Por tanto, las isoformas TR α 1, TR β 1 y TR β 2 son las isoformas capaces de unir la hormona y comparten la misma estructura con otros receptores nucleares. Los niveles de expresión de estos receptores varían según el tipo celular y la etapa de desarrollo, sugiriendo que pueden tener roles específicos dependiendo del tejido. Por ejemplo, TR α 1 se expresa de forma casi ubicua desde las primeras etapas del desarrollo, siendo su expresión mayor en el hueso, cerebro, intestino, corazón y musculo esquelético (Flamant & Gauthier, 2013; Ribeiro et al., 2010), mientras que los niveles de TR β 1 se expresan predominantemente en el hígado y riñón y la expresión de TR β 2 está restringida a la pituitaria y algunos tipos neuronales (Hodin et al., 1989; Lechan et al., 1994b; Wood et al., 1991).

4.2. ESTRUCTURA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS.

Los receptores de hormonas tiroideas pertenecen a la familia de los receptores nucleares. Al igual que otros receptores nucleares, presentan dominios característicos. Entre estos dominios destacan: una región A/B en el extremo N-terminal con un dominio de activación (AF-1), un dominio de unión al DNA (*DNA Binding Domaine*, DBD), una región bisagra (D) y una región conservada en el extremo C-terminal que contiene el dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domaine*, LBD) y un segundo dominio de activación (AF-2) (Bakker, 2004; Chen & Young, 2010; Fumel, 2011; Glass & Ogawa, 2006; Y. Wu et al., 2001) (Figura 7).

La región A/B es la que más variaciones presenta en cuanto a tamaño y secuencia. Esta región presenta una señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*, NLS) que es fundamental para internalización del receptor TR α 1 al núcleo (Giammanco et al., 2020a)(Giammanco et al., 2020b). Algunos estudios han demostrado que la capacidad de transcripción se pierde tras delecionar el extremo N-terminal de este dominio, sugiriendo la posible función como regulador de la interacción del TR con otras proteínas, como los factores de transcripción o los coactivadores (Bakker, 2004).

El dominio DBD, es la región más conservada de los receptores nucleares y, es el encargado de mediar las uniones a elementos de respuesta del ADN en regiones promotoras de genes diana (Glass & Ogawa, 2006). Esta región se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc

(Bakker, 2004; Giammanco et al., 2020a). El primer dedo de zinc es importante para la asociación o reconocimiento de los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE, *Thyroid hormone Response Element*). En cambio, el segundo dedo de zinc se encarga de estabilizar la dimerización del receptor (Bakker, 2004; Giammanco et al., 2020a). Este dominio, junto con el dominio A/B están relacionados con la interacción con los coactivadores (Bakker, 2004).

El dominio D, no está bien conservado a lo largo de todos los receptores y sirve de bisagra entre el dominio DBD y el dominio LBD. Esta región contiene un NLS tanto para TR α 1 como para TR β y, participa en las interacciones con los correpresores (Bakker, 2004; Giammanco et al., 2020a).

El dominio LBD es un dominio multifuncional, además de la unión a la hormona, media la homo y heterodimerización, la activación y represión transcripcional ligando-dependiente (Bakker, 2004). Este dominio, contiene un motivo C-terminal AF2 responsable de la activación transcripcional ligando-dependiente (Giammanco et al., 2020a). Tras la unión de la T3, la hélice 12 (compuesta por los aminoácidos finales del receptor) sufre un cambio conformacional y libera el correpresor permitiendo la unión de los coactivadores y la transcripción del gen diana (Bakker, 2004). Las mutaciones en este dominio dificultan la unión del receptor a T3 así como a correpresores, además de una actividad dominante negativa frente a otros receptores (Vlaeminck-Guillem et al., 2015).

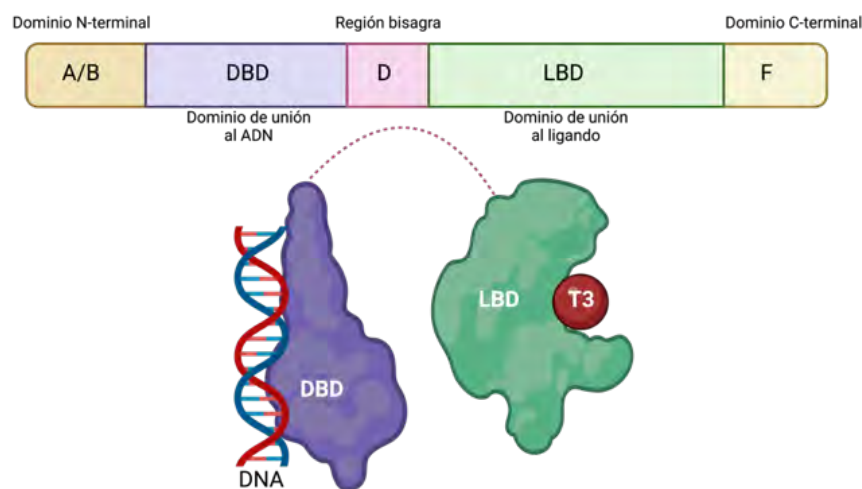


Figura 7. Estructura de los receptores de hormonas tiroideas. Creada con biorender.com.

En resumen, la activación de los receptores de hormonas tiroideas incrementa la actividad transcripcional de sus genes diana al unirse a secuencias repetidas en las regiones regulatorias del DNA conocidas como TREs que, generalmente se encuentran en las regiones 5'- de los genes diana (Y. Wu et al., 2001). Los TREs están, comúnmente, formados por dos o más regiones hexaméricas compuestas por repeticiones de la secuencia AGGTCA (Chatonnet et al., 2015; Paquette et al., 2014; Y. Wu et al., 2001). La unión a estos sitios ocurre mayormente como heterodímeros (Plateroti et al., 2020; Y. Wu et al., 2001) siendo la asociación más común, con el receptor de ácido retinoico RXR (Y. Wu et al., 2001). A diferencia de otros receptores

nucleares, los TRs interaccionan con los TREs incluso en ausencia de ligando. En presencia y ausencia de ligando, los heterodímeros de TR/RXR se unen a los TREs sobre promotores de genes diana (Chatonnet et al., 2015; Cheng et al., 2010; Giammanco et al., 2020b; van Gucht et al., 2017; Y. Wu et al., 2001) (Figura 11).

En ausencia de T3, el receptor de hormonas tiroideas se encuentra en forma de aporreceptor. El aporreceptor usualmente reprime la transcripción de los genes diana al asociarse a correpresores como el mediador de silenciamiento para receptor retinoico y tiroideo (*silencing mediator of retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor*, SMRT), el correpresor nuclear (*nuclear receptor co-repressor*, NcoR) y Alien (van Gucht et al., 2017), los cuales reclutan deacetilasas de histonas (como Sin3 y HDAC), manteniendo la cromatina en su estado compacto (Z. Sun et al., 2013; You et al., 2013). En cambio, cuando la T3 se une a la región LBD del TR, este último adopta la forma de un holoreceptor cambiando su conformación tridimensional y dando lugar a la disociación del correpresor y a la interacción con coactivadores, como el coactivador del receptor esteroideo 1 (*steroid receptor coactivator-1*, SRC-1), CBP, el coactivador de arginina metiltransferasa 1 asociada (*coactivator associated arginine methyltransferase 1*, CARM1) y la proteína arginina N-metiltransferasa 1 (proteína arginina N-methyltransferase 1, PRMT1) (Giannocco et al., 2021), que promueven la transcripción génica. A su vez, las hormonas tiroideas regulan a sus propios co-moduladores, aumentando la expresión de SMRT y disminuyen la de SRC-1. Por tanto, mediante el reclutamiento directo de otras proteínas o la generación de modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas, como la acetilación y la metilación, los coactivadores y los correpresores influyen en la tasa de iniciación de la transcripción de los genes diana (Glass & Rosenfeld, 2000).

Por otra parte, además de esta modulación de la transcripción génica mediada por TRs, la acción de TH también muestra una amplia gama de acciones no genómicas e independientes de su acción sobre TRs que tienen lugar fuera del núcleo (Giammanco et al., 2020a). Mientras que las acciones genómicas de las TH están mediadas por T3, los efectos no genómicos pueden ser provocados tanto por T3 como por T4 o, incluso, por los metabolitos de estas, como T2 (Incerpi et al., 2018) y se caracterizan por ser respuestas más rápidas que las genómicas puesto que no requieren ni de la transcripción de genes ni de la síntesis de proteínas (P. J. Davis et al., 2008, 2021; Incerpi et al., 2018). Las acciones no genómicas se inician o bien interactuando con una proteína de la superficie celular, la integrina $\alpha\beta3$, o con isoformas truncadas del receptor nuclear TR α en la membrana plasmática, en el citoplasma (P. J. Davis et al., 2002; Hammes & Davis, 2015) o en las mitocondrias (TR α -p43 y TR α -p28) (Hammes & Davis, 2015; Incerpi et al., 2018). También se ha identificado que son capaces de controlar las concentraciones plasmáticas de sales como el calcio, sodio o potasio actuando sobre la Ca²⁺-ATPasa (Senese et al., 2014) y la Na⁺/K⁺-ATPasa.

La integrina $\alpha\beta3$ se ha identificado como un receptor de membrana de TH que presenta dos dominios de unión. El dominio S1 reconoce exclusivamente a T3 y activa al fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (X. Cao et al., 2005; Senese et al., 2014), que media el tráfico de los TR α al núcleo (Incerpi et al., 2018). Se ha visto que la activación de PI3K, a su vez, regula la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en la membrana celular. En cambio, el dominio S2 es capaz de unir tanto T3 como a T4 y activa a MAPK1 y MAPK2 (Bergh et al., 2005; Senese et al., 2014; Y. C. S. H. Yang et al., 2021), que median la internalización de TR β desde el citosol al núcleo (Incerpi et al., 2018) (Figura 8).

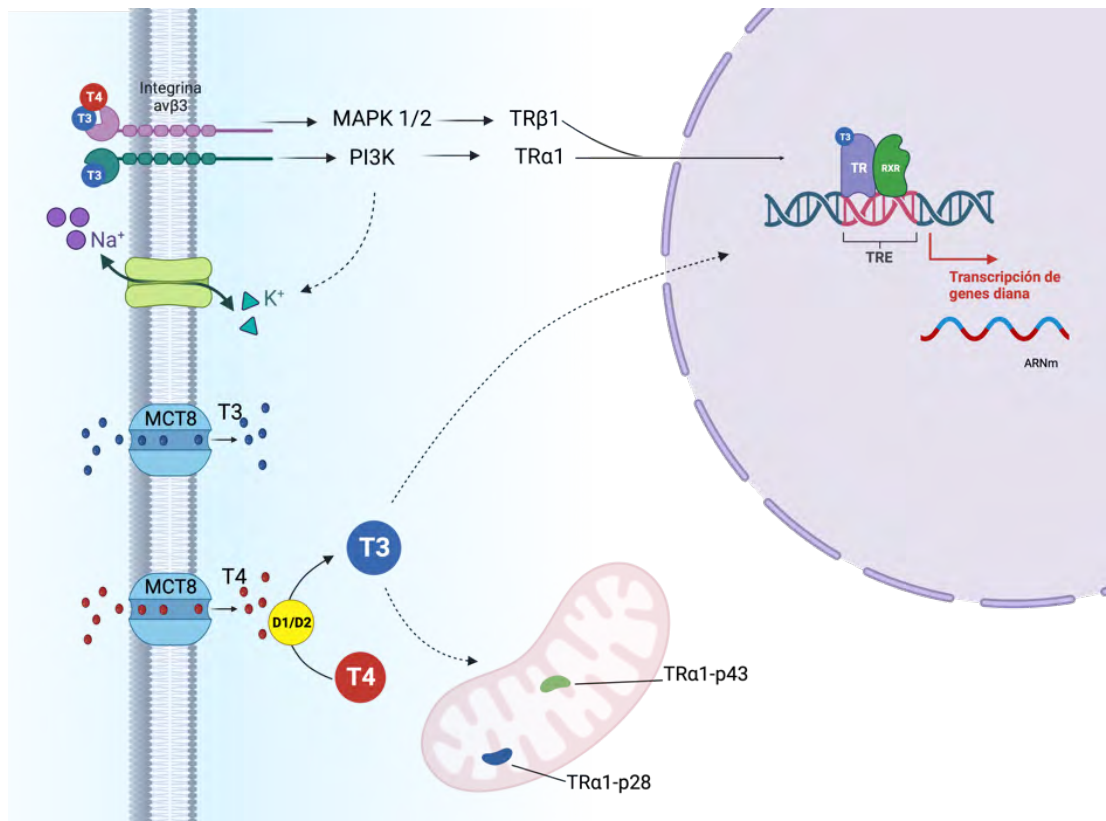


Figura 8. Efectos genómicos y no genómicos de las hormonas tiroideas. Creada con biorender.com.

4.3. MODIFICACIONES DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS.

El papel de los TR se ha puesto de manifiesto dado a que las mutaciones en los genes de TR causan el síndrome de resistencia a las hormonas tiroideas (*thyroid hormone resistance*, THR). EL THR es un síndrome genético en el que la sensibilidad de los tejidos a las hormonas tiroideas se ve disminuida, acompañado de altos niveles de hormonas tiroideas circulantes y niveles normales o elevados de TSH (Bernal, 2011). Según los genes TR mutados, el THR se clasifica como THR α y THR β (Refetoff & Dumitrescu, 2007). La resistencia a la hormona tiroidea beta (THR β) es un trastorno heredado de forma dominante debido a mutaciones THR β , que se caracteriza con niveles séricos elevados T4 o T3 y niveles normales o elevados de TSH (Singh & Yen, 2017). Los principales signos clínicos del THR β son bocio, baja estatura, trastorno de déficit de atención y taquicardia, a pesar de que algunos pacientes son asintomáticos (Beck-Peccoz et al., 1994; Refetoff et al., 2007). En seres humanos, estas mutaciones conducen a sobrepeso e hiperfagia a pesar de las características del hipertiroidismo, como la taquicardia y el aumento del gasto energético debido a las acciones de la T3 en los tejidos que responden al TR α (Mitchell et al., 2010). A pesar de que las mutaciones en el receptor beta están bien estudiadas, no fue hasta el año 2012 cuando se han descubierto las mutaciones sobre el receptor alfa de hormonas tiroideas. La THR α se caracteriza bioquímicamente por niveles elevados/altos-normales de T3 y bajos/bajos-normales de T4, dando lugar a una relación T4/T3 marcadamente reducida junto con niveles bajos de rT3 en algunos casos (Schoenmakers et al., 2013; Singh & Yen, 2017). Las características clínicas

incluyen facies dismórfica, displasia esquelética (macrocefalia, disgenesia epifisaria), retraso del crecimiento, estreñimiento, bradicardia, dispraxia y déficit intelectual (Schoenmakers et al., 2013). Además, los pacientes con $THRA$ presentan sobrepeso u obesidad con un gasto energético reducido (Bochukova et al., 2011).

Con el fin de comprender mejor estas mutaciones en humanos se han desarrollado varios modelos de ratones con mutaciones en los TR, bien mediante la delección del receptor (*knockout*, KO) o bien mediante la introducción de mutaciones (*knockin*, KI) que reproducen las observadas en humanos (Refetoff & Dumitrescu, 2007). Mientras que los fenotipos de los ratones *knockin* sugieren que las funciones de $TR\alpha 1$ y $TR\beta 1$ son distintas, los modelos *knockout* sugirieron una redundancia entre las funciones de estos dos receptores (Flamant et al., 2017), al aumentarse los genes diana regulados por el receptor restante (Taneja et al., 1996). La principal observación que respalda esta opinión ha sido la combinación del *knockout* de los receptores $TR\alpha$ y $TR\beta$, donde la desregulación de TSH y la reducción de la temperatura corporal eran máximas (Gauthier et al., 1999; Göthe et al., 1999).

Hasta la fecha, se han generado diversos modelos en los que se han noqueado al receptor beta de hormonas tiroideas. Pese a ser modelos aparentemente equivalentes, los constructos diferían en detalles que pudiendo tener consecuencias sutiles en los fenotipos observados (Flamant et al., 2017). En esta tesis cobra real importancia el modelo $Thrb^{tm1Mkni}$. El ratón $Thrb^{tm1Mkni}$, también conocido como $TR\beta^{lox}$, fue generado por recombinación homóloga, introduciendo dos sitios loxP 5' y 3' en el exón 5 (Winter et al., 2009a). Esto permite la delección del exón 5 mediante la recombinación por Cre. La delección de este exón introduce un desplazamiento de marco, de modo que el locus deleccionado tiene el potencial de codificar únicamente productos truncados, cuya homología se extiende al dominio de unión al ADN (aminoácido 178 de $TR\beta 1$) (Figura 9).

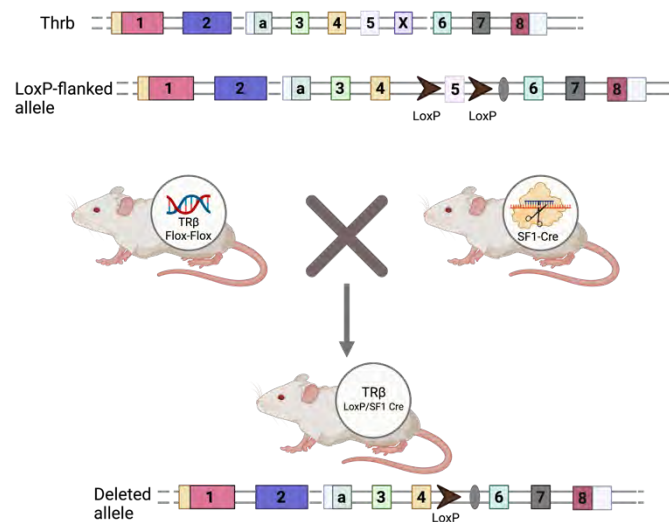


Figura 9. Diseño del alelo TRB KO y recombinación por Cre. Creada con biorender.com.

La situación de $THRA$ es diferente. Los *knockouts* revelaron que la estructura de $THRA$ es más compleja que el locus $THRB$, puesto que no sólo codifica para $TR\alpha 1$ sino también para los

productos de traducción alternativos de TR α 1 como son p43 y p30 que también unen T3 (Bigler et al., 1992) pero no son proteínas nucleares (Kalyanaraman et al., 2014). Por otro lado, el empalme alternativo también da lugar a TR α 2 (Hodin et al., 1990a) y TR α 3 (Mitsubishi et al., 1988). También se ha observado que los modelos *knockin* se asemejan más a las mutaciones observadas en humanos. Entre los modelos de animales KI para TR α se han observado diferencias notables (Mittag et al., 2010). Tres de estas mutaciones (L400R, P398H, PV) alteran la hélice 12 C-terminal requerida para el reclutamiento del coactivador. La cuarta mutación (R384C) también se localiza en el dominio de unión al ligando, pero su efecto es diferente puesto que no influye directamente en las interacciones proteína/proteína, pero reduce la afinidad de TR α 1 por T3. En este caso, los efectos causados por TR α 1R384C pueden atenuarse por un exceso de THs.

En esta tesis cobra vital importancia el modelo *knockin*: TR α 1^{L400R} (también conocido como TR α AMI). Éste se desarrolló sobre la base de la mutación artificial RTH β (TR β L454R), que previene la unión de coactivadores, pero preserva la interacción con los correpresores. La mutación se introdujo en el dominio AF2 del receptor TR α 1 de ratón convirtiendo una leucina en una arginina (L400R). Esta mutación impide la interacción entre AF2 y la región bisagra, permitiendo la unión a T3. Tanto en presencia como en ausencia de T3, el receptor mutado interacciona con el correpresor NcoR pero no con los coactivadores SRC1 o SRC2, ejerciendo una fuerte actividad dominante negativa. Esta mutación se introdujo entre dos casetes, el casete PGKNeoRpolyA y el casete IRES-Tau-LacZ. El casete PGKNeoRpolyA contiene una señal de poliadenilación del virus simio 40 (SV40), que impide la traducción de TR α 1L400R. Este casete, se encuentra flanqueado por dos secuencias loxP, por lo que tras la recombinación mediada por CRE permiten la síntesis de la TR α 1^{L400R} (Figura 10).

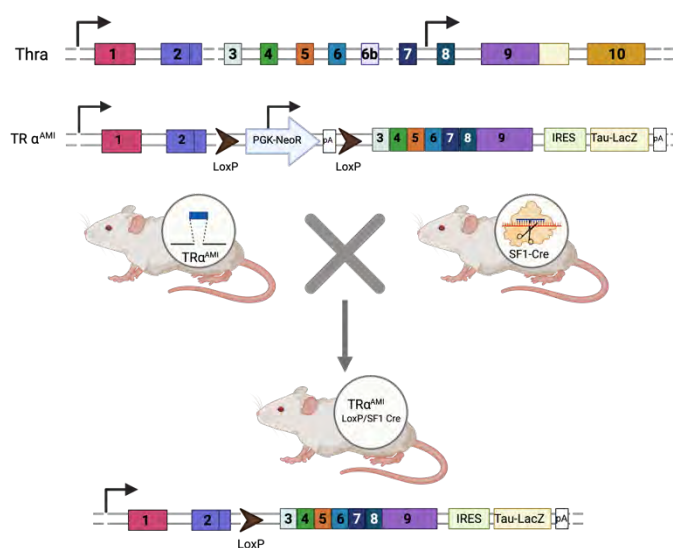


Figura 10. Diseño del alelo TR α AMI y recombinación por Cre. Creada con biorender.com.

4.4. PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL CEREBRO.

Las hormonas tiroideas ejercen un papel fundamental no solo en el desarrollo y diferenciación neuronal, sino también en el mantenimiento y la regulación funcional del sistema nervioso central (SNC) en el adulto (Wirth & Schweizer, 2014). Estas acciones a nivel central se encuentran reguladas por el transporte y metabolismo en este tejido. Para ejercer su acción en el cerebro, las THs han de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en un proceso facilitado por los transportadores MCT8, para la T4 y la T3, y el transportador OATP1C1, para la T4 (Bernal, 2007; Roberts et al., 2008), presentes en las células endoteliales de la BHE. La biodisponibilidad de las THs en el cerebro no está únicamente determinada por el transporte sino también por la producción de T3 y la degradación de T4 y T3 llevada a cabo por las deiodinasas. En este sentido, la T4 entra desde las células endoteliales de la BHE a los astrocitos a través de OATP1c1, donde es, posteriormente, convertida a T3 por Dio2 (Curcio-Morelli et al., 2003). Luego, la T3 generada en los astrocitos pasa a las neuronas mediante MCT8, LAT2 u otros transportadores, dónde, o bien ejerce su acción o es degradada por Dio3 (Freitas et al., 2010) (Figura 11). Esta deiodinasa es fundamental para la prevención de la acción excesiva de las THs en el cerebro (Bianco et al., 2002; Schroeder & Privalsky, 2014) (Figura 14). La Dio3 se expresa altamente en el cerebro adulto y en desarrollo (Hernandez, 2005) y se localiza predominantemente en las neuronas (Escámez et al., 1999; H. M. Tu et al., 1999). Además de su expresión en neuronas, también se observan niveles altos de expresión de Dio3 en el hipotálamo neonatal (Hernandez et al., 2006) y el área preóptica (Escámez et al., 1999), ambas regiones esenciales para la función neuroendocrina, los comportamientos sociales y la diferenciación sexual del cerebro.

Estudios recientes en ratones carentes de Dio3 (Dio3 KO), mostraron una función neuroendocrina anormal, que incluye la programación anormal del eje tiroideo (Hernandez et al., 2006) y el sistema de leptina y melanocortina (Z. Wu et al., 2017). Además, estos ratones también mostraron alteraciones en el comportamiento (Stohn et al., 2016, 2018) y una expresión alterada de oxitocina y vasopresina (Stohn et al., 2018). Por otro lado, la delección de Dio2, también ha mostrado cambios en el comportamiento de los animales (Bárez-López et al., 2017).

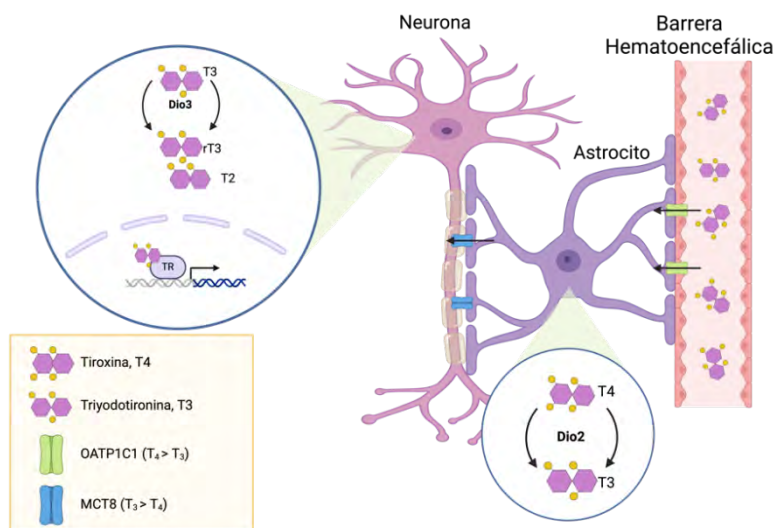


Figura 11. Metabolismo de las hormonas tiroideas en astrocitos y neuronas. Creada con biorender.com.

Las hormonas tiroideas, además sus acciones sobre el comportamiento, se sabe que ejercen un papel fundamental en el desarrollo y la maduración del cerebro. Durante el desarrollo, la función tiroidea fetal depende, especialmente al principio, del suministro de THs de la madre;

por lo tanto, cualquier alteración en el suministro materno de TH durante el embarazo causa alteraciones cerebrales irreversibles y retraso mental en humanos (Bernal, 2005). La deficiencia de THs durante etapas tempranas del desarrollo causan defectos específicos en la migración y diferenciación celular de las células granulares del cerebelo (Oppenheimer & Schwartz, 1997). En esta etapa, las células proliferantes de la capa granular externa (EGL) migran hacia la capa interna, diferenciándose a células maduras durante el proceso y estableciendo contactos con las células de Purkinje (Legrand, 1979; Nicholson & Altman, 1972; Rabié & Legrand, 1973). En el cerebro hipotiroideo, este proceso de migración y diferenciación es más largo, alterando el establecimiento de los contactos sinápticos entre las células granulares y las células de Purkinje (Legrand, 1979; Nicholson & Altman, 1972; Rabié & Legrand, 1973). Otro defecto en el cerebro neonatal hipotiroideo es la reducción de la mielinización. La mielina es una estructura multilaminar producida por oligodendrocitos que rodea y sostiene a los axones facilitando la conducción de los impulsos nerviosos. Por tanto, la reducción de la mielinización puede tener efectos marcados sobre la conectividad neuronal y el establecimiento de redes neuronales. Los estados hipotiroideos conducen a una disminución de la mielinización, debido a un retraso en la diferenciación de los oligodendrocitos (Barres et al., 1994; Johe et al., 1996).

Estas acciones están mediadas por la acción de las THs sobre sus receptores nucleares, al igual que en otros tejidos. Ambos subtipos de TR ($TR\alpha$ y $TR\beta$) tienen una distribución diferente en el cerebro. El patrón de expresión de estos receptores también difiere según la etapa del desarrollo. Mientras que $TR\alpha 1$ es la isoforma dominante durante etapas tempranas de la gestación, su expresión disminuye durante el desarrollo cerebral (Hodin et al., 1990b). En cambio, $TR\beta 1$ se expresa en etapas posteriores del desarrollo cerebral y, los niveles de ARNm de $TR\beta 1$ no disminuyen durante la gestación (Bradley et al., 1992; Hodin et al., 1990b). El análisis de cerebro de ratón reveló que la expresión de $TR\alpha 1$ alcanza su punto máximo en el cerebelo, la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado y el bulbo olfatorio en las tres primeras semanas de vida y disminuye en la edad adulta (Bernal, 2007; Keijzer et al., 2007; Mellström et al., 1991). Además, el análisis de ratones $TR\alpha 1$ -GFP confirmó la presencia de $TR\alpha 1$ en prácticamente todas las neuronas del cerebro adulto, siendo su expresión predominante sobre $TR\beta$ (H. L. Schwartz et al., 1992; Wallis et al., 2010). En cambio, la expresión de $TR\beta 1$ alcanza su punto máximo en la corteza cerebral posnatal temprana, el hipocampo, el cuerpo estriado y el bulbo olfatorio y se estabiliza en la edad adulta (Bernal, 2007; Keijzer et al., 2007; Mellström et al., 1991). $TR\beta 2$, por el contrario, está presente en el núcleo hipotalámico paraventricular y en la hipófisis y, por tanto, está implicado en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Lechan et al., 1994a).

La expresión de los TR también se ha demostrado en el hipotálamo. A este nivel, se ha observado que los núcleos PVH, VMH y ARC, son sensibles a las THs y, los efectos de estas hormonas sobre ellos regulan la ingesta y el gasto energético. Los cambios en el estado tiroideo se han relacionado con alteraciones en los patrones de alimentación (López et al., 2007; Pijl et al., 2001), caracterizándose el hipertiroidismo normalmente por hiperfagia y el hipotiroidismo por una reducción general del apetito y de la ingesta de alimentos (González et al., 2012; López et al., 2001; Pijl et al., 2001). Se ha demostrado que las THs en el ARC inducen un aumento de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY, así como una disminución de POMC (Ishii et al., 2003; Varela et al., 2012). Estos cambios en la expresión de neuropéptidos en el ARC están mediados por un complejo mecanismo molecular en el que intervienen varias dianas moleculares de THs, como Dio2 (Coppola et al., 2005), la proteína de desacoplamiento 2 (UCP2) (Andrews et al., 2008; López et al., 2013) y la diana de rapamicina en células de

mamífero (mTOR, *Mammalian Target of Rapamycin*) (P. Martínez de Morentin et al., 2014; Varela et al., 2012). mTOR es una serina-treonina quinasa conservada evolutivamente que modula la progresión y el crecimiento del ciclo celular al detectar cambios en el equilibrio energético, los factores de crecimiento, los nutrientes y el oxígeno (Catania et al., 2011; Martínez De Morentin et al., 2014). Resultados de nuestro grupo han demostrado que la hiperfagia producida por el estado hipertiroideo está regulada por la activación de mTOR en el núcleo ARC, donde se colocaliza con TR α . Al administrar inhibidores de mTOR se revierte la hiperfagia inducida por el hipertiroidismo, respuesta debida a un equilibrio en la expresión de AgRP y NPY en el ARC (López et al., 2013; Varela et al., 2012).

Por otro lado, el VMH se ha establecido como una región crítica para la acción de las THs (López et al., 2010). Datos de nuestro grupo han evidenciado que la T3 actúa en el VMH regulando la termogénesis en el BAT y el *browning* del WAT (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Martínez-Sánchez et al., 2017). En este núcleo hipotalámico, la T3 inhibe la ruta de señalización de AMPK actuando en una población neuronal específica del VMH, las neuronas SF1 (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). La inhibición de la AMPK hipotalámica y sus efectos sobre sus dianas lipogénicas descendentes, es decir, ACC, FAS y CPT1, aumenta la lipogénesis *de novo* local, incluidos los niveles de malonil-CoA y especies lipídicas complejas, lo que a su vez conduce a la activación del SNS y a la inducción de la termogénesis en el BAT (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Esto se ha evidenciado 1) inhibiendo la señalización de THs en el VMH, mediante la inyección de adenovirus portadores de un receptor de hormonas tiroideas dominante negativo, que revierte los efectos de la administración central de hormonas tiroideas (López et al., 2010, 2013; Sentis et al., 2024); 2) el mismo efecto se obtiene tras el tratamiento estereotáxico con adenovirus que albergan isoformas constitutivamente activas de AMPK (AMPK-CA), que reducen la activación del BAT previniendo la pérdida de peso asociada al hipertiroidismo sin aumento de la ingesta; y 3) la ablación específica en las neuronas SF1 de la isoforma AMPK α 1 recapitula totalmente los efectos centrales de la T3 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Además de sus efectos sobre la termogénesis y el *browning* del WAT, en 2017 Martínez-Sánchez, et al. demostraron que la inhibición de AMPK en las neuronas SF1 del VMH por T3, induce un aumento de la quinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1), provocando un aumento de la tasa lipogénica en el hígado a través del SNPS (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017).

4.5. PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO.

Las TH regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos, como el crecimiento, el desarrollo y la tasa metabólica (Brent, 2012; Lage et al., 2008; López et al., 2013; Mullur, Liu, & Brent, 2014). La relación de las TH con el balance energético está ampliamente estudiada. Se conoce que las THs son capaces de mantener la tasa metabólica basal, regulan la termogénesis adaptativa, regulan también el apetito y la ingesta de alimento y, por ende, regulan el peso corporal (Brent, 2012; Lage et al., 2008; López et al., 2013; Mullur, Liu, & Brent, 2014). La desregulación del eje tiroideo provoca una marcada alteración en el balance energético, esto se ha visto ejemplificado en pacientes con disfunciones tiroideas dando lugar al hipotiroidismo e hipertiroidismo (Lage et al., 2008; López et al., 2013). En el caso de un exceso de producción

de .hormonas tiroideas o hipertiroidismo, se produce un aumento del consumo de oxígeno y la temperatura corporal, dando lugar a un incremento en el metabolismo, pérdida de peso, aumento de la ingesta y taquicardia (Lage et al., 2008; López et al., 2013). Por otro lado, una reducción de los niveles de TH o hipotiroidismo se asocia a una reducción de la tasa metabólica basal, aumento de peso, hipercolesterolemia, reducción de la lipólisis y reducción de la gluconeogénesis, así como una elevada sensibilidad al frío (Lage et al., 2008; López et al., 2013; Warner & Mittag, 2012). Esta regulación del balance energético por las THs se realiza tanto a nivel central como periférico (Brent, 2012; Lage et al., 2008; López et al., 2013; Mullur, Liu, & Brent, 2014).

4.5.1. Papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la termogénesis.

Como ya se ha expuesto anteriormente, el tejido adiposo marrón es una de las dianas directas de las hormonas tiroideas, y es bien conocido el papel que ejercen estas hormonas en la regulación de la termogénesis obligatoria y adaptativa aumentando la tasa metabólica de sus tejidos diana (Bianco & McAninch, 2013; Silva, 2003; Yau & Yen, 2020b). Estos efectos sobre el BAT pueden ejercerse tanto a nivel central como localmente el tejido adiposo marrón y blanco. En el BAT se expresa la Dio2, que cataliza la conversión intracelular de T4 en T3 (Silva, 2003). Durante la exposición al frío, se produce una inducción noradrenérgica de Dio2, que conduce a un aumento de la T3 intracelular que estimula de la expresión de *Ucp1* y, consecuentemente se produce un aumento de la respiración mitocondrial y a la generación de calor. Además, la exposición a frío también incrementa los niveles sistémicos de THs, lo que sugiere que la inducción de Dio2 en el BAT puede tener algunos efectos mediados por la T3 a nivel sistémico (Fernandez et al., 1987; Silva & Larsen, 1983). Además de sus efectos sobre el BAT, durante la exposición al frío se induce fuertemente la expresión y actividad de Dio2 en el WAT, lo cual conllevará al *browning* y a una mayor capacidad termogénica de este tejido (K. Krause, 2020).

Las hormonas tiroideas aumentan la capacidad termogénica tanto del BAT como del WAT mediante la inducción de la expresión de *Ucp1* (Bianco & McAninch, 2013)(Silva, 2005; Yau & Yen, 2020b) y la biogénesis mitocondrial, mediante la inducción de PGC1 α y Nrf1. Además, PGC1 α es un coactivador transcripcional de los receptores de hormonas tiroideas y está regulado por un circuito de alimentación que amplifica aún más los efectos de T3 sobre la expresión génica (Puigserver et al., 1998). Además de estos efectos, las THs estimulan la lipólisis del WAT y BAT mediante la inducción de ATGL y HSL, favoreciendo la movilización de ácidos grasos desde el WAT al BAT y ser utilizados como fuel en la termogénesis. Así mismo, las THs estimulan la expresión de genes involucrados en la β -oxidación de ácidos grasos (Cpt1b, Acs11) en el BAT (Yau et al., 2019).

Al igual que en otros tejidos, la regulación de la transcripción de genes termogénicos a través de las THs se lleva a cabo a través de sus receptores nucleares. Tanto los adipocitos marrones como blancos expresan una elevada cantidad tanto de TRs. Sin embargo, parece que TR α puede desempeñar un papel más predominante en la termogénesis obligatoria y la respuesta simpática, mientras que TR β puede desempeñar un papel más importante en la estimulación de la expresión de *Ucp1* en el BAT (Bianco et al., 1988; Ribeiro et al., 2001, 2010; Yau & Yen, 2020b).

4.5.2. Papel de las hormonas tiroideas en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico.

En el estado hipermetabólico inducido por el hipertiroidismo se produce un aumento de la demanda de glucosa, lo que conduce a una mayor tasa de su producción endógena, que no responde a los efectos supresores de la insulina (López et al., 2013; Mitrou et al., 2010). El cambio inducido por las THs en el metabolismo de la glucosa corporal es complejo e implica varias vías en diferentes órganos metabólicamente activos: 1) promueven la absorción intestinal de glucosa y la captación de glucosa por parte del BAT y el músculo; 2) influyen en la síntesis de glucógeno hepático y la glucogenólisis; 3) modulan la capacidad de respuesta del hígado, WAT y músculo a otras hormonas como la insulina y las catecolaminas; y 4) aumentan la degradación de la insulina en pacientes con hipertiroidismo (López et al., 2013).

En el hígado, las THs inducen la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis tanto directamente, a través de la activación de los TRs hepáticos, como indirectamente, mediante el aumento de la secreción pancreática y suprarrenal de glucagón y adrenalina respectivamente (Mitrou et al., 2010). Además de la producción de glucosa, los THs también regulan el metabolismo lipídico hepático, y ambos procesos están estrechamente interconectados.

A pesar de que la variante más prevalente del TR en el hígado es el TR β , la regulación de la metabolización lipídica por THs depende de la acción coordinada y diferenciada tanto del TR α como del TR β (Sinha et al., 2018). De hecho, los ratones que presentan una mutación dominante negativa en el TR β exhiben una acumulación acelerada de lípidos en el hígado, desarrollando esteatosis hepática temprana. Esto se debe a un incremento en la señalización de PPAR γ y a una disminución en la β -oxidación de ácidos grasos, la cual es dependiente de THs (Araki et al., 2009). Por otro lado, los ratones con inhibición de la señalización de TR α muestran una disminución en el peso del hígado y una acumulación de lípidos, resultado de una reducción en la lipogénesis (Araki et al., 2009).

En tejidos como el hígado y el hipotálamo, a nivel celular, la acción de las THs incluye 1) el aumento de la transcripción de varios genes lipogénicos clave, como *Acc1* y *Fasn*; 2) la modulación de la actividad de otros factores de transcripción, como SREBP1C, los receptores X hepáticos (LXRs) y la proteína de unión a elementos sensibles a carbohidratos (ChREBP) 3) la reducción de la fosforilación de la AMPK y ACC y el aumento simultáneo de la actividad de FAS (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Sinha et al., 2018). Por último, además de inducir la lipogénesis, los THs modulan otras vías metabólicas hepáticas relacionadas con los lípidos, como la síntesis de colesterol, el transporte inverso de colesterol y la cetogénesis (Sinha et al., 2018).

Además de los efectos locales de las THs sobre el metabolismo hepático de la glucosa, las hormonas tiroideas regulan la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina a través del SNS desde el PVH (Fliers et al., 2010; Klieverik et al., 2008, 2009). El estado hipertiroides provoca la liberación de glucosa por parte del hígado y la ablación del SNS contribuye a la reducción de la producción de la glucosa hepática. Sin embargo, la parasimpatectomía parece alterar más bien la sensibilidad a insulina. Todo este proceso se puede observar también al inyectar T3 en el PVH, el núcleo donde se produce la TRH, ya que esta administración central

requiere de un SNS intacto para que el eje PVH- hígado pueda controlar la liberación de glucosa (Klieverik et al., 2009).

HIPÓTESIS

5. HIPÓTESIS

Las evidencias actuales de nuestro grupo han demostrado como la inhibición selectiva de la subunidad AMPK α 1 en las neuronas SF1, bien a través de su ablación genética, mediante la administración de vesículas extracelulares o mediante la administración de hormonas tiroideas, conlleva un aumento del gasto energético y la termogénesis, protegiendo a los animales frente al desarrollo de obesidad inducida por dieta. Las hormonas tiroideas ejercen sus efectos a través de sus receptores nucleares (TR α y TR β), sin embargo, hasta la fecha se desconocía cuál de los dos era el responsable de los efectos termogénicos de las hormonas tiroideas a nivel central. En esta tesis se hipotetizó que, dada a la mayor expresión de TR α frente a TR β en el cerebro, fuese el receptor TR α en las neuronas SF1 el encargado ejercer los efectos de las hormonas tiroideas sobre la termogénesis del BAT.

OBJETIVOS

6. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral fueron:

1. Estudiar el fenotipo metabólico de ratones que expresan una mutación dominante negativa de TR α en neuronas SF1 bajo condiciones de dieta estándar o de dieta alta en grasa.
2. Estudiar el fenotipo metabólico de ratones TR β 1 knock-out en neuronas SF1 bajo condiciones de dieta estándar o de dieta alta en grasa.
3. Estudiar el fenotipo metabólico de ratones que combinan la expresión de una mutación dominante negativa de TR α y la delección del TR β 1 en neuronas SF1 bajo condiciones de dieta estándar o de dieta alta en grasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. LEGISLACIÓN

Durante la elaboración de esta tesis doctoral, los métodos experimentales y los procedimientos de manipulación de animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela, con el número de procedimiento ID 15012/2020/010. Miguel Antonio López Pérez fue designado como responsable final, y previamente, estos protocolos fueron aprobados 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, entidad competente para emitir dicha autorización.

Asimismo, se garantizó el cumplimiento de la legislación vigente, en particular:

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

Se prestó especial atención al cumplimiento del artículo 4 del Real Decreto 53/2013, que se refiere al principio de reemplazo, reducción y refinamiento. El objetivo final fue asegurar el uso mínimo de animales en los procedimientos, evitando la duplicación innecesaria de experimentos y reduciendo el número de animales en cada grupo experimental sin comprometer los objetivos del estudio. Además, se fomentó el bienestar animal, buscando reducir al máximo el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en los animales.

8. MODELOS ANIMALES

En la realización de esta tesis se han utilizado 3 modelos animales:

- Ratones con una isoforma dominante negativa de TR α 1 en las neuronas SF1: TR α AMI; SF1-Cre.
- Ratones *knockout* para la isoforma TR β 1 en las neuronas SF1: TR β 1^{KO}; SF1-Cre
- Ratones con la isoforma dominante negativa de TR α 1 y una delección de TR β 1 en las neuronas SF1: TR α AMI; TR β 1^{KO}; SF1-Cre.

Los animales fueron alojados en condiciones ambientales estables, manteniendo una temperatura constante de 21±2°C y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (de 8:00 a 20:00 horas). Se les proporcionó un período de adaptación de aproximadamente 7 días antes de realizar cualquier procedimiento. A lo largo de este periodo, los animales tuvieron acceso libre a una 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 agua, a menos que se indicara lo contrario en procedimientos experimentales específicos.

Para asegurar el bienestar adecuado de los animales, se llevó a cabo un monitoreo regular que incluyó el seguimiento controlado de su masa corporal e ingesta. La forma de alojamiento de los animales ya sea en grupo o de forma individual, se determinó según las características de cada procedimiento, siempre teniendo en cuenta el comportamiento social de los animales. En la mayoría de los experimentos que requerían un seguimiento de masa corporal o ingesta, se optó por el alojamiento individual, aunque nunca por periodos que excedieran los 10 días.

9. ANALGESIA Y ANESTESIA

Previo a cualquier procedimiento quirúrgico, a los ratones se les suministró anestesia general a través de una inyección intraperitoneal (IP). La dosis administrada fue de 100 μ l/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.

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.

10. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

10.1. VÍA INTRAPERITONEAL

Esta ruta se empleó para la administración de la anestesia (detalles de la dosis en la sección anterior) y otros compuestos como glucosa e insulina. La administración intraperitoneal se lleva a cabo en la región ventro-caudal del ratón, debajo del peritoneo. El animal se asegura sujetándolo por la espalda y aplicando una ligera presión en las extremidades anteriores para inmovilizarlo. La cabeza del animal se inclina ligeramente hacia abajo para reducir el riesgo de

desgarros en las vísceras, y la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, *BD Medical Surgical Systems*) se introduce en el costado derecho del animal en un ángulo aproximado de 45 grados respecto al vientre, acoplada a una jeringa (1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, *BD Medical Surgical Systems*).

10.2. VÍA SUBCUNTÁNEA

Esta forma de administración no necesita anestesia y se realiza en la zona lateral dorsocaudal del animal. Se procede pellizcando la piel en la parte superior del lomo del animal y, al mismo tiempo, inmovilizándolo con la misma mano. Con la otra mano, se introduce la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, *BD Medical Surgical Systems*) conectada a una jeringa (1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, *BD Medical Surgical Systems*) de manera paralela a la columna vertebral.

10.3. VÍA NÚCLEO ESPECÍFICA O ESTEREOTAXIA

Para esta vía de administración, es necesario anestesiarse al animal de manera general. En este contexto, la administración se lleva a cabo de forma bilateral en distintos núcleos hipotalámicos, utilizando coordenadas específicas para cada núcleo. Se emplean coordenadas estereotáxicas anteroposteriores (AP), laterales (L) y dorsoventrales (DV), siendo el bregma el punto de referencia principal. Estas coordenadas se eligen siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico de cerebro de rata y ratón (Franklin & Paxinos, 2019). Para el VMH objeto de estudio, las coordenadas fueron las siguientes: -1,7 mm AP; $\pm 0,5$ mm L; -5,5 mm DV.

Después de anestesiarse al animal, se realiza la inoculación de la sustancia de interés utilizando un aparato de estereotaxia (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) (se detalla más en Procedimientos quirúrgicos) y jeringuillas de microinyección (Hamilton, NeuroHamilton Modelo 7001KH Neuro Syringe). El flujo de inyección es de 200 nl/min durante 10 minutos en el caso de ratones.

11. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

11.1. GENERACIONES DE RATONES

Para generar los ratones *knockin* (KI) de TR α 1 específico en las neuronas positivas para SF1 (TR α AMI-SF1), se cruzaron ratones SF1-Cre (Tg(Nr5a1-cre)^{Lowl/J}, número de stock 012462; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) con ratones TR α AMI (Thra^{tm1Ffla}, proporcionados por el profesor Frédéric Flamant, Institut de Genomique Fonctionnelle de Lyon) caracterizados por Quignodon et al. (Quignodon et al., 2007). Se estableció la línea con animales heterocigóticos TR α AMI-SF1 Cre⁺ y TR α AMI-SF1 Cre⁻ heterocigóticos que se utilizaron como controles.

Los ratones SF1-Cre, expresan la Cre recombinasa bajo la dirección del promotor de ratón del receptor nuclear subfamilia5, grupo A, miembro 1 (*Nr5a1*, *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*). El patrón de actividad de la Cre recombinasa, en estos ratones, imita el patrón endógeno de expresión génica (mRNA) y es detectado en neuronas positivas para SF1 en el núcleo VMH, así como en la hipófisis, gónadas y tejido adrenal. Para ello se emplearon animales homocigotos de esta cepa. Al cruzar estos ratones con los TR α AMI (que presentan una mutación en la región AF2 inducible) se elimina el casete PGK-NeoR-pA mediante recombinación Cre/loxP y desencadena la expresión de TR α 1^{L400R} (Flamant et al., 2017; Markossian et al., 2018; Picou et al., 2012) (Figura 12). La expresión de la proteína TR α 1^{L400R} no es capaz de activar la transcripción cuando se une el ligando, ejerciendo un fuerte efecto dominante negativo sobre la activación transcripcional mediada por el receptor TR α 1.

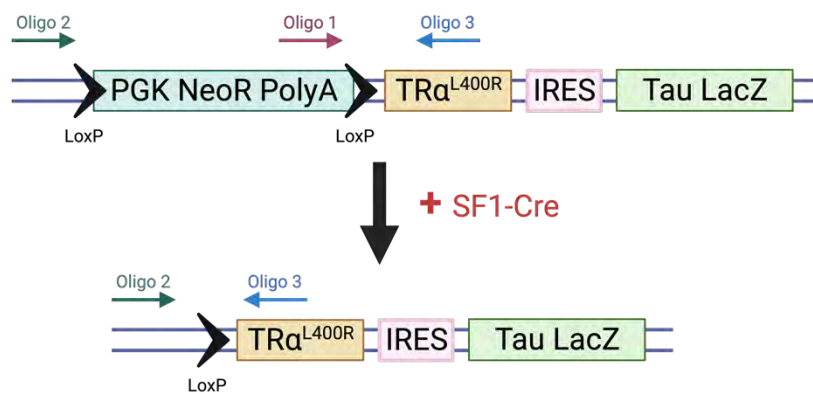


Figura 12. Representación gráfica del constructo de TR α AMI antes y después de la recombinación por Cre y lugares de recombinación de los cebadores utilizados para el genotipado.

En el caso de los ratones *knockout* (KO) para la isoforma TR β 1, se cruzaron ratones los ratones homocigotos TR β 1^{lox} caracterizados por Winter et al. (Selmi-Ruby et al., 2014; Winter et al., 2009b) (*Thrb*^{tm1Mkni}, cedidos por Karine Gauthier, Institut de Genomique Fonctionnelle de Lyon) con los ratones SF1-Cre (*Tg(Nr5a1cre)Low1/J*) (Figura 13).

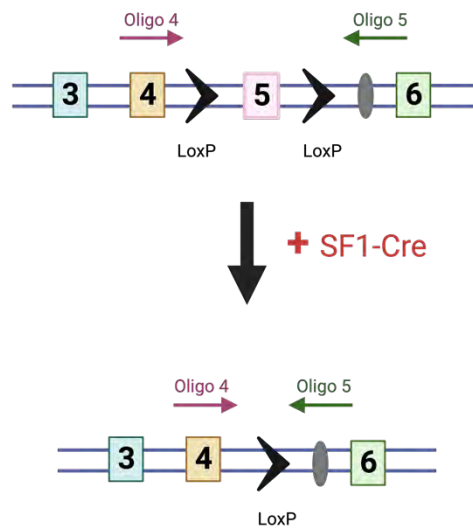


Figura 13. Representación gráfica del constructo de TR β^{KO} antes y después de la recombinação por Cre y lugares de recombinação utilizados para el genotipado.

Para generar el tercer modelo animal, los TR α AMI; TR β^{KO} - SF1, se cruzaron primero los ratones TR α AMI y TR β^{lox} , para posteriormente cruzarlos con ratones SF1-Cre.

11.2. 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 y hasta la semana 20 de vida. Para el control de la ingesta, los ratones se estabularon individualmente durante la semana 12-14 de vida y la ingesta se midió diariamente durante 4-5 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 15:00 y las 17:00 horas).

11.3. MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Para ahondar en el análisis de los componentes del balance energético y del metabolismo se utilizó un sistema de calorimetría indirecta. 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). La calorimetría indirecta es capaz de medir el volumen de O₂ inspirado (VO₂) y el CO₂ (VCO₂) expirado para calcular el gasto energético en reposo (GER) y el coeficiente respiratorio (RQ). Este cálculo se realiza mediante la ecuación de Weir donde GER = (3,9 x VO₂ + 1,1 x VCO₂) x 1,44 y RQ = VO₂/VCO₂. Este último coeficiente refleja la proporción de

oxidación de carbohidratos y grasas; un rango de 0,7 a 0,8 corresponde a una dieta rica en carbohidratos, mientras que un rango de 0,9 a 1 corresponde a una dieta rica en grasas.

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.

11.4. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Para el análisis de la composición corporal se hizo con un sistema de resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (*Whole Body Composition Analyzer*; EchoMRI; Houston, TX, EEUU). Con esta técnica se analiza la composición corporal del animal, calculando la cantidad de masa grasa y magra del animal. Para este procedimiento no es necesario anestesiarse al animal, que se introduce en un adaptador de su tamaño.

11.5. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL Y DEL BAT

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. Por otro lado, para la medición de la temperatura del BAT se sacaron imágenes del área interescapular de los animales previamente afeitada, con una cámara infrarroja (B335: *Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera*; FLIR; West Malling, Kent, UK). 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 entre 2 y 3 imágenes por animal.

11.6. EXPOSICIÓN AL FRÍO

En la exposición al frío, los animales se estabularon individualmente en jaulas que posteriormente se alojaron en una cámara fría a una temperatura de $6\pm 2^\circ\text{C}$ durante 6 horas. Se midió la temperatura rectal basal, así como la temperatura del BAT antes de introducirlos en la cámara y, posteriormente, cada 2 horas.

11.7. INDUCCIÓN DE HIPERTIROIDISMO

Para la inducción del hipertiroidismo los ratones fueron tratados con 0.5 mg/L de 3,3',5-triyodotironina (T32877, Sigma-Aldrich) en 0.01% de BSA en agua de bebida durante 14 días. Los ratones de control recibieron un tratamiento con 0.01% de BSA (vehículo de tratamiento).

11.8. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA INSULINA

Se realizaron test de tolerancia a glucosa e insulina para valorar el grado de tolerancia a glucosa y de sensibilidad a insulina y así conocer su capacidad metabólica. Para la prueba de tolerancia a glucosa los animales fueron sometidos a un ayuno previo de 13 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 (*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) (2mg/kg) para la prueba 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.

12.PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

12.1. ESTEREOTAXIA

Después de anestesiar a los animales y verificar su estado, se colocan en un aparato estereotáxico de (*David Kopf Instruments en Tujunga*, CA, EE. UU). Una vez que el animal está posicionado en el equipo y la cabeza está inmovilizada, se realiza un corte transversal en la piel de la cabeza, entre la altura de los ojos y las orejas. Las coordenadas estereotáxicas se calculan tomando el bregma como referencia, y dependiendo del núcleo al que se quiera acceder en cada especie, se calculan a partir de coordenadas de referencia específicas anteriormente mencionadas.

Luego, en cada una de las coordenadas calculadas, se perfora el cráneo con una broca quirúrgica y se administra la sustancia. Se utiliza una jeringa (*Hamilton*, Serie 700, modelo 7001, calibre 25; Reno, NV, EE. UU.) para inocular 1 µl de sustancia durante 5 minutos, con una velocidad de administración de 200 nl/min. Después de completar la inyección, se sutura la incisión en la piel del animal con seda de sutura (*Ethicon Mersilk Soie*, Special 2-0, Johnson and Johnson company, Alemania). Los animales se alojan de forma individual.

12.2. DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Los animales son sacrificados al concluir cada procedimiento experimental mediante luxación cervical y decapitación posterior, siguiendo las leyes y normativas de experimentación animal. Se procede a la extracción de diversos tejidos de cada animal, como el hipotálamo (ARC, VMH, PVN y LHA), la corteza, la grasa parda (BAT), el tejido adiposo blanco gonadal (gWAT), el tejido adiposo subcutáneo (sWAT), el tejido adiposo blanco visceral (vWAT), el hígado, los ovarios o testículos, adrenales y el músculo. Estos tejidos se conservan a -80°C hasta su procesamiento y análisis.

Para los análisis inmunohistoquímicos e histológicos, las muestras se fijan con formalina al 10% (Formalina 10% neutra tamponada, Bio-Optica, Italia) y, tras deshidratarlas con etanol al 70%, se parafinan.

13.DISEÑO EXPERIMENTAL

13.1. INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS ASOCIADOS TR α 1VP16 EN LOS RATORES TR α AMI SF1

Para determinar si la expresión de un receptor dominante positivo para TR α 1 revierte el fenotipo de los ratones TR α AMI en las SF1, se procedió a la inoculación por estereotaxia de los adenovirus asociados del serotipo 1 (AAV1) en el VMH. Estos virus contienen el vector TR α 1VP16 (Figura 14), que codifica un receptor dominante positivo para TR α 1, o mCherry, utilizado como controles.

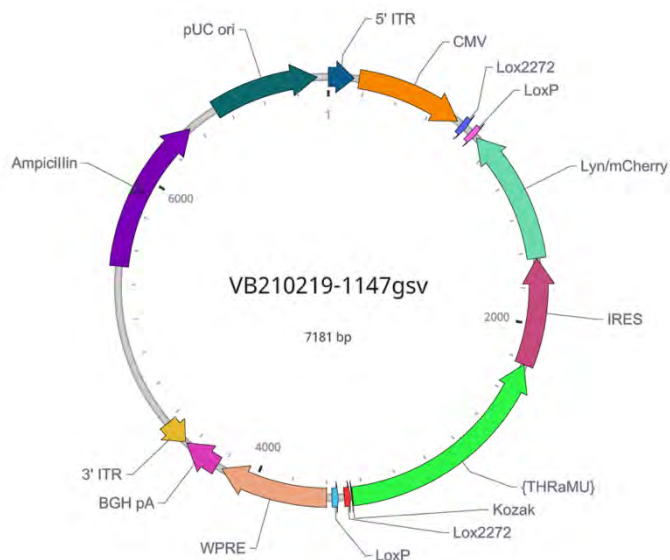


Figura 14. Mapa del vector que codifica para el receptor dominante positivo de TR α 1 (TR α 1VP16).

Los animales se estabularon en grupos de 4 o 5 ratones según la camada hasta transcurrida la primera semana que se estabularon individualmente. Durante la primera semana post-cirugía, se monitorizó únicamente el peso de los ratones cada 2 días. Posteriormente, una vez individualizados, se procedió a la monitorización tanto del peso como de la ingesta de cada animal. A mitad de experimento (día 15) se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT y a la medición de la temperatura corporal. El día 21 post-cirugía, los animales se introdujeron durante 6 horas en una cámara fría con el fin de estudiar su capacidad de adaptación al frío. Previamente a introducir los animales en la cámara fría, se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT y a la medición de la temperatura corporal y, después se repitió la monitorización de la temperatura a las 3 y 6 horas. Finalmente, se procede al sacrificio y la disección de tejidos (Figura 15).

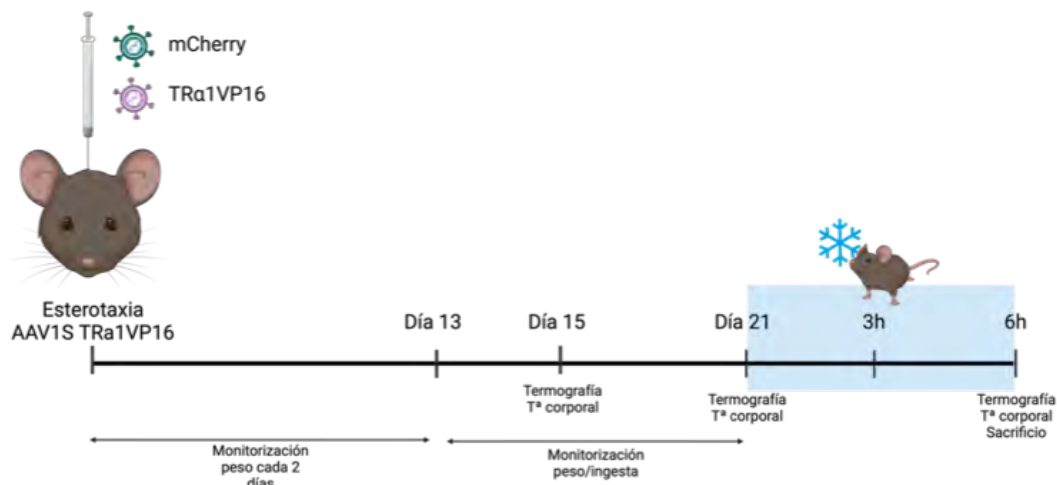


Figura 15. Representación gráfica del diseño experimental utilizado para la administración esterotáxica de los virus y posterior fenotipado. Creada con biorender.com

13.2. EXPOSICIÓN A FRÍO EN LOS RATORES $TR\alpha$ AMI SF1 Y $TR\beta^{KO}$ SF1

Con el fin de valorar la capacidad de respuesta al frío de los animales KO para el receptor $TR\beta$ 1 y KI para el receptor $TR\alpha$ 1, alcanzada la edad de 12-14 semanas los animales se introdujeron durante 6 horas en una cámara fría. Previamente a la exposición al frío, se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT y a la medición de la temperatura corporal. Este procedimiento se repitió a las 2, 4 y 6 horas de exposición al frío. Transcurridas las 6 horas, los animales se sacrificaron y se procedió a la disección de los tejidos (Figura 16).

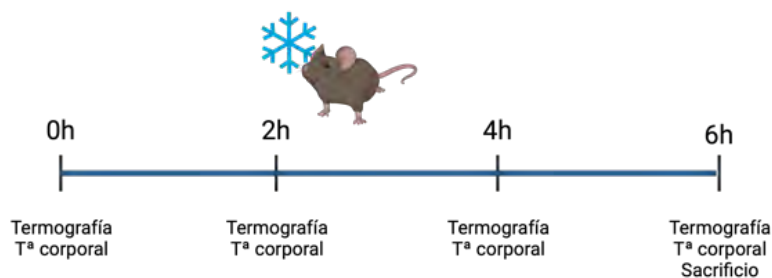


Figura 16. Representación gráfica del diseño experimental utilizado en la exposición al frío. Creada con biorender.com

13.3. INDUCCIÓN DE HIPERTIROIDISMO

Con el objetivo de valorar la capacidad de respuesta a las hormonas tiroideas de los ratones TR β ^{KO} y TR α AMI en SF1, se les administró una dosis de 0.5 mg/L de T3 en el agua de bebida. Para ello, los animales se estabularon individualmente y, tras un periodo de aclimatación (2-3 días), los animales se dividieron en dos grupos: grupo tratado (tratamiento con T3 en 0,01% de BSA) y grupo control (tratamiento con vehículo, solución de 0,01% de BSA en agua). Los animales fueron tratados durante un total de 14 días durante el cual, los animales tuvieron acceso ilimitado a comida y agua. Durante todo el tratamiento y diariamente se les monitorizó tanto la ingesta de comida como de bebida, además del peso corporal.

Los días 7 y 14 de tratamiento se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT y a la medición de la temperatura corporal. Finalmente, los animales se sacrificaron y se procedió a la disección de los tejidos (Figura 17).

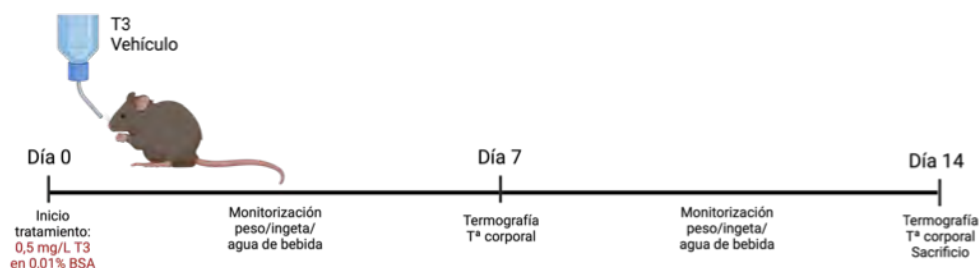


Figura 17. Representación gráfica del diseño experimental utilizado para la inducción de hipertiroidismo periférico. Creada con biorender.com

14. TECNICAS ANALÍTICAS

14.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

14.1.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Para llevar a cabo la extracción de proteínas, se procede cortando una porción del tejido que se va a analizar. La porción cortada se coloca en un tubo de seguridad de 2 ml (*Safe-Lock Tubes 2,0 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), que contiene una bola de acero y una cantidad específica de tampón según el tipo de tejido (ver Tabla 3). Este tampón de lisis incluye un inhibidor de proteasas (*Complete TM*, Roche, Mannheim, Alemania). Durante todo el proceso, tanto las muestras como el tampón de lisis se mantienen en hielo.

Tabla 2. Composición del tampón de lisis.

Reactivo	Cantidad/volumen
Tris-HCL pH 7,5	2,5 ml
EGTA 0,2 M (pH 8)	2,5 ml
EDTA 0,2 M (pH 8)	2,5 ml
Tritón X-100	5 ml
Ortavanadato Sódico 0,1 M	5 ml
Fluoruro Sódico	1g
Pirofosfato Sódico	1,1g
Sacarosa	46g
Ajustar pH a 7,5 y agua destilada hasta 500ml	
Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 1 pastilla por cada 50 ml	

Tabla 3. Volumen del tampón de lisis para cada tejido.

Tejido	Volumen
BAT	300 μ l
Hígado	500 μ l
VMH	100 μ l

A continuación, se procede a homogeneizar las muestras mediante un proceso de disgregación mecánica utilizando un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, USA) durante aproximadamente 5 minutos a una frecuencia de 22 Hz. Posteriormente, se realizan varias centrifugaciones a 13.200 rpm durante 15 minutos, y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de seguridad de 1,5 ml (*Safe-Lock Tubes 1,5 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), descartando el precipitado. Para las muestras de tejido adiposo pardo (BAT), se realiza una centrifugación previa de 10 minutos para facilitar la eliminación de la grasa.

14.1.2. 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). Primero, es necesario diluir la muestra en agua destilada. 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 4).

Tabla 4. 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

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, posteriormente, se le añade 250 µl del reactivo Bio-Rad Protein Assay, previamente diluido a un factor de 1:5 en agua destilada, incubándolo 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.

14.1.3. WESTERN BLOT

14.1.3.1. Preparación de los geles

Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de electroforesis Tris/glicina SDS Poliacrilamida en distintas concentraciones. En primer lugar, se preparan las carcasas Y posteriormente se preparan los geles separadores (Tabla 5), para eliminar las burbujas de la superficie y nivelar el borde superior se agrega isopropanol al 60% en la parte superior del gel separador. Una vez gelificados, se elimina el isopropanol y se lava con agua destilada. Los geles concentradores se preparan (Tabla 6) después de secar el exceso de agua destilada de lavado y se agregan sobre los geles separadores. Inmediatamente se colocaron peines para formar pocillos, que serán extraídos posteriormente después de que polimericen los geles.

Tabla 5. Preparación de los geles separadores de electroforesis.

Reactivo	8%	10%
	Volumen	Volumen
H ₂ O destilada	4,6 ml	4,0 ml
Acrilamida (30%)	2,7 ml	3,3 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 ml
APS 10 %	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 µl	4 µl

Tabla 6. Preparación del gel concentrador de electroforesis.

Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada	3,4 ml
Acilamida (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

14.1.3.2.Preparación de las muestras para electroforesis

A partir de los datos extraídos de la espectrofotometría se calcularon las proporciones de muestra, tampón de carga 1x (Tabla 7) y tampón de lisis con inhibidor de proteasa necesarias para la preparación de las alícuotas que se cargaron posteriormente en cada pocillo del gel, teniendo en cuenta las diluciones previamente realizadas. Para cada tipo de tejido se ajustó la cantidad de proteína adecuada para el análisis por western blot, en general 10 μ g de proteína.

Tabla 7. 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 H ₂ O miliQ hasta 1 L	

14.1.3.3.Electroforesis

Para separar las proteínas en los geles, antes de cargarlos con las muestras, se colocan en las carcasas de electroforesis y se añaden 500 ml de tampón de electroforesis 1X (100ml de tampón de electroforesis 5X (Tabla 10) en 400 ml de agua destilada) asegurándose de que los geles quedan sumergidos en el tampón.

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis 5X.

Reactivo	Cantidad
Glicina	72 g
Tris-HCl	15 g
SDS	5 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 L	

Previamente a cargar las muestras, estas se incuban a 95°C durante 10 min y se cargan los pocillos con 16 μ l de muestra, dejando el primer pocillo libre para cargar 5 μ l de marcador de pesos estándar para gel (*Precision Plus Protein*, cat 161-0374 Bio-Rad). A la carcasa se le coloca la tapa que lleva los electrodos y que se conectan directamente a una fuente alimentación con un voltaje constante de 100V.

14.1.3.4. Transferencia del gel de electroforesis a una membrana

Una vez separadas las proteínas por peso molecular, se transfieren del gel a membranas de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*, Millipore, Burlington, MA, EEUU). Este procedimiento se conoce como transferencia. Para ello se prepara papel absorbente (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU) que se sumerge en tampón de transferencia 1X y se cortan las membranas de PVDF de la medida deseada, un poco más grandes que el gel (9 x 6,5 cm) y se activan (5min en metanol, 5min en agua y 5 min de tampón de transferencia 1X (Tabla 11)). Una vez realizado este proceso, se coloca el papel absorbente en el aparato de transferencia, luego se coloca la membrana de PVDF y sobre ella el gel de electroforesis y otra pieza de papel absorbente. Se cierra el equipo de transferencia (Trans-blot) y se conecta a una fuente de alimentación con un amperaje constante de 0,25 V durante 2 horas.

Tabla 11. Composición del tampón de transferencia 1X.

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

14.1.3.5. Inmunodetección

Una vez terminada la transferencia las membranas se bloquean en BSA al 3% (3g de BSA en 100ml de TBS-TWEEN 1% (Tablas 12 y 13)) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, las membranas se incuban con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. El anticuerpo se diluye en BSA-TWEEN 3% y la incubación se realiza durante una hora en agitación a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Tabla 12. Composición del TBS 10X

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl	24,2 g
NaCl	80 g
Ajustar pH 7,6 y H2O destilada hasta 1 L	

Tabla 13. Composición del TBS 1X

Reactivo	Cantidad
TBS 10X	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Ajustar con H2O destilada hasta 1 L	

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se retira y se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS-TWEEN 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo. Luego, se incuban la membrana con un anticuerpo secundario, específico para el anticuerpo primario, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizan de nuevo tres lavados con TBS-TWEEN 0,1% de 5 minutos cada uno

Tabla 14. Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
α -tubulina	1:5000	Sigma	AB_330337
GAPDH	1:5000	Merck Millipore	AB_191838
UCP1	1:10000	Abcam	AB_10983
PGC1 α	1:1000	Abcam	AB_191838
PGC1 β	1:1000	Abcam	AB_176328
Phospho-HSL (Ser660)	1:1000	Cell Signaling Technology	#4126
HSL	1:1000	Abcam	AB_45422
DIO2	1:2000	Abcam	AB_77779
Phospho-AcetylCoA Carboxylase (Ser79)	1:2000	Cell Signaling Technology	AB_330337
AcetylCoA Carboxylase	1:1000	Merck Millipore	AB_673047
Phospho-AMPK α (Trh172)	1:1000	Cell Signaling Technology	AB_331250
AMPK α 1	1:1000	Merck Millipore	AB_310542
AMPK α 2	1:1000	Merck Millipore	AB_310553
Fatty Acid Synthase	1:1000	BD Biosciences	AB_398276
Anti-Rabbit inmunoglobulins/HPR	1:5000	Dako	AB_2617138
Anti-Mouse inmunoglobulins/HPR	1:5000	Dako	AB_2636929

14.1.3.6.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. Las membranas se incuban en 1 ml de ECL durante 3 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se colocan 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.

14.1.3.7.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 y se mide la densidad óptica de cada una de las señales, además de 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 con la señal obtenida para el control (α -tubulina o GAPDH) de esa misma muestra.

14.2. ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO

14.2.1. Extracción de ARNm

Al igual que para la extracción de proteína, se corta un pequeño fragmento de las muestras congeladas y se homogeniza de manera mecánica con una bola de acero en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 5 min (*TissueLyser II*, Qiagen, Germantown, MD, USA) a 22 Hz.

Posteriormente, las muestras se centrifugan a 12.000 rcf durante 15 minutos a 4°C y se aspira la fase intermedia. A esta fracción, se le añaden 200 µl 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 y se centrifugan de nuevo a 12.000 rcf durante 15 minutos. Tras esta 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 µl 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 a 4°C. 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. 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.

14.2.2. Cuantificación de 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 la ratio 260/280, considerándose entorno a 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/µl o de 1000ng/µl para las muestras de grasa.

14.2.3. Retrotranscripción

Debido a que el ARN no se puede amplificar de forma directa, debemos realizar un proceso de retrotranscripción (RT). El volumen total de cada muestra va a ser de 30 µl. Compuesto por los siguientes reactivos:

- 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.

Una vez preparado un tubo de reacción para cada muestra, se incuban en un termociclador 50 min a 37°C, 15 min a 42°C y finalmente 5 min a 95°C.

14.2.4. PCR en tiempo real (Taqman)

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizan, además de los cebadores, 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 FAMTM en el extremo 5' y, en el extremo 3', una unión al surco menor (MGB) un supresor no fluorescente o *quencher*.

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 15). 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 15. Genes y sondas específicas para la PCR en tiempo real.

ARNm	Gen Bank	Referencia
Hprt	NM_013556.2	Mm01545399_m1
Ucp1	NM_009463.3	Mm01244861_m1
Ppargc1a	NM_008904.2	Mm01208835_m1
Ppargc1b	NM_133249.2	Mm00504730_m1
Prdm16	NM_001177995.1	Mm01266512_m1
Adrb3	NM_013462.3	Mm01545399_m1
Pparγ	NM_011146.3	Mm01184322_m1
Dio2	NM_010050.2	Mm01184322_m1
Cidea	NM_007702.2	Mm00432554_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 16).

Además de los cebadores y la sonda, en la mezcla de reacción de PCR en tiempo real se añade un marcador llamado "referencia pasiva". Este marcador ayuda a normalizar la señal emitida por el fluoróforo durante la recolección de datos, permitiendo corregir posibles variaciones en la fluorescencia debido a cambios en la concentración o volumen de las reacciones.

Durante las primeras etapas de la PCR, hay pocos cambios en la señal de fluorescencia, lo que establece una línea base para la amplificación. Cuando la intensidad de la fluorescencia aumenta por encima de esta línea base, comienza el proceso de detección. Se puede establecer un umbral de detección de fluorescencia ligeramente superior a esta línea base, conocido como *Threshold*. El parámetro CT (*Threshold Cycle*) o ciclo umbral se refiere al ciclo de amplificación en el que se produce un incremento significativo en la intensidad de la señal de fluorescencia (Rn) y comienza la detección. Este umbral se calcula como la desviación estándar de Rn durante las primeras etapas de la PCR multiplicada por un factor de ajuste. Posteriormente, la estimación de la concentración de DNA se estima interpolando sus valores de CT en una recta patrón construida con estándares de concentración conocida. Una vez obtenidos los valores relativos de DNA para nuestro gen estudio, este se normaliza por un gen de referencia, , en este caso, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Hprt, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), mediante la ratio gen problema/gen de referencia de cada una de las muestras.

Tabla 16. 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	

14.3. PCR PARA GENOTIPADO

14.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utiliza una pequeña sección del hipotálamo. Añadimos a cada una de las muestras 700 µl de buffer de lisis (Tabla 17) y proteinquinasa K en una proporción 1/100. Posteriormente las muestras se incuban a 60°C y se agitan cada media hora hasta que el tejido se haya degradado por completo. Luego las muestras se centrifugan a 13000g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se recoge el sobrenadante y se pasa a otro eppendorf al que previamente se le ha añadido 700 µl isopropanol. Se invierte el eppendorf varias veces para mezclar todo bien y se vuelven a centrifugar las muestras. Finalmente se vuelca el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70%. Una vez seco el pellet, este se resuspende en 20 ó 30 µl de agua DEPC.

Tabla 17. Composición del buffer de lisis para ADN.

Reactivo	Volumen
Agua miliQ	34 ml
Tris 1M pH 8,5	5 ml
EDTA 0,5M pH 8	500 μ l
SDS 10%	1 ml
ClNa 1M	10 ml

14.3.2. Amplificación por PCR

Para el genotipado se utiliza el método de PCR estándar. La región de ADN de interés se amplifica mediante el uso de los siguientes cebadores (Tabla 18).

Tabla 18. Set de cebadores y condiciones de PCR para el genotipado.

Ratones TR α AMI				
Oligos	Secuencia	Condiciones de la PCR		Tamaños de las secuencias amplificadas
Oligo 1 Oligo 2 Oligo 3	5' GCCTTCTATCGCCTTCTTGACG 3' 5' TCCACAGGTATCTCCAGACAGG 3' 5' GATTCTTCTGGATTGTGCGGCG 3'	94°C 5min 94°C 30 sec 58°C 30 sec 72°C 30 sec 72°C 10 min	x 30 ciclos	Locus TR α AMI: 1200 pb Locus TR α AMI escindido (TR α ^{L400R}): 800 pb
Ratones TR β ^{KO}				
Oligo 4 Oligo 5	5' CATCTATGTTGGCATGGCAACAGACT 3' 5' AACGTCAGTGTGTGGTGTACAGG 3'	94°C 20 segundos 59°C 20 segundos 72°C 3 min y 50 sec	x 32 ciclos	Locus TR β floxado: 3721 pb Locus TR β escindido: 601pb

14.3.3. Electroforesis de agarosa

La separación de los fragmentos amplificados se realiza mediante el uso de geles de agarosa (*Agarose*, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA). La agarosa se disuelve en 100 ml de tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; Ácido acético 20mM y EDTA 1mM) mediante la aplicación calor con un microondas. Una vez disuelta, se le añaden 5 μ l 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 cargan las muestras y 5 μ l 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).

14.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se empleó la técnica de inmunohistoquímica (ICH, *immunohistochemistry*) para identificar la presencia y ubicación de proteínas específicas en el tejido mismo. En este estudio, se llevó a cabo la inmunohistoquímica en tejido adiposo subcutáneo blanco (scWAT) de ratón utilizando muestras parafinadas. Para ello, se extrajeron los tejidos y se fijaron sumergiéndolos en formalina al 10% durante 24 horas. Luego, se sometieron a un proceso de deshidratación (aumento de las concentraciones de alcohol), montaje en xileno e inclusión en parafina para su análisis histológico. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 μm que fueron procesadas, desparafinadas en xileno, rehidratadas y enjuagadas en agua destilada. Posteriormente, se tiñeron para llevar a cabo la inmunohistoquímica de la proteína UCP1.

En el procedimiento de inmunohistoquímica de UCP1, las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario UCP1 (Abcam, Cambridge, RU), se lavaron y posteriormente incubaron con el anticuerpo secundario ENVISION (capaz de detectar anti-ratón y anti-conejo de DAKO; Glostrup, Dinamarca). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Olympus XC50 (*Olympus Corporation*; Tokio, Japón) a un aumento de 20x. La cuantificación de las imágenes se realizó mediante el software Frida Software: *FRamework for Image Dataset Analysis* (The Johns Hopkins University; Baltimore, MD, USA).

14.4.1. Tinción hematoxilina/eosina

Empleamos esta técnica para estudiar las estructuras celulares mostrando de forma general la estructura del tejido. Para ello se utilizaron muestras parafinadas que fueron tratadas con xilol para eliminar los excesos de parafina. Después se sometieron los cortes a un proceso de rehidratación, consistente en una batería de alcoholes a concentraciones decrecientes (100°, 95° y 70°). Tras lavar una vez con H₂O destilada se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron e inmediatamente se pasaron por un alcohol ácido. Tras el lavado, las muestras se sumergieron 30 segundos en eosina. A continuación, se deshidrataron los cortes pasándolos por los mismos alcoholes en graduación creciente. Finalmente, antes del montaje, se dejaron sumergidos en xilol 10 min. Se tomaron imágenes con una cámara digital Olympus XC50 (*Olympus Corporation*; Tokyo, Japan) a 20x. Las imágenes se cuantificaron con el software ImageJ-1.33 (NIH; Bethesda, MD, USA).

14.5. OIL-RED

Esta tinción se realiza en secciones de hígado congeladas. En un criostato se realizan cortes de un grosor de 10 μm . Se fijan las muestras toda la noche en formalina neutra tamponada al 10%. Posteriormente, se tiñen con Solución Oil Red durante 20 minutos (*Oil red color solution*, Merck) y se lavan con agua destilada. Se sumergen en otro colorante y se contratiñen con hematoxilina de Harris durante 10 minutos (Hematoxilina de Harris, Biooptica). Se vuelven a lavar con agua destilada y se montan con un medio de montaje acuoso. Una vez fijadas las muestras al portaobjetos, se realizan fotos en un microscopio conectado a una cámara Olympus XC50 (*Olympus Corporation*; Tokyo, Japón), con aumentos al 20x y 40x. Finalmente, las fotos fueron procesadas con el programa ImageJ (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, USA).

14.6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO

Las concentraciones séricas de triglicéridos se determinaron mediante colorimetría usando el kit Spinreact (Spinreact SA, San Esteve de Bas, España). Las determinaciones se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial.

15. ESTADÍSTICA

La mayoría de los resultados obtenidos en los procedimientos experimentales se presentan en porcentaje en comparación con su control, donde el valor representado corresponde a la media y el error se muestra como la desviación estándar de la media (SEM). En experimentos que implican la medición de parámetros como la ingesta o la masa corporal de los animales, se representan los valores brutos. El número de muestras o animales utilizados en cada procedimiento se especifica en las leyendas de las figuras de los resultados representado por la letra “n”. El número de animales por grupo será de 7-12, ya que muchos de nuestros trabajos previos se ha demostrado que ese es el número más apropiado para obtener datos fiables y un análisis estadístico sólido. Se consideraron significativos todos los resultados $p < 0.05$, muy significativos con $p < 0.01$ y extremadamente significativos con $p < 0.001$.

Para identificar muestras y/o animales atípicos, se emplea el programa *GraphPad Software Outlier Calculator*, que utiliza la prueba de Grubbs para determinar si alguno de los valores es significativamente atípico. Además, cualquier comportamiento anómalo observado en un animal durante un procedimiento experimental, como mal aspecto externo, estereotipias o signos de dolor, resulta en su exclusión de los resultados.

La normalidad de los resultados se evalúa mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (Kao y Green, 2008), para conjuntos de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 , y la prueba Kolmogorov-Smirnov cuando el $n \leq 6$ (Razali & Wah, 2011). La confirmación de la normalidad permite la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas como el T-test o ANOVA. En caso de que la población no superase la prueba de normalidad se realizarían test estadísticos no paramétricos (Test Kruskal-Wallis y Test Mann-Whitney), lo que no ocurrió durante el análisis de los datos de esta tesis. Los estudios de gasto energético fueron analizados mediante ANCOVA, considerando como variable el peso corporal total (Tschöp et al., 2012). A lo largo de la literatura se especifica el test estadístico utilizado en cada caso.

En relación con el T-test de Student, este compara las medias de dos poblaciones no pareadas que siguen una distribución normal gaussiana. Es considerado un estadístico robusto ya que es capaz de comparar poblaciones con un número igual o menor a 5. Esta prueba evalúa la diferencia entre las medias de las poblaciones analizadas, donde las regiones de la cola inferior y superior de la distribución corresponden a las regiones críticas del estadístico. Se utilizan T-test de Student de una o dos colas, detallados en las leyendas de las figuras de los resultados. Cuando se estudian variables sin conocimiento previo de su efecto o no hay evidencia previa, se realiza un T-test de Student de dos colas. En variables donde se conoce su efecto previo, se utiliza un T-test de Student de una cola.

El análisis de la varianza (ANOVA) se utiliza para determinar si existen diferencias entre las medias de tres o más grupos que siguen una distribución normal y son independientes entre

sí. Existen varias pruebas que se pueden realizar: uno de ellos es el Tukey test que compara dos medias simples cada vez y ejecuta todas las posibles comparaciones; el Dunnett test se realiza cuando se comparan todas las medias con el grupo control, por lo que no es un procedimiento tan exhaustivo y, por último, la corrección o test de Bonferroni que es el procedimiento más potente; y su uso se recomienda cuando se realizan comparaciones entre más de tres grupos experimentales.

RESULTADOS

16.RESULTADOS

16.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE TR α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH.

A lo largo de los años se ha demostrado el papel que juegan las THs sobre el metabolismo. En 2017, Martínez-Sánchez et al. demostraron que la administración de T3 en el VMH provocaba una disminución de AMPK que, a su vez, conducía a la disminución de la concentración de ceramidas hipotalámicas y la posterior reducción del estrés del retículo endoplasmático, aumentando el tono simpático sobre el BAT y la termogénesis (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Pese a que se conoce que las acciones locales de las TH en el BAT están mediadas por ambos receptores de hormonas tiroideas (TR α y TR β), hasta la fecha se desconoce cuál de los receptores (i.e. TR α y/o TR β) mediaba los efectos de T3 sobre la regulación de la termogénesis a nivel central.

Con el fin de dilucidar cuál de los dos receptores de hormonas tiroideas está implicado en la regulación del balance energético a nivel central se generaron tres modelos animales: los ratones TR α AMI SF1, los ratones TR β 1 KO SF1 y los ratones TR α AMI- TR β 1 KO SF1.

En primer lugar, se generó una línea animal con el receptor TR α 1 truncado en las neuronas SF1. Para ello se cruzaron los ratones TR α AMI (Quignodon et al., 2007) con los ratones SF1-Cre, dando lugar a la expresión de la proteína TR α 1^{L400R} (Flamant et al., 2017; Picou et al., 2012) que actúa como un receptor dominante negativo de TR α 1.

La efectividad de la recombinación del sistema Cre/lox se validó mediante PCR en el VMH. Los cebadores de la PCR del modelo TR α AMI se diseñaron de forma específica para que amplificasen una banda recombinante, en torno a 800 pares de bases (pb), sólo cuando hubiese recombinación por la Cre-recombinasa y se expresase la proteína TR α 1^{L400R}. De esta manera, el análisis por PCR del núcleo ventromedial de estos animales demostró la presencia de una banda a 800 pb en los ratones TR α AMI SF1 (Figura 18), demostrándose de esta manera la efectividad de la recombinación.

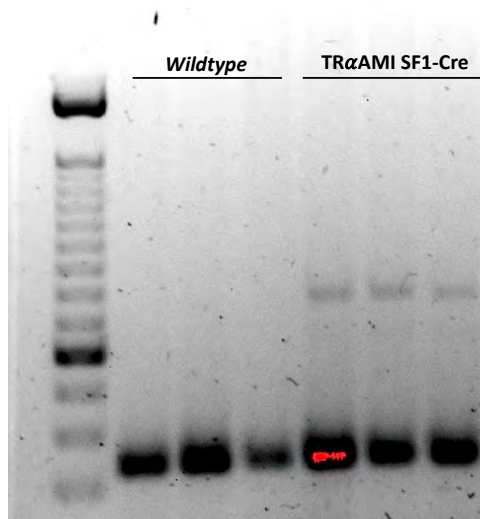


Figura 18. Estudio de la efectividad de la recombinación por la Cre-recombinasa en las neuronas SF1. (A) PCR para la detección del alelo recombinado del gen *Thra* en las neuronas SF1 del VMH en modelo animal TR α AMI SF1.

16.2. EFECTO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DEL RECEPTOR ALFA DE HORMONAS TIROIDEAS (TR α 1) EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.

16.2.1. La ablación del efecto de las hormonas tiroideas sobre el receptor alfa afecta tanto al peso corporal como al gasto energético.

Para poder llevar a cabo el estudio de este trabajo, tras generar la línea animal se hizo el seguimiento de la masa corporal durante 16 semanas en dieta estándar. Durante este periodo de tiempo se observó que los ratones macho TR α AMI SF1 presentaban una mayor masa corporal (Figuras 19-A) independientemente de la ingesta (Figuras 19-B) con respecto a sus hermanos de camada (*wildtype*). Pese a las diferencias observadas en la masa corporal, no se apreciaron diferencias en los depósitos grasos estudiados de forma individual (Figuras 19-C). Sin embargo, se ha observado una menor acumulación en los depósitos de masa magra en estos animales (Figura 19-D).

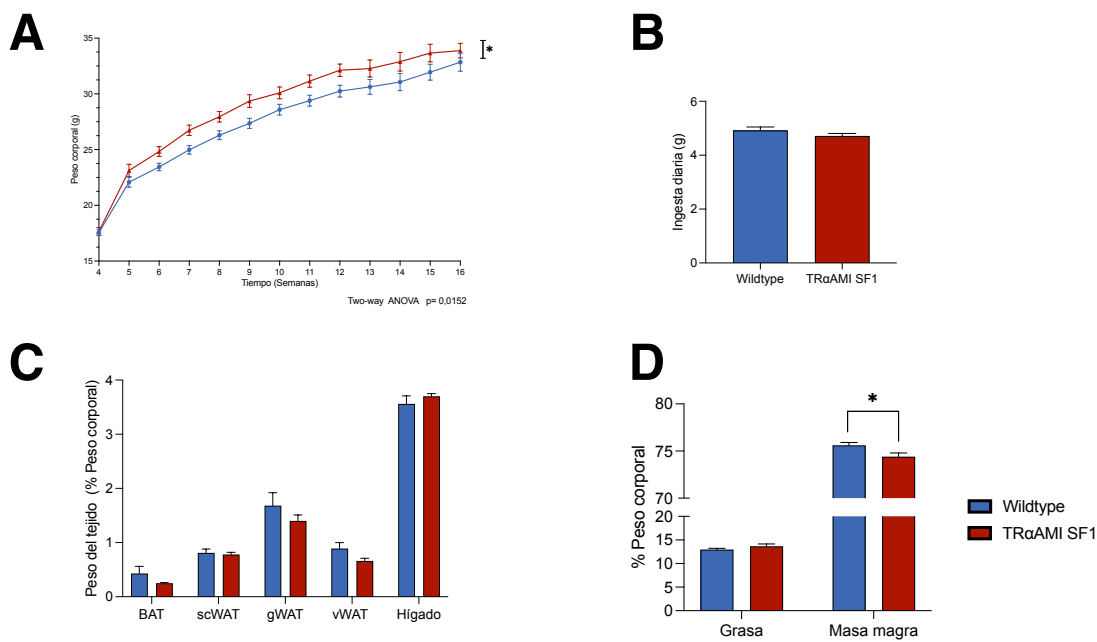


Figura 19. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en la masa y composición corporal en los machos: (A) Ganancia de peso corporal (TR α AMI SF1 n= 26, WT n= 46); (B) ingesta diaria tras 5 días (TR α AMI SF1 n= 6, WT n= 5); (C) BAT, gWAT, scWAT e hígados pesados inmediatamente después de ser diseccionados y normalizados por el peso corporal (TR α AMI SF1 n= 29, WT n= 31) y (D) composición corporal (TR α AMI SF1 n= 9, WT n= 13). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas) para la ingesta y masa y composición corporal y un Two-way ANOVA para la ganancia de peso corporal. * p < 0.05.

El fenotipado metabólico en las TR α AMI SF1 en hembras mostró que estas presentaban una mayor masa corporal (Figura 20-A) independiente de la ingesta (Figura 20-B) y sin cambios en los depósitos grasos (Figura 20-C) al igual que lo observado en machos. A diferencia de estos últimos, las hembras no mostraron una mayor acumulación de los depósitos de masa grasa (Figura 20-D).

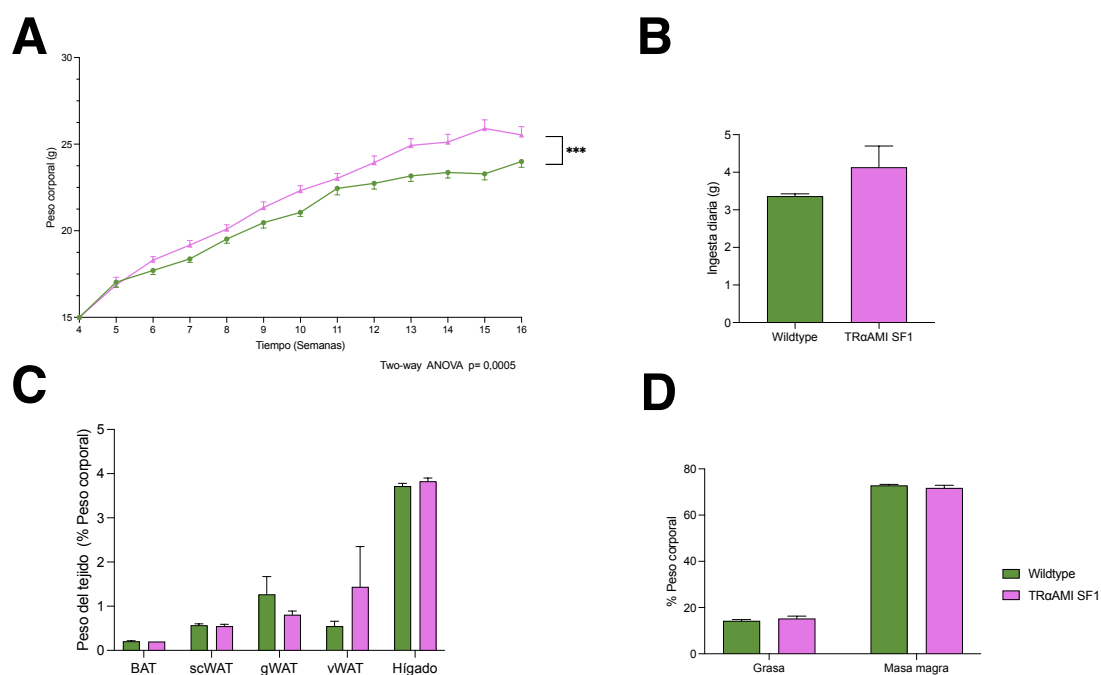


Figura 20. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en la masa y composición corporal en las hembras: (A) Ganancia de peso corporal (TR α AMI SF1 n= 26, WT n= 36); (B) ingesta diaria (TR α AMI SF1 n= 16, WT n= 21); (C) BAT, gWAT, scWAT e hígados pesados inmediatamente después de ser diseccionados y normalizados por el peso corporal (TR α AMI SF1 n= 5, WT n= 8) y (D) composición corporal (TR α AMI SF1 n= 15, WT n= 24). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas) para la ingesta y masa y composición corporal y un Two-way ANOVA para la ganancia de peso corporal. *** p < 0.001.

Puesto que la ganancia de masa corporal no está asociada a un aumento de la ingesta en los animales TR α AMI SF1 y, con el fin de esclarecer si ésta estaba asociada a una disminución del gasto energético, se procedió al estudio de este paralelamente a otros parámetros como la actividad locomotora y el cociente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*), mediante calorimetría indirecta. El RQ se relaciona con el tipo de sustrato metabolizado en el organismo, y su valor oscila entre 0,7 y 1 según se estén metabolizando únicamente lípidos (0,7) o carbohidratos (1). Los datos obtenidos mostraron que los animales TR α AMI SF1 machos presentaban un menor gasto energético (Figuras 21-A y 21-B). Así mismo, el análisis ANCOVA, utilizando la masa corporal como covariable vimos como ambos animales TR α AMI SF1 y *wildtype*, presentaban diferencias en el gasto energético. El estudio de del RQ, mostró un mayor metabolismo lipídico en los animales TR α AMI SF1 (Figura 21-D) y sin cambios en la actividad locomotora (Figura 21-E).

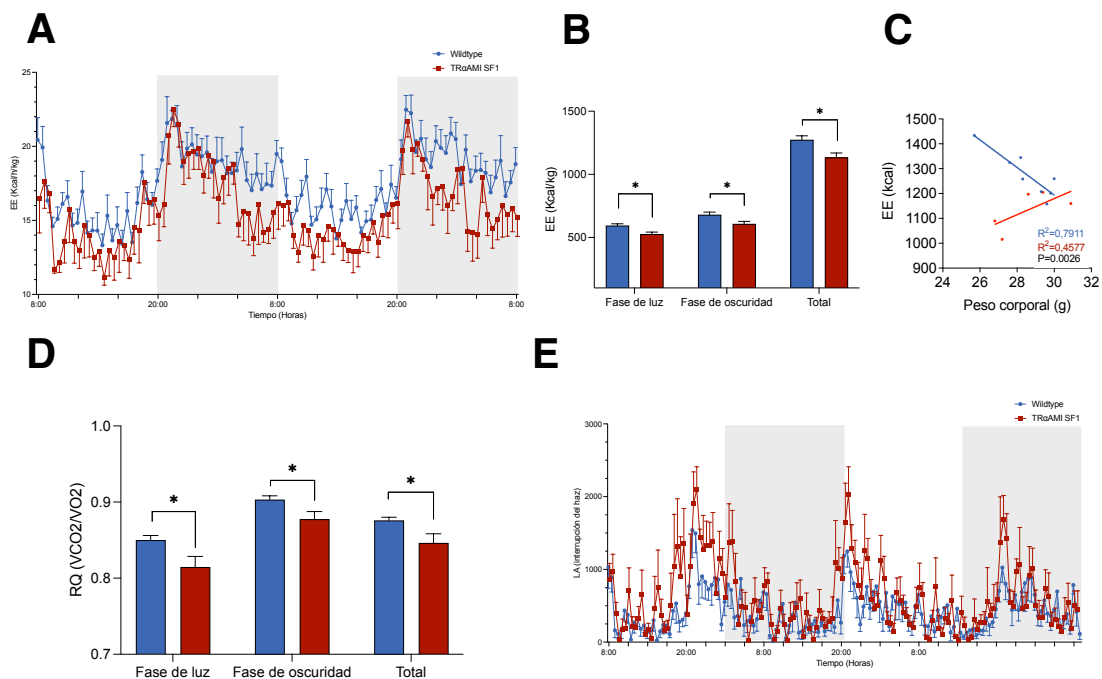


Figura 21. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en la homeostasis energética de ratones macho: (A) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (H1) (TR α AMI SF1 n= 5, WT n= 8); (B) Gasto energético medio durante las diferentes fases de luz; (C) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable; (D) Coeficiente respiratorio medio durante las diferentes fases de luz (TR α AMI SF1 n= 5, WT n= 8); (E) Actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (TR α AMI SF1 n= 5, WT n= 8). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05.

Paralelamente a los estudios realizados en machos, se analizó el gasto energético en hembras. Estos análisis mostraron un menor gasto energético en las hembras TR α AMI SF1 (Figura 22-A) independientemente de la fase de luz (Figura 22-B). El análisis mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable, tampoco mostró diferencias en el gasto energético en este sexo. Tampoco se observaron cambios en el coeficiente respiratorio (Figura 22-D) ni en la actividad locomotora (Figura 22-E).

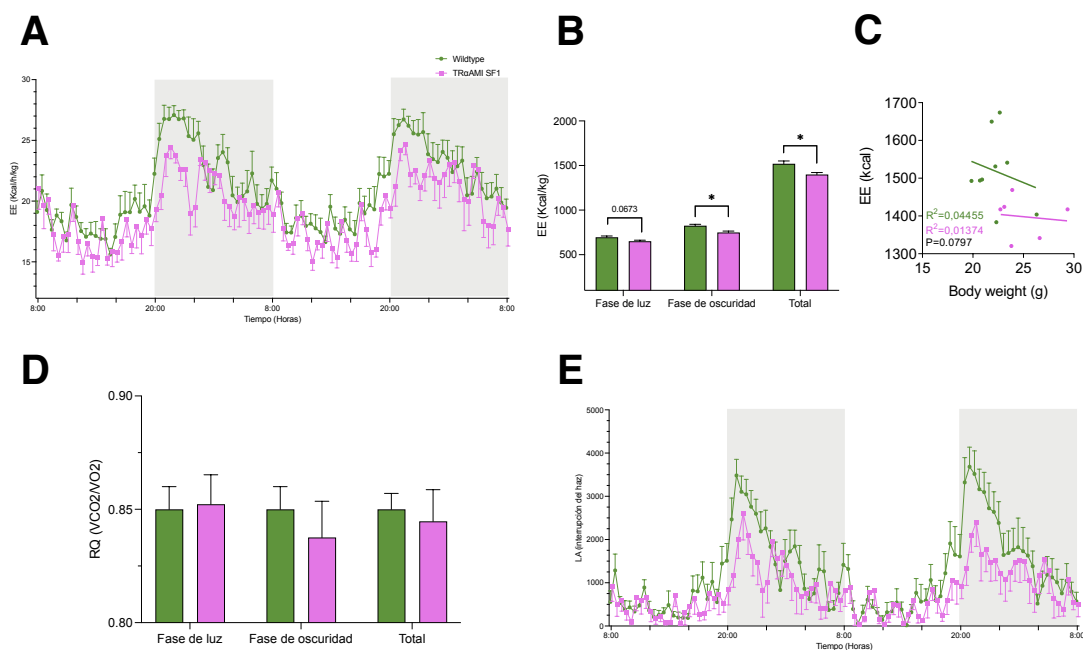


Figura 22. Efecto de la delección de *TRα1* en las neuronas SF1 en la homeostasis energética de ratones hembra: (A) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (H1) (*TRα1*AMI SF1 n= 6, WT n= 9); (B) Gasto energético medio durante las diferentes fases de luz; (C) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable; (D) Coeficiente respiratorio medio durante las diferentes fases de luz (*TRα1*AMI SF1 n= 6, WT n= 9); (E) Actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (*TRα1*AMI SF1 n= 6, WT n= 9). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * $p < 0.05$.

16.2.2. Los animales *TRα1*AMI SF1 presentan una disminución en la termogénesis en el BAT y menor *browning* en el tejido adiposo blanco.

El estudio de la capacidad termogénica del BAT en estos animales demostró que los ratones *Knockin* machos para el receptor *TRα1* presentaban una disminución de la temperatura del área del BAT (Figura 23-A) y de la temperatura corporal (Figura 23-B). Paralelamente a estos resultados, el análisis de la expresión de marcadores termogénicos por *RT-QPCR* (Figura 23-C) y *western blot* (Figura 23-D) mostró una disminución en los niveles de mRNA y proteína de UCP1, seguido de una disminución de los niveles de mRNA y proteína de *Dio2* y de los niveles de proteína de HSL y de la forma fosforilada de la misma.

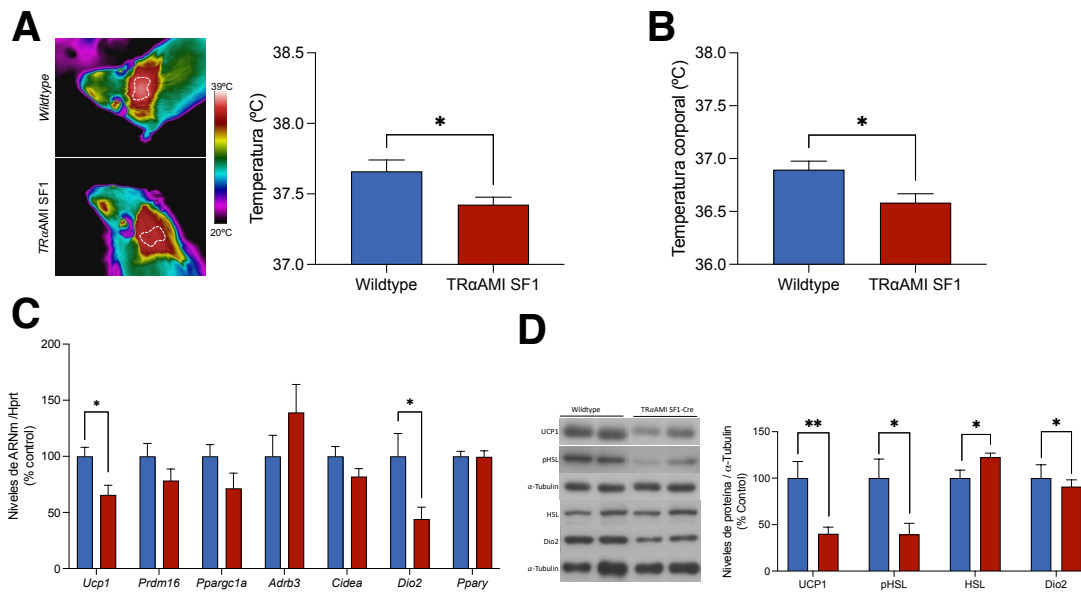


Figura 23. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 sobre la termogénesis del BAT en machos: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TR α AMI SF1 n= 16, WT n= 14); (B) temperatura corporal (TR α AMI SF1 n= 6, WT n= 5); (C) análisis de la expresión de ARNm de los marcadores termogénicos en el BAT (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 8); (D) niveles proteicos de los marcadores termogénicos en el BAT (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01.

En el caso de las hembras, el análisis de la maquinaria termogénica en el BAT mostró una disminución en la temperatura del área adyacente al BAT (Figura 24-A), pero sin cambios en la temperatura corporal (Figura 24-B). El análisis de los niveles de mRNA de los marcadores termogénicos mostró una disminución de los niveles de *Ucp1*, *Dio 2* y una tendencia a estar disminuida de *Ppary* (Figura 24-C). El análisis de los niveles de proteína de los marcadores termogénicos estudiados mediante western blot (Figura 24-D) mostraron una disminución de UCP1, PGC1 β , pHSL y HSL. En cambio, solo se observó una ligera tendencia a la disminución en Dio2 y PGC1 α .

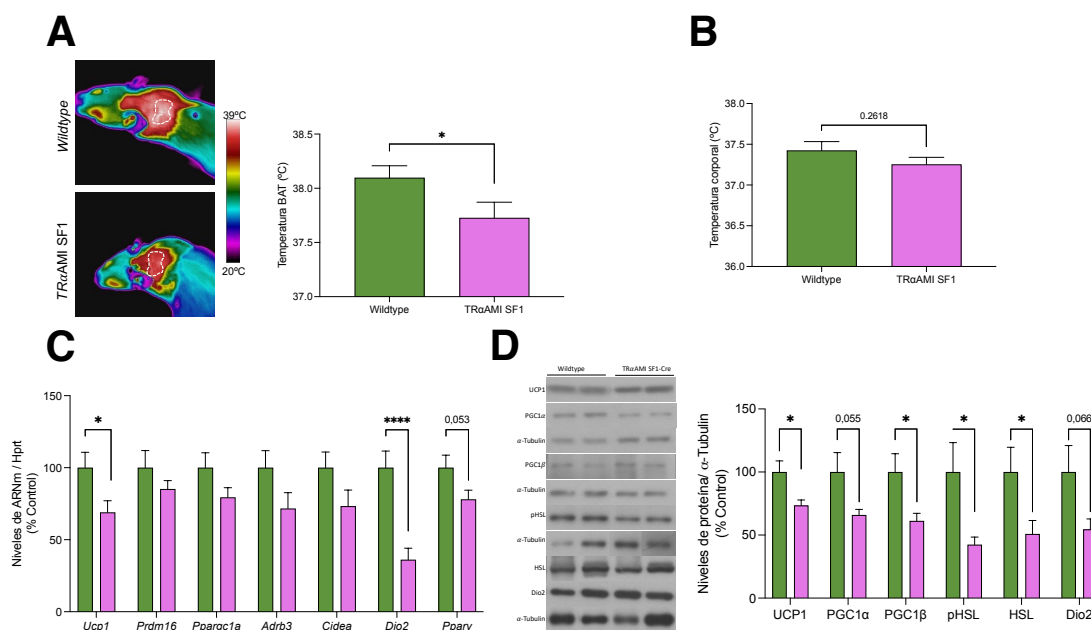


Figura 24. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 sobre la termogénesis del BAT en hembras: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TR α AMI SF1 n= 16, WT n= 20); (B) temperatura corporal (TR α AMI SF1 n= 16, WT n= 20); (C) análisis de la expresión de ARNm de los marcadores termogénicos en el BAT (TR α AMI SF1 n= 11, WT n= 9); (D) niveles proteicos de los marcadores termogénicos en el BAT (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; *** p < 0.001.

Dado que en los animales con la isoforma predominantemente negativa de TR α 1 en las neuronas SF1 del VMH se observaba una disminución de la actividad termogénica del BAT, se decidió explorar la posibilidad de que la capacidad termogénica del tejido adiposo blanco estuviese también alterada. Estudios previos demostraron que además de poseer efectos periféricos, las THs son capaces de inducir mediante mecanismos a nivel central que conduce a una activación del BAT y del *browning* en el WAT (Alvarez-Crespo et al., 2016; López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017).

El análisis de los depósitos de grasa subcutánea y gonadal mostraron que los machos TR α AMI SF1 presentaban un mayor tamaño de los adipocitos tanto en scWAT como gWAT (Figuras 25-E y 25-F). La inmunotinción de UCP1 en estas muestras también mostró una menor presencia de UCP1 en las muestras de grasa subcutánea, pero sin diferencias significativas en los depósitos de grasa gonadal (Figuras 25-C y 25-D). En concordancia con estos resultados, el análisis por RT-PCR en tiempo real, confirmó una disminución de la expresión de *Ucp1* y *Cidea* en las muestras de scWAT (Figura 25-A) pero, sin diferencias en la expresión de mRNA de los marcadores de *browning* en el gWAT (Figuras 25-B).

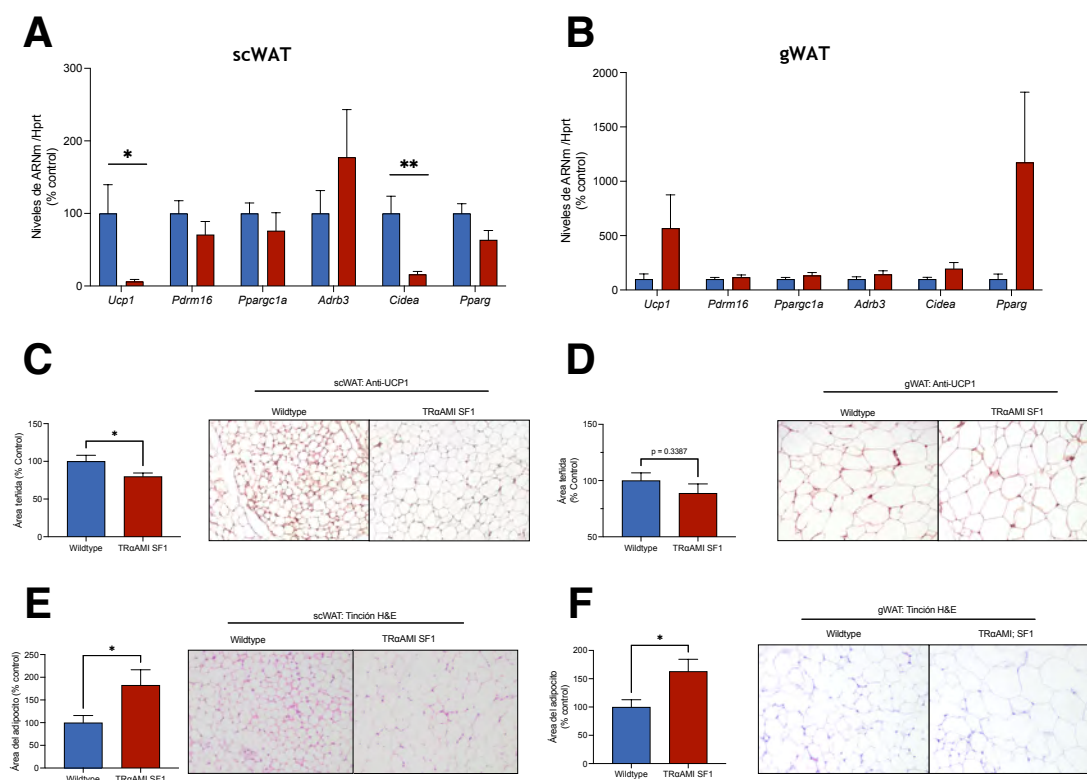


Figura 25. Efecto de la delección de TRα1 en las neuronas SF1 sobre el browning en scWAT y gWAT en machos: (A-B) expresión de los niveles de ARNm en los depósitos de scWAT (panel izquierdo) (TRαMI SF1 n= 9, WT n= 9) y gWAT (panel derecho) (TRαMI SF1 n= 6, WT n= 8); (C-D) Inmunohistoquímica representativa con anticuerpo anti-UCP1 (20X) y cuantificación del área teñida en scWAT (panel izquierdo) (TRαMI SF1 n= 17, WT n= 13) y gWAT (panel derecho) (TRαMI SF1 n= 8, WT n= 6); (E-F) tinción hematoxilina-eosina (40X) y área de los adipocitos en scWAT (panel izquierdo) (TRαMI SF1 n= 18, WT n= 18) y en gWAT (panel derecho) (TRαMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01.

Paralelamente al estudio de los depósitos de scWAT y gWAT llevados a cabo en los machos, se realizaron el mismo análisis en las hembras. Los datos obtenidos mostraron cierto paralelismo a lo observado en machos. La inmunotinción de UCP1 en estos tejidos mostró una menor presencia de esta proteína en los depósitos de scWAT (Figuras 26-C) mientras que en gWAT únicamente se observó una ligera tendencia (Figura 26-D). Así mismo, la cuantificación del área de los adipocitos en estos depósitos grasos mostró un mayor tamaño de los mismo en ambos tejidos (Figura 26-E y 26-F). Finalmente, la cuantificación de mRNA de los marcadores de termogénesis en estos tejidos no arrojó diferencias entre los *wildtypes* y las hembras TRαMI SF1 en los depósitos de grasa gonadal (Figura 26-B). Sin embargo, se observó una disminución de *Ucp1*, *Pparg1a* y *Cidea* en la grasa subcutánea.

En resumen, la presencia de una isoforma predominantemente negativa de TRα1 en las neuronas SF1 del VMH se traduce en una disminución de la capacidad termogénica del BAT junto con un menor *browning* en los depósitos de grasa subcutánea y gonadal en ambos sexos.

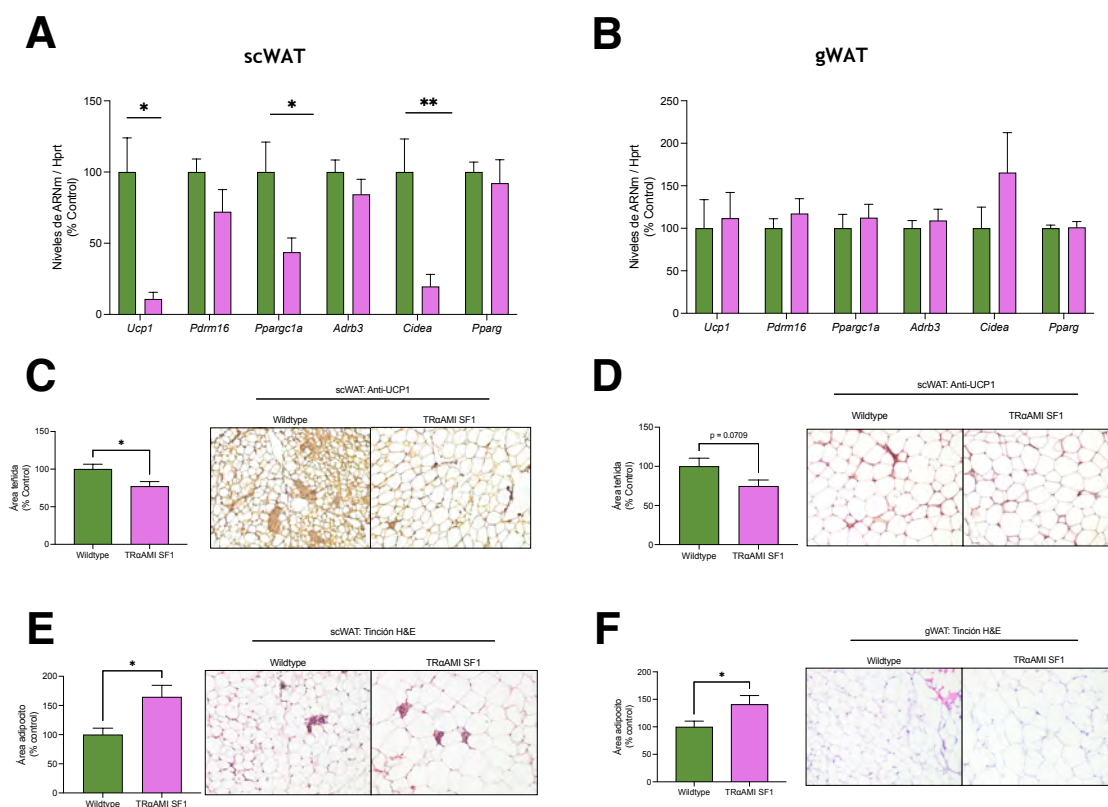


Figura 26. Efecto de la delección de TRa1 en las neuronas SF1 sobre el browning en scWAT y gWAT en hembras: (A-B) expresión de los niveles de ARNm en los depósitos de scWAT (panel izquierdo) (TRαAMI SF1 n= 9, WT n= 8) y gWAT (panel derecho) (TRαAMI SF1 n= 9, WT n= 7); (C-D) Inmunohistoquímica representativa con anticuerpo anti-UCP1 (20X) y cuantificación del área teñida en scWAT (panel izquierdo) (TRαAMI SF1 n= 14, WT n= 11) y gWAT (panel derecho) (TRαAMI SF1 n= 9, WT n= 9); (E-F) tinción hematoxilina-eosina (40X) y área de los adipocitos en scWAT (panel izquierdo) (TRαAMI SF1 n= 16, WT n= 12) y en gWAT (panel derecho) (TRαAMI SF1 n= 9, WT n= 9). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01.

16.2.3. Los animales TRαAMI SF1 presentan una peor adaptación al frío.

Está bien establecido que la exposición al frío es uno de los principales factores estimulantes de la termogénesis en el BAT y, que las hormonas tiroideas ejercen un importante rol en el mantenimiento de la temperatura corporal (Capelli et al., 2021; López et al., 2013; Peres et al., 2019; Rial-Pensado et al., 2022; Warner & Mittag, 2012). En este sentido, se ha estudiado el efecto de la exposición a frío (6 horas) en los ratones TRαAMI SF1. Tras 6 horas a frío los machos TRαAMI SF1 presentaban una peor adaptación a las bajas temperaturas ambientales. Esto se vio reflejado en una tendencia a una menor temperatura del BAT (Figura 27-A) y una menor temperatura corporal (Figura 27-B).

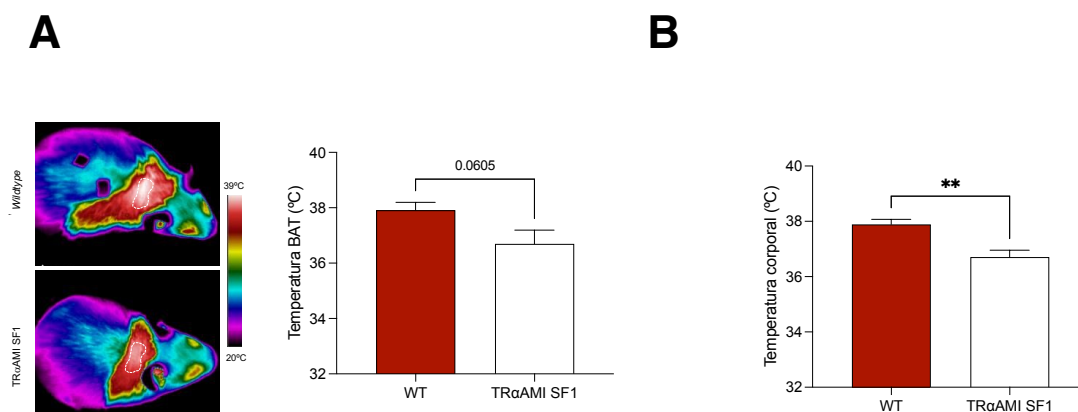


Figura 27. Efecto de la delección de TRα1 en las neuronas SF1 en la adaptación al frío: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TRαAMI SF1 n= 4, WT n= 5) y (B) temperatura corporal (TRαAMI SF1 n= 4, WT n= 5). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01.

Contrariamente a lo observado en machos, las hembras TRαAMI SF1 no mostraron una peor adaptación a temperaturas a 4°C. Esto se vio reflejado en la falta de variaciones en la temperatura adyacente al BAT de estos animales (Figura 28-A) y de la temperatura corporal (28-B), lo cual indica la presencia de dimorfismos sexual en esta respuesta.

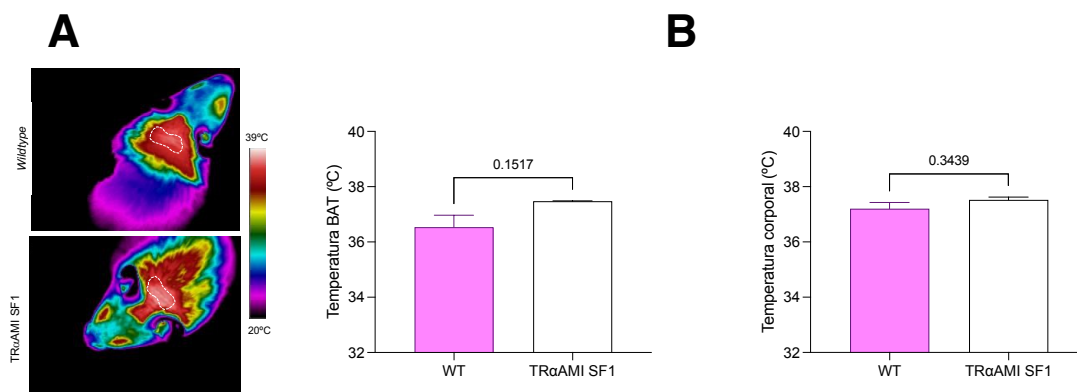


Figura 28. Efecto de la delección de TRα1 en las neuronas SF1 en la adaptación al frío: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TRαAMI SF1 n= 3, WT n= 5) y (B) temperatura corporal (TRαAMI SF1 n= 3, WT n= 5). Los valores se representan como Media ±SEM.

16.2.4. Los animales TRαAMI SF1 no presentan diferencias en la regulación de la glucemia.

Está bien estudiado que el VMH, y concretamente las neuronas SF1, juegan un papel importante en la CRR a la hipoglucemia (Fioramonti et al., 2011; Güemes & Georgiou, 2018; L. Tu et al., 2022b) y en la homeostasis de la glucosa. Estas evidencias nos han llevado a estudiar si la ablación de los efectos de THs sobre el receptor TRα1 en estas neuronas modificaba de algún modo la homeostasis de la glucosa a nivel periférico. El test de tolerancia a la glucosa (Figuras 29-A y 29-B) no mostró diferencias entre los *wildtype* y los machos

TR α AMI SF1. Los mismos resultados se observaron en el test de tolerancia a la insulina (Figuras 29-B y 29-C).

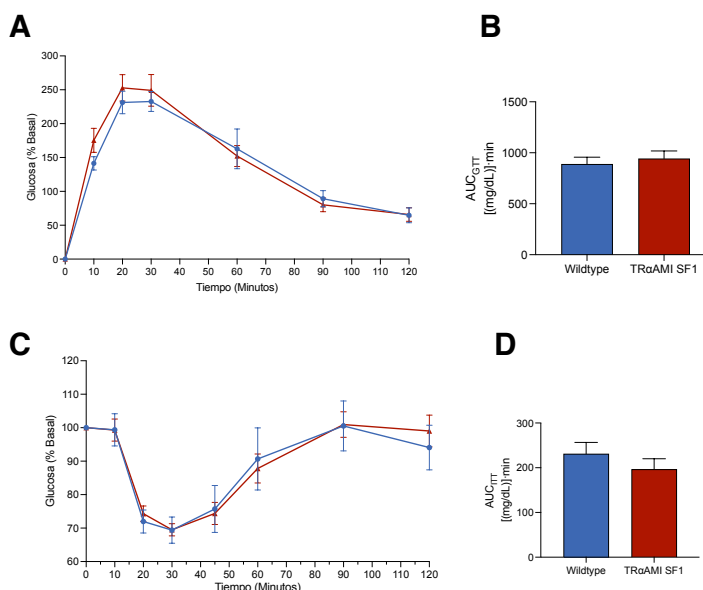


Figura 29. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones TR α AMI SF1 machos: (A-B) GTT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la GTT (TR α AMI SF1 n= 6, WT n= 7); (C-D) ITT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la ITT (TR α AMI SF1 n= 12, WT n= 10). Los valores se expresan como media \pm SEM.

Al igual que lo observado en machos, el test de tolerancia a la glucosa (Figura 30-A y 30-B) y el test de tolerancia a la insulina (Figura 30-C y 30-D) no mostraron diferencias en hembras. Esto sugiere que el receptor TR α 1 en las neuronas SF1 no regula la glucemia, en ninguno de los sexos.

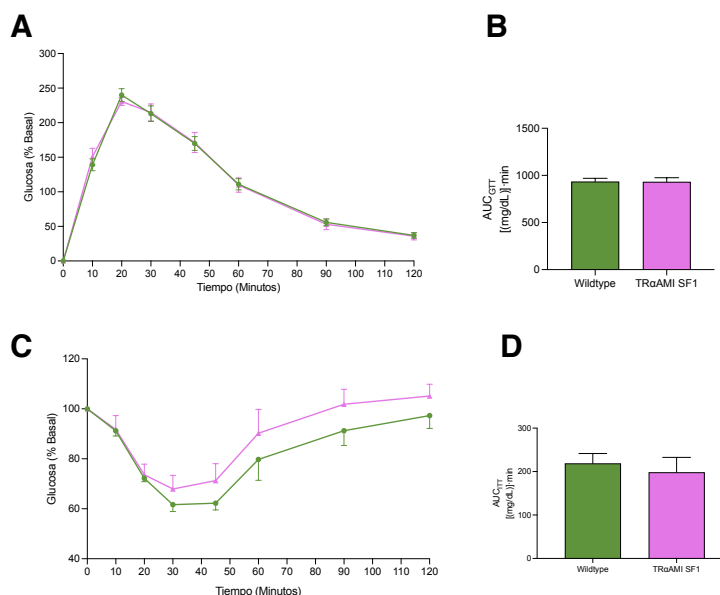


Figura 30. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones TR α AMI SF1 hembras: (A-B) GTT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la GTT (TR α AMI SF1 n= 16, WT n= 11); (C-D) ITT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la ITT (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se expresan como media \pm SEM.

16.2.5. Los animales TR α AMI SF1 no presentan diferencias en la lipogénesis hepática.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la disminución de AMPK inducida por T3 en el VMH regula la vía lipogénica hepática mediante la modulación de la quinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1), provocando un aumento de la tasa lipogénica en el hígado (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Partiendo de esta premisa se ha estudiado el metabolismo lipídico de los animales TR α AMI SF1.

Los resultados del análisis de la ruta de AMPK en el hígado por *western blot* no arrojan diferencias entre los ratones *knock-in* macho frente a sus controles (Figura 32-A), a diferencia de una disminución aislada de la proteína ACC. Tampoco se han observado variaciones en la acumulación de lípidos hepáticos (Figura 31-B) ni en la concentración de triglicéridos (TG) circulantes (Figura 31-C).

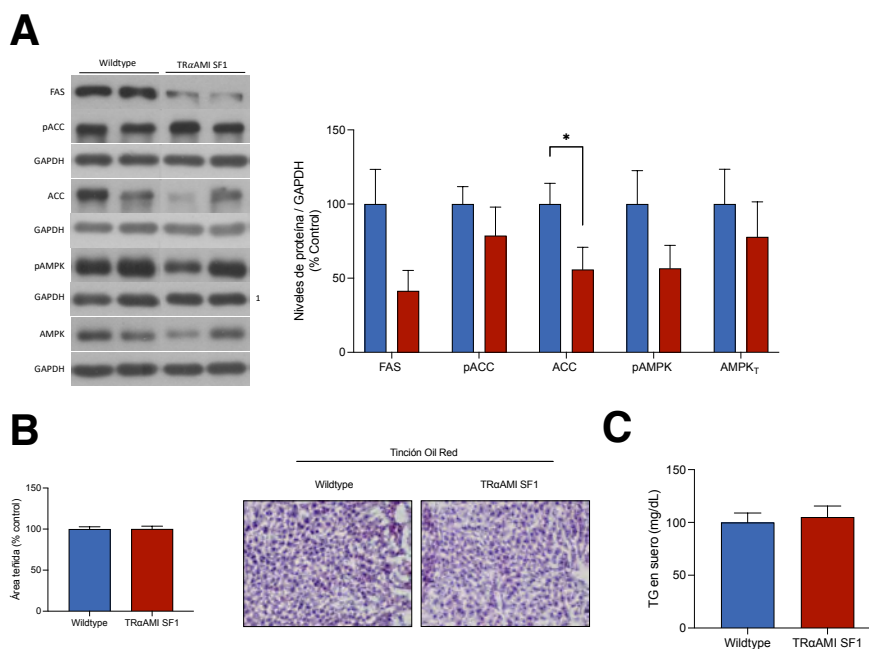


Figura 31. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en el metabolismo lipídico hepático en los ratones TR α AMI SF1 macho: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7); (B) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (40X, panel derecho) y su cuantificación (panel izquierdo) (TR α AMI SF1 n= 8, WT n= 6) y (C) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los datos se expresan como media \pm SEM. (1 Control de carga común para para FAS y pAMPK). * p < 0.05.

El mismo análisis en hembras, no mostró variaciones en la expresión proteica de la ruta de AMPK en este órgano (Figura 32-A). Como tampoco se observaron diferencias en la acumulación de lípidos en el hígado (Figura 32-B) ni en las concentraciones circulantes de TGs (Figura 32-C).

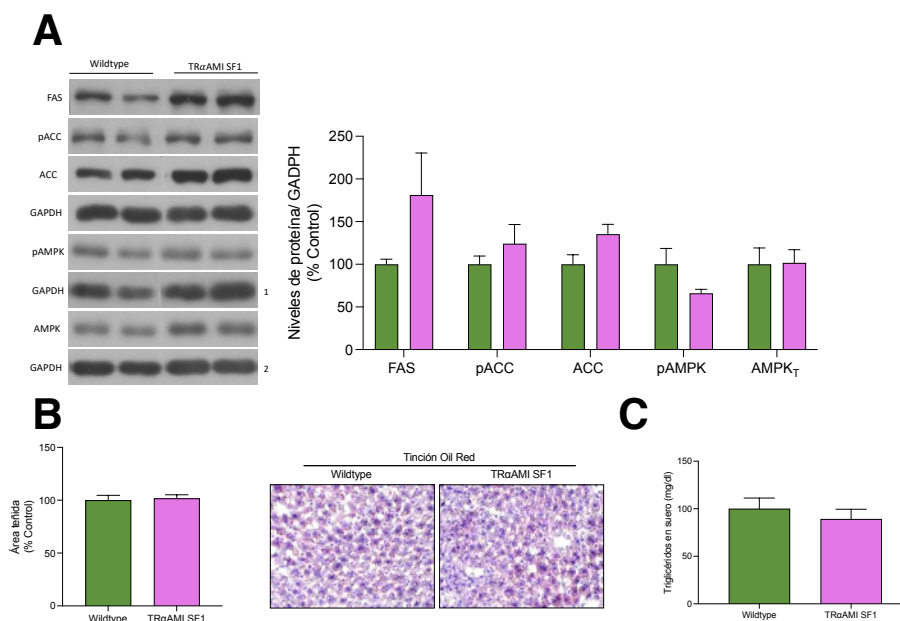


Figura 32. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en el metabolismo lipídico hepático en los ratones TR α AMI SF1 hembra: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7); (B) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (40X, panel derecho) y su cuantificación (panel izquierdo) (TR α AMI SF1 n= 12, WT n= 15) y (C) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (TR α AMI SF1 n= 9, WT n= 9). Los datos se expresan como media \pm SEM. (1 Control de carga común para pAMPK y pACC. 2 control de carga común para FAS y AMPK)

16.2.6. Los animales TR α AMI SF1 no presentan diferencias en la ruta de AMPK en el VMH.

Como ya se ha comentado anteriormente, la estimulación de las neuronas SF1 con T3 es capaz de regular AMPK. Estos cambios, a su vez, conllevan a cambios periféricos que regulan el metabolismo energético. Hemos visto que, en estado basal, sin administración central de T3, no se observan cambios en la vía de AMPK en el VMH por *western blot* ni en machos (Figuras 33) ni en hembras (Figura 34).

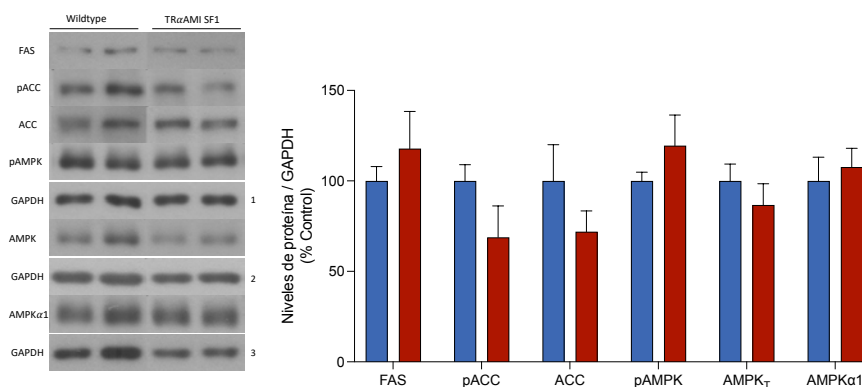


Figura 33. Efecto de la delección de TR α 1 en las neuronas SF1 en la ruta de AMPK: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el VMH (TR α AMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los datos se expresan como media \pm SEM. (1 Control de carga común para pACC y pAMPK; 2 Control de carga común para FAS y AMPK; 3 Control de carga común para ACC y AMPK α 1).

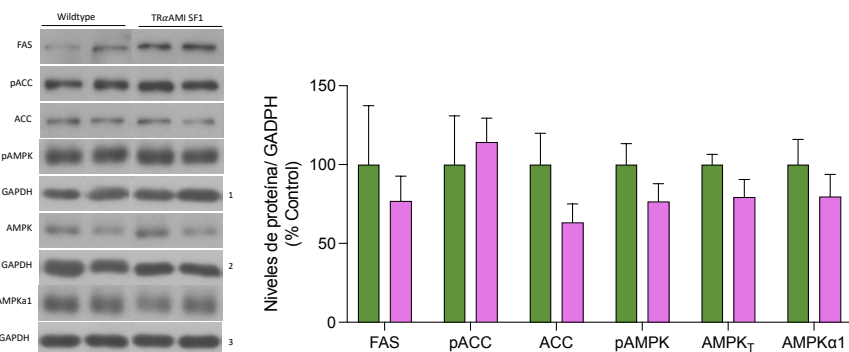


Figura 34. Efecto de la delección de TRα1 en las neuronas SF1 en la ruta de AMPK: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el VMH (TRαMI SF1 n= 7, WT n= 7). Los datos se expresan como media± SEM. (1 Control de carga común para pACC y pAMPK; 2 Control de carga común para FAS y AMPK; 3 Control de carga común para ACC y AMPKα1).

16.2.7. La inducción del hipertiroidismo en los animales carentes del receptor TRα1 en el VMH no se presenta de forma paralela a sus controles.

Posteriormente hemos llevado a cabo algunas aproximaciones con el fin de demostrar que los efectos observados sobre la regulación de la termogénesis a nivel central estaban realmente mediados por el receptor TRα1. En primer lugar, se decidió inducir un estado hipertiroideo en estos animales mediante la administración de T3 en agua de bebida durante un periodo de 14 días. Para ello se utilizaron machos TRαMI SF1 y sus respectivos controles, que se dividieron a su vez en dos grupos, los tratados con T3 y los tratados con vehículo (VH). Los resultados in vivo no mostraron que las diferencias significativas de peso entre los ratones TRαMI SF1 y sus controles *wildtype* (Figura 35-A). Sin embargo, ambos grupos respondieron al efecto de la hormona en lo relativo a la ingesta (Figura 38-B), observándose un claro efecto orexigénico. En cuanto a lo que a la temperatura del BAT se refiere, mientras que los animales *wildtype* parecen responder a los efectos termogénicos de la T3 con una temperatura del BAT más alta, los ratones TRαMI SF1 no presentaron dicha respuesta, siendo la temperatura de los animales tratados con vehículo y los tratados con T3 la misma (Figura 35-C). En cambio, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos en la temperatura corporal (Figura 35-D).

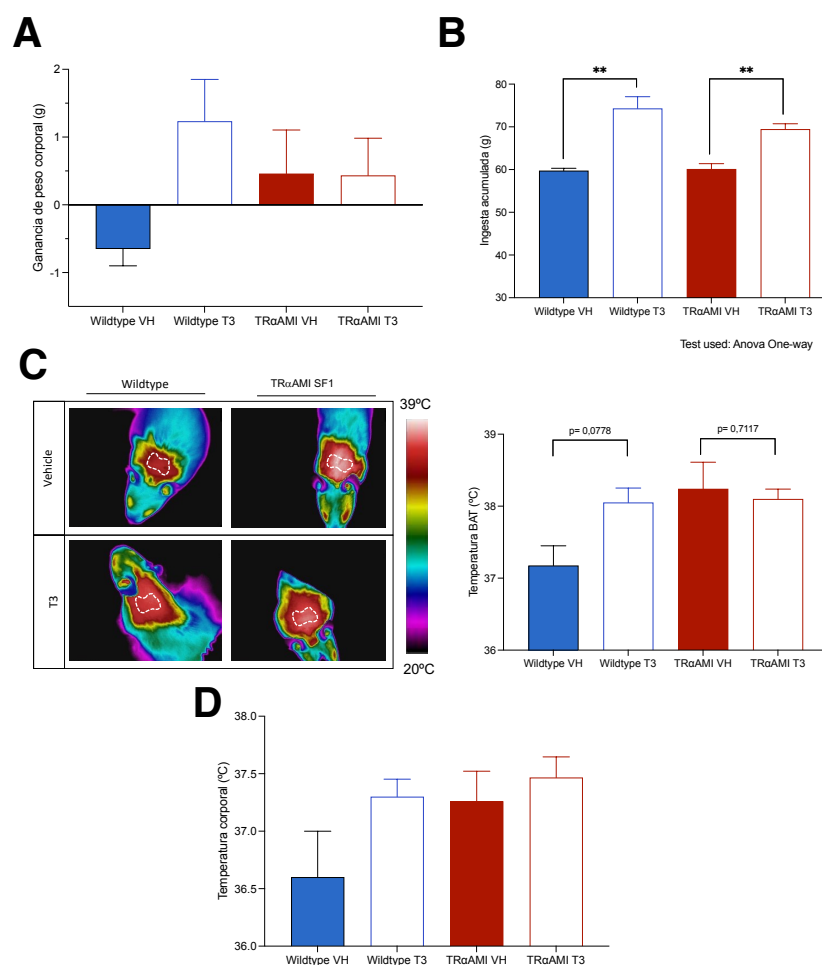


Figura 35. Respuesta a la inducción del hipertiroidismo en los ratones TRαMI SF1: (A) Ganancia de peso corporal; (B) Ingesta de alimento acumulada; (C) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas y (D) Temperatura corporal (TRαMI SF1 VH n= 5, TRαMI SF1 T3 n= 6, WT VH n= 2, WT T3 n= 3). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por One-way ANOVA. * p < 0.05; ** p < 0.01.

16.2.8. El tratamiento con adenovirus asociados que expresan un receptor TRα1 dominante positivo rescata parcialmente el fenotipo de los ratones TRαMI.

Otra de las aproximaciones realizadas con el fin de evaluar que los efectos observados en este modelo eran originados por la falta de activación del receptor TRα1 en el VMH y no debidos a otras causas asociadas, fue el tratamiento de estos animales con un adenovirus asociado (AAV) que expresa la isoforma dominante positiva de TRα1 (TRα1VP16). Tras la administración de estos virus en el núcleo ventromedial del hipotálamo no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal (Figura 36-A) ni en la ingesta acumulada de alimento (Figura 36-B) durante los 21 días que duró el experimento. En cambio, tras exponer a estos animales durante un periodo de 6 horas a frío, se observó una mejor adaptación de los animales tratados con el virus TRα1VP16-AAV a estas temperaturas, presentando una mayor temperatura corporal (Figura 36-C).

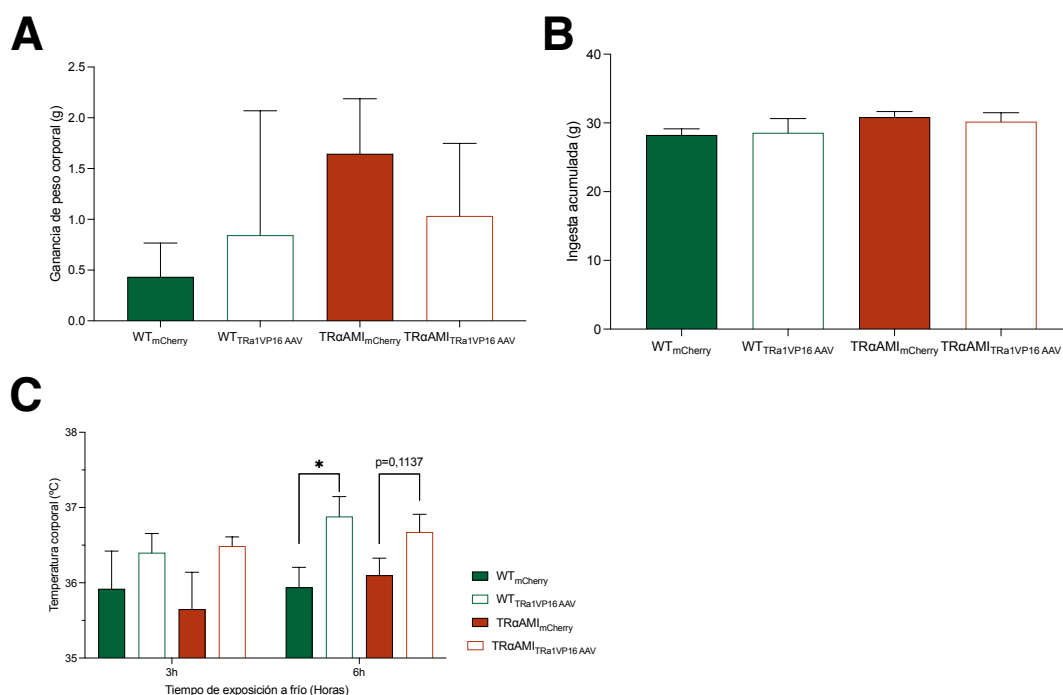


Figura 36. Efecto de la expresión de un receptor TR α 1 dominante positivo en VMH en animales TR α AMI SF1: (A) Ganancia de peso corporal; (B) Ingesta de alimento acumulada; (C) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT (panel izquierdo) y cuantificación de la temperatura de estas (panel derecho) y (D) Temperatura corporal (TR α AMI SF1 GFP n= 6, TR α AMI SF1 TR α 1VP16 n= 8, WT GFP n= 5, WT TR α 1VP16 n= 5). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por One-way ANOVA. * p < 0.05.

16.3. EFECTO DE LA ABLACIÓN DEL RECEPTOR BETA 1 DE HORMONAS TIROIDEAS (TR β 1) EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.

16.3.1. Caracterización de la eliminación de TR β 1 en las neuronas SF1 del VMH.

Paralelamente a la generación del modelo TR α AMI SF1, se generó el modelo *knockout* para la isoforma TR β 1. Para ello se cruzaron los ratones TR β 1^{lox} (Selmi-Ruby et al., 2014; Winter et al., 2009b) con los ratones SF1-Cre. La efectividad de la recombinación del sistema Cre/lox se validó mediante PCR en el VMH. Los cebadores de la PCR del modelo TR β 1 SF1 KO se diseñaron para que se amplificase una banda recombinante de 601 pb, cuando se produjese la excisión del exón 5 tras la recombinación por la Cre-recombinasa. El análisis por PCR de los VMH en estos animales reveló la presencia de una banda de 600 pb en los ratones TR β 1 KO SF1 (Figura 37), lo que confirma la eficacia de la recombinación genética en este estudio.

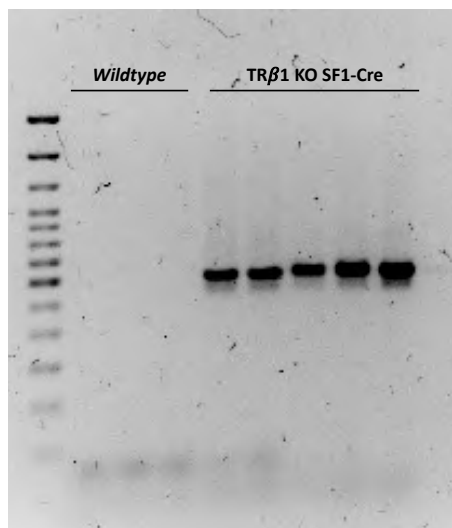


Figura 37. Estudio de la efectividad de la recombinación por la Cre-recombinasa en las neuronas SF1. (A) PCR para la detección del alelo recombinado del gen *Thrb* en las neuronas SF1 del VMH en modelo animal $TR\beta^{KO}$.

16.3.2. La ablación del efecto de las hormonas tiroideas sobre el receptor beta no afecta ni al peso corporal ni al gasto energético.

Con el fin de averiguar si los efectos centrales sobre el balance energético por hormonas tiroideas eran debidos únicamente a los efectos sobre una de las de las dos isoformas de los receptores de hormonas tiroideas ($TR\alpha$ y $TR\beta$) o a ambas, además de la generación del modelo $TR\alpha$ AMI, se generó una línea animal en la que se deletionó el receptor $TR\beta$ 1 en las neuronas SF1 mediante el sistema Cre/lox. Tras el fenotipado metabólico de estos animales, se observó que los ratones $TR\beta^{KO}$ SF1 macho no mostraban diferencias ni en la masa corporal (Figuras 38-A) ni en la ingesta diaria de alimento (Figura 38-B). Así mismo, tampoco presentaban diferencias en los diferentes depósitos grasos (Figuras 38-C y Figura 38-D) ni en la ingesta (Figuras 38-B y 38-B).

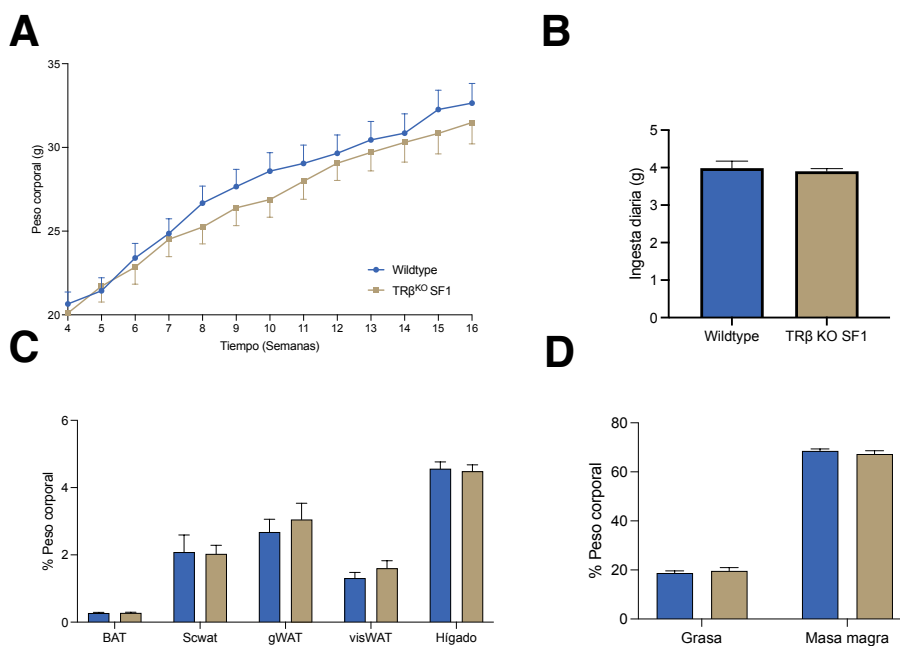


Figura 38. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 en la masa y composición corporal en los machos: (A) Ganancia de peso corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 25, WT n= 21); (B) ingesta diaria de alimento (TRβ^{KO} SF1 n= 9, WT n= 8); (C) BAT, gWAT, scWAT e hígados pesados inmediatamente después de ser diseccionados y normalizados por el peso corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 15, WT n= 16) y (D) composición corporal ((TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas) para la ingesta y masa y composición corporal y un Two-way ANOVA para la ganancia de peso corporal.

Paralelamente a los estudios realizados en machos, se monitorizó el peso de las hembras durante 16 semanas. Estos datos no mostraron variaciones en la masa corporal (Figura 39-A). La monitorización de la ingesta durante 5 días tampoco arrojó diferencias entre ambos grupos (Figura 39-B), como tampoco se observaron diferencias en ellos depósitos grasos (Figura 39-C y Figura 39-D).

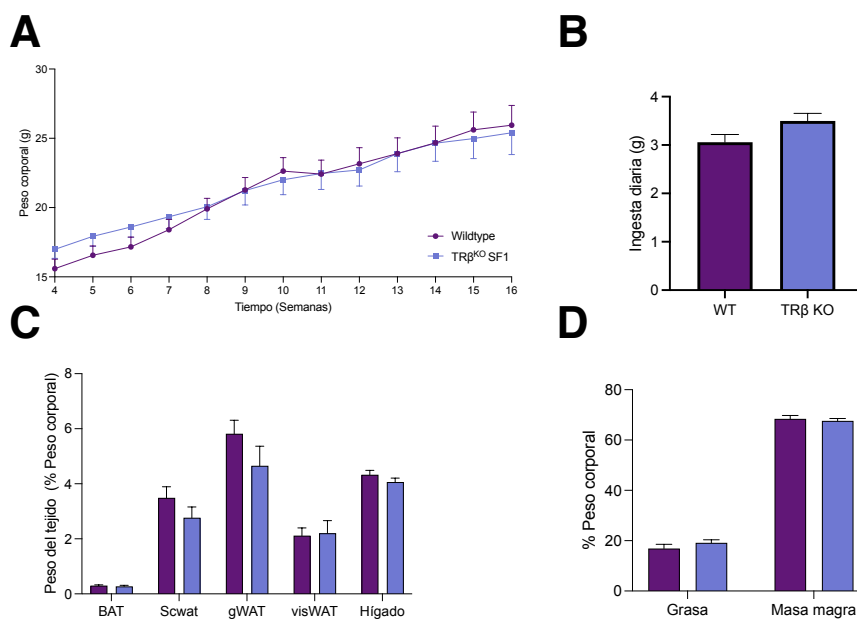


Figura 39. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 en la masa y composición corporal en los machos: (A) Ganancia de peso corporal (TR β ^{KO} SF1 n= 19, WT n= 16); (B) ingesta diaria de alimento (TR β ^{KO} SF1 n= 11, WT n= 9); (C) BAT, gWAT, scWAT e hígados pesados inmediatamente después de ser diseccionados y normalizados por el peso corporal (TR β ^{KO} SF1 n= 15, WT n= 12) y (D) composición corporal ((TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas) para la ingesta y masa y composición corporal y un Two-way ANOVA para la ganancia de peso corporal.

Al igual que en los animales TR α AMI SF1, se procedió al estudio del gasto energético en los animales TR β ^{KO} SF1 mediante la calorimetría indirecta. Los resultados mostraron una ausencia de cambios en lo referente al gasto energético en machos (Figuras 40-A y 40-B). El análisis ANCOVA, utilizando la masa corporal como covariable (Figura 40-C) tampoco mostró diferencias en el gasto energético entre los animales TR β ^{KO} SF1 y sus hermanos *wildtype*. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias en el coeficiente respiratorio (Figura 40-D) ni en la actividad locomotora (Figura 40-F).

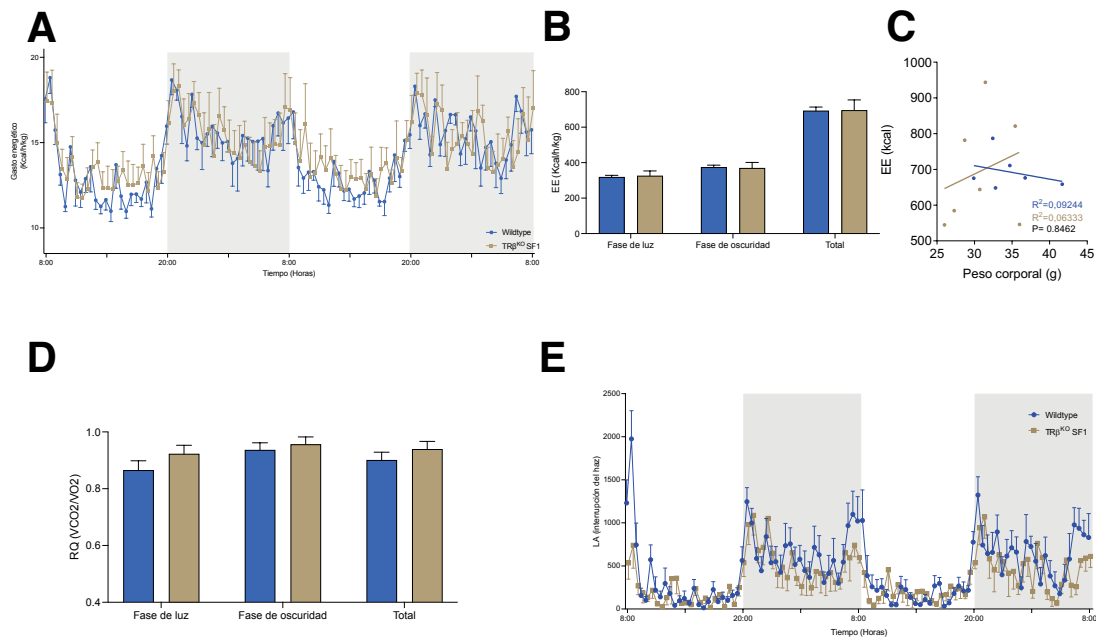


Figura 40. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 en la homeostasis energética de ratones macho: (A) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (H1) (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6); (B) Gasto energético medio durante las diferentes fases de luz; (C) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable; (D) Coeficiente respiratorio medio durante las diferentes fases de luz (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6); (E) Actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas).

Estos mismos análisis en hembras no mostraron diferencias en el gasto energético (Figuras 41-A, 41-B y 41-C), ni en la actividad locomotora (Figuras 41-E). Sin embargo, a diferencia de lo observado en machos, las hembras TR β ^{KO} SF1 mostraron un mayor RQ (Figura 41-D) lo cual es indicativo de una mayor oxidación de carbohidratos.

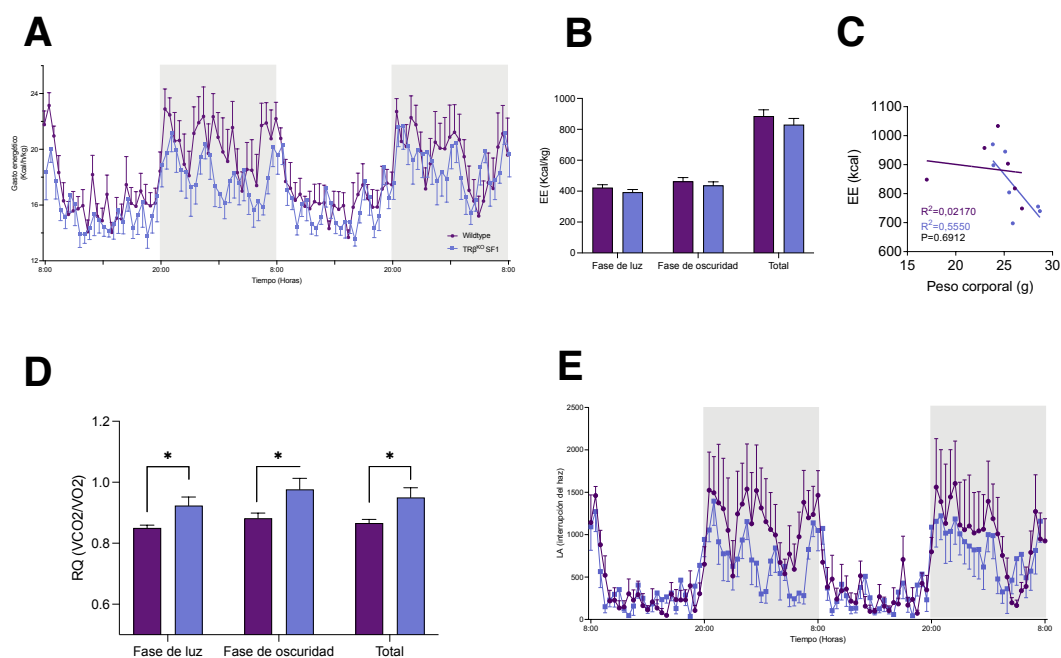


Figura 41. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 en la homeostasis energética de ratones hembra: (A) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (H1)(TR β ^{ko} SF1 n= 7, WT n= 6); (B) Gasto energético medio durante las diferentes fases de luz; (C) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable; (D) Coeficiente respiratorio medio durante las diferentes fases de luz (TR β ^{ko} SF1 n= 7, WT n= 6); (E) Actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (TR β ^{ko} SF1 n= 7, WT n= 6). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas).

16.3.3. Los animales TR β SF1 no presentan cambios en la termogénesis en el BAT ni en el browning en el tejido adiposo blanco.

Simultáneamente a los estudios sobre la capacidad termogénica del BAT que fueron realizados en los animales TR α AMI SF1, se decidió estudiar también la maquinaria termogénica en los ratones *Knock-out* para el receptor TR β 1. Estos estudios no mostraron diferencias en la temperatura del área adyacente al BAT (Figura 42-A) ni en la temperatura corporal (Figura 42-B) de los machos TR β ^{ko} SF1. En concordancia con estos resultados, el estudio por *western blot* (Figura 42-D) y *RT-PCR* (Figura 42-C) no mostró diferencias en la expresión de los marcadores termogénicos en el BAT.

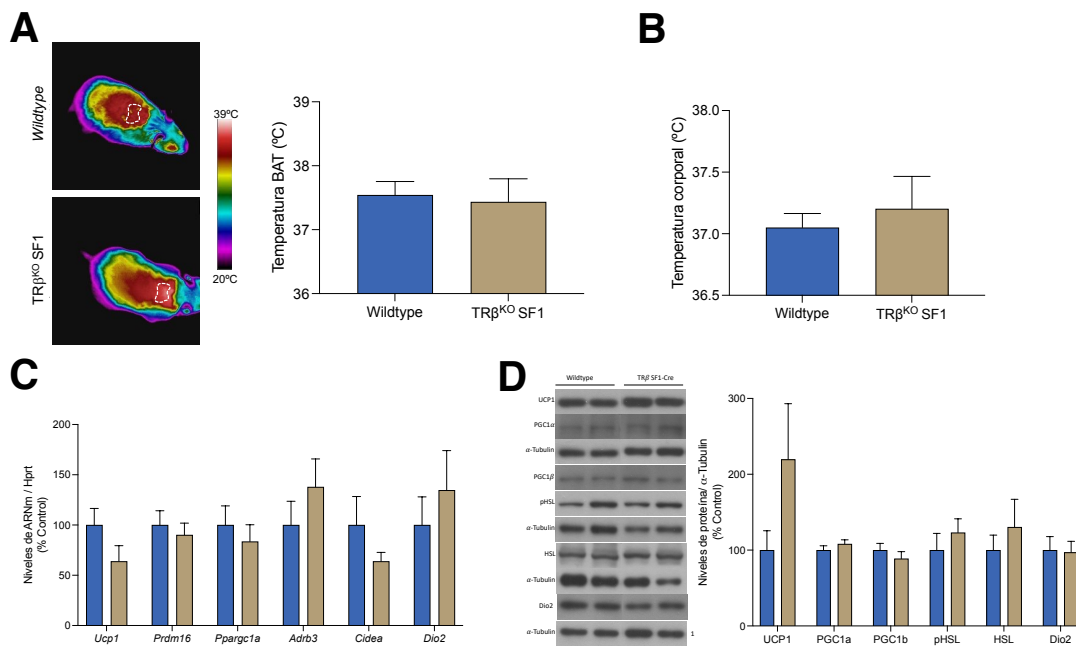


Figura 42. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 sobre la termogénesis del BAT de ratones macho: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7); (B) temperatura corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7); (C) análisis de la expresión de ARNm de los marcadores termogénicos en el BAT (TRβ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 8); (D) niveles proteicos de los marcadores termogénicos en el BAT (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). (1 Control de carga común para PGC1β y Dio2).

Al igual que lo observado en machos, las hembras TRβ^{KO} SF1 no mostraron diferencias en la temperatura adyacente al BAT (Figura 43-A), en la temperatura corporal (Figura 43-B) ni en los marcadores termogénicos estudiados por *western blot* (Figura 43-D) y *RT-PCR* (Figura 43-C).

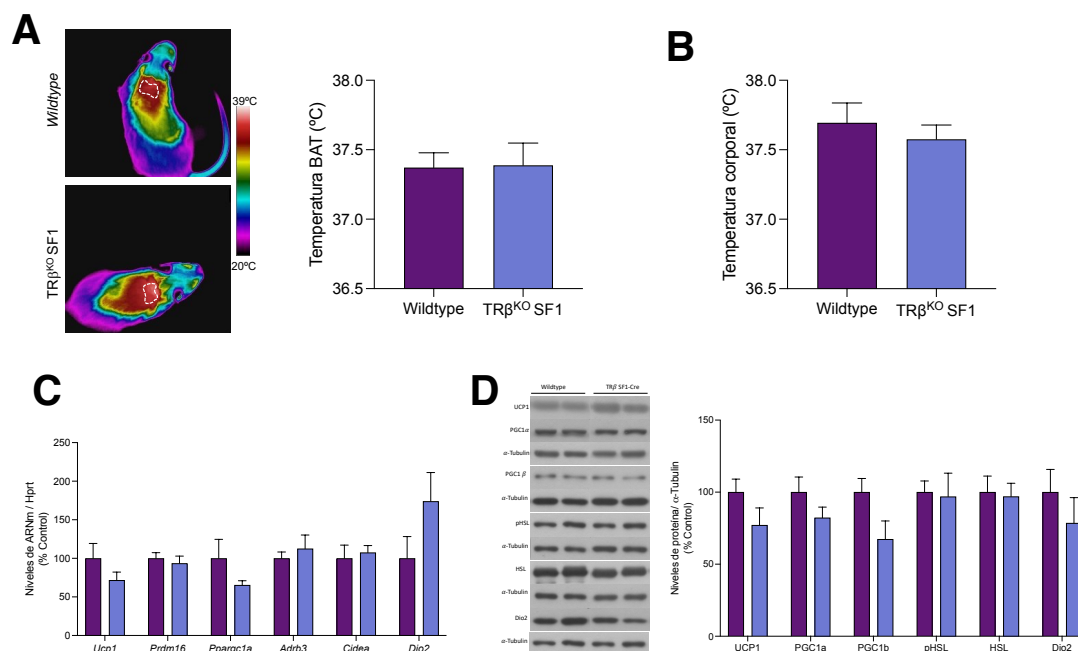


Figura 43. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 sobre la termogénesis del BAT de ratones hembra: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas (TRβ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 9); (B) temperatura corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 9); (C) análisis de la expresión de ARNm de los marcadores termogénicos en el BAT (TRβ^{KO} SF1 n= 6, WT n= 8); (D) niveles proteicos de los marcadores termogénicos en el BAT (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas).

En el análisis de los niveles de mRNA de los marcadores de *browning* no se observaron diferencias en ninguno de los marcadores estudiados ni en scWAT (Figura 44-A) ni en gWAT (Figura 44-B), a diferencia de *Ppargc1a* en la que se observa una disminución. Junto con estos resultados, tampoco se apreciaron diferencias en la inmunotinción de UCP1 en estos tejidos (Figuras 44-C y 44-D) ni en el área de los adipocitos (Figuras 44-E y 44-F).

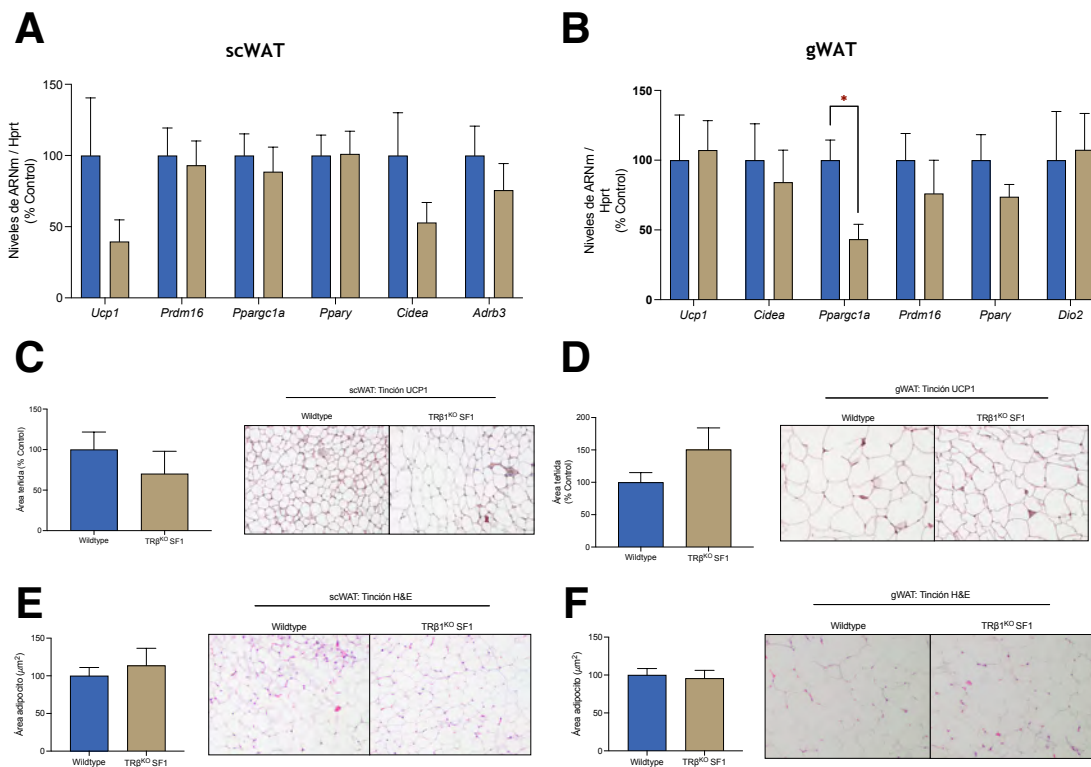


Figura 44. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 sobre el browning en scWAT y gWAT de ratones macho: (A-B) expresión de los niveles de ARNm en los depósitos de scWAT (panel izquierdo) (TRβ^{KO} SF1 n= 6, WT n= 7) y gWAT (panel derecho) (TRβ^{KO} SF1 n= 5, WT n= 7); (C-D) Inmunohistoquímica representativa con anticuerpo anti-UCP1 (20X) y cuantificación del área teñida en scWAT (panel izquierdo) (TRβ^{KO} SF1 n= 9, WT n= 11) y gWAT (panel derecho) (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 12); (E-F) tinción hematoxilina-eosina (40X) y área de los adipocitos en scWAT (panel izquierdo) (TRβ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 15) y en gWAT (panel derecho) (TRβ^{KO} SF1 n= 12, WT n= 14). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05.

En el caso de las hembras KO para TRβ1, tampoco presentaban diferencias en cuanto a la expresión marcadores de *browning* en scWAT (Figura 45-A) y gWAT (Figura 45-B), así como tampoco mostraban diferencias en la inmunotinción UCP1 (Figuras 45-C y 45-D) ni en la morfología de los adipocitos de estos dos tejidos (Figuras 45-E y 45-F). Estos datos sugieren que, el receptor β de hormonas tiroideas en las neuronas SF1 no ejerce un rol relevante en la regulación de la termogénesis del BAT ni en el *browning* del tejido adiposo blanco.

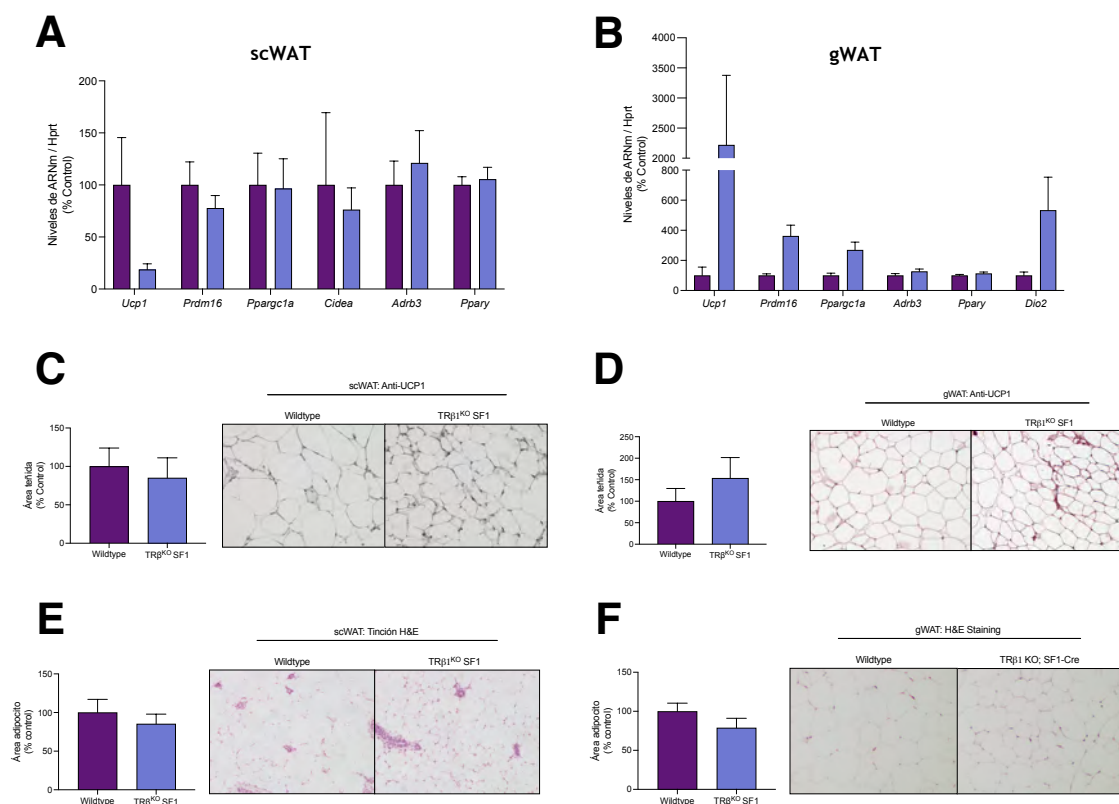


Figura 45. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 sobre el browning en scWAT y gWAT de ratones macho: (A-B) expresión de los niveles de ARNm en los depósitos de scWAT (panel izquierdo) (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 6) y gWAT (panel derecho) (TR β ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 7); (C-D) Inmunohistoquímica representativa con anticuerpo anti-UCP1 (20X) y cuantificación del área teñida en scWAT (panel izquierdo) (TR β ^{KO} SF1 n= 9, WT n= 11) y gWAT (panel derecho) (TR β ^{KO} SF1 n=8, WT n= 10); (E-F) tinción hematoxilina-eosina (40X) y área de los adipocitos en scWAT (panel izquierdo) (TR β ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 12) y en gWAT (panel derecho) (TR β ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 12). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas).

16.3.4. Los animales TR β KO SF1 no presentan diferencias en la adaptación al frío.

Con el fin de determinar el papel que juega el receptor TR β en la regulación de la termogénesis y, del mismo modo que el estudio realizado previamente en los TR α AMI SF1, se expusieron a los animales TR β ^{KO} SF1 durante a 6 horas a 4°C. Tras las 6 horas de experimento los machos KO no mostraron diferencias en cuanto a la temperatura del área adyacente al BAT (Figura 46-A) ni en la temperatura corporal (Figura 46-B).

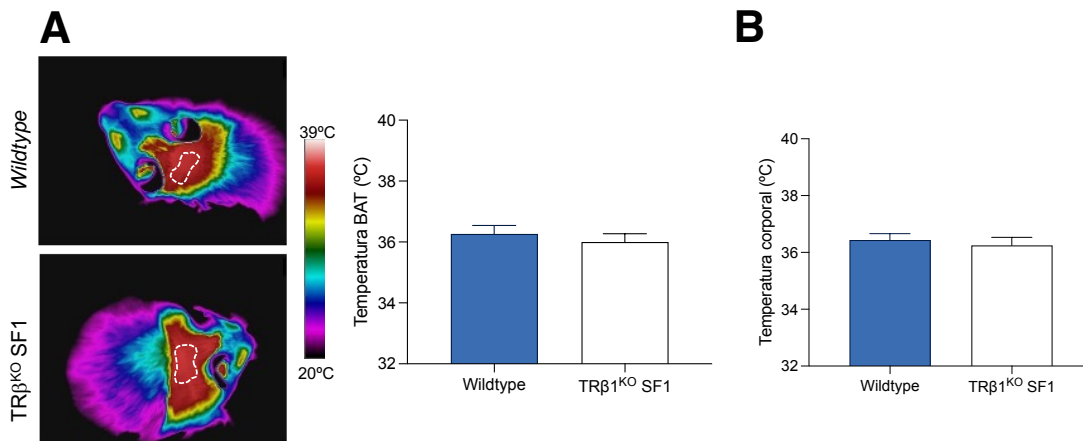


Figura 46. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 en la adaptación al frío de ratones macho: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT (panel izquierdo) y cuantificación de la temperatura de estas (panel derecho) (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7) y (B) temperatura corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media ±SEM.

Contrariamente a los resultados observados en los machos TRβ^{KO} SF1, las hembras presentaban una mejor capacidad de adaptación mostrando un aumento de la capacidad termogénica del BAT que se ve reflejado en una mayor temperatura del área adyacente a este órgano (Figura 47-A) y a una ligera tendencia a una mayor temperatura corporal (Figura 47-B).

En resumen, los datos obtenidos corroboran la hipótesis de que el receptor TRβ1 no presenta un papel relevante en la regulación de la termogénesis adaptativa en machos. Sin embargo, los datos obtenidos en hembras sugieren la existencia de dimorfismo sexual en esta respuesta.

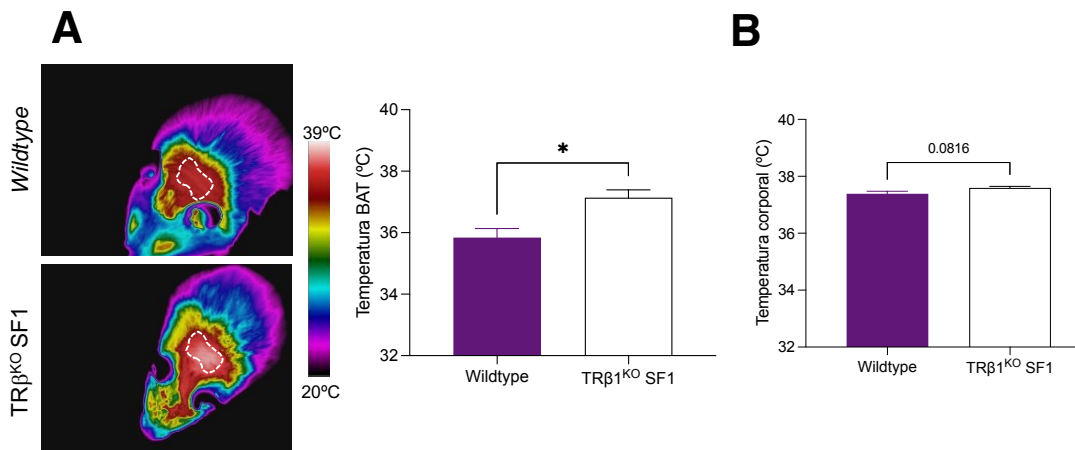


Figura 47. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 en la adaptación al frío de ratones hembra: (A) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT (panel izquierdo) y cuantificación de la temperatura de estas (panel derecho) (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7) y (B) temperatura corporal (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los valores se representan como Media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05.

16.3.5. La ablación del receptor TR β en las neuronas SF1 no afecta a la regulación de la glucemia.

Del mismo modo que los estudios realizados con los animales TR α AMI SF1, con el fin de dilucidar si los receptores de hormonas tiroideas en las neuronas SF1 ejercen algún control sobre la homeostasis de la glucosa, se realizaron GTT e ITT en los ratones TR β ^{KO} SF1. En el caso de los machos, no se observaron diferencias ni en la GTT (Figura 48-A y 48-B) ni en la ITT (Figura 48-C y 48-D).

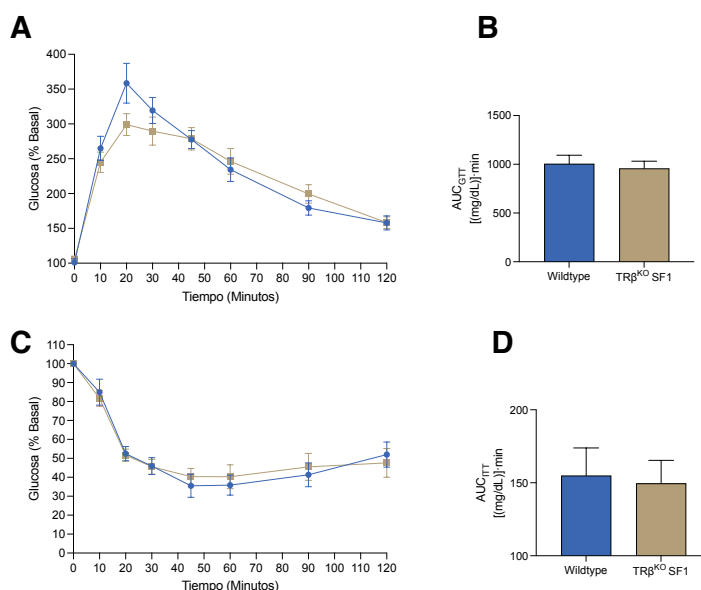


Figura 48. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones TR β ^{KO} SF1 macho: (A-B) GTT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la GTT (TR β ^{KO} SF1 n= 11, WT n= 12); (C-D) ITT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (*area under curve*) de la ITT (TR β ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 8). Los valores se expresan como media \pm SEM.

A diferencia de los machos, las hembras TR β ^{KO} SF1 mostraron una peor tolerancia a la glucosa (Figuras 49-A). Estas diferencias se vieron reflejadas en una mayor área bajo la curva (Figura 49-B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos en la ITT (Figuras 49-C y 49-D).

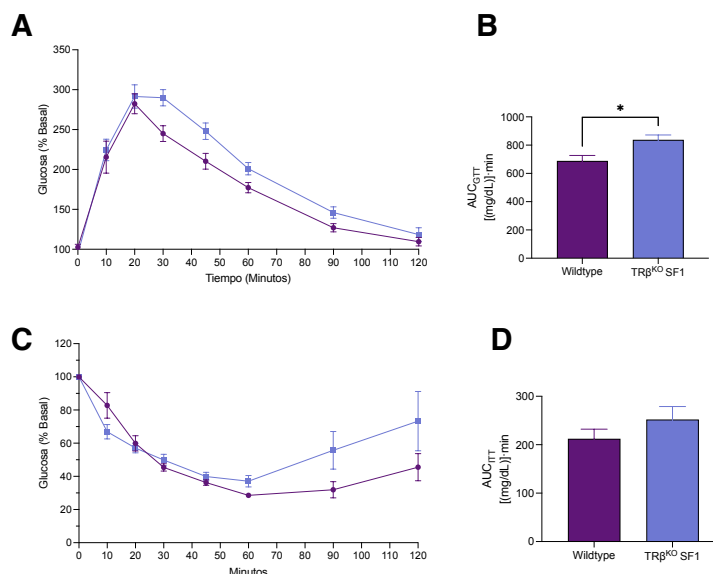


Figura 49. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina (ITT) en los ratones TRβ^{KO} SF1 hembra: (A-B) GTT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (area under curve) de la GTT (TRβ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 7); (C-D) ITT (panel izquierdo) y área bajo la curva AUC (area under curve) de la ITT (TRβ^{KO} SF1 n= 9, WT n= 8). Los valores se expresan como media ±SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05.

16.3.6. Los animales TRβ KO SF1 no presentan diferencias en la lipogénesis hepática.

Como se comentaba anteriormente, las neuronas SF1 del VMH juegan un papel importante en la regulación de la lipogénesis hepática por T3 a través de JNK1 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Estas evidencias han motivado el estudio de la síntesis de ácidos grasos hepáticos en los animales KO para el receptor beta de hormonas tiroideas. En este sentido, el estudio en machos de la expresión proteicas de la ruta de AMPK no ha mostrado diferencias entre ambos grupos (Figuras 50-A). Tampoco se han observado diferencias en la tinción oil-red (Figura 50-B) ni en los niveles circulantes de triglicéridos (Figura 50-C).

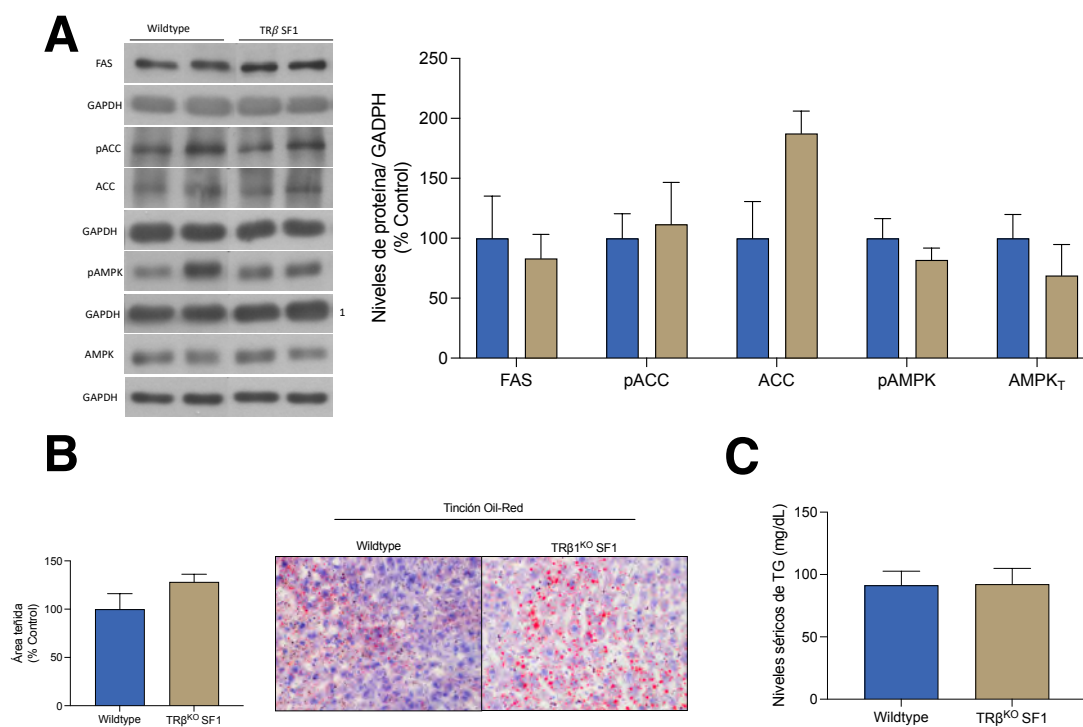


Figura 50. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 en el metabolismo lipídico hepático en machos: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7); (B) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (40X, panel derecho) y su cuantificación (panel izquierdo) (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 5) y (C) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (TRβ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 8). Los datos se expresan como media± SEM. (1 Control de carga común pACC y pAMPK).

Estos mismos análisis en hembras, únicamente mostraron diferencias en los niveles proteicos de FAS (Figura 51-A). Contrariamente a esta elevación de los niveles de FAS en el hígado no se presentaron diferencias ni en la acumulación de lípidos hepáticos (Figura 51-B) y en los niveles séricos de triglicéridos (Figuras 51-C).

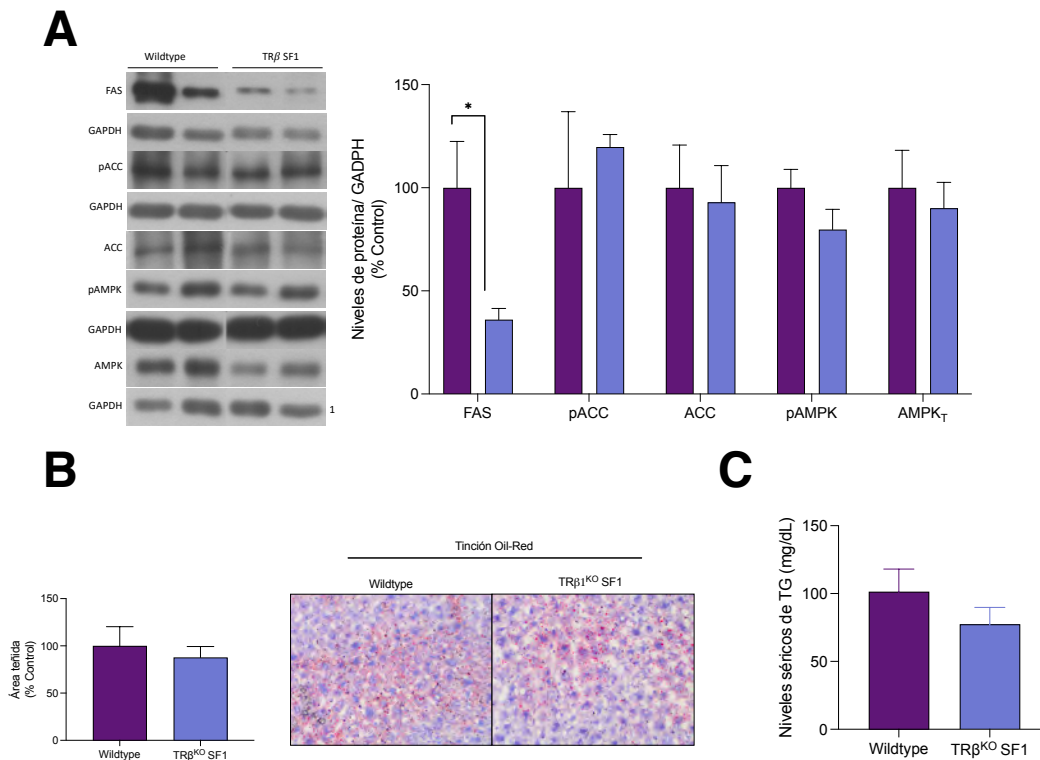


Figura 51. Efecto de la delección de TRβ1 en las neuronas SF1 en el metabolismo lipídico hepático en hembras: (A) Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el hígado (TRβ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7); (B) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (40X, panel derecho) y su cuantificación (panel izquierdo) (TRβ^{KO} SF1 n= 10, WT n= 6) y (C) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (TRβ^{KO} SF1 n= 8, WT n= 8). Los datos se expresan como media± SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05. (1 Control de carga común para ACC y AMPK).

16.3.7. Los animales TRβKO SF1 no presentan diferencias en la ruta de AMPK en el VMH.

El estudio de la ruta de AMPK en el VMH en los ratones macho TRβ^{KO} SF1 no mostró diferencias significativas en ninguna de estas proteínas con la excepción de ACC en machos (Figura 52). En el caso de las hembras, éstas únicamente presentan diferencias en los niveles proteicos de FAS (Figura 53).

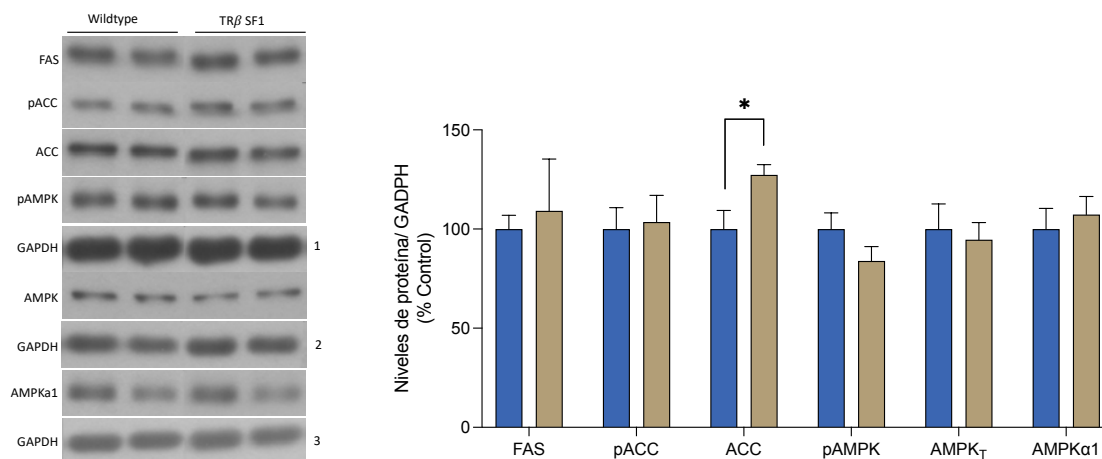


Figura 52. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 en la ruta de AMPK en ratones macho: Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el VMH (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los datos se expresan como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05. (1 Controles de carga comunes para pACC y pAMPK; 2 Controles de carga comunes para FAS y AMPK; 3 Controles de carga comunes para ACC y AMPK α 1)

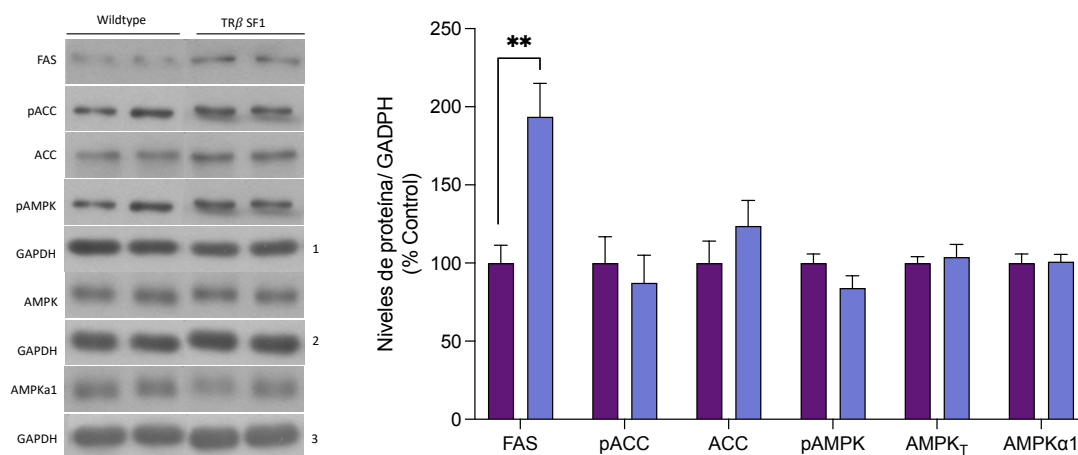


Figura 53. Efecto de la delección de TR β 1 en las neuronas SF1 en la ruta de AMPK en ratones hembra: Niveles de proteína de la ruta de AMPK en el VMH (TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7). Los datos se expresan como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01. (1 Controles de carga comunes para pACC y pAMPK; 2 Controles de carga comunes para FAS y AMPK; 3 Controles de carga comunes para ACC y AMPK α 1)

16.3.8. La ablación del receptor TR β 1 en las neuronas SF1 no modifica la respuesta al hipertiroidismo inducido de forma periférica

Con el propósito de valorar la capacidad de respuesta de estos animales a los efectos de las hormonas tiroideas se decidió inducir un estado hipertiroides de forma periférica a los machos TR β ^{KO} SF1. Estudios previos de inducción oral del hipertiroidismo mostraron que los animales hipertiroides presentaban mayor capacidad termogénica, aumento de la ingesta y un aumento de peso corporal, debido a la inducción del crecimiento (Capelli et al., 2021). Estos mismos resultados se observaron en los ratones TR β ^{KO} SF1. Los animales tratados con T3 oral presentaban una mayor ganancia de peso (Figura 54-A) junto con una mayor ingesta de comida

(Figura 54-B) independientemente de su genotipo. Paralelamente a estos resultados, los animales tratados con T3 presentaban una mayor temperatura corporal (Figura 54-D) frente a sus controles vehículo, aunque sin cambios significativos en la temperatura adyacente al BAT (Figura 54-C). Estos datos sugieren que la falta del receptor TR β 1 en el VMH no interfiere en la respuesta a T3 periférica, a diferencia de lo que ocurría con los animales con una mutación dominante negativa para el receptor TR α 1 en las neuronas SF1.

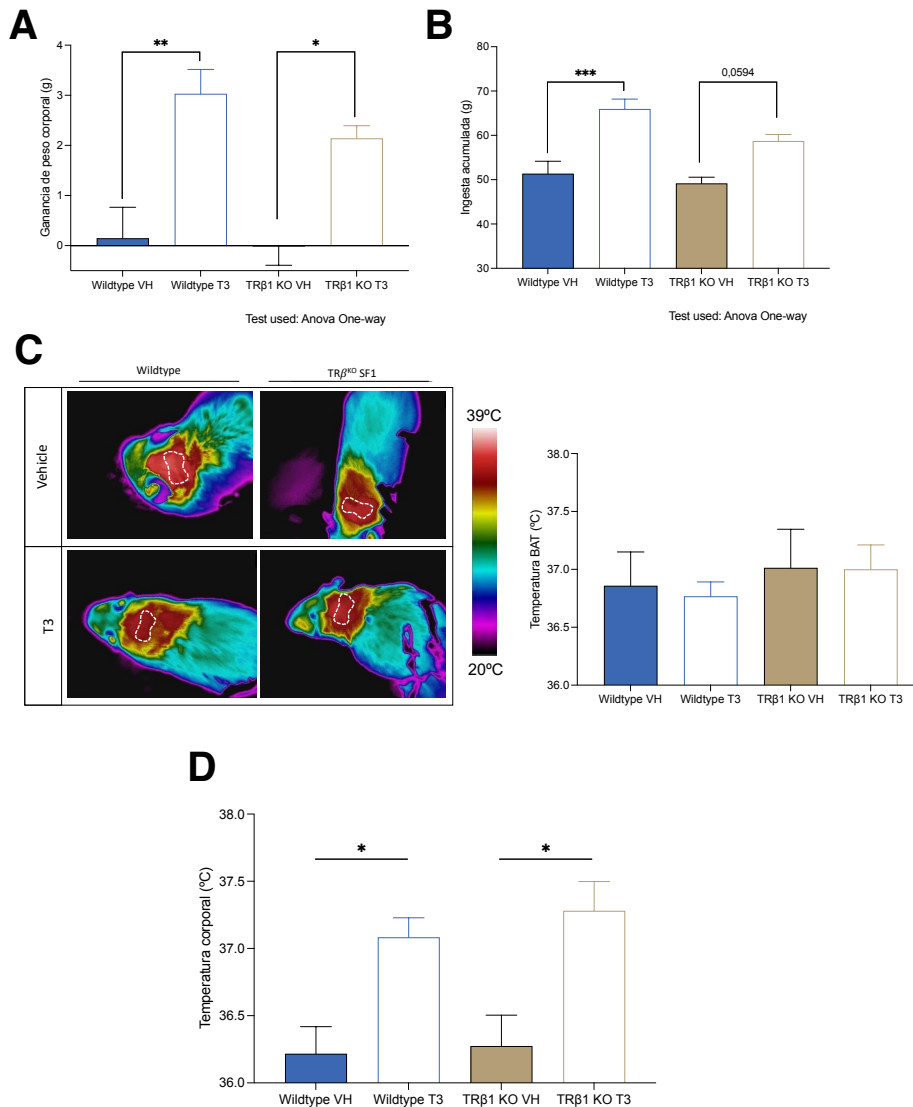


Figura 54. Respuesta a la inducción del hipertiroidismo en los ratones TR β ^{KO} SF1 macho: (A) Ganancia de peso corporal; (B) Ingesta de alimento acumulada; (C) Fotos infrarrojas representativas del área adyacente al BAT y cuantificación de la temperatura de estas y (D) Temperatura corporal (TR β ^{KO} SF1 VH n= 4, TR β ^{KO} SF1 T3 n= 5, WT VH n= 6, WT T3 n= 6). Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por One-way ANOVA. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

16.4. EFECTO DE LA ABLACIÓN DEL RECEPTOR TR β 1 Y LA INCORPORACIÓN DE UN RECEPTOR DOMINANTE NEGATIVO PARA TR α 1 EN LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO.

Posteriormente a los análisis realizados individualmente para los animales TR α AMI SF1 y TR β ^{KO} SF1, se decidió cruzar estos dos modelos animales con los ratones SF1-Cre, con el fin de conseguir un modelo animal que combinase la ablación del receptor TR β 1 y el receptor dominante negativo para TR α 1, generando así un doble KO funcional de los receptores de hormonas tiroideas que denominaremos TR α AMI-TR β ^{KO} SF1. Este modelo nos permitirá analizar si los efectos observados individualmente en cada uno de los modelos (TR α AMI SF1 y TR β ^{KO} SF1) es debido a la carencia/falta de función del receptor *per se* o bien están relacionados con una compensación del receptor intacto.

Los datos preliminares del fenotipo metabólico del modelo TR α AMI-TR β ^{KO} SF1 han mostrado que los machos presentaban una mayor proporción de masa grasa (Figura 55-B) que se relacionaba con una mayor acumulación de los depósitos grasos de BAT, scWAT, gWAT y vWAT (Figura 55-A). Por otro lado, el estudio de la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón mostró una menor capacidad termogénica de éste en estos animales. El análisis de los niveles proteicos de marcadores termogénicos por *western blot* mostró una marcada caída en los niveles de algunos marcadores como PGC1 α , PGC1 β , HSL y una tendencia a la disminución de UCP1 (Figura 55-C).

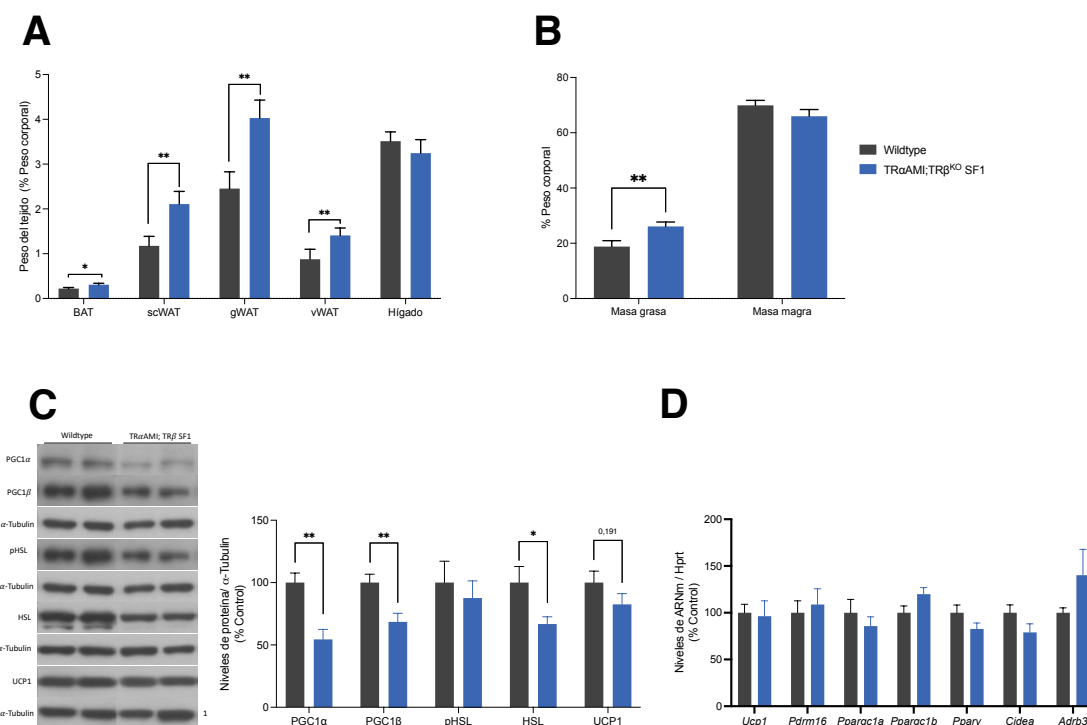


Figura 55. Efecto de la delección de TR α 1 y TR β 1 en las neuronas SF1 metabolismo energético en machos: (A) BAT, gWAT, scWAT e hígados pesados inmediatamente después de ser diseccionados y normalizados por el peso corporal (TR α AMI-TR β ^{KO} SF1 n= 6, WT n= 12), (B) composición corporal ((TR β ^{KO} SF1 n= 6, WT n= 13), (C) niveles proteicos de los marcadores termogénicos en el BAT (TR α AMI-TR β ^{KO} SF1 n= 7, WT n= 7), Los valores se representan como Media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por T-Student (2 colas). * p < 0.05; ** p < 0.01.

En resumen, los datos preliminares obtenidos en este modelo sugieren que los efectos observados en el modelo TR α AMI SF1 no es debido a una compensación o sobreestimulación del receptor TR β 1 en las neuronas SF1, si no a la carencia de per se del receptor TR α 1 en esta población neuronal.

DISCUSIÓN

17. DISCUSIÓN

En las últimas décadas la obesidad ha emergido como un problema de salud pública global que afecta a las personas independientemente de la edad o la clase social. Esta enfermedad de carácter multifactorial se ha asociado con el desarrollo de otras dolencias metabólicas como son la hipertensión, la dislipemia, la diabetes tipo 2, el hígado graso e, incluso, el cáncer (Aaseth et al., 2021; Blüher et al., 2023; De Fano et al., 2022; Lette et al., 2016). El impacto de esta enfermedad junto con sus comorbilidades no solo supone un problema sanitario, sino que también tienen un fuerte impacto en la economía o gasto sanitario del país. Se estima que los países desarrollados gastan alrededor de 8% de su presupuesto en tratar el sobrepeso y sus comorbilidades (Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care, 2015; Vuik et al., 2019). Es por ello por lo que la intervención en la prevención y tratamiento de esta enfermedad es crucial para reducir la carga sobre los pacientes y la sociedad. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes terapias para el tratamiento de la obesidad, basados principalmente en el control de la ingesta y gasto energético. Sin embargo, tanto la prevención, como el tratamiento, de la obesidad suele fracasar a largo plazo. Debido a esto sigue siendo necesario volcar los esfuerzos en buscar nuevas dianas terapéuticas.

En los últimos años se ha demostrado que el sistema nervioso central y, en concreto el hipotálamo, juega un papel importante en la regulación del apetito y el gasto energético (Amin et al., 2011). Esta área cerebral es capaz de integrar tanto la información central como la de los tejidos periféricos relativa a la ingesta y estado energético del organismo. Por un lado, el hipotálamo controla la ingesta de alimentos mediante la regulación de la expresión de neuropéptidos orexigénicos (que aumentan la ingesta) y anorexigénicos (que promueven la saciedad) (González-García et al., 2020). Además, numerosos estudios han demostrado que el hipotálamo regula el metabolismo energético en tejidos periféricos como el hígado, el músculo esquelético, el páncreas y regula la termogénesis y *browning* en el BAT y WAT, respectivamente (González-García et al., 2020). Pese a que los diferentes núcleos hipotalámicos parecen tener cierta implicación en la regulación de la termogénesis, el VMH se ha alzado como un importante núcleo regulador de este proceso en el BAT. Evidencias genéticas han demostrado que la delección de SF1 en las poblaciones neuronales de este núcleo conducen a una disminución del gasto energético y de la expresión de UCP1 en el BAT (Schulz et al., 2013; Seale et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que diferentes señales hormonales, entre ellas las hormonas tiroideas, son capaces de activar la respuesta termogénica del BAT a través del VMH (Alvarez-Crespo et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2017).

A lo largo de los años se ha demostrado el papel que juegan las THs en el comportamiento alimentario, el crecimiento general, la temperatura corporal, la composición corporal, la actividad metabólica del BAT, el *browning* del WAT y el metabolismo lipídico del hígado, entre otras acciones. A pesar de que la visión clásica atribuía los efectos de las hormonas tiroideas era debido a un efecto periférico, datos más recientes destacan el papel que ejercen las hormonas tiroideas a nivel central en la regulación del balance energético, actuando a nivel del hipotálamo. La relación fisiológica entre las THs y el BAT está regulada por el SNC. Por tanto,

la activación de la termogénesis requiere de las hormonas tiroideas, de la estimulación adrenérgica y de la expresión de UCP1 (L. Sun et al., 2020). Hoy en día se conoce que en esta activación del tono simpático juegan un papel importante las neuronas que expresan el factor esteroideogénico 1 (SF1) del VMH. Estas proyectan desde el VMH a centros autónomos, como al núcleo del tracto solitario (NTS) y, a otras áreas hipotalámicas implicadas en el flujo simpático, como el ARC y el PVH (Lindberg et al., 2013). Además, también se ha demostrado que el VMH está conectado con otras regiones del tronco encefálico, como núcleo del rafe pálido (rRPa) y la oliva inferior (IO) (Butenas et al., 2024; Fan et al., 2007; Morrison, 1999) que actúan como relés, a través del cual las neuronas del VMH modulan la inervación simpática sobre el BAT y el WAT (Morrison et al., 2014; Nakamura, 2011). Además de sus acciones a nivel central, la regulación de la termogénesis a nivel local por las hormonas tiroideas se encuentra regulada tanto por el receptor TR α como por TR β . En 2017, Martínez-Sánchez et al. demostraron que la administración de T3 en el VMH provocaba una disminución de AMPK que, a su vez, conducía a la disminución de la concentración de ceramidas hipotalámicas y la posterior reducción del estrés del retículo endoplasmático, aumentando el tono simpático sobre el BAT y la termogénesis (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Además de su papel sobre la maquinaria termogénica las hormonas tiroideas también son capaces de modular la lipogénesis en el hígado actuando a través de JNK1 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Pese a que se conoce que las acciones de las TH en el BAT están mediadas por ambos receptores de hormonas tiroideas (TR α y TR β), hasta la fecha varias incógnitas no habían sido respondidas: **a)** se ignoraba la población neuronal responsable de este efecto, **b)** se desconocía si el receptor TR β podría mediar los efectos de T3 sobre la regulación de la termogénesis a nivel central, **c)** había que papel desempeñan los receptores hipotalámicos de las hormonas tiroideas en el estímulo fundamental de la termogénesis del BAT, la exposición a frío. En este estudio, hemos demostrado por primera vez que los efectos sobre la termogénesis del BAT a nivel central están mediados exclusivamente por el TR α presente en la población neuronal SF1, observándose una mayor masa corporal en el modelo TR α AMI SF1 ligada a una menor activación del BAT y menor gasto energético, independiente de la ingesta, datos que no se observaron en los animales KO para TR β 1. Así mismo, los datos obtenidos arrojan que la regulación del *browning* en la grasa subcutánea y gonadal está mediada por TR α 1 y no por TR β 1. Resultados paralelos a los de los animales *knockin* para TR α 1 se han observado en el fenotipado metabólico de la línea animal TR α AMI; TR β ^{KO} SF1 que funcionalmente es un doble KO. En estos ratones, *knockin* para TR α 1 y *knockout* para TR β 1 en las neuronas SF1, se ha observado mayor acumulación de grasa junto con una caída de los marcadores termogénicos en el tejido adiposo marrón. Estos resultados evidencian que los datos obtenidos en el modelo TR α AMI SF1 son causa de una falta de activación del receptor TR α 1 *per se* y no a causa de una posible compensación por el receptor TR β 1.

Pese a que estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que las hormonas tiroideas inhibían la señalización de AMPK en el VMH, específicamente de AMPK α 1, induciendo una activación de la termogénesis en el BAT (López et al., 2010; Martínez De Morentin et al., 2014; Seoane-Collazo et al., 2018; Whittle et al., 2012b), el estudio de la ruta de AMPK en el VMH de los animales TR α AMI y TR β ^{KO} SF1 no mostró diferencias en los niveles de esta proteína. Esto sugiere que, en ausencia del estímulo de T3, el efecto de la ablación de los receptores de hormonas tiroideas no es lo suficientemente fuerte como para alterar la ruta de AMPK. Sin embargo, una limitación de nuestro trabajo es que hemos utilizado extractos totales de VMH y sería más oportuno analizar los niveles de pAMPK (o de su marcador subrogado pACC) en células SF1 aislada mediante sorting o, alternativamente,

mediate técnicas de ICH/IF. Otras posibles alternativas que no pueden ser excluidas: **a)** que los niveles de hormonas tiroideas en los animales KO estén disminuidos, **b)** que la modificación genética inducida de manera embrionaria genere compensaciones moleculares y celulares en el VMH y **c)** que la interacción de las THs con la integrina $\alpha v\beta 3$ sea la vía molecular que media las acciones sobre AMPK.

Con el fin de demostrar que estos efectos se deben únicamente a la acción del receptor TR α 1, se llevaron a cabo diferentes aproximaciones. En primer lugar, los animales se expusieron por un periodo de 6 horas a frío con el fin de valorar su capacidad de adaptación a bajas temperaturas, puesto que se ha demostrado que la acción termogénica de las hormonas tiroideas está influenciada por la temperatura ambiental (Rial-Pensado et al., 2022). Los datos obtenidos demostraron que los animales *knockin* para TR α 1 eran incapaces de aclimatarse a esta temperatura y, en cambio, los animales TR β ^{KO} SF1 no mostraron diferencias en lo que a la adaptación se refiere. Estos datos demuestran que el receptor TR α 1 en VMH es esencial para activar la maquinaria termogénica del BAT en la respuesta al frío. Datos contradictorios se observaron en las hembras de ambos modelos animales, lo cual sugiere que, como han confirmado diversos estudios, los estrógenos son capaces de activar la maquinaria termogénica del BAT (González-García et al., 2018; González-García, Tena-Sempere, et al., 2017; Martínez De Morentin et al., 2017.; Y. Xu & López, 2018) y, este proceso, lo ejercen, probablemente, de forma independiente a la acción de los receptores de hormonas tiroideas.

En segundo lugar, se les indujo hipertiroidismo mediante la administración de T3 en agua de bebida durante un periodo de 14 días siguiendo el esquema del estudio de Capelli et al., en el cual se observó que los animales hipertiroideos presentaban mayor capacidad termogénica, aumento de la ingesta y un aumento de peso corporal. Estos efectos se observaron también en los animales TR β ^{KO}, demostrando que estos animales son capaces de responder a los efectos de la T3 periférica mientras que los animales TR α AMI, fueron incapaces de activar su maquinaria termogénica pese a los estímulos de la T3. Estos hallazgos evidenciaron la incapacidad del BAT de responder a los efectos de las hormonas tiroideas en ausencia del receptor TR α 1 central. Por último, se ha tratado de rescatar el fenotipo de los animales TR α AMI mediante la administración de adenovirus asociados en el VMH que expresan una isoforma predominantemente positiva del receptor TR α 1. Tras los 14 días posteriores a la administración de los virus los animales fueron expuestos a frío con el fin de evaluar, de nuevo, su capacidad de adaptación al frío. Se observó, que, tras la administración de los virus, los animales TR α AMI recuperaban la capacidad termogénica de respuesta al frío, evidenciando una vez más el papel crucial del receptor alfa 1 de hormonas tiroideas en la regulación de la maquinaria termogénica del BAT. Pese a los resultados observados en estos dos estudios, cabe destacar algunas de las discrepancias observadas en las temperaturas obtenidas entre *wildtype*-VH vs. TR α AMI SF1-VH y *wildtype*-GFP vs. TR α AMI SF1-GFP frente a las temperaturas basales observadas durante el fenotipado metabólico entre *wildtype* vs. TR α AMI SF1. Mientras que en este último se observaba una clara disminución de la temperatura corporal y del BAT en los animales mutantes, tanto en el estudio farmacológico con T3 como en el estudio virogenético no se observan estas diferencias. Esto se puede justificar por el bajo número de animales empleados en ambos estudios frente a los utilizados durante el fenotipado.

Como se mencionaba previamente, se ha demostrado que las hormonas tiroideas son capaces de regular el metabolismo lipídico hepático mediante la modulación del tono del sistema nervioso parasimpático actuando sobre JNK1 en el núcleo ventromedial del hipotálamo

(Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017). Además, a nivel local el receptor beta de hormonas tiroideas en los hepatocitos es capaz de modular la lipogénesis de novo en este tejido. Sin embargo, la delección de los receptores alfa y beta de hormonas tiroideas centrales no mostró diferencias en la acumulación de lípidos hepáticos ni tampoco en la ruta de biosintética de los mismos. Asimismo, el estudio de los niveles de triglicéridos séricos no se vio alterada. Estos datos sugieren que, en un estado basal o eutiroideo, sin el estímulo de las hormonas tiroideas a nivel central o localmente sobre el hígado, la lipogénesis hepática no se ve alterada. Igualmente, en estados eutiroideos la actividad termogénica del BAT no se ve aumentada y, consecuentemente no se requiere de la movilización de ácidos grasos desde el WAT o desde el hígado en forma de TG. En este supuesto, la falta de activación de la ruta lipogénica hepática en estos modelos animales estaría justificada.

En lo relativo a la homeostasis de la glucosa, numerosos estudios han evidenciado el papel del VMH en la regulación de los niveles de glucosa mediante la estimulación de su producción por tejidos periféricos como a través de la regulación de los niveles circulantes de insulina y glucagón (Hirschberg et al., 2020c; Routh, 2010; L. Tu et al., 2022). Pese a esta capacidad del VMH para controlar la glucemia corporal, en ambos modelos animales, TR α AMI SF1 y TR β ^{KO} SF1, no se han observado diferencias en los test de tolerancia a la glucosa ni en los test de tolerancia a la insulina en machos. Esto sugiere que, la regulación de la homeostasis de la glucosa por este núcleo hipotalámico no está directamente regulada por ninguno de los dos receptores de hormonas tiroideas, aunque se observa cierto dimorfismo sexual. Se ha demostrado que los estrógenos regulan el metabolismo de la glucosa actuando a través de las neuronas SF1 (Fagan et al., 2020; Y. Xu et al., 2011b). Así mismo, también se sabe que los estrógenos son capaces de activar a través de su receptor las cascadas de señalización de PI3K/AKT (Guo et al., 2006; Khatpe et al., 2021) y de Erk1/2 (Keshamouni et al., 2002; Meng et al., 2011; Welsh et al., 2012) al igual que lo hacen las hormonas tiroideas a través de la integrina α v β 3 para regular el tráfico de los receptores TR α y TR β del citosol al núcleo (Bergh et al., 2005; P. J. Davis et al., 2021; Y. C. S. H. Yang et al., 2021). De este modo, se podría hipotetizar que: 1) los estrógenos regulan la homeostasis de la glucosa en las neuronas SF1 mediante la activación las cascadas de señalización PI3K/AKT y Erk1/2, facilitando el tráfico de los receptores TR α y TR β del citosol al núcleo y, no se observan cambios en las hembras TR α AMI SF1 debido a diferencias en el ciclo ovárico de las mismas respecto a las hembras TR β ^{KO} SF1; y 2) los estrógenos regulan la homeostasis de la glucosa en las neuronas SF1 únicamente activando la ruta Erk1/2, facilitando el tráfico del receptor TR β del citosol al núcleo, lo cual explicaría los cambios observados en las hembras TR β ^{KO} SF1 y no en las TR α AMI SF1.

Pese a la consistencia de los resultados observados en los tres modelos animales y la concordancia entre machos y hembras, se han encontrado en algunos análisis ciertas discrepancias que sugieren la existencia de un dimorfismo sexual en los resultados. En los experimentos de exposición a frío durante 6 horas, tanto las hembras TR α AMI SF1 como TR β ^{KO} SF1, mostraron una mejor adaptación a las bajas temperaturas ambientales frente a sus controles *wildtype*. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se ha demostrado que los estrógenos son capaces de activar la maquinaria termogénica del BAT actuando sobre sus receptores (Er α) presentes en el VMH (P. B. Martínez de Morentin et al., 2014). Esto sugiere que, a bajas temperaturas, además de las hormonas tiroideas, los estrógenos actúan también como un estímulo para la activación de la termogénesis adaptativa del BAT, facilitando la adaptación de las hembras.

Como se mencionaba previamente, los patrones de expresión de los receptores TR α como TR β varían según el tejido, siendo TR α la isoforma predominante en el cerebro (Bianco et al., 2019). Asimismo, en 1990 Hodin et al. demostraron en ratas que la administración de T3 no provocan cambios en los niveles de expresión de TR β y, producían una disminución de los niveles de RNA mensajero de TR α en los diferentes tejidos donde éste se expresa, con la excepción del cerebro, dónde no se observaron variaciones (Hodin et al., 1990b). Esto, podría explicar los efectos observados en nuestros modelos, extrayéndose la siguiente hipótesis: al deleccionar el receptor TR β se produce un aumento de los niveles TR α , de tal modo que los efectos sobre el metabolismo ejercidos por TR β quedan enmascarados por el efecto de las hormonas tiroideas sobre TR α . Mientras que en el modelo TR α AMI SF1, debido a la incapacidad de receptor TR β para aumentar los niveles de RNA mensajero y, dada su baja expresión en el cerebro, los efectos de T3 en este receptor no son suficientes para enmascarar o compensar la ausencia de TR α 1.

En conclusión, nuestros datos muestran que la ablación del receptor TR α 1 en las neuronas SF1 del VMH disminuye la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón, incrementa los depósitos grasos de estos animales y, por tanto, se correlaciona con una mayor masa corporal independiente de la ingesta (Figura 56). Además de este efecto sobre la tasa metabólica, la ruta lipogénica del hígado y la homeostasis de la glucosa no se ven alteradas. Estos resultados sugieren que modulación específica del receptor TR α 1, pero no el TR β , de hormonas tiroideas en las neuronas SF1 del VMH podría alzarse como una diana terapéutica adecuada para combatir la obesidad sin afectación de otras rutas metabólicas.

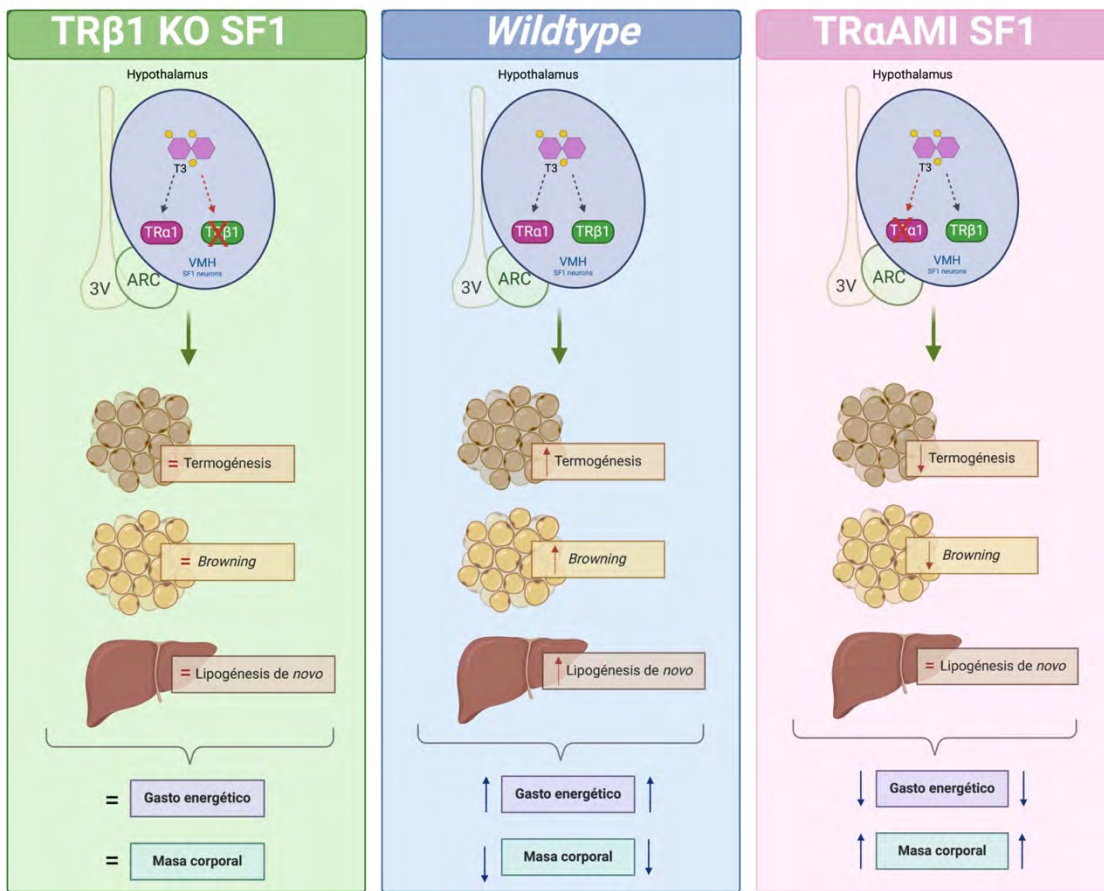


Figura 56. Resumen gráfico de los efectos de las hormonas tiroideas sobre los receptores TRα1 y TRβ1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial del hipotálamo. Creado con biorender.com

CONCLUSIONES

18. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos durante la realización de esta tesis nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La generación de un modelo animal con un receptor dominante negativo para TR α 1 en las neuronas SF1 del VMH, conduce a un menor gasto energético asociado a una disminución de la actividad termogénica del BAT y un menor browning del WAT, que se traduce en un aumento de la masa corporal independiente de la ingesta.
2. La ablación del receptor TR β 1 en las neuronas SF1 del VMH no tiene implicaciones en la regulación del gasto energético ni en la regulación de la masa corporal.
3. La generación de un modelo animal con un receptor dominante negativo para TR α 1 y *knockout* para el receptor TR β 1 en las neuronas SF1 del VMH, se traduce en un marcado aumento de los depósitos de grasa corporal y una disminución de la capacidad termogénica del BAT.
4. Los efectos de las hormonas tiroideas sobre la termogénesis del tejido adiposo marrón y el *browning* en el tejido adiposo blanco se encuentra regulados por el receptor TR α 1 y no por el receptor TR β en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial del hipotálamo.

19. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aaseth, J., Ellefsen, S., Alehagen, U., Sundfjør, T. M., & Alexander, J. (2021). Diets and drugs for weight loss and health in obesity – An update. *Biopharmacology and Drug Therapy*, *140*(1), 111789. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111789>
- Achermann, J. C. (2024). Steroidogenic factor-1 (NR5A1): orphan nuclear receptor finds a home in human reproduction, and beyond. *EBioMedicine*, *100*, 104984. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.104984>
- Alvarez-Crespo, M., Csikasz, R. I., Martínez-Sánchez, N., Diéguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., & López, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Molecular Metabolism*, *5*(4), 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.008>
- Amin, A., Dhillo, W. S., & Murphy, K. G. (2011). The Central Effects of Thyroid Hormones on Appetite. *Journal of Thyroid Research*, *2011*, 306510. <https://doi.org/10.4061/2011/306510>
- Andrews, Z. B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschöp, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I., Coppola, A., Gao, X.-B., Horvath, T. L., & Diano, S. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, *454*(7206), 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature07181>
- Araki, O., Ying, H., Zhu, X. G., Willingham, M. C., & Cheng, S. Y. (2009). Distinct Dysregulation of Lipid Metabolism by Unliganded Thyroid Hormone Receptor Isoforms. *Molecular Endocrinology*, *23*(3), 308–315. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0311>
- Arrojo E Drigo, R., & Bianco, A. C. (2011). Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(10), 1432–1441. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.016>
- Azzu, V., Jastroch, M., Divakaruni, A. S., & Brand, M. D. (2010). The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(6–7), 785–791. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.035>
- Bakker, O. (2004). Thyroid Hormone Receptors. In L. Martini (Ed.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (1st, pp. 490–495). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/01295-6>
- Bárez-López, S., Montero-Pedrazuela, A., Bosch-García, D., Venero, C., & Guadaño-Ferraz, A. (2017). Increased anxiety and fear memory in adult mice lacking type 2 deiodinase. *Psychoneuroendocrinology*, *84*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.013>
- Barres, B. A., Lazar, M. A., & Raff, M. C. (1994). A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development*, *120*(5), 1097–1108. <https://doi.org/10.1242/dev.120.5.1097>
- Basolo, A., Magno, S., Santini, F., & Ceccarini, G. (2022). Ketogenic Diet and Weight Loss: Is There an Effect on Energy Expenditure?. *Nutrients* *14*(9), 1814. <https://doi.org/10.3390/nu14091814>
- Beck-Peccoz, P., & Chatterjee, V. K. K. (1994). The Variable Clinical Phenotype in Thyroid Hormone Resistance Syndrome. *Thyroid*, *4*(2), 225–232. <https://doi.org/10.1089/thy.1994.4.225>

- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Fernø, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Frühbeck, G., & Nogueiras, R. (2014). GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning Through Hypothalamic AMPK. *Diabetes*, 63(10), 3346–3358. <https://doi.org/10.2337/db14-0302>
- Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S., & Davis, P. J. (2005). Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7), 2864–2871. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0102>
- Bernal, J. (2005). Thyroid Hormones and Brain Development. *Vitamins and Hormones*, 71, 95–122. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)71004-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)71004-9)
- Bernal, J. (2007). Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(3), 249–259. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0424>
- Bernal, J. (2011). Síndromes de resistencia a las hormonas tiroideas. *Endocrinología y Nutrición*, 58(4), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.02.001>
- Bianco, A. C., Dumitrescu, A., Gereben, B., Ribeiro, M. O., Fonseca, T. L., Fernandes, G. W., & Bocco, B. M. L. C. (2019). Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews*, 40(4), 1000–1047. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00275>
- Bianco, A. C., & McAninch, E. A. (2013). The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 1(3), 250–258. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70069-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70069-X)
- Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., & Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, 23(1), 38–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.1.0455>
- Bianco, A. C., Sheng, X., & Silva, J. E. (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18168–18175. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)81340-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)81340-6)
- Bigler, J., Hokanson, W., & Eisenman, R. N. (1992). Thyroid Hormone Receptor Transcriptional Activity Is Potentially Autoregulated by Truncated Forms of the Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 12(5), 2406–2417. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.5.2406-2417.1992>
- Blondin, D. P., & Haman, F. (2018). Shivering and non-shivering thermogenesis in skeletal muscles. *Handbook of Clinical Neurology*, 156, 153–173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00010-2>
- Blüher, M., Aras, M., Aronne, L. J., Batterham, R. L., Giorgino, F., Ji, L., Pietiläinen, K. H., Schnell, O., Tonchevska, E., & Wilding, J. P. H. (2023). New insights into the treatment of obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 25(8), 2058–20172. <https://doi.org/10.1111/dom.15077>
- Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., Rajanayagam, O., Keogh, J. M., Henning, E., Reinemund, J., Gevers, E., Sarri, M., Downes, K., Offiah, A., Albanese, A., Halsall, D., Schwabe, J. W., Bain, M., Lindley, K., Muntoni, F., Vargha-Khadem, F., Chatterjee, K. (2011). A Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Alpha Gene. *The New England Journal of Medicine*, 366(3), 243–252. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110296>
- Bradley, D. J., Towle, H. C., & Young, W. S. (1992). Spatial and temporal expression of α - and β -thyroid hormone receptor mRNAs, including the $\beta 2$ -subtype, in the developing

- mammalian nervous system. *Journal of Neuroscience*, 12(6), 2288–2302. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-06-02288.1992>
- Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3035–3043. <https://doi.org/10.1172/JCI60047>
- Brown, E. D. L., Obeng-Gyasi, B., Hall, J. E., & Shekhar, S. (2023). The Thyroid Hormone Axis and Female Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9815. <https://doi.org/10.3390/ijms24129815>
- Büdefeld, T., Tobet, S. A., & Majdic, G. (2011). Altered position of cell bodies and fibers in the ventromedial region in SF-1 knockout mice. *Experimental Neurology*, 232(2), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.021>
- Busiello, R. A., Savarese, S., & Lombardi, A. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in Physiology*, 6(36). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00036>
- Butenas, A. L. E., Flax, J. S., Carroll, R. J., Chuwonganant, C. S., Baranczuk, A. M., & Copp, S. W. (2024). Sex differences in the purinergic 2 receptor-mediated blood pressure response to treadmill exercise in rats with simulated peripheral artery disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 326(6), R449–R460. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00010.2024>
- Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M., & Collins, S. (2004). p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Molecular and Cellular Biology*, 24(7), 3057–3067. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.7.3057-3067.2004>
- Cao, X., Kambe, F., Moeller, L. C., Refetoff, S., & Seo, H. (2005). Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Molecular Endocrinology*, 19(1), 102–112. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0093>
- Capelli, V., Grijota-Martínez, C., Dragano, N. R. V., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Nogueiras, R., Mittag, J., Diéguez, C., & López, M. (2021). Orally Induced Hyperthyroidism Regulates Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase. *Nutrients*, 13(12), 4204. <https://doi.org/10.3390/nu13124204>
- Caprio, M., Infante, M., Guglielmi, V., Saito, M., Matsushita, M., Yoneshiro, T., & Okamatsu-Ogura, Y. (2020). Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Frontiers in Endocrinology*, 1(222). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00222>
- OECD (2015). *Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care*. Healyh Policy Studies, OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264233010-en>
- Carvalho, D. P., Dias, A. F., Sferruzzi-Perri, A. N., & Ortiga-Carvalho, T. M. (2022). Gaps in the knowledge of thyroid hormones and placental biology. *Biology of Reproduction*, 106(6), 1033–1048. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac006>
- Catania, C., Binder, E., & Cota, D. (2011). mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *International Journal of Obesity*, 35(6), 751–761. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.208>
- Chatonnet, F., Flamant, F., & Morte, B. (2015). A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(2), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.023>

- Chen, Y., & Young, M. A. (2010). Structure of a Thyroid Hormone Receptor DNA-Binding Domain Homodimer Bound to an Inverted Palindrome DNA Response Element. *Molecular Endocrinology*, *24*(8), 1650–1664. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0129>
- Cheng, S. Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews*, *31*(2), 139–170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
- Cohen, R. S., & Pfaff, D. W. (1992). Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. *Progress in Neurobiology*, *38*(5), 423–453. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90045-G](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90045-G)
- Congdon, P. (2019). Obesity and urban environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(3), 464. <https://doi.org/10.3390/ijerph16030464>
- Díez-González, L. M., Díaz-García, O., Dévora-Figueroa, C. (2019). Nutrición y Obesidad. In Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (Ed.), *Trastornos del aparato digestivo, metabolismo y sistema endocrino: programa de actualización en farmacología y farmacoterapia* (1st ed., pp. 325–353).
- Contreras, C., Gonzalez, F., Fernø, J., Diéguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., & López, M. (2015). The brain and brown fat. *Annals of Medicine*, *47*(2), 150–168. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.919727>
- Coppola, A., Hughes, J., Esposito, E., Schiavo, L., Meli, R., & Diano, S. (2005). Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Letters*, *579*(21), 4654–4658. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.035>
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., ... Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, *37*(4), 649–661. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1)
- Curcio-Morelli, C., Gereben, B., Zavacki, A. M., Kim, B. W., Huang, S., Harney, J. W., Larsen, P. R., & Bianco, A. C. (2003). In Vivo Dimerization of Types 1, 2, and 3 Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrinology*, *144*(3), 937–946. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220960>
- Davis, A. M., Seney, M. L., Stallings, N. R., Zhao, L., Parker, K. L., & Tobet, S. A. (2004). Loss of Steroidogenic Factor 1 Alters Cellular Topography in the Mouse Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus. *Journal of Neurobiology*, *60*(4), 424–436. <https://doi.org/10.1002/neu.20030>
- Davis, P. J., Leonard, J. L., & Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.09.003>
- Davis, P. J., Mousa, S. A., & Lin, H. Y. (2021). Nongenomic actions of thyroid hormone: The integrin component. *Physiological Reviews*, *101*(1), 319–352. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2019>
- Davis, P. J., Tillmann, H. C., Davis, F. B., & Wehling, M. (2002). Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. *Journal of Endocrinological Investigation*, *25*(4), 377–388. <https://doi.org/10.1007/BF03344022>
- De Fano, M., Bartolini, D., Tortoioli, C., Vermigli, C., Malara, M., Galli, F., & Murdolo, G. (2022). Adipose Tissue Plasticity in Response to Pathophysiological Cues: A Connecting Link between Obesity and Its Associated Comorbidities. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5511. <https://doi.org/10.3390/ijms23105511>

- Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., White, R. D., Edelstein, E. A., Coppari, R., Balthasar, N., Cowley, M. A., Chua, S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, *49*(2), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.021>
- Diano, S., Naftolin, F., Goglia, F., & Horvath, T. L. (1998). Segregation of the intra- and extrahypothalamic neuropeptide Y and catecholaminergic inputs on paraventricular neurons, including those producing thyrotropin-releasing hormone. *Regulatory Peptides*, *75–76*, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00060-3](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00060-3)
- Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, *960*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1
- Escámez, M. J., Guadaño-Ferraz, A., Cuadrado, A., & Bernal, J. (1999). Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology*, *140*(11), 5443–5446. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7244>
- Fagan, M. P., Ameroso, D., Meng, A., Rock, A., Maguire, J., & Rios, M. (2020). Essential and sex-specific effects of mGluR5 in ventromedial hypothalamus regulating estrogen signaling and glucose balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(32), 19566–19577. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011228117>
- Fan, W., Morrison, S. F., Cao, W.-H., & Yu, P. (2007). Thermogenesis activated by central melanocortin signaling is dependent on neurons in the rostral raphe pallidus (rRPa) area. *Brain Research*, *1179*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.006>
- Farias, G., Netto, B. D. M., Bettini, S. C., Dâmaso, A. R., & de Freitas, A. C. T. (2017). Neuroendocrine regulation of energy balance: Implications on the development and surgical treatment of obesity. *Nutrition and Health*, *23*(3), 131–146. <https://doi.org/10.1177/0260106017719369>
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: Role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *28*(2–3), 97–114. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.04.002>
- Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Huang, Q. H., Tatro, J. B., Rand, W. M., Emerson, C. H., & Lechan, R. M. (2000). α -melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *Journal of Neuroscience*, *20*(4), 1550–1558. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-04-01550.2000>
- Fernandez, J. A., Mampel, T., Villarroya, F., & Iglesias, R. (1987). Direct assessment of brown adipose tissue as a site of systemic tri-iodothyronine production in the rat. *Biochemical Journal*, *243*(1), 281–284. <https://doi.org/10.1042/bj2430281>
- Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R. P., Beuve, A., & Routh, V. H. (2011). Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: A two-edged sword. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(3), 505–517. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3331>
- Flamant, F., & Gauthier, K. (2013). Thyroid hormone receptors: The challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(7), 3900–3907. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.06.003>
- Flamant, F., Gauthier, K., & Richard, S. (2017). Genetic Investigation of Thyroid Hormone Receptor Function in the Developing and Adult Brain. *Current Topics in Developmental Biology*, *125*, 303–335. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.01.001>

- Flamant, F., & Quignodon, L. (2008). L'hormone thyroïdienne thyroïdienne et ses récepteurs : la génétique de la souris clarifie-t-elle la situation ? *Journal de La Société de Biologie*, 202(2), 67–71. <https://doi.org/10.1051/jbio:2008008>
- Fliers, E., Klieverik, L. P., & Kalsbeek, A. (2010). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(4), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.008>
- Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R. J., Everds, N., Stewart, C. L., Wehner, J. M., & Curran, T. (1996). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor β : Evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO Journal*, 15(12), 3006–3015. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00664.x>
- Fosch, A., Zagmutt, S., Casals, N., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2021). New Insights of SF1 Neurons in Hypothalamic Regulation of Obesity and Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6186. <https://doi.org/10.3390/ijms22126186>
- Franklin, K., & Paxinos, G. (2019). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact* (5th ed.). Academic Press.
- Freitas, B. C. G., Gereben, B., Castillo, M., Kalló, I., Zeöld, A., Egri, P., Liposits, Z., Zavacki, A. M., Maciel, R. M. B., Jo, S., Singru, P., Sanchez, E., Lechan, R. M., & Bianco, A. C. (2010). Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 2206–2217. <https://doi.org/10.1172/JCI41977>
- Fumel, B. (2011). *Rôles des récepteurs à l'hormone thyroïdienne, TR α 1 et p43, dans le contrôle de la prolifération des cellules de Sertoli chez la souris*. Université François Rabelais (Tours). Français. <https://hal.inrae.fr/tel-02809035>
- Füzesi, T., Wittmann, G., Lechan, R. M., Liposits, Z., & Fekete, C. (2009). Noradrenergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in rats. *Brain Research*, 1294, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.094>
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C.-X., Chowen, J. A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., & Tschöp, M. H. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanyocytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, 22, 7–14. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., & Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO Journal*, 18(3), 623–631. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.623>
- Gautron, L., & Elmquist, J. K. (2011). Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2087–2093. <https://doi.org/10.1172/JCI45888>
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K. R., Srisai, D., Sugrue, M. L., Hollenberg, A. N., & Cone, R. D. (2010). Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Molecular Endocrinology*, 24(12), 2366–2381. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0203>
- Giammanco, M., Di Liegro, C. M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2020a). Genomic and Non-Genomic Mechanisms of Action of Thyroid Hormones and Their Catabolite 3,5-Diiodo-L-Thyronine in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4140. <https://doi.org/10.3390/ijms21114140>
- Giannocco, G., Kizys, M. M. L., Maciel, R. M., & de Souza, J. S. (2021). Thyroid hormone, gene expression, and Central Nervous System: Where we are. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 114, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.09.007>

- Glass, C. K., & Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, *6*(1), 44–55. <https://doi.org/10.1038/nri1748>
- Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development*, *14*(2), 121–141. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>
- González, C. R., Martínez De Morentin, P. B., Martínez-Sánchez, N., Gómez-Díaz, C., Lage, R., Varela, L., Diéguez, C., Nogueiras, R., Castaño, J. P., & López, M. (2012). Hyperthyroidism differentially regulates neuropeptide S system in the rat brain. *Brain Research*, *1450*(23), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.024>
- González-García, I., Contreras, C., Estévez-Salguero, Á., Ruíz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., Liñares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Martínez de Morentin, P. B., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., Le Stunff, H., Magnan, C., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Reports*, *25*(2), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.038>
- González-García, I., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., & López, M. (2017). Hypothalamic Lipids: Key Regulators of Whole Body Energy Balance. *Neuroendocrinology*, *104*(4), 398–411. <https://doi.org/10.1159/000448432>
- González-García, I., Milbank, E., Martínez-Ordoñez, A., Carlos Diéguez, & López, M., & Contreras, C. (2020). HYPOTHesizing about central comBAT against obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *76*(2), 193–211. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00719-y>
- González-García, I., Tena-Sempere, M., & López, M. (2017). Estradiol regulation of brown adipose tissue thermogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1043*, 315–335. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_15
- Göthe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J. M., Barros, A. C., Ohlsson, C., Vennström, B., & Forrest, D. (1999). Mice devoid of all known thyroid hormone receptors but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes and Development*, *13*(10), 1329–1341. <https://doi.org/10.1101/gad.13.10.1329>
- Grijota-Martínez, C., Báñez-López, S., Gómez-Andrés, D., & Guadaño-Ferraz, A. (2020). MCT8 Deficiency: The Road to Therapies for a Rare Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *14*(380). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00380>
- Guo, R.-X., Wei, L.-H., Tu, Z., Sun, P.-M., Wang, J.-L., Zhao, D., Li, X.-P., & Tang, J.-M. (2006). 17 β -Estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *99*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.11.013>
- Hammes, S. R., & Davis, P. J. (2015). Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, *29*(4), 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.001>
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2003). Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, *43*(2), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00049-1)
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2005). Microlesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Effects on sociosexual behaviors in male rats. *Behavioral Neuroscience*, *119*(5), 1227–1234. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.5.1227>
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., & Morohashi, K. I. (1996). Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes to Cells*, *1*(7), 663–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00254.x>

- Heindel, J. J., Lustig, R. H., Howard, S., & Corkey, B. E. (2024). Obesogens: a unifying theory for the global rise in obesity. *International Journal of Obesity*, *48*(4), 449–460. <https://doi.org/10.1038/s41366-024-01460-3>
- Hernandez, A. (2005). Structure and function of the type 3 deiodinase gene. *Thyroid*, *15*(8), 865–874. <https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.865>
- Hernandez, A., Martinez, M. E., Fiering, S., Galton, V. A., & St. Germain, D. (2006). Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(2), 476–484. <https://doi.org/10.1172/JCI26240>
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *76*(3), 475–499. <https://doi.org/10.1002/cne.900760308>
- Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (2009). Hypothalamic Lesions And Adiposity In The Rat. *Nutrition Reviews*, *41*(4), 124–127. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1983.tb07169.x>
- Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2012). Obesity Energy Balance and Obesity How the Body Achieves Energy Balance. *Circulation*, *126*, 126–132. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>
- Hirschberg, P. R., Sarkar, P., Suraj, |, Teegala, B., & Routh, V. H. (2020a). Ventromedial hypothalamus glucose-inhibited neurones: A role in glucose and energy homeostasis? *Journal of Neuroendocrinology*, *32*(1), e12773. <https://doi.org/10.1111/jne.12773>
- Hodin, R. A., Lazar, M. A., & Chin, W. W. (1990a). Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *Journal of Clinical Investigation*, *85*(1), 101–105. <https://doi.org/10.1172/JCI114398>
- Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D., & Chin, W. W. (1989). Identification of a tHyroid Hormone Receptor That Is Pituitary-Specific. *Science*, *244*(4900), 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.2539642>
- Hoivik, E. A., Lewis, A. E., Aumo, L., & Bakke, M. (2010). Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, *315*(1–2), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.003>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, *444*(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Incerpi, S., Davis, P. J., Pedersen, J. Z., & Lanni, A. (2018). Nongenomic actions of thyroid hormones. In Belfiore, A., LeRoith, D. (Eds.), *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. *Endocrinology* (1st ed., pp. 259–284). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_32
- Isaksson, M. (2004). Corticosteroids. *Dermatologic Therapy*, *17*(4), 314–320. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04036.x>
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., & Oikawa, S. (2003). Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology*, *78*(6), 321–330. <https://doi.org/10.1159/000074885>
- Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., & McKay, R. D. G. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes and Development*, *10*(24), 3129–3140. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3129>
- Kalyanaraman, H., Schwappacher, R., Joshua, J., Zhuang, S., Scott, B. T., Klos, M., Casteel, D. E., Frangos, J. A., Dillmann, W., Boss, G. R., & Pilz, R. B. (2014). Nongenomic Thyroid

- Hormone Signaling Occurs Through a Plasma Membrane–Localized Receptor. *Science Signaling*, 7(326), ra48. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004911>
- Keijzer, R., Blommaart, P.-J. E., Labruyère, W. T., Vermeulen, J. L. M., Doulabi, B. Z., Bakker, O., Tibboel, D., & Lamers, W. H. (2007). Expression of thyroid hormone receptors A and B in developing rat tissues; evidence for extensive posttranscriptional regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(5), 523–535. <https://doi.org/10.1677/jme.1.02125>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Keshamouni, V. G., Mattingly, R. R., & Reddy, K. B. (2002). Mechanism of 17-Estradiol-induced Erk1/2 Activation in Breast Cancer Cells A ROLE FOR HER2 AND PKC-*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 22558–22565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202351200>
- Khatpe, A., Adebayo, A., Herodotou, C., Kumar, B., & Nakshatri, H. (2021). Nexus between PI3K/AKT and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, 13(3), 369. <https://doi.org/10.3390/cancers13030369>
- Khodai, T., & Luckman, S. M. (2021). Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass. *Endocrinology*, 162(10), bqab141. <https://doi.org/10.1210/endoqr/bqab141>
- Kim, D. H., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2012). Hypothalamic Akt/PKB signaling in regulation of food intake. *Frontiers in Bioscience - Scholar*, 4(3), 953–966. <https://doi.org/10.2741/s311>
- Kim, K. W., Li, S., Zhao, H., Peng, B., Tobet, S. A., Elmquist, J. K., Parker, K. L., & Zhao, L. (2010). CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. *Molecular Endocrinology*, 24(6), 1240–1250. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0206>
- Kim, K. W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Eliasa, C. F., Lee, C., Parker, K. L., & Elmquist, J. K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10673–10678. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102364108>
- King, B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, 87(2), 221–244. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007>
- Klieverik, L. P., Janssen, S. F., Van Riel, A., Foppen, E., Bisschop, P. H., Serlie, M. J., Boelen, A., Ackermans, M. T., Sauerwein, H. P., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2009). Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5966–5971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805355106>
- Klieverik, L. P., Sauerwein, H. P., Ackermans, M. T., Boelen, A., Kalsbeek, A., & Fliers, E. (2008). Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294(3), E513–E520. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00659.2007>
- Klößener, T., Hess, S., Belgardt, B. F., Paeger, L., Verhagen, L. A. W., Husch, A., Sohn, J.-W., Hampel, B., Dhillon, H., Zigman, J. M., Lowell, B. B., Williams, K. W., Elmquist, J. K., Horvath, T. L., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2011). High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nature Neuroscience*, 14(7), 911–918. <https://doi.org/10.1038/nn.2847>

- Krause, K. (2020). Novel Aspects of White Adipose Tissue Browning by Thyroid Hormones. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 128(6–7), 446–449. <https://doi.org/10.1055/a-1020-5354>
- Krause, W. C., Rodriguez, R., Gegenhuber, B., Matharu, N., Rodriguez, A. N., Padilla-Roger, A. M., Toma, K., Herber, C. B., Correa, S. M., Duan, X., Ahituv, N., Tollkuhn, J., & Ingraham, H. A. (2021). Oestrogen engages brain MC4R signalling to drive physical activity in female mice. *Nature*, 599(7883), 131–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04010-3>
- Krauss, S., Zhang, C. Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3) 248–261. <https://doi.org/10.1038/nrm1592>
- Kumar, R., & Thompson, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. In *Steroids*, 64(5), 310–319. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(99\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(99)00014-8)
- Kumarnsit, E., Johnstone, L. E., & Leng, G. (2003). Actions of neuropeptide Y and growth hormone secretagogues in the arcuate nucleus and ventromedial hypothalamic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 17(5), 937–944. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02521.x>
- Kurrasch, D. M., Cheung, C. C., Lee, F. Y., Tran, P. V., Hata, K., & Ingraham, H. A. (2007). The Neonatal Ventromedial Hypothalamus Transcriptome Reveals Novel Markers with Spatially Distinct Patterning. *The Journal of Neuroscience*, 27(50), 13624–13634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2858-07.2007>
- Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., & López, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine* 14(12), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.007>
- Lammers, J. H. C. M., Kruk, M. R., Meelis, W., & van der Poel, A. M. (1988). Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. *Brain Research*, 449(1–2), 311–327. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91046-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91046-3)
- Lazcano, I., Hernández-Puga, G., Robles, J. P., & Orozco, A. (2019). Alternative ligands for thyroid hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 493, 110448. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.05.007>
- Lechan, R. M., Qi, Y., Jackson, I. M. D., & Mahdavi, V. (1994a). Identification of Thyroid Hormone Receptor Isoforms in Thyrotropin-Releasing Hormone Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Endocrinology*, 135(1), 92–100. <https://doi.org/10.1210/endo.135.1.7516871>
- Lecube, A., Monereo, S., Rubio, M. Á., Martínez-de-Icaya, P., Martí, A., Salvador, J., Masmiquel, L., Goday, A., Bellido, D., Lurbe, E., García-Almeida, J. M., Tinahones, F. J., García-Luna, P. P., Palacio, E., Gargallo, M., Bretón, I., Morales-Conde, S., Caixàs, A., Menéndez, E., ... Casanueva, F. F. (2017). Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 64(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.002>
- Légrádi, G., & Lechan, R. M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 140(8), 3643–3652. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6935>
- Legrand, J. (1979). Morphogenetic actions of thyroid hormones. *Trends in Neurosciences*, 2, 234–236. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(79\)90091-2](https://doi.org/10.1016/0166-2236(79)90091-2)

- Leiva, M., Matesanz, N., Pulgarín-Alfaro, M., Nikolic, I., & Sabio, G. (2020). Uncovering the Role of p38 Family Members in Adipose Tissue Physiology. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 572089. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.572089>
- Lette, M., Bemelmans, W. J. E., Breda, J., Slobbe, L. C. J., Dias, J., & Boshuizen, H. C. (2016). Health care costs attributable to overweight calculated in a standardized way for three European countries. *The European Journal of Health Economics*, *17*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10198-014-0655-8>
- Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, *470*(7333), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature09736>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in endocrinology*, *12*, 706978. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
- Lindberg, D., Chen, P., & Li, C. (2013). Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(14), 3167–3190. <https://doi.org/10.1002/cne.23338>
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- López, M., Seoane, L., Searis, R. M., & Diéguez, C. (2001). Prepro-orexin mRNA levels in the rat hypothalamus, and orexin receptors mRNA levels in the rat hypothalamus and adrenal gland are not influenced by the thyroid status. *Neuroscience Letters*, *300*(3), 171–175. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01569-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01569-5)
- López, M., Tovar, S., Vázquez, M. J., Williams, L. M., & Diéguez, C. (2007). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, *66*(1), 131–155. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005368>
- López, M., Varela, L., Vázquez, M. J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C. R., Velagapudi, V. R., Morgan, D. A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., de Morentin, P. B. M., Tovar, S., Nogueiras, R., Carling, D., Lelliott, C., Gallego, R., Orešič, M., Chatterjee, K., Saha, A. K., ... Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature Medicine*, *16*(9), 1001–1008. <https://doi.org/10.1038/nm.2207>
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652–660. <https://doi.org/10.1038/35007527>
- Luiza Maia, A., Kim, B. W., Huang, S. A., Harney, J. W., & Larsen, P. R. (2005). Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(9), 2524–2533. <https://doi.org/10.1172/JCI25083>
- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., da Silva, D. S., Farias, G. R., de Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutrition & Metabolism*, *19*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Marcelin, G., Gautier, E. L., & Clément, K. (2022). Adipose Tissue Fibrosis in Obesity: Etiology and Challenges. *Annual Review of Physiology*, *84*, 135–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060721-092930>
- Markossian, S., Guyot, R., Richard, S., Teixeira, M., Aguilera, N., Bouchet, M., Plateroti, M., Guan, W., Gauthier, K., Aubert, D., & Flamant, F. (2018). CRISPR/Cas9 Editing of the Mouse Thra Gene Produces Models with Variable Resistance to Thyroid Hormone. *Thyroid*, *28*(1), 139–150. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0389>

- Martínez De Morentin, P. B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., Fernández-Mallo, D., Martínez-Sánchez, N., Ruíz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D. A., Pinilla, L., Gallego, R., Saha, A. K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P. H., Diéguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Tena-Sempere, M., & López, M. (2014). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*, *20*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.031>
- Martínez de Morentin, P. B., Varela, L., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., & López, M. (2010). Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(3), 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.09.016>
- Martínez de Morentin, P. B., Whittle, A. J., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., & López, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, *61*(4), 807–817. <https://doi.org/10.2337/db11-1079>
- Martínez de Morentin, P., Martínez-Sánchez, N., Roa, J., Ferno, J., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., & Lopez, M. (2014). Hypothalamic mTOR: The Rookie Energy Sensor. *Current Molecular Medicine*, *14*(1), 3–21. <https://doi.org/10.2174/1566524013666131118103706>
- Martínez-Sánchez, N., Moreno-Navarrete, J. M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Fernández-Real, J. M., & López, M. (2017). Thyroid hormones induce browning of white fat. *Journal of Endocrinology*, *232*(2), 351–362. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0425>
- Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T. C., Vázquez-Martínez, R., González-García, I., Roa, J., Whittle, A. J., Gomez-Santos, B., Velagapudi, V., Tung, Y. C. L., Morgan, D. A., Voshol, P. J., Martínez de Morentin, P. B., ... López, M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metabolism*, *26*(1), 212–229. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.014>
- Mason, B. L., Wang, Q., & Zigman, J. M. (2014). The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annual Review of Physiology*, *76*, 519–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170310>
- Mathews, D., & Edwards, D. A. (1977). Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiology and Behavior*, *19*(2), 319–326. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90345-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90345-6)
- MCCLELLAN, K., PARKER, K., & TOBET, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*(2), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.002>
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiological Reviews*, *87*(3), 873–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- Meek, T. H., Nelson, J. T., Matsen, M. E., Dorfman, M. D., Guyenet, S. J., Damian, V., Allison, M. B., Scarlett, J. M., Nguyen, H. T., Thaler, J. P., Olson, D. P., Myers, M. G., Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2016). Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(14), 2073–2082. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521160113>

- Mellström, B., Naranjo, J. R., Santos, A., Gonzalez, A. M., & Bernal, J. (1991). Independent expression of the α and β c-erbA genes in developing rat brain. *Molecular Endocrinology*, 5(9), 1339–1350. <https://doi.org/10.1210/mend-5-9-1339>
- Mendoza, A., & Hollenberg, A. N. (2017). New insights into thyroid hormone action. In *Pharmacology and Therapeutics*, 173, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.012>
- Meng, R., Tang, H.-Y., Westfall, J., London, D., Cao, J. H., Mousa, S. A., Luidens, M., Hercbergs, A., Davis, F. B., Davis, P. J., & Lin, H.-Y. (2011). Crosstalk between Integrin $\alpha\beta3$ and Estrogen Receptor- α Is Involved in Thyroid Hormone-Induced Proliferation in Human Lung Carcinoma Cells. *PLoS ONE*, 6(11), e27547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027547>
- Milbank, E., Dragano, N., Vidal-Gómez, X., Rivas-Limeres, V., Garrido-Gil, P., Wertheimer, M., Recoquillon, S., Pata, M. P., Labandeira-Garcia, J. L., Diéguez, C., Nogueiras, R., Martínez, M. C., Andriantsitohaina, R., & López, M. (2023). Small extracellular vesicle targeting of hypothalamic AMPK α 1 promotes weight loss in leptin receptor deficient mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 139, 155350. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155350>
- Milbank, E., Dragano, N. R. V., González-García, I., Garcia, M. R., Rivas-Limeres, V., Perdomo, L., Hilairet, G., Ruiz-Pino, F., Mallegol, P., Morgan, D. A., Iglesias-Rey, R., Contreras, C., Vergori, L., Cuñarro, J., Porteiro, B., Gavaldà-Navarro, A., Oelkrug, R., Vidal, A., Roa, J., ... López, M. (2021). Small extracellular vesicle-mediated targeting of hypothalamic AMPK α 1 corrects obesity through BAT activation. *Nature Metabolism*, 3(10), 1415–1431. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00467-8>
- Mitchell, C. S., Savage, D. B., Dufour, S., Schoenmakers, N., Murgatroyd, P., Befroy, D., Halsall, D., Northcott, S., Raymond-Barker, P., Curran, S., Henning, E., Keogh, J., Owen, P., Lazarus, J., Rothman, D. L., Farooqi, I. S., Shulman, G. I., Chatterjee, K., & Petersen, K. F. (2010). Resistance to thyroid hormone is associated with raised energy expenditure, muscle mitochondrial uncoupling, and hyperphagia. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1345–1354. <https://doi.org/10.1172/JCI38793>
- Mitrou, P., Raptis, S. A., & Dimitriadis, G. (2010). Insulin action in hyperthyroidism: A focus on muscle and adipose tissue. *Endocrine Reviews*, 31(5), 663–679. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0046>
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G. E., & Nikodem, V. M. (1988). Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(16), 5804–5808. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5804>
- Mittag, J., Wallis, K., & Vennström, B. (2010). Physiological consequences of the TR α 1 aporeceptor state. *Heart Failure Reviews*, 15(2), 111–115. <https://doi.org/10.1007/s10741-008-9119-5>
- Morrison, S. F. (1999). RVLN and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276(4), R962–R973. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.4.R962>
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 19(5), 741–756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.007>
- Mullur, R., Liu, Y. Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, 94(2), 355–382. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>

- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(5), R1207–R1228. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>
- Narita, K., Murata, T., & Matsuoka, S. (2016). The ventromedial hypothalamus oxytocin induces locomotor behavior regulated by estrogen. *Physiology & Behavior*, 164, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.047>
- Nicholson, J. L., & Altman, J. (1972). The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. II. Synaptogenesis in the molecular layer. *Brain Research*, 44(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90363-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90363-0)
- Nijjima, A., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1984). Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 247(4), R650–R654. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.4.R650>
- Nillni, E. A. (2018). *Textbook of Energy Balance, Neuropeptide Hormones, and Neuroendocrine Function* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89506-2>
- Niswender, K. D. (2011). Basal insulin: Physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgraduate Medicine*, 123(4), 17–26. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.07.2300>
- Norman, A. W., & Henry, H. L. (2015). Thyroid Hormones. In A. W., Norman, & H. L., Henry (Eds.), *Hormones* (3rd ed., pp. 89–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091906-5.00005-7>
- Oppenheimer, J. H., & Schwartz, H. L. (1997). Molecular Basis of Thyroid Hormone-Dependent Brain Development*. *Endocrine Reviews*, 18(4), 462–475. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0309>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Paquette, M. A., Atlas, E., Wade, M. G., & Yauk, C. L. (2014). Thyroid Hormone Response Element Half-Site Organization and Its Effect on Thyroid Hormone Mediated Transcription. *PLoS ONE*, 9(6), e101155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101155>
- Peres Valgas da Silva, C., Hernández-Saavedra, D., White, J., & Stanford, K. (2019). Cold and Exercise: Therapeutic Tools to Activate Brown Adipose Tissue and Combat Obesity. *Biology*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.3390/biology8010009>
- Perkins, M. N., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Stone, T. W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature*, 289(5796), 401–402. <https://doi.org/10.1038/289401a0>
- Pfaff, D. W., & Sakuma, Y. (1979). Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology*, 288(1), 203–210. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012691>
- Picou, F., Fauquier, T., Chatonnet, F., & Flamant, F. (2012). A Bimodal Influence of Thyroid Hormone on Cerebellum Oligodendrocyte Differentiation. *Molecular Endocrinology*, 26(4), 608–618. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1316>
- Pijl, H., De Meijer, P. H. E. M., Langius, J., Coenegracht, C. I. G. M., Van Den Berk, A. H. M., Chandie Shaw, P. K., Boom, H., Schoemaker, R. C., Cohen, A. F., Burggraaf, J., & Meinders, A. E. (2001). Food choice in hyperthyroidism: Potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(12), 5848–5853. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8112>

- Plateroti, M., Grijota-Martinez, C., Sachs, L. M., Chiellini, G., Saponaro, F., Sestito, S., Runfola, M., & Rapposelli, S. (2020). Selective Thyroid Hormone Receptor-Beta (TR β) Agonists: New Perspectives for the Treatment of Metabolic and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Medicine*, 7, 331. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00331>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81410-5)
- Qin, C., Li, J., & Tang, K. (2018). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology*, 159(9), 3458–3472. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00453>
- Quenneville, S., Labouèbe, G., Basco, D., Metref, S., Viollet, B., Foretz, M., & Thorens, B. (2020). Hypoglycemia-Sensing Neurons of the Ventromedial Hypothalamus Require AMPK-Induced Txn2 Expression but Are Dispensable for Physiological Counterregulation. *Diabetes*, 69(11), 2253–2266. <https://doi.org/10.2337/db20-0577>
- Quignodon, L., Vincent, S., Winter, H., Samarut, J., & Flamant, F. (2007). A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Molecular Endocrinology*, 21(10), 2350–2360. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0176>
- Rabié, A., & Legrand, J. (1973). Effects of thyroid hormone and undernourishment on the amount of synaptosomal fraction in the cerebellum of the young rat. *Brain Research*, 61, 267–278. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90532-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90532-5)
- Rahbani, J. F., Bunk, J., Lagarde, D., Samborska, B., Roesler, A., Xiao, H., Shaw, A., Kaiser, Z., Braun, J. L., Geromella, M. S., Fajardo, V. A., Koza, R. A., & Kazak, L. (2024). Parallel control of cold-triggered adipocyte thermogenesis by UCP1 and CKB. *Cell Metabolism*, 36(3), 526–540. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.01.001>
- Ramadori, G., Fujikawa, T., Anderson, J., Berglund, E. D., Frazao, R., Michán, S., Vianna, C. R., Sinclair, D. A., Elias, C. F., & Coppari, R. (2011). SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell Metabolism*, 14(3), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.014>
- Rau, A. R., & Hentges, S. T. (2021). Energy state alters regulation of proopiomelanocortin neurons by glutamatergic ventromedial hypothalamus neurons: pre- and postsynaptic mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 125(3), 720–730. <https://doi.org/10.1152/jn.00359.2020>
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 85–93. <https://doi.org/doi:10.1515/bile-2015-0008>
- Refetoff, S., & Dumitrescu, A. M. (2007). Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(2), 277–305. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.005>
- Reitman, M., He, Y., & Gong, D.-W. (1999). Thyroid hormone and other regulators of uncoupling proteins. *International Journal of Obesity*, 23(S6), S56–S59. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800948>
- Rial-Pensado, E., Rivas-Limeres, V., Grijota-Martínez, C., Rodríguez-Díaz, A., Capelli, V., Barca-Mayo, O., Nogueiras, R., Mittag, J., Diéguez, C., & López, M. (2022). Temperature modulates systemic and central actions of thyroid hormones on BAT thermogenesis. *Frontiers in Physiology*, 13, 1017381. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1017381>

- Ribeiro, M. O., Bianco, S. D. C., Kaneshige, M., Schultz, J. J., Cheng, S. Y., Bianco, A. C., & Brent, G. A. (2010). Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor- β isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, *151*(1), 432–440. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0667>
- Ribeiro, M. O., Carvalho, S. D., Schultz, J. J., Chiellini, G., Scanlan, T. S., Bianco, A. C., & Brent, G. A. (2001). Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(1), 97–105. <https://doi.org/10.1172/JCI200112584>
- Richard, D. (2015). Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, *11* (8), 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.103>
- Ricquier, D. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*, *345*(2), 161–179.
- Roberts, L. M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D. S., Haggerty, J. E., Tate, E. H., Grindstaff, K. K., Mengesha, W., Raman, C., & Zerangue, N. (2008). Expression of the Thyroid Hormone Transporters Monocarboxylate Transporter-8 (SLC16A2) and Organic Ion Transporter-14 (SLCO1C1) at the Blood-Brain Barrier. *Endocrinology*, *149*(12), 6251–6261. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0378>
- Rodrigues, F., Grenha, J., Ortez, C., Nascimento, A., Morte, B., M-Belinchón, M., Armstrong, J., & Colomer, J. (2014). Hypotonic male infant and MCT8 deficiency - a diagnosis to think about. *BMC Pediatrics*, *14*(1), 252. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-14-252>
- Roh, E., Song, D. K., & Kim, M.-S. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*, 216. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.4>
- Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(12), 885–896. <https://doi.org/10.1038/nrm2066>
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, *444*(7121), 847–853. <https://doi.org/10.1038/nature05483>
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F., & Ricquier, D. (2004). The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes*, *53*(suppl_1), S130–S135. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S130>
- Routh, V. H. (2010). Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors*, *10*, 9002–9025. <https://doi.org/10.3390/s101009002>
- Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Reviews in Endocrinology and Metabolic Disorders*, *14*, 387–407. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9261-9>
- Ruze, R., Liu, T., Zou, X., Song, J., Chen, Y., Xu, R., Yin, X., Xu, Q., Cebola, I., Sochett, E., Zhang, P., & Beijing Friendship Hospital, A. (2023). Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1161521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521>
- Sano, K., Tsuda, M. C., Musatov, S., Sakamoto, T., & Ogawa, S. (2013). Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor α in the medial amygdala, medial pre-optic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on sexual and aggressive behavior of male mice. *European Journal of Neuroscience*, *37*(8), 1308–1319. <https://doi.org/10.1111/ejn.12131>
- Schoenmakers, N., Moran, C., Peeters, R. P., Visser, T., Gurnell, M., & Chatterjee, K. (2013). Resistance to thyroid hormone mediated by defective thyroid hormone receptor alpha. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1830*(7), 4004–4008. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.018>

- Schroeder, A. C., & Privalsky, M. L. (2014). Thyroid Hormones, T3 and T4, in the Brain. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 40. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00040>
- Schulz, T. J., Huang, P., Huang, T. L., Xue, R., McDougall, L. E., Townsend, K. L., Cypess, A. M., Mishina, Y., Gussoni, E., & Tseng, Y. H. (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495(7441), 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature11943>
- Schwartz, H. L., Strait, K. A., Ling, N. C., & Oppenheimer, J. H. (1992). Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 267(17), 11794–11799. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)49768-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)49768-8)
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661–671. <http://dx.doi.org/10.1038/35007534>
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., & Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 96–105. <https://doi.org/10.1172/JCI44271>
- Selmi-Ruby, S., Bouazza, L., Obregon, M. J., Conscience, A., Flamant, F., Samarut, J., Borson-Chazot, F., & Rousset, B. (2014). The targeted inactivation of TR β gene in thyroid follicular cells suggests a new mechanism of regulation of thyroid hormone production. *Endocrinology*, 155(2), 635–646. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1435>
- Senese, R., Cioffi, F., De Lange, P., Goglia, F., & Lanni, A. (2014). Thyroid: biological actions of ‘nonclassical’ thyroid hormones. *Journal of Endocrinology*, 221(2), 1–12. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0573>
- Sentis, S. C., Dore, R., Oelkrug, R., Kolms, B., Iwen, K. A., & Mittag, J. (2024). Hypothalamic Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$ Signaling Controls Body Temperature. *Thyroid*, 34(2), 243–251. <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0513>
- Seoane-Collazo, P., Martínez-Sánchez, N., Milbank, E., & Contreras, C. (2020). Incendiary Leptin. *Nutrients*, 12(2), 472. <https://doi.org/10.3390/nu12020472>
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., López-González, T., Morgan, D. A., Pardavila, J. Á., Sánchez-Tapia, M. J., Martínez-Sánchez, N., Contreras, C., Fidalgo, M., Diéguez, C., Coppari, R., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). SF1-Specific AMPK $\alpha 1$ Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 67(11), 2213–2226. <https://doi.org/10.2337/db17-1538>
- Shimogawa, Y., Maekawa, F., & Yamanouchi, K. (2014). Unilateral Lesion Increases Oestrogen Receptor α Expression in the Intact Side of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus in Ovariectomised Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(4), 258–266. <https://doi.org/10.1111/jne.12149>
- Si, R., Pan, D., Wang, Z., Chen, Y., & Cao, J. (2022). Regulation of the central melanocortin system on energy balance in mammals and birds. *Neuropeptides*, 95, 102267. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102267>
- Silva, J. E. (2003). The Thermogenic Effect of Thyroid Hormone and Its Clinical Implications. *Annals of Internal Medicine*, 139(3), 205–213. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-3-200308050-00010>
- Silva, J. E. (2005). Thyroid hormone and the energetic cost of keeping body temperature. *Bioscience Reports*, 25(3–4), 129–148. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2882-9>

- Silva, J. E. (2006). Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, 86(2), 435–464. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2005>
- Silva, J. E., & Larsen, P. R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, 305(5936), 712–713. <https://doi.org/10.1038/305712a0>
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 53(2), 120–128. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000200002>
- Singh, B. K., & Yen, P. M. (2017). A clinician's guide to understanding resistance to thyroid hormone due to receptor mutations in the TR α and TR β isoforms. *Clinical Diabetes and Endocrinology*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40842-017-0046-z>
- Sinha, R. A., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2018). Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(5), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.10>
- Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., & Bloom, S. (2005). Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiological Reviews*, 85(4), 1131–1158. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2004>
- Stark, R., Ashley, S. E., & Andrews, Z. B. (2013). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.012>
- Sternson, S. M., Shepherd, G. M. G., & Friedman, J. M. (2005). Topographic mapping of VMH \rightarrow arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience*, 8(10), 1356–1363. <https://doi.org/10.1038/nn1550>
- Stock, L. J. (1986). Influence of environmental temperature on energy balance, diet-induced thermogenesis and brown fat activity in 'cafeteria'-fed rats. *British Journal of Nutrition*, 56, 123–129. <https://doi.org/10.1079/BJN19860092>
- Stohn, J. P., Martinez, M. E., & Hernandez, A. (2016). Decreased anxiety- and depression-like behaviors and hyperactivity in a type 3 deiodinase-deficient mouse showing brain thyrotoxicosis and peripheral hypothyroidism. *Psychoneuroendocrinology*, 74, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.08.021>
- Stohn, J. P., Martinez, M. E., Zafer, M., López-Espíndola, D., Keyes, L. M., & Hernandez, A. (2018). Increased aggression and lack of maternal behavior in Dio3-deficient mice are associated with abnormalities in oxytocin and vasopressin systems. *Genes, Brain and Behavior*, 17(1), 23–35. <https://doi.org/10.1111/gbb.12400>
- Sun, L., Goh, H. J., Govindharajulu, P., Sun, L., Henry, C. J., & Leow, M. K. S. (2020). A Feedforward Loop within the Thyroid-Brown Fat Axis Facilitates Thermoregulation. *Scientific Reports*, 10(1), 9661. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66697-0>
- Sun, Z., Feng, D., Fang, B., Mullican, S. E., You, S.-H., Lim, H.-W., Everett, L. J., Nabel, C. S., Li, Y., Selvakumaran, V., Won, K.-J., & Lazar, M. A. (2013). Deacetylase-Independent Function of HDAC3 in Transcription and Metabolism Requires Nuclear Receptor Corepressor. *Molecular Cell*, 52(6), 769–782. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.022>
- Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1983). Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience*, 6, 269–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.06.030183.001413>
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Wiegand, S. J., & Price, J. L. (1980). Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Research*, 198(1), 190–195. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90354-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90354-6)

- Tabuchi, C., & Sul, H. S. (2021). Signaling Pathways Regulating Thermogenesis. *Frontiers in endocrinology*, *12*, 595020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.595020>
- Taneja, R., Roy, B., Plassat, J. L., Zusi, C. F., Ostrowski, J., Reczek, P. R., & Chambon, P. (1996). Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(12), 6197–6202. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6197>
- Thomas, J., Jose, A., Poojari, V. G., Shetty, S., Prasada, S. K., Prabhu V, K. R., & Rao, M. (2024). Role and Clinical Significance of Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) During Pregnancy. *Reproductive Sciences*, *30*, 1758–1769. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01162-z>
- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R. J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M. D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L. M., Lee, C. E., Choi, C. S., Zigman, J. M., Shulman, G. I., Sherwin, R. S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2007). Synaptic Glutamate Release by Ventromedial Hypothalamic Neurons Is Part of the Neurocircuitry that Prevents Hypoglycemia. *Cell Metabolism*, *5*(5), 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.04.001>
- Torres, N., Vargas-Castillo, A. E., & Tovar, A. R. (2015). Adipose Tissue: White Adipose Tissue Structure and Function. In B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 35–42). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00006-4>
- Tran, P. V., Lee, M. B., Marín, O., Xu, B., Jones, K. R., Reichardt, L. F., Rubenstein, J. R., & Ingraham, H. A. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *22*(4), 441–453. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00027-7)
- Trayhurn, P., & Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, *60*(3), 329–339. <https://doi.org/10.1079/PNS200194>
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2005). Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions*, *33*(5), 1078–1081. <https://doi.org/10.1042/BST0331078>
- Tschöp, M. H., Speakman, J. R., Arch, J. R. S., Auwerx, J., Brüning, J. C., Chan, L., Eckel, R. H., Farese, R. V., Galgani, J. E., Hambly, C., Herman, M. A., Horvath, T. L., Kahn, B. B., Kozma, S. C., Maratos-Flier, E., Müller, T. D., Münzberg, H., Pfluger, P. T., Plum, L., ... Ravussin, E. (2012). A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nature Methods*, *9*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1806>
- Tu, H. M., Legradi, G., Bartha, T., Salvatore, D., Lechan, R. M., & Larsen, P. R. (1999). Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*, *140*(2), 784–790. <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6486>
- Tu, L., Fukuda, M., Tong, Q., & Xu, Y. (2022). The ventromedial hypothalamic nucleus: watchdog of whole-body glucose homeostasis. *Cell & Bioscience*, *12*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00799-2>
- Unger, T. J., Calderon, G. A., Bradley, L. C., Sena-Esteves, M., & Rios, M. (2007). Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *Journal of Neuroscience*, *27*(52), 14265–14274. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3308-07.2007>

- Vaitkus, J. A., Farrar, J. S., Celi, F. S., Ross, J. M., & Coppotelli, G. (2015). Thyroid Hormone Mediated Modulation of Energy Expenditure. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7), 16158–16175. <https://doi.org/10.3390/ijms160716158>
- van der Spek, A. H., Fliers, E., & Boelen, A. (2017). The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *458*, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.025>
- van der Vaart, J. I., Boon, M. R., & Houtkooper, R. H. (2021). The role of ampk signaling in brown adipose tissue activation. *Cells*, *10*(5), 1122. <https://doi.org/10.3390/cells10051122>
- van Gucht, A. L. M., Moran, C., Meima, M. E., Visser, W. E., Chatterjee, K., Visser, T. J., & Peeters, R. P. (2017). Resistance to Thyroid Hormone due to Heterozygous Mutations in Thyroid Hormone Receptor Alpha. *Current Topics in Developmental Biology*, *125*, 337–355. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.02.001>
- Varela, L., Martínez-Sánchez, N., Gallego, R., Vázquez, M. J., Roa, J., Gándara, M., Schoenmakers, E., Nogueiras, R., Chatterjee, K., Tena-Sempere, M., Diéguez, C., & López, M. (2012). Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *Journal of Pathology*, *227*(2), 209–222. <https://doi.org/10.1002/path.3984>
- Vella, K. R., Ramadoss, P., Lam, F. S., Harris, J. C., Ye, F. D., Same, P. D., O'Neill, N. F., Maratos-Flier, E., & Hollenberg, A. N. (2011). NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metabolism*, *14*(6), 780–790. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.009>
- Viskaitis, P., Irvine, E. E., Smith, M. A., Choudhury, A. I., Alvarez-Curto, E., Glegola, J. A., Hardy, D. G., Pedroni, S. M. A., Paiva Pessoa, M. R., Fernando, A. B. P., Katsouri, L., Sardini, A., Ungless, M. A., Milligan, G., & Withers, D. J. (2017). Modulation of SF1 Neuron Activity Coordinately Regulates Both Feeding Behavior and Associated Emotional States. *Cell Reports*, *21*(12), 3559–3572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.089>
- Visser, W. E., Friesema, E. C. H., Jansen, J., & Visser, T. J. (2008). Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *19*(2), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.11.003>
- Vlaeminck-Guillem, V., Espiard, S., Flamant, F., & Wémeau, J.-L. (2015). TR α receptor mutations extend the spectrum of syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. *La Presse Médicale*, *44*(11), 1103–1112. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2015.07.022>
- Vohra, M. S., Benchoula, K., Serpell, C. J., & Hwa, W. E. (2022). AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *European Journal of Pharmacology*, *915*, 174611. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174611>
- Vuik, S., Lerouge, A., Guillemette, Y., Feigl, A., & Aldea, A. (2019). *The Heavy Burden of Obesity: Health Policy Studies*, OECD. <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>
- Wallis, K., Dudazy, S., Hogerlinden, M. van, Nordström, K., Mittag, J., & Vennström, B. (2010). The Thyroid Hormone Receptor α 1 Protein Is Expressed in Embryonic Postmitotic Neurons and Persists in Most Adult Neurons. *Molecular Endocrinology*, *24*(10), 1904–1916. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0175>
- Wang, B., & Cheng, K. (2018). Hypothalamic AMPK as a Mediator of Hormonal Regulation of Energy Balance. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3552. <https://doi.org/10.3390/ijms19113552>
- Wang, L., Yu, C.-C., Li, J., Tian, Q., & Du, Y.-J. (2021). Mechanism of Action of Acupuncture in Obesity: A Perspective From the Hypothalamus. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 632324. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.632324>

- Wang, Y., Sun, Y. P., Yang, B., Wang, Q., & Kuang, H. (2023). The management and metabolic characterization: hyperthyroidism and hypothyroidism. *Neuropeptides*, *97*, 102308. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102308>
- Warner, A., & Mittag, J. (2012). Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *Journal of Molecular Endocrinology*, *49*(1), R29–R35. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0068>
- Webber, E. S., Bonci, A., & Krashes, M. J. (2015). The elegance of energy balance: Insight from circuit-level manipulations. *Synapse*, *69*(9), 461–474. <https://doi.org/10.1002/syn.21837>
- Welsh, T., Johnson, M., Yi, L., Tan, H., Rahman, R., Merlino, A., Zakar, T., & Mesiano, S. (2012). Estrogen receptor (ER) expression and function in the pregnant human myometrium: estradiol via ER α activates ERK1/2 signaling in term myometrium. *Journal of Endocrinology*, *212*, 227–238. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0358>
- Westbury, S., Oyebode, O., Thijs Van Rens, ·, Thomas, ·, & Barber, M. (2013). Obesity Stigma: Causes, Consequences, and Potential Solutions. *Current Obesity Reports*, *12*, 10–23. <https://doi.org/10.1007/s13679-023-00495-3>
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., López, M., & Vidal-Puig, A. (2012a). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell*, *149*(4), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066>
- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., López, M., & Vidal-Puig, A. (2012b). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell*, *149*(4), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066>
- Winter, H., Rüttiger, L., Müller, M., Kuhn, S., Brandt, N., Zimmermann, U., Hirt, B., Bress, A., Sausbier, M., Conscience, A., Flamant, F., Tian, Y., Zuo, J., Pfister, M., Ruth, P., Löwenheim, H., Samarut, J., Engel, J., & Knipper, M. (2009a). Deafness in TR β Mutants Is Caused by Malformation of the Tectorial Membrane. *The Journal of Neuroscience*, *29*(8), 2581–2587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3557-08.2009>
- Winter, H., Rüttiger, L., Müller, M., Kuhn, S., Brandt, N., Zimmermann, U., Hirt, B., Bress, A., Sausbier, M., Conscience, A., Flamant, F., Tian, Y., Zuo, J., Pfister, M., Ruth, P., Löwenheim, H., Samarut, J., Engel, J., & Knipper, M. (2009b). Deafness in TR β Mutants Is Caused by Malformation of the Tectorial Membrane. *The Journal of Neuroscience*, *29*(8), 2581–2587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3557-08.2009>
- Wirth, E. K., & Schweizer, U. (2014). Transport of Thyroid Hormone in Brain. *Frontiers in Endocrinology*, *5*, 98. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00098>
- Wood, W. M., Ocran, K. W., Gordon, D. F., & Ridgway, E. C. (1991). Isolation and Characterization of Mouse Complementary DNAs Encoding α and β Thyroid Hormone Receptors from Thyrotrope Cells: The Mouse Pituitary-Specific β 2 Isoform Differs at the Amino Terminus from the Corresponding Species from Rat Pituitary Tumor Cells. *Molecular Endocrinology*, *5*(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1210/mend-5-8-1049>
- Woods, S. C., & D'alessio, D. A. (2008). Central Control of Body Weight and Appetite. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(11), 37–50. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1630>
- Wright, S. M., & Aronne, L. J. (2012). Causes of obesity. *Abdominal Radiology*, *37*(5), 730–732. <https://doi.org/10.1007/s00261-012-9862-x>

- Wu, J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2013). *Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown?*. *Genes & Development*, *27*, 234–250. <https://doi.org/10.1101/gad.211649.112>
- Wu, Y., Xu, B., & Koenig, R. J. (2001). Thyroid Hormone Response Element Sequence and the Recruitment of Retinoid X Receptors for Thyroid Hormone Responsiveness. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(6), 3929–3936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006743200>
- Wu, Z., Elena Martinez, M., Germain, D. L. S., & Hernandez, A. (2017). Type 3 deiodinase role on central thyroid hormone action affects the leptin-melanocortin system and circadian activity. *Endocrinology*, *158*(2), 419–430. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1680>
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H., & Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, *6*(7), 736–742. <https://doi.org/10.1038/nn1073>
- Xu, B., & Xie, X. (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(5), 282–292. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.24>
- Xu, Y., & López, M. (2018). Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Molecular Metabolism*, *15*, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.012>
- 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., Khan, S. A., Elias, C. F., Elmquist, J. K., & Clegg, D. J. (2011a). Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metabolism*, *14*(4), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.009>
- Yang, C. F., Chiang, M. C., Gray, D. C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S. A., Unger, E. K., Wells, J. A., & Shah, N. M. (2013). Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell*, *153*(4), 896–909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017>
- Yang, Y. C. S. H., Ko, P. J., Pan, Y. S., Lin, H. Y., Whang-Peng, J., Davis, P. J., & Wang, K. (2021). Role of thyroid hormone-integrin $\alpha\beta 3$ -signal and therapeutic strategies in colorectal cancers. *Journal of Biomedical Science*, *28*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00719-5>
- Yau, W. W., Singh, B. K., Lesmana, R., Zhou, J., Sinha, R. A., Wong, K. A., Wu, Y., Bay, B. H., Sugii, S., Sun, L., & Yen, P. M. (2019). Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy*, *15*(1), 131–150. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1511263>
- Yau, W. W., & Yen, P. M. (2020). Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 3020. <https://doi.org/10.3390/ijms21083020>
- Yoneshiro, T., Armani, A., Raffaele Pisana, S., Lei Zhang, I., Fromme, T., & Bast-Habersbrunner, A. (2020). Purine Nucleotides in the Regulation of Brown Adipose Tissue Activity. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 118. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00118>
- You, S. H., Lim, H. W., Sun, Z., Broache, M., Won, K. J., & Lazar, M. A. (2013). Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 in vivo. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(2), 182–187. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2476>
- Yousefvand, S., & Hamidi, F. (2021). The Role of Ventromedial Hypothalamus Receptors in the Central Regulation of Food Intake. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *27*(1), 689–702. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10120-9>

- Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., & DiMarchi, R. (2005). Leptin: Structure, Function and Biology. *Vitamins and Hormones*, 71, 345–375. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\), 71012-71018](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05), 71012-71018)
- Zhang, J., Chen, D., Sweeney, P., & Yang, Y. (2020). An excitatory ventromedial hypothalamus to paraventricular thalamus circuit that suppresses food intake. *Nature Communications*, 11(1), 6326. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20093-4>
- Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B. B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2008). Selective Inactivation of Socs3 in SF1 Neurons Improves Glucose Homeostasis without Affecting Body Weight. *Endocrinology*, 149(11), 5654–5661. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0805>
- Zhang, Y., Xie, C., Wang, H., Foss, R. M., Clare, M., George, E. V., Li, S., Katz, A., Cheng, H., Ding, Y., Tang, D., Reeves, W. H., & Yang, L.-J. (2016). Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 311(2), E530–E541. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00094.2016>
- Zhao, L., Ki, W. K., Ikeda, Y., Anderson, K. K., Beck, L., Chase, S., Tobet, S. A., & Parker, K. L. (2008). Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Molecular Endocrinology*, 22(6), 1403–1415. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0034>
- Ziegler, D. R., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 448(3), 217–229. <https://doi.org/10.1002/cne.10257>

ANEXOS

ANEXO I. LISTA DE LICENCIAS DE LAS IMÁGENES PROCEDENTES DE LA INTRODUCCIÓN

IMAGEN	Nº LICENCIA
Figura 3. Estructura de los principales genes manifestados en el VMH.	Creative Common CC BY license (Fosch et. al, 2021).
Figura 9. Representación gráfica del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroidea (HPT), transporte sanguíneo de THs y acción de las THs en la célula diana.	Elsevier y Copyright Clearance Center (Número de licencia: 5770850366272) (Giannocco et al., 2021)
Figuras 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, y 56	Creadas con biorender.com



Diploma del Curso

Función de Eutanasia de los Animales: Función B

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

Verónica Rivas Limeres

17464330Q

Ha superado el curso de 24 horas de duración para la obtención de la Función B de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 9 de Septiembre al 25 de Octubre de 2019 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid para toda España, con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia CAM O566-7).

Y para que conste se expide en Madrid, a 25 de Octubre de 2019.

Los Directores del Curso

Dr. José M^a Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015



Programa del curso para la Función B	
Nº	Módulos Troncales
1	Legislación nacional
2	Ética, Bienestar Animal y las Tres Erres. Nivel 1
3	Biología básica. Nivel 1
4	Cuidado, Salud y Manejo de los Animales. Nivel 1
5	Reconocimiento del Dolor, el Sufrimiento y la Angustia
6	Métodos incruentos de sacrificio (Eutanasia). Nivel 1
	Módulos de Función
2	Biología básica. Nivel 2
5	Métodos incruentos de sacrificio (Eutanasia). Nivel 2

Diploma del Curso

Función de Realización de los Procedimientos: Función C

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

Verónica Rivas Limeres
17464330Q

Ha superado el curso de 57 horas de duración para la obtención de la Función C de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 9 de Septiembre al 25 de Octubre de 2019 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid para toda España, con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia CAM O566-7).

Y para que conste se expide en Madrid, a 25 de Octubre de 2019.

Los Directores del Curso

Dr. José M^a Orellana Muriana Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura

De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015



Programa del curso para la Función C

Nº	Módulos
Módulos Troncales	
1	Legislación nacional
2	Ética, bienestar animal y las Tres Erres. Nivel 1
3	Biología básica. Nivel 1
4	Cuidado, salud y manejo de los animales. Nivel 1
5	Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia
6	Métodos incruentos de sacrificio (eutanasia). Nivel 1
Módulos de Función	
2	Biología básica. Nivel 2
6	Procedimientos mínimamente invasivos realizados sin anestesia. Nivel 1
7	Procedimientos mínimamente invasivos realizados sin anestesia, Nivel 2
8	Anestesia para procedimientos menores
9	Anestesia para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados
10	Principios de cirugía

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 notifícase a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.



FE DE ERRATAS

Finalizada la tesis doctoral, titulada: “Papel de los receptores de hormonas tiroideas en la regulación hipotalámica del balance energético” de la doctoranda Verónica Rivas Limeres y dirigida por Dr. Miguel Antonio López Pérez y el Dr. Ismael González García, se advirtieron ciertos errores, los cuales se detallan a continuación:

En todo momento:

A lo largo de todo el texto original se menciona incorrectamente que se muta la isoforma 1 del receptor TR β . Sin embargo, esto es un error. En el modelo animal descrito (TR β KO SF1), la delección afecta al exón 5, el cual es común a la isoforma 1 y 2 del receptor TR β (Figura 1) (Hameed et. al, 2017). Por lo tanto, ambas isoformas (1 y 2) estarían mutadas. Por esta razón, cada vez que se hace referencia en el texto a la mutación de la isoforma 1, debe entenderse que es un error, ya que no es exclusivo de dicha isoforma.

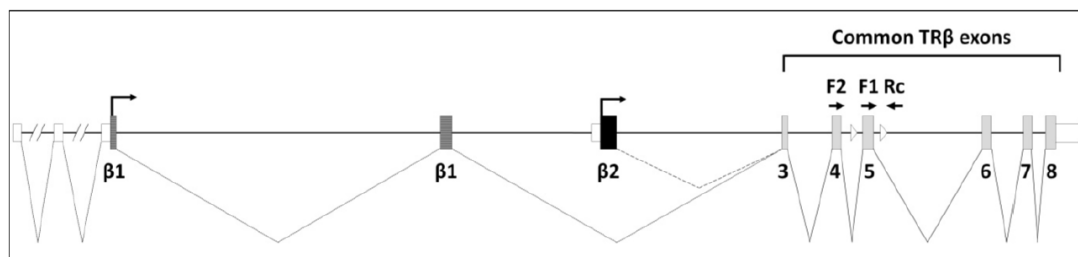


Figura 1. Estructura genómica de Thrb que muestra la localización de las isoformas beta 1 y beta 2 del receptor de la hormona tiroidea. Los recuadros blancos representan los exones no traducidos, los recuadros sombreados indican los exones 5' Thr β 1 únicos, el recuadro negro muestra el exón 5' Thr β 2 único, y los recuadros gris claro muestran los 6 exones comunes a ambas isoformas. Las posiciones de los dos sitios LoxP que flanquean el exón 5 están indicadas por los triángulos blancos. (Hameed et. al, 2017).



Las hormonas tiroideas han demostrado tener una gran implicación en el gasto energético y la ingesta, actuando principalmente a nivel central. A nivel hipotalámico y, concretamente en el VMH, se ha demostrado que dichas hormonas inhiben la señalización de AMPK en las neuronas SF1 de este mismo núcleo. La inhibición de AMPK conduce a un aumento del tono simpático sobre el BAT, lo que provoca un aumento de la termogénesis en este órgano. Sin embargo, hasta la fecha se desconocía cuál de los dos receptores de hormonas tiroideas ($TR\alpha$ y $TR\beta$) estaba implicado en estas acciones en las neuronas SF1 del VMH. En este trabajo, tras la generación de diferentes modelos animales, se demostró que es $TR\alpha1$ el receptor implicado en la regulación de la termogénesis a nivel central por hormonas tiroideas.