

TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN CENTRAL DEL
BALANCE ENERGÉTICO
POR CERAMIDAS Y
ESTRÉS DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO**

Ismael González García

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Regulación central del balance energético por ceramidas y estrés de retículo endoplasmático

D. Ismael González García

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

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

En Santiago de Compostela, 29 de Enero de 2018

Fdo.



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE TESIS

Regulación central del balance energético por ceramidas y estrés de retículo endoplasmático

D. Miguel A. López Pérez
D. Carlos Diéguez González

INFORMAN:

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

En Santiago de Compostela, 29 de Enero de 2018

Fdo. Miguel A. López Pérez

Fdo. Carlos Diéguez González.



Regulación central del balance energético por ceramidas y estrés de retículo endoplasmático

RESUMO

Na presente tese de doutoramento estudamos o papel das ceramidas e o estrés de retículo endoplasmático (ER stress) hipotalámico na regulación do balance enerxético. Os resultados obtidos demostran que a lipotoxicidade hipotalámica inducida polas ceramidas e o ER stress provocan unha diminución do tono simpático do tecido adiposo pardo (BAT), o cal conduce a unha diminución da termoxénese e a un aumento do peso corporal independente da inxesta. Este mecanismo fisiopatolóxico está implicado no desenvolvemento de obesidade xenética e inducida por dieta. A redución do ER stress hipotalámico mediante a acción da chaperona GRP78 no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) promoveu unha mellora xeral do fenotipo metabólico a través dun aumento da termoxénese do BAT e do *browning* da graxa branca. Finalmente demostramos que os estróxenos regulan o balance enerxético mediante a modulación deste mecanismo hipotalámico. O estradiol produce unha mellora na lipotoxicidade e no ER stress inducidos por ceramidas especificamente no VMH. Esta acción conduce a un aumento da termoxénese do BAT que se asocia cunha perda de peso corporal independente da inxesta.

PALABRAS CHAVE

Ceramidas, Estrés de retículo endoplasmático, Hipotálamo, Tecido adiposo pardo, Obesidade

RESUMEN

En la presente tesis doctoral hemos estudiado el papel de las ceramidas y el estrés de retículo endoplasmático (ER stress) hipotalámico en la regulación del balance energético. Los resultados obtenidos demuestran que la lipotoxicidad hipotalámica inducida por las ceramidas y el ER stress provocan una disminución del tono simpático del tejido adiposo pardo (BAT), lo que conduce a una disminución de la termogénesis y a un aumento de peso corporal independiente de la ingesta. Este mecanismo fisiopatológico está implicado en el desarrollo de obesidad genética e inducida por dieta. La reducción del ER stress hipotalámico mediante la acción de la chaperona GRP78 en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) promovió una mejora general del fenotipo metabólico a través de un aumento de la termogénesis del BAT y del *browning* de la grasa blanca. Finalmente demostramos que los estrógenos regulan el balance energético mediante la modulación de este mecanismo hipotalámico. El estradiol produce una mejora de la lipotoxicidad y el ER stress inducidos por ceramidas específicamente en el VMH. Esta acción conduce a un aumento de la termogénesis del BAT que se asocia con una pérdida de peso corporal independiente de la ingesta.

PALABRAS CLAVE

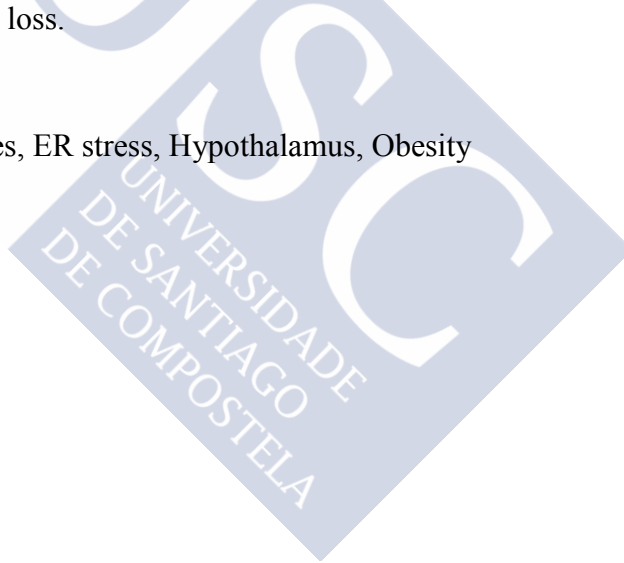
Ceramidas, Estrés de retículo endoplasmático, Hipotálamo, Tejido adiposo pardo, Obesidad

ABSTRACT

In this doctoral thesis we have studied the role of hypothalamic ceramides and endoplasmic reticulum (ER) stress in the regulation of energy balance. The obtained data demonstrate that ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress decrease the sympathetic tone of brown adipose tissue (BAT), which leads to a decrease in thermogenesis and a feeding-independent body weight gain. This pathophysiological mechanism is involved in the development of genetic and diet induced obesity. The hypothalamic ER stress amelioration by the action of GRP78 chaperone in the ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH) promoted a general improvement of the metabolic phenotype through an increase of BAT thermogenesis and white fat browning. Finally, we demonstrate that estrogens regulate energy balance by modulating this hypothalamic mechanism. Estradiol produces an improvement in ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress specifically in the VMH. This action leads to an increase in BAT thermogenesis which is associated with a food intake independent body weight loss.

KEYWORDS

Brown adipose tissue, Ceramides, ER stress, Hypothalamus, Obesity







ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS

ACTH: hormona adrenocorticotropa

Ad: adenovirus

ADP: adenosín difosfato

AgRP: proteína relacionada con agouti (*agouti related protein*)

AKT: proteína kinasa B (*protein kinase B*)

AMPc: adenosin monofosfato cíclico

AMPK: proteína kinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)

ANOVA: análisis de la varianza

ANS: sistema nervioso autónomo (*autonomic nervous system*)

AP: área postrema

ARC: núcleo arcuato hipotalámico (*arcuate nucleus of hypothalamus*)

AR- α : receptor adrenérgico alfa (*adrenergic receptor alpha*)

AR- β : receptor adrenérgico beta (*adrenergic receptor beta*)

ATF6: factor de transcripción activado 6 (*activating transcription factor 6*)

ATGL: lipasa adiposa de triglicéridos (*adipose triglyceride lipase*)

ATP: adenosín trifosfato

BAT: tejido adiposo pardo o marrón (*brown adipose tissue*)

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

BMI: índice de masa corporal (*body mass index*)

BMP8B: proteína morfogenética ósea 8B (*bone morphogenetic protein 8B*)

BSA: seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*)

CART: transcrito regulado por cocaína y amfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)

CCK: colecistoquinina

CerS: ceramida sintetasa (*ceramide synthase*)

CHOP: proteína homóloga C/EBP (*C/EBP homologous protein*)

CIDEA: efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (*cell death-inducing DNA fragmentation factor-like effector-a*)

CNS: sistema nervioso central (*central nervous system*)
CPT1: carnitina palmitoil transferasa 1
CRH: hormona liberadora de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*)
DAG: diacilglicerol
DEPC: dietilpirocarbonato
DIO: obesidad inducida por dieta (*diet induced obesity*)
DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo (*dorsomedial nucleus of hypothalamus*)
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
DREADD: receptores diseñados exclusivamente para su activación mediante un fármaco de diseño (*designer receptors exclusively activated by designer drugs*)
E2: 17 β -estradiol
EE: gasto energético (*energy expenditure*)
eIF2 α : factor de iniciación eucariota 2 (*eukaryotic initiation factor 2*)
ELISA: Enzimoimmunoensayo
ER stress: estrés del retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum stress*)
ER: retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)
EREs: elementos de respuesta a estrógenos (*estrogen response elements*)
ER α : receptor de estrógenos alfa (*estrogen receptor alpha*)
ER β : receptor de estrógenos beta (*estrogen receptor beta*)
FABP3: proteína de unión a ácidos grasos 3 (*fatty acid-binding protein 3*)
FADH: flavín adenín dinucleótido
FFAs: ácidos grasos libres (*free fatty acids*)
FSH: hormona foliculo estimulante (*follicle-stimulating hormone*)
GABA: ácido γ -aminobutírico (*Gamma-Aminobutyric acid*)
GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)
GHSR: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (*growth hormone secretagogue receptor*)
GLP-1: péptido similar al glucagón 1 (*glucagon-like peptide-1*)
GMPc: guanosin monofosfato cíclico
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone*)
GPCR: receptor 7 transmembrana asociado a proteína G (*G protein-coupled receptors*)
GPER: receptor de estrógenos acoplado a proteína G (*G protein-coupled estrogen receptor*)
GRP78/BiP: proteína regulada por glucosa de 78kDa/proteína de unión a inmunoglobulina (*78-kDa glucose regulated protein/binding immunoglobulin protein*)

GTP: guanosin trifosfato

GTT: test de tolerancia a glucosa (*glucose tolerance test*)

H&E: hematoxilina y eosina

HFD: dieta alta en grasa (*high fat diet*)

HSL: hormona sensible a lipasa

ICV: intracerebroventricular

IKK- β : inhibidor del factor nuclear kinasa kappa-beta (*inhibitor of nuclear factor kappa-beta kinase*)

IL6: interleukina 6

IO: núcleo inferior de la oliva

IP: intraperitoneal

IR: receptor de insulina (*insulin receptor*)

IRE1 α : proteína requerida de inositol 1 alfa (*inositol-requiring enzyme 1 alpha*)

KO: *knock out*

LEAP2: péptido antimicrobiano 2 expresado en hígado (*liver-expressed antimicrobial peptide 2*)

LEPRs: receptores de leptina (*leptin receptors*)

LHA: hipotálamo lateral (*lateral hypothalamus*)

LPB: núcleo parabraquial lateral (*lateral parabrachial nucleus*)

LZR: ratas Zucker delgadas (*lean Zucker rats*)

Malonil-CoA: malonil-coenzima A

MAPK: proteínas kinasa del mitógeno activado p38 (*p38 mitogen-activated protein kinase*)

MC3R: receptor de melanocortina 3 (*melanocortin 3 receptor*)

MC4R: receptor de melanocortina 4 (*melanocortin 4 receptor*)

MCH: hormona concentradora de melanina (*melanin concentrating hormone*)

MCHR: receptor de la hormona concentradora de melanina (*melanin concentrating hormone receptor*)

MCRs: receptores de melanocortinas (*melanocortin receptors*)

MBH: hipotálamo mediobasal (*mediobasal hypothalamus*)

ME: eminencia media (*median eminence*)

MnPO: núcleo medial preóptico (*median preoptic nucleus*)

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (*messenger ribonucleic acid*)

mTOR: *mammalian Target of Rapamicyn*

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NE: norepinefrina

NEFAs: ácidos grasos libres no esterificados (*non-esterified fatty acids*)

NFk β : factor nuclear kappa beta (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NPY: neuropéptido Y

NTS: núcleo del tracto solitario

OVX: ovariectomía u ovariectomizada/s

OX: orexinas

OZR: ratas Zucker obesas (*obese Zucker rats*)

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

PERK: kinasa similar a PKR del retículo endoplásmico (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*)

PGC1 α : coactivador tipo 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PGE₂: prostaglandinas E₂

PI3K: fosfoinositol 3 kinasa (*phosphatidylinositide 3-kinase*)

PKA: proteína kinasa A

PKC- θ : proteína kinasa C- θ (*protein kinase C- θ*)

POA: área preóptica

POMC: proopiomelanocortina

PP: polipéptido pancreático

PPAR γ : receptor activado por el proliferador del peroxisoma activado gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PRDM16: *Pr domain zinc finger16*

pSTAT3: *phospho signal transducer and activator of transcription 3*

PVH: núcleo paraventricular (*paraventricular hypothalamus*)

PYY: péptido YY

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

ROCK1: kinasa-Rho1 (*Rho-associated protein kinase 1*)

RPa: núcleo del rafe pálido (*raphe pallidus*)

RQ: tasa de respiración metabólica (*respiratory quotient*)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real time polimerase chain reaction*)

SC: subcutáneo

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEM: desviación estándar de la media (*standard error of the mean*)

SERMs: moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (*selective estrogen receptor modulators*)

SF1: factor de transcripción esteroideogénico 1 (*steroidogenic factor 1*)

Sham: *sham operated*

shRNA: *short hairpin ribonucleic acid*

- SMasa: esfingomielina fosfodiesterasa
- SNA: actividad nerviosa del simpático (*sympathetic nervous activity*)
- SNS: sistema nervioso simpático (*sympathetic nervous system*)
- SOCS3: supresor de la señalización de la citokina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)
- SPT: serina palmitoiltransferasa (*serine palmitoyltransferase*)
- SPTLC1: subunidad 1 de la cadena larga de la serina palmitoiltransferasa (*serine palmitoyltransferase long chain subunit 1*)
- SPTLC2: subunidad 2 de la cadena larga de la serina palmitoiltransferasa (*serine palmitoyltransferase long chain subunit 2*)
- STAT3: transductor de señal activador de la transcripción 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)
- STD: dieta estándar (*standard diet*)
- T3: triyodotironina
- TAG: triglicéridos
- TLR-4: receptor kinasa tipo toll 4 (*toll like receptor 4*)
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
- TRH: hormona liberadora de tirotrópina (*thyrotropin-releasing hormone*)
- TRP: receptor de potencial transitorio (*transient receptor potential*)
- TSE: sistema de calorimetría indirecta
- TSH: hormona estimuladora del tiroides (*thyroid-stimulating hormone*)
- TUDCA: ácido tauroso-deoxicólico (*tauroursodeoxycholic acid*)
- UCP1: proteína desacoplante 1 (*uncoupling protein 1*)
- UPR: respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response*)
- VMH: núcleo hipotalámico ventromedial (*ventromedial hypothalamus*)
- VTA: área ventral tegmental (*ventral tegmental area*)
- WAT: tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*)
- WT: *wild type*
- XBP1: proteína de unión X-box (*X-box binding protein 1*)
- α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos alfa (*alpha-Melanocyte-stimulating hormone*)
- β 3-AR: receptor adrenérgico beta-3 (*beta-3 adrenergic receptors*)



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. BALANCE ENERGÉTICO	23
1.2. FISIOLÓGIA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	24
1.2.1. Insulina	25
1.2.2. Leptina	25
1.2.3. Ghrelin	26
1.2.4. Señales de saciedad	27
1.3. EFECTOS METABÓLICOS DE LOS ESTRÓGENOS	28
1.3.1. Receptores estrogénicos	29
1.3.2. Estrógenos y balance energético	30
1.3.2.1. Efectos metabólicos periféricos de los estrógenos	31
1.3.2.1.1. <i>Regulación de leptina y ghrelin por estrógenos</i>	32
1.3.2.1.2. <i>Estrógenos y adiposidad</i>	32
1.3.2.1.3. <i>Estrógenos y actividad del BAT</i>	33
1.3.2.2. Efectos metabólicos centrales de los estrógenos	34
1.3.2.3.1. <i>Estrógenos y regulación central de la ingesta</i>	34
1.3.2.3.2. <i>Estrógenos y regulación del gasto energético</i>	36
1.4. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y BALANCE ENERGÉTICO	38
1.4.1. Regulación hipotalámica del balance energético	39
1.4.1.1. Núcleo arcuato del hipotálamo	39
1.4.1.1.1. <i>Neuronas AgRP/NPY</i>	40
1.4.1.1.2. <i>Neuronas POMC/CART</i>	42
1.4.1.2. Núcleo ventromedial del hipotálamo	43
1.4.1.3. Área lateral del hipotálamo	44
1.4.1.4. Núcleo dorsomedial del hipotálamo	45
1.4.1.5. Núcleo paraventricular del hipotálamo	46
1.5. FISIOLÓGIA DE LA REGULACIÓN TÉRMICA Y TEJIDO ADIPOSO PARDO	47
1.5.1. Mecanismos disipadores de calor	47
1.5.2. Mecanismos generadores de calor	48
1.5.2.1. Termogénesis del tejido adiposo pardo y <i>browning</i> del tejido adiposo blanco	48
1.5.3. Detección de la temperatura corporal	52

1.5.4. Regulación central de la termogénesis	52
1.6. LIPOTOXICIDAD Y ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN EL HIPOTÁLAMO	55
1.6.1. Alteraciones metabólicas inducidas por la lipotoxicidad	55
1.6.2. Mecanismos moleculares de ER stress	59
1.6.2.1. La vía de IRE (<i>Inositol-requiring protein-1</i>)	61
1.6.2.2. La vía de ATF6 (<i>Activating transcription factor 6</i>)	62
1.6.2.3. La vía de PERK (<i>PKR-like ER kinase</i>)	62
1.6.3. ER stress en obesidad y patologías asociadas	62
1.6.4. ER stress hipotalámico y balance energético	64
2. OBJETIVOS	67
3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES IN VIVO	69
3.1.1. Modelos animales	69
3.1.2. Procedimientos no quirúrgicos	70
3.1.2.1. Administración de compuestos a través de diferentes vías	70
3.1.1.1.1. <i>Vía Subcutánea</i>	70
3.1.1.1.2. <i>Vía intraperitoneal</i>	70
3.1.1.1.3. <i>Vía intracerebroventricular</i>	71
3.1.2.2. Monitorización de la ingesta y de la masa corporal	71
3.1.2.3. Determinación de la temperatura corporal y del BAT	71
3.1.2.4. Determinación de la composición corporal	72
3.1.2.5. Test de tolerancia oral a glucosa	72
3.1.2.6. Test de tolerancia a insulina	72
3.1.2.7. Test de tolerancia a leptina	73
3.1.2.8. Análisis por calorimetría indirecta	73
3.1.3. Procedimientos quirúrgicos	73
3.1.3.1. Anestesia y analgesia	73
3.1.3.2. Canulación ICV	74
3.1.3.3. Estereotaxia	75
3.1.3.4. Ovariectomía	75
3.1.3.5. Registro de la actividad simpática	76
3.1.3.6. Ensayo de sensibilidad a insulina	76

3.1.3.7. Perfusión intracardiaca	77
3.1.3.8. Sacrificio y disección de tejidos	77
3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES	77
3.2.1. Tratamiento ICV crónico con ceramida C6	77
3.2.2. Inyección extereotáxica en VMH y ARC de Ad GRP78	78
3.2.3. Inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento ICV crónico con ceramida C6	79
3.2.4. Inyección extereotáxica en VMH y ARC de Ad GRP78 DN	80
3.2.5. Inducción de obesidad por HFD y tratamiento ICV crónico con TUDCA	80
3.2.6. Inducción de obesidad por HFD e inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78	81
3.2.7. Inducción de obesidad por HFD, inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento SC con SR59230A	82
3.2.8. Tratamiento ICV crónico con tapsigargina e inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78	83
3.2.9. OVX y tratamiento ICV crónico con E2	83
3.2.10. OVX y tratamiento ICV crónico con miriocina	84
3.2.11. OVX, tratamiento ICV crónico con miriocina y tratamiento SC con SR59230A	84
3.2.12. OVX e inyección extereotáxica en VMH de Ad shSPTLC1	85
3.2.13. OVX y tratamiento ICV crónico con TUDCA	86
3.2.14. OVX e inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78	86
3.2.15. OVX, inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento SC con SR59230A	87
3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES IN VITRO	87
3.3.1. Western Blot	87
3.3.1.1. Extracción de proteína	87
3.3.1.2. Cuantificación de proteína	88
3.3.1.3. Preparación de las muestras	88
3.3.1.4. Electroforesis	89
3.3.1.5. Transferencia	90
3.3.1.6. Inmunodetección de proteínas	91
3.3.1.7. Revelado y fijación de la señal	92
3.3.1.8. Cuantificación	93

3.3.2. RT-PCR	93
3.3.2.1. Extracción de RNA.....	93
3.3.2.2. Cuantificación de RNA.....	93
3.3.2.3. Retrotranscripción (RT).....	94
3.3.2.4. PCR en tiempo real.....	94
3.3.3. Fluorescencia directa de GFP	95
3.3.4. Determinaciones séricas	96
3.3.5. Cuantificación de ceramidas	96
3.3.6. Tinción Oil-Red O	97
3.3.7. Inmunohistoquímica	97
3.3.8. Estadística	97
4. RESULTADOS	101
4.1. LA LIPOTOXICIDAD Y EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDOS POR CERAMIDAS REGULAN EL BALANCE ENERGÉTICO	101
4.1.1. El tratamiento central con ceramidas indujo ER stress hipotalámico y aumento de peso corporal a través de la inhibición simpática del BAT.....	101
4.1.2. GRP78 en el VMH revirtió el efecto central con ceramidas sobre el peso corporal y la termogénesis del BAT.....	102
4.1.3. GRP78 en el VMH revirtió el efecto central con ceramidas sobre la resistencia a la insulina.....	106
4.1.4. La inactivación de GRP78 en el VMH indujo ER stress, aumento de peso y disminución de UCP1 en BAT.....	106
4.1.5. GRP78 en el VMH revirtió el ER stress inducido por ceramidas en ratas Zucker obesas.....	108
4.1.6. GRP78 en el VMH aumentó la termogénesis del BAT y mejoró el perfil metabólico de las ratas Zucker obesas.....	109
4.1.7. GRP78 en el VMH mejoró la señalización de la leptina y la resistencia a la insulina en ratas Zucker obesas.....	111
4.1.8. El ER stress hipotalámico está incrementado en las ratas obesas alimentadas con HFD.....	113
4.1.9. El tratamiento central con TUDCA disminuyó el peso corporal y el ER stress de las ratas obesas HFD.....	114
4.1.10. GRP78 en el VMH disminuyó el peso corporal y el ER stress de las ratas obesas HFD.....	115

4.1.11. GRP78 en el VMH mejoró la sensibilidad a insulina y la señalización de leptina de las ratas obesas HFD	118
4.1.12. GRP78 en el VMH estimuló la termogénesis en el BAT y el <i>browning</i> del WAT de las ratas obesas HFD	120
4.1.13. GRP78 en el VMH indujo la termogénesis del BAT y el <i>browning</i> del WAT a través de la activación del SNS	124
4.1.14. El <i>browning</i> del WAT inducido por GRP78 en el VMH es independiente de la señalización de leptina	125
4.1.15. GRP78 en el VMH revirtió los efectos centrales de la taspigargina en el balance energético	126
4.2. EL ESTRADIOL REGULA EL BALANCE ENERGÉTICO REDUCIENDO EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDO POR LAS CERAMIDAS	128
4.2.1. El estradiol central inhibe la lipotoxicidad y el ER stress hipotalámico inducido por ceramidas	128
4.2.2. La inhibición farmacológica de la síntesis de ceramidas hipotalámicas mimetiza el efecto central del estradiol sobre el balance energético a través del SNS	130
4.2.3. El silenciamiento de SPTLC específicamente en el VMH disminuye el ER stress y el fenotipo metabólico de las ratas OVX	133
4.2.4. La inhibición farmacológica del ER stress hipotalámico recapitula el efecto central del estradiol sobre el balance energético	135
4.2.5. GRP78 en el VMH disminuye el peso corporal y mejora el fenotipo metabólico de las ratas OVX a través del SNS	137
5. DISCUSIÓN	141
5.1. LA LIPOTOXICIDAD Y EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDOS POR CERAMIDAS REGULAN EL BALANCE ENERGÉTICO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN SIMPÁTICA DEL BAT	141
5.1.1. Las ceramidas regulan el balance energético	141
5.1.2. Las ceramidas regulan el ER stress hipotalámico	142
5.1.3. La reversión del ER stress hipotalámico inducido por HFD revierte el fenotipo obeso	144
5.2. EL ESTRADIOL MODULA EL ER STRESS HIPOTALÁMICO A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DE LAS CERAMIDAS PARA AUMENTAR LA TERMOGÉNESIS DEL BAT Y DISMINUIR EL PESO CORPORAL	146
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	153



1. INTRODUCCIÓN

1.1. BALANCE ENERGÉTICO

La relación existente entre la energía que entra y la que sale en cualquier sistema físico se denomina balance energético. Cuando el sistema a estudio es el organismo humano podemos hablar de la relación entre la cantidad de energía que se ingiere en forma de alimentos y la cantidad de energía consumida bajo distintas formas, como son: el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis adaptativa (Figura 1) (Frayn, 2010; Lopez et al., 2016).

La energía que liberan los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas tras su oxidación será transformada en trabajo mecánico, en calor o en otras formas de energía química. En este sentido, el glucógeno y los triglicéridos serán usados como reservas metabólicas por el organismo, para acompañar a medio y largo plazo el balance energético. Cuando un balance energético negativo es mantenido durante un tiempo prolongado puede dar lugar a estados de caquexia. Cuando el balance energético es positivo, el organismo almacena la energía extra principalmente en forma de triglicéridos en los adipocitos, generando una elevada adiposidad que puede llegar a desencadenar sobrepeso u obesidad (Hall, 2016; Lopez et al., 2016).

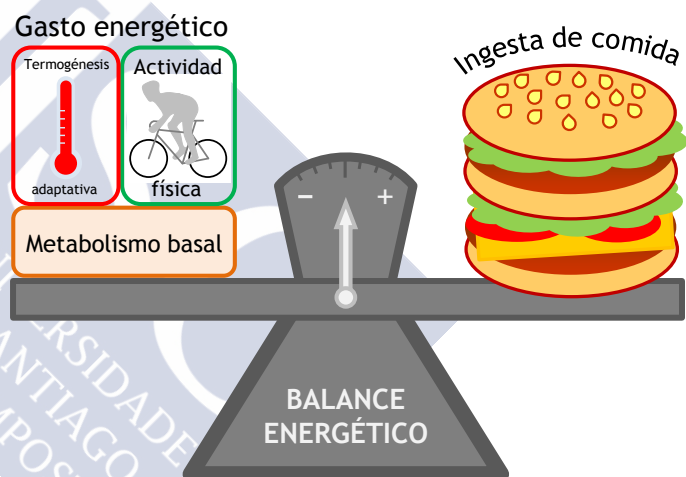


Figura 1. Representación conceptual del balance energético.

Como se ha descrito anteriormente, el gasto energético está compuesto por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis adaptativa. El metabolismo basal es la energía necesaria para el mantenimiento de las funciones orgánicas esenciales para la vida y el metabolismo celular (a nivel celular por ejemplo: el transporte activo de iones a través de membranas para el mantenimiento de gradientes, la renovación de proteínas y otras estructuras celulares, etc.; a nivel de órganos por ejemplo: el bombeo de sangre por el corazón, la respiración pulmonar, etc.). En los humanos, la tasa metabólica basal describe un ritmo circadiano, siendo mayor durante el día y menor durante la noche.

La actividad física comprende el ejercicio locomotor tanto voluntario como involuntario de un organismo. El aparato musculo esquelético es el principal responsable de esta actividad y el gasto energético tendrá como principal factor la contracción de los músculos esqueléticos (Hall, 2016).

Por último, la termogénesis es un componente esencial en los animales homeotermos (de sangre caliente), cuando estos se encuentran a una temperatura ambiental inferior a su termoneutralidad (por encima de este punto la termogénesis fisiológica basal es suficiente para mantener la temperatura corporal sin la activación de otros mecanismos homeostáticos). Bajo ese umbral se activan mecanismos de ahorro de calor como la vasoconstricción cutánea, la piloerección, así como la adopción de posturas esféricas y la reducción de la movilidad. Cuando estos mecanismos no son suficientes para mantener la temperatura corporal dentro de un rango fisiológico se activa la termogénesis facultativa. Por una parte, se producen los escalofríos, contracciones involuntarias de la musculatura esquelética y por otra parte se activará la termogénesis facultativa no dependiente de escalofríos que tiene lugar en el tejido adiposo pardo (BAT). En el BAT, se produce una disipación de la energía en forma de calor a través de un desacoplamiento de la respiración mitocondrial por parte de la proteína desacoplante 1 (UCP1) (Cannon and Nedergaard, 2004; Hall, 2016). Este apartado se desarrollará más en profundidad en la sección 1.5 fisiología de la regulación térmica y BAT.

1.2. FISIOLÓGÍA DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El mantenimiento de un equilibrio entre la energía que gasta un organismo y la que consume requiere de una fina regulación. Con este motivo, la evolución ha dispuesto en los animales una serie de sistemas neuroendocrinos que permiten modular ambas variables. En general el sistema nervioso central (CNS) va a recibir e integrar una serie de señales periféricas como son hormonas, aferencias nerviosas y nutrientes, generando una respuesta adecuada la ingesta de nutrientes y en el gasto de energía. Además, en base a las anteriores señales periféricas el CNS actuará regulando la homeostasis de la glucosa así como el metabolismo lipídico (Figura 2) (Schwartz et al., 2000; Morton et al., 2006; Coll et al., 2007; Speakman and O'Rahilly, 2012; Waterson and Horvath, 2015).

Así pues, distintas señales informarán al CNS de que los niveles de energía del organismo a corto o largo plazo son bajos ante lo cual el CNS inducirá un

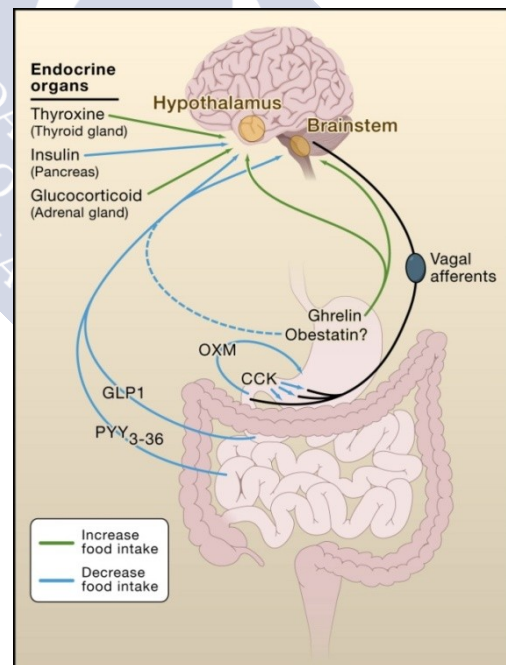


Figura 2. Regulación fisiológica del balance energético (Coll et al., 2007). Licencia Creative Commons.

aumento de la ingesta de nutrientes así como una disminución del gasto energético y una movilización de glucosa hacia la circulación mediante la gluconeogénesis hepática. Por otra parte, otras señales diferentes serán las encargadas de transmitir al CNS que el organismo ha alcanzado unos niveles de energía de manera puntual o bien de almacenamiento suficientes, ante lo cual promoverá una inhibición de la ingesta, un incremento del gasto energético y un aumento de la gluconeogénesis y de la lipogénesis (Lam et al., 2005; Luquet and Magnan, 2009; Blouet and Schwartz, 2010; Williams and Elmquist, 2012; Yeo and Heisler, 2012; Schneeberger et al., 2014; Waterson and Horvath, 2015; Lopez et al., 2016).

Podemos establecer por tanto dos categorías funcionales a la hora de clasificar las señales metabólicas que llegarán al CNS para informar del balance energético del organismo: anorexigénicas y orexigénicas. De todas ellas, nos centraremos en la insulina, la leptina y ghrelin por ser las hormonas más relevantes en el control de la homeostasis energética.

1.2.1. Insulina

Esta hormona pancreática, fue la primera señal que se vinculó a la regulación del peso corporal y la ingesta. Producida en las células β de los islotes de Langerhans en respuesta a una glucemia elevada, induce la incorporación de la glucosa plasmática en los tejidos periféricos. Además la insulina ejerce diversas funciones sobre el metabolismo, por ejemplo estimulando la glucogenogénesis, la síntesis de lípidos y proteínas, e inhibiendo la glucogenolisis y la lipolisis (Schwartz et al., 2000; Bruning et al., 2000; Saltiel and Kahn, 2001). En general podemos describir a la insulina como una hormona anabólica que favorecerá el almacenamiento de energía por parte del organismo. Además la insulina actúa en el CNS como señal anorexigénica (Baskin et al., 1999b). Se ha descrito que la insulina actúa en el núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) inhibiendo la sensación de hambre (Woods et al., 1979; Porte, Jr. et al., 2005; Varela and Horvath, 2012). El receptor de insulina (IR) se expresa en estas poblaciones neuronales colocalizándose con las neuronas proopiomelanocortina (POMC) y proteína relacionada con agouti (AgRP) (Benoit et al., 2002). La administración intracerebroventricular de insulina tanto en primates como en roedores tiene un efecto anorexigénico (Woods et al., 1979; McGowan et al., 1993; Air et al., 2002). Por otra parte, la insulina también actúa a nivel central modulando la homeostasis de la glucosa en tanto que inhibe la producción hepática de glucosa (Obici et al., 2002).

1.2.2. Leptina

Es una hormona peptídica de 167 aminoácidos producida y secretada principalmente por los adipocitos. Fue descubierta en 1994, tras el clonaje y secuenciación del gen *ob* tanto murino como humano (Zhang et al., 1994). La leptina circulante es directamente proporcional a la adiposidad del organismo y alcanza el CNS a través de un transporte saturable situado en la barrera hematoencefálica (Considine et al., 1996; Schwartz et al., 1996). En este sentido

actúa como una señal anorexigénica que llega al CNS informando de las reservas energéticas que el organismo tiene a medio y largo plazo en forma de depósitos grasos (Schwartz et al., 2000). Los receptores de leptina (LEPRs) se expresan en distintas regiones del CNS destacando el ARC, donde esta adipokina actuará activando las neuronas POMC e inhibiendo las neuronas AgRP, dando como resultado una inhibición de la ingesta (Weigle et al., 1995; Campfield et al., 1995; Cheung et al., 1997; Elmquist et al., 1998b; Baskin et al., 1999a). Además, se ha descrito que la leptina no solo actúa en uno de los lados de la ecuación, sino que también inducirá un incremento en el gasto energético del organismo. En este sentido, se ha visto que activa el sistema nervioso simpático (SNS) induciendo un incremento en la termogénesis del BAT (Pandit et al., 2017).

1.2.3. Ghrelin

Hormona secretada por las células parietales del estómago, ghrelin es la principal hormona orexigénica. Se ha detectado su expresión en otras partes del tracto gastrointestinal (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon), en el CNS (hipotálamo e hipófisis), en páncreas, riñones, corazón, placenta, sistema inmunitario, gónadas y pulmones (Muller et al., 2015). Está compuesta por una secuencia de 28 aminoácidos y ejerce su acción a través del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR) (Kojima et al., 1999). La acilación en la serina 3 es necesaria para adoptar la forma activa que atraviesa la barrera hematoencefálica y se une a su receptor (Kojima et al., 1999; Romero et al., 2010). Los niveles séricos de ghrelin varían en función del estado prandial elevándose en estados de ayuno y reduciéndose tras las comidas (Tschop et al., 2000; Cummings et al., 2001). La administración tanto central como periférica de esta hormona gástrica incrementa el apetito produciendo un incremento en la ingesta, la adiposidad, y el peso corporal tanto en roedores como en humanos (Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001). Ghrelin actúa en las neuronas AgRP del hipotálamo estimulando la producción de neuropéptido Y (NPY) y AgRP (neuropéptidos orexigénicos) e inhibe las neuronas POMC y transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (neuropéptidos anorexigénicos) (Kamegai et al., 2001; Cowley et al., 2003). A nivel de señalización, nuestro grupo ha descrito como ghrelin actúa a través de dos mecanismos hipotalámicos: por una parte activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) (Lopez et al., 2008; Ramirez et al., 2013); y por otra parte activa a la quinasa *mammalian target of rapamycin* (mTOR) en el ARC (Martins et al., 2012). Se ha visto también que ghrelin actúa también reduciendo el gasto energético ya que la administración central crónica reduce la expresión de UCP1 en el BAT (Tsubone et al., 2005; Coll and Yeo, 2013). Además ghrelin actuará otras zonas del CNS para modular la ingesta de alimentos en mecanismos no relacionados con la homeostasis energética. En este sentido, se ha visto que la inyección de ghrelin en áreas mesolímbicas como el área ventral tegmental (VTA) y el núcleo accumbens induce un incremento en la ingesta de alimentos (Abizaid et al., 2006). Estas áreas están muy implicadas en la regulación de los aspectos motivacionales del comportamiento y en las conductas adictivas. Sin embargo, sólo la acción sobre el VTA parece ser necesaria y

suficiente para desencadenar el efecto orexigénico en este contexto (Skibicka et al., 2011). Recientemente, se ha descrito la existencia de un antagonista endógeno producido en el hígado y en el intestino delgado, el péptido antimicrobiano 2 expresado en hígado (LEAP2), cuya secreción se suprime en el ayuno. LEAP2 inhibe completamente la activación del GHSR por ghrelin y bloquea los principales efectos de ghrelin in vivo, incluida la ingesta de alimentos (Ge et al., 2017).

1.2.4. Señales de saciedad

Adicionalmente a las señales indicadoras del estado nutricional a medio y largo plazo (leptina, insulina, ghrelin, etc.) que regulan el balance energético promoviendo que los animales inicien la ingesta de comida o prolonguen su ayuno, existen una serie de mecanismos fisiológicos que determinan la cantidad de alimento que se consume en una comida individual. El tamaño de las comidas viene determinado por la aparición de la saciedad, un estado biológico inducido por el estímulo neuro-humoral generado durante la ingesta de alimentos que desencadena la terminación de la comida (Schwartz et al., 2000).

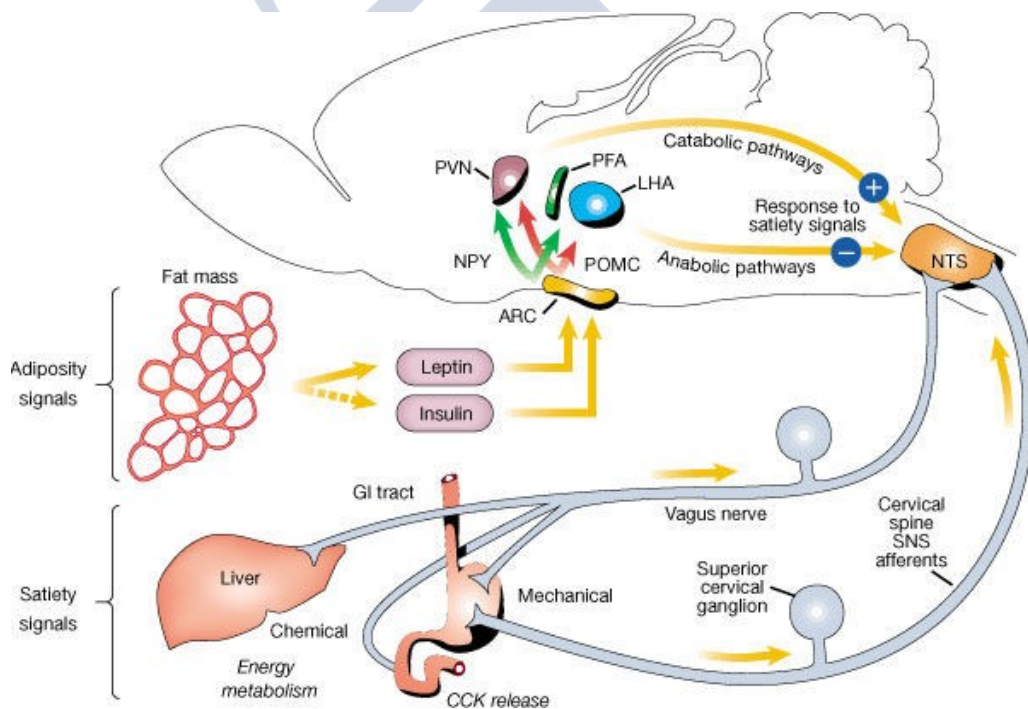


Figura 3. Mecanismos centrales del control de la saciedad (Schwartz et al., 2000). Con permiso de Springer Nature.

El llenado gastrointestinal, es uno de los estímulos que inhibe la ingesta. En el momento que los alimentos llenan el tracto gastrointestinal superior (fundamentalmente estómago y duodeno) sus paredes se distienden y generan una señal mecánica de estiramiento que es transmitida por el nervio vago hasta el troncoencéfalo (Cummings and Overduin, 2007). En esta región nerviosa, el NTS integrará las señales aferentes vagales desencadenando la

sensación de saciedad (Figura 3) (Grill and Hayes, 2012). Además de esto existen factores en la cavidad oral relacionados con el proceso de masticación, la salivación, la deglución y el gusto que van a condicionar la sensación de saciedad (Travers et al., 1987; Hall, 2016).

Existen también hormonas gastrointestinales como la colecistokinina (CCK), el péptido similar al glucagón 1 (GLP1), el polipéptido pancreático (PP) y el péptido YY 3-36 (PYY 3-36) que actúan en el núcleo del tracto solitario (NTS) induciendo la saciedad en las comidas. Se sabe además que nutrientes circulantes como la glucosa y los ácidos grasos libres regulan directamente la función del NTS y el área postrema (AP) (Lutz, 2012). Todas estas señales aferentes van a ser integradas en el NTS junto con la información de otras áreas encefálicas como el sistema límbico y el hipotálamo para emitir la señal de saciedad (Zheng et al., 2005; Geerling et al., 2010; Rui, 2013).

1.3. EFECTOS METABÓLICOS DE LOS ESTRÓGENOS

Además de las señales metabólicas anteriormente explicadas, existen otras como por ejemplo las hormonas sexuales, que también actúan como moduladoras del balance energético. Dada la relevancia de los estrógenos en esta tesis doctoral, se dedicará una sección específica para introducir sus acciones sobre la homeostasis metabólica. Los estrógenos, son las hormonas sexuales femeninas más importantes. En los mamíferos están compuestos por tres moléculas diferentes: estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3) (Figura 4). Estos, son producidos y secretados principalmente en las células de la granulosa de los ovarios durante la fase folicular del ciclo ovárico. Alternativamente, en las glándulas adrenales, en los testículos, en el tejido adiposo y en la placenta también se producen estrógenos (Melmed et al., 2015; López and Tena-Sempere, 2015). A nivel fisiológico los estrógenos participan en el desarrollo puberal, en la función sexual-reproductora, en la homeostasis del hueso, en el equilibrio electrolítico entre otras múltiples funciones, si bien la que más nos va a interesar en esta tesis es el efecto de los estrógenos sobre el metabolismo (Mauvais-Jarvis et al., 2013; López and Tena-Sempere, 2015).

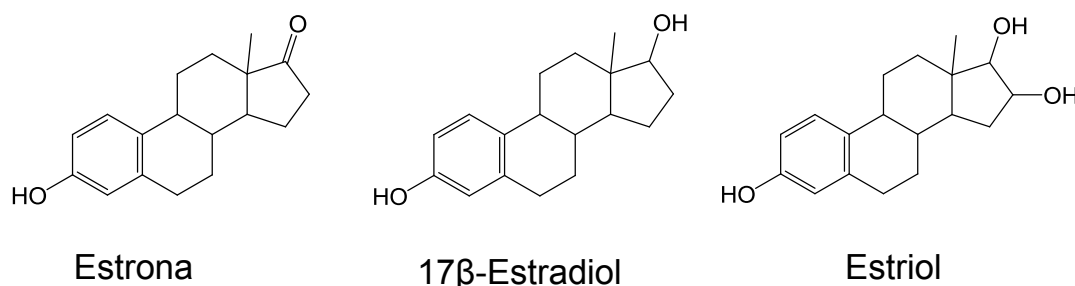


Figura 4. Representación gráfica de las tres estructuras moleculares que componen los estrógenos.

En este sentido, la simple observación nos hace percatarnos que en diferentes especies de mamíferos el fenotipo femenino y el masculino divergen significativamente, no solo en

caracteres sexuales si no en los rasgos más íntimamente asociados con el balance energético y con el metabolismo. Sin ir más lejos, por ejemplo, la distribución de grasa corporal en hombres (principalmente acumulada en el abdomen y anatómicamente visceral) y en mujeres (distribuida en caderas y senos y anatómicamente subcutánea), es claramente diferente y es debido a los estrógenos, mucho más abundantes en las féminas. En las mujeres, es también conocido como tras la menopausia se produce un aumento de peso que se corresponde con la etapa donde los niveles de estrógenos descienden significativamente. De hecho, en la presente tesis se empleará un modelo animal, las ratas ovariectomizadas (OVX), que recapitula este estado de menopausia y que nos será muy útil a la hora de evaluar las acciones de los estrógenos.

1.3.1. Receptores estrogénicos

Los estrógenos son hormonas esteroideas y su estructura molecular posee los cuatro anillos fusionados característicos de los esteroides. Bioquímicamente se originan a partir del colesterol que tras varias transformaciones da lugar a androstendiona y a testosterona. Es a partir de estos andrógenos cuando tras su aromatización se obtienen los tres estrógenos descritos anteriormente (E1, E2, E3). Su naturaleza esteroidea por tanto los hace moléculas altamente liposolubles que atravesarán las membranas celulares con facilidad para actuar sobre los receptores de estrógenos localizados en el interior de las células (Mauvais-Jarvis, 2011).

Existen dos tipos de receptores de estrógenos: el ER α y el ER β . Tanto el ER α como el ER β , se expresan bajo diferentes isoformas. En el caso del ER α , se han descrito 3 isoformas (ER α 1-3) y en el caso del ER β se han descrito hasta 5 isoformas (Matthews and Gustafsson, 2003). Ambos receptores presentan dos mecanismos de señalización, el clásico o genómico y el no clásico o extranuclear (Figura 5). En el clásico los receptores son proteínas nucleares diméricas que actúan como factores de transcripción uniéndose al DNA en las secuencias denominadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs)

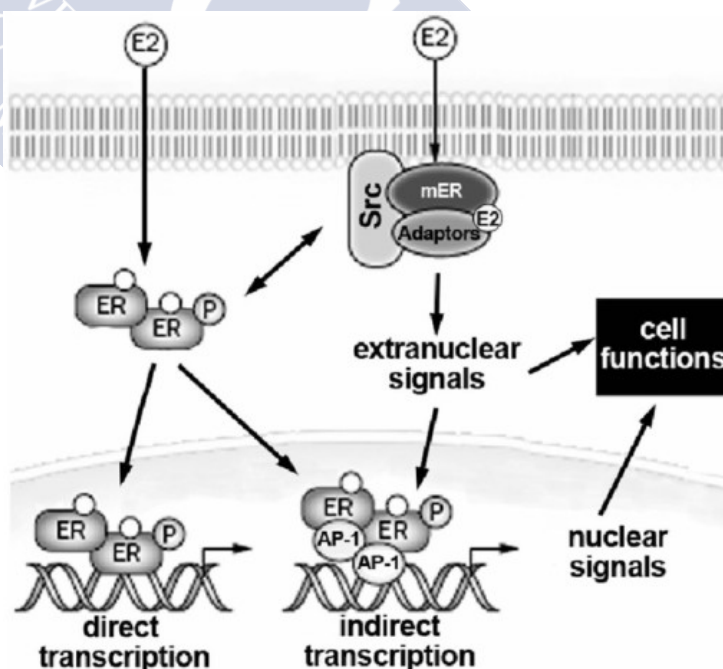


Figura 5. Representación gráfica de los dos mecanismos de acción asociados (Fiocchetti et al., 2012). Licencia Creative Commons.

para activar así la transcripción de los genes diana (Marino et al., 2006). En este proceso de unión a promotores, que ocurre en cuestión de horas, es frecuente la participación de cofactores como AP1 o Sp1 que facilitan la interacción con otros factores de transcripción como Fos/Jun y este a su vez conectan el receptor al DNA (Nilsson et al., 2001). Existe además de esta activación clásica, una activación de los receptores de estrógenos no clásica, extranuclear que ocurre de manera más rápida (en minutos o segundos) (Flint et al., 2002; Cvorovic et al., 2006). En esta, los receptores actúan como receptores extranucleares, como formas asociadas a membrana o como receptores de estrógenos acoplados a proteína G (GPER) que inducen la activación de canales iónicos y kinasas (Levin, 2009; Fiocchetti et al., 2012).

1.3.2. Estrógenos y balance energético

Los estudios iniciales que investigaron el papel de los estrógenos observaron que la disminución de los niveles de E2 tras la OVX se correlaciona con hiperfagia, reducción del gasto energético en forma de actividad física y en consecuencia incremento de peso y de la adiposidad en los animales (Wade, 1972; Wade and Gray, 1979). La administración exógena de E2 tiene la capacidad de restablecer los efectos de la OVX y se ha visto que tras cuatro días de tratamiento con E2 se consigue una restauración del ciclo estral de los animales y la ingesta de comida disminuye hasta alcanzar niveles normales (Gray and Greenwood, 1982; Asarian and Geary, 2006).

En los últimos años, los modelos genéticos han contribuido notablemente al conocimiento de la relación entre estrógenos y balance energético. Uno de los primeros publicados fue el ratón KO para la aromatasa. Como vimos anteriormente la aromatasa es una enzima esencial en la biosíntesis de los estrógenos catalizando el último paso que transforma la androstendiona y la testosterona en estrógenos. Las hembras y los machos de los ratones ArKO presentan un fenotipo obeso (Jones et al., 2000). Curiosamente la deficiencia en humanos da lugar a una patología de síntomas similares (Grumbach and Auchus, 1999). Metabólicamente estos animales presentaban una menor reducción de la glucosa y unos mayores niveles de colesterol. Sin embargo los ratones ArKO no presentan una mayor ingesta sino que los cambios en el balance energético parecen motivados por la reducción de la actividad física espontánea (Jones et al., 2000; Jones et al., 2001). Los ratones deficientes para el ER α , desarrollan un fenotipo similar al ArKO con obesidad, incremento de adiposidad, resistencia a insulina e intolerancia a glucosa tanto en machos como en hembras pero sin incrementos en la ingesta. La delección del ER α genera un descenso en el gasto energético de los animales que explica los anteriores efectos (Heine et al., 2000; Ohlsson et al., 2000). Sin embargo, la delección del ER β no induce obesidad ni alteraciones metabólicas en condiciones dietéticas estándar pero cuando se someten a una dieta alta en grasa (HFD) los animales desarrollan un peso corporal y una adiposidad mayor que sus *wild types* (Foryst-Ludwig et al., 2008).

A la vista de estos resultados se ha planteado que los receptores de estrógenos tienen papeles diferentes en el balance energético. En este sentido, se ha visto como el efecto anorexigénico de la administración de E2 en las hembras no se observa en los ratones ER α KO (Geary et al., 2001). Además, el metil-piperidino-pirazol (MPP), antagonista selectivo del ER α disminuye el efecto sobre la ingesta del E2 en ratas intactas (Santollo and Eckel, 2009). En el caso de los ratones ER β KO, se demostró que el efecto anorexigénico del tratamiento con E2 se mantiene (Geary et al., 2001). Estas evidencias proponen que el efecto de E2 sobre la ingesta está mediado por el ER α y no por el ER β , pero es necesario aclarar que existen estudios que demuestran un modelo diferente en el cual el silenciamiento del ER β a nivel central es capaz de anular el efecto anorexigénico de E2 (Liang et al., 2002). Esta controversia, podría deberse a la diferente localización de los ER en el hipotálamo, donde ER α tiene una expresión más acentuada en el VMH, mientras que ER β se expresa en el núcleo paraventricular (PVH) (Shughrue et al., 1997b; Barros and Gustafsson, 2011).

El papel de los ER en la homeostasis energética también se ha abordado con el uso de moduladores selectivos de los receptores de estrogénicos (SERMs). El tratamiento con propilpirazotriol (PPT), agonista selectivo del ER α , produce una disminución en la ingesta y en el peso corporal de ratas OVX (Stauffer et al., 2000). Mientras que la administración de diarilpropionitrilo (DPN), agonista selectivo de ER β , no produjo cambios ni en la ingesta ni en el peso de los animales (Meyers et al., 2001). Se ha visto también que el potente efecto anorexigénico del tamoxifeno, también modulador selectivos de los receptores de estrógenos, está asociado con la regulación del metabolismo de ácidos grasos en el hipotálamo (Lopez et al., 2006). Cuando se activa la señalización por GPER, mediante el uso del agonista STX, se observa un descenso de la temperatura en los animales OVX sugiriendo que esta vía puede tener un papel en la función termogénica de los animales (Qiu et al., 2006).

1.3.2.1. Efectos metabólicos periféricos de los estrógenos

La acción de los estrógenos sobre la homeostasis energética se ejerce en múltiples tejidos sin que se puedan clasificar de forma precisa en base a la localización anatómica de los tejidos diana. A nivel práctico los estrógenos pueden actuar de forma directa en diversos tejidos e indirectamente regulando la expresión de distintas señales de tipo endocrino, paracrino o neurocrino que a su vez pueden influenciar esos tejidos. Sin ánimo de ser exhaustivos, revisaremos algunos de sus efectos biológicos más relevantes que nos permitan comprender los fenómenos homeostáticos por ellos regulados. Aunque nos focalizaremos en este apartado en su repercusión a nivel periférico, veremos posteriormente que en algunos casos el fenómeno homeostático es una combinación de efectos centrales y periféricos en los que es harto difícil el diseccionar con precisión la contribución de cada uno de ellos.

1.3.2.1.1. Regulación de leptina y ghrelin por estrógenos

Los datos plasmáticos de mujeres sanas plantean que la administración de estrógenos externos produce un aumento de la leptina circulante (Lin et al., 2005), siendo el tejido adiposo el tejido responsable. En este sentido se ha visto como el E2 estimula la secreción de leptina en adipocitos (Casabiell et al., 1998). Sin embargo cuando la administración de E2 se realiza de manera crónica, no se consiguen detectar cambios ni en la expresión ni en la secreción de leptina (Rocha et al., 2001; Tritos et al., 2004). Es más, datos recientes señalan que la administración crónica (10 semanas de tratamiento) de E2 en ratas OVX disminuye los niveles séricos de leptina, efecto que se observa también con la administración de agonistas α pero no β (Weigt et al., 2012). La acción de ghrelin, está sometida también a la acción de los estrógenos y se sabe que su capacidad orexigénica varía entre hombres y mujeres (Clegg et al., 2007). Diferencia, debida a que los estrógenos inhiben la producción de ghrelin en el tejido gástrico (Ferrer-Lorente et al., 2007). El tratamiento de ratas OVX con E2, disminuye la respuesta orexigénica de ghrelin (Clegg et al., 2007). Además, durante el ciclo estral en ratas la inducción de la ingesta por ghrelin varía entre las diferentes fases de manera tal que cuando los niveles de E2 están elevados el efecto de ghrelin se ve claramente reducido (Clegg et al., 2007). A pesar de estas evidencias, algunos estudios plantean que la interferencia entre E2 y ghrelin no existe planteando que tanto machos como hembras responden igual a ghrelin y actúan a través del mismo mecanismo molecular (Lage et al., 2010). Estudios en mujeres han aportado evidencias de que durante el ciclo menstrual los niveles de ghrelin no varían y que en mujeres menopaúsicas tampoco se observan cambios significativos de sus niveles circulantes (Dafopoulos et al., 2010). Es más, un estudio en concreto ha propuesto la asociación contraria donde la terapia de reemplazo hormonal en mujeres post-menopaúsicas se asocia a unos mayores niveles de ghrelin (Kellokoski et al., 2005).

1.3.2.1.2. Estrógenos y adiposidad

Uno de los efectos más relevante de los estrógenos es que ejercen un efecto muy marcado en como el tejido adiposo se distribuye anatómicamente. Las hembras, como responsables de la gestación y lactancia, han adaptado sus reservas energéticas durante la evolución de manera que estas no sean tan susceptibles de ser movilizadas en períodos de escasez y estén disponibles para la descendencia. Los depósitos grasos se localizaron en la zona subcutánea con una capacidad lipolítica menor que la zona visceral. Los machos en cambio, responsables de actividades más físicas como la protección ante predadores y la caza, tienen menos grasa corporal y desplazaron sus reservas a la zona visceral que permite una rápida disposición de la energía hacia la función muscular (Mauvais-Jarvis, 2011). Hoy en día la excesiva acumulación de tejido adiposo a nivel visceral o central se correlaciona con un incremento en el riesgo y la mortalidad, por diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipertensión y aterosclerosis. En el contexto estrogénico se ha demostrado que la grasa visceral se asocia de manera inversa con los niveles de estrógenos (Brown et al., 2010; Mauvais-Jarvis et al., 2013). La disminución de los niveles de estrógenos tras la menopausia acarrea un incremento de la grasa

visceral, es decir la distribución cambia hacia un fenotipo más masculino (Lovejoy et al., 2008). Sin embargo, la terapia de reemplazamiento hormonal con estrógenos previene esta acumulación intraabdominal (Haarbo et al., 1991). Curiosamente existe un caso en humanos de tratamiento con estrógenos en varones, el tratamiento hormonal en el cambio de sexo, y en estos se ha visto como la acción de los estrógenos incrementa los depósitos subcutáneos en relación con los viscerales (Elbers et al., 1999). En las ratas OVX, se produce un incremento en la adiposidad, específicamente en la grasa visceral mientras que en la grasa subcutánea no hay cambios (Clegg et al., 2006). La administración de E2 en estos animales es capaz de modificar la distribución de la grasa corporal dando lugar a un fenotipo que replica el de las ratas con la función estrogénica intacta (Clegg et al., 2006).

En cuanto a la relevancia que los receptores de estrógenos pueden tener en los patrones de distribución de la adiposidad, diferentes estudios proponen que tanto el ER α como el ER β juegan un importante papel. El receptor ER α se expresa en el tejido adiposo de manera abundante y su delección global induce un incremento de la adiposidad en los ratones cercano al doble en los depósitos viscerales (Heine et al., 2000). Sin embargo, los depósitos inguinales (subcutáneos) de los ratones ER α KO también están incrementados, lo cual indica que la ablación de ER α no afecta de manera selectiva a los depósitos intraabdominales (Heine et al., 2000). Park y colaboradores, han propuesto además que la vía no clásica del ER α es importante para que el E2 realice las funciones sobre el balance energético. En su estudio usaron ratones *knock in* que expresan un ER α mutante incapaz de unirse al DNA. En estos animales la vía no canónica de ER α es capaz de restaurar las alteraciones metabólicas presentes en el ER α KO a través de la normalización del gasto energético (Park et al., 2011). En el ratón ER β KO, que recordamos no desarrolla obesidad en condiciones de dieta estándar, la adiposidad tampoco se veía afectada pudiendo concluir que es el ER α y no el ER β el relevante en la distribución adiposa (Ogawa et al., 1999). Datos recientes del grupo de Clegg también proponen que es el ER α expresado en el tejido adiposo el que regula la distribución corporal de la grasa así como también la inflamación del tejido adiposo y la fibrosis (Davis et al., 2013). Datos en humanos soportan esta conclusión ya que en un estudio con mujeres premenopáusicas que presentaban un polimorfismo en ER α tenían un incremento en la adiposidad y una mayor relación cintura-cadera (índice de adiposidad intra-abdominal). Además se veía que en las mujeres postmenopáusicas el polimorfismo no afectaba de manera relevante los caracteres físicos (Yamada et al., 2002; Okura et al., 2003a; Okura et al., 2003b).

1.3.2.1.3. Estrógenos y actividad del BAT

Además de los efectos sobre el WAT, los estrógenos tienen una influencia directa sobre la actividad del BAT que va a repercutir en la homeostasis energética global del organismo. En este sentido, el primer estudio que sugirió esta posible relación mostraba la existencia de una unión molecular entre el E2 y el BAT (Wade and Gray, 1978). Poco después se demostró que el BAT está implicado en el incremento de gasto energético que provoca el E2 y se demostró como E2 incrementa la lipólisis y la termogénesis del BAT (Edens and Wade, 1983;

Bartness and Wade, 1984; Schneider et al., 1986; Richard, 1986; Kamei et al., 2005). Estos efectos también se asocian con un incremento de la actividad simpática que inerva el BAT (Yoshida et al., 1987) y aunque E2 actúa sobre los adipocitos marrones, fundamentalmente será el control nervioso a través de la acción central de E2 el que module la actividad del BAT.

Aun así, se ha descrito como el efecto de E2 sobre BAT se asocia a cambios en los receptores adrenérgicos y sobre la biogénesis mitocondrial más que actuando sobre la expresión de UCP1 (Figura 6) (Rodríguez et al., 2002; Monjo et al., 2003; Rodríguez-Cuenca et al., 2007). En los modelos KO, el ratón ER α KO a pesar de tener un aumento en la adiposidad no presentó cambios en el BAT (Heine et al., 2000; Cooke et al., 2001). Por el contrario, el ArKO tiene un BAT de mayor tamaño que es revertido tras el tratamiento con E2 (Hewitt et al., 2004). Los animales con una delección del GPER, presentan una reducción en el gasto energético, incrementos en el contenido de lípidos del BAT y una disminución de UCP1 y del receptor adrenérgico β 3 (β 3-AR) (Davis et al., 2014). En humanos, el rol de los estrógenos en el BAT no ha sido estudiado en profundidad pero se sabe que tanto el ER α como el ER β se expresan en el BAT fetal, con mayor abundancia del ER α (Velickovic et al., 2014).

1.3.2.2. Efectos metabólicos centrales de los estrógenos

Los receptores de estrógenos se expresan de manera importante en el CNS, indicando que los estrógenos tienen como diana estas células. Tanto el ER α como el ER β presentan un patrón de expresión similar en las distintas regiones del CNS, aunque en determinadas áreas o zonas cerebrales la presencia de uno sobre otro predomina. Por ejemplo, en el VMH o en el órgano subfornical solo se ha detectado la presencia de ER α y en el ARC, hipotálamo lateral (LHA) y tronco cerebral su expresión prevalece sobre la del ER β . En el bulbo olfatorio, el núcleo supraóptico, el PVH, el núcleo supraquiasmático, el VTA y el cerebelo sólo se expresa el ER β . En el hipocampo aunque se detectan ambos, es el ER β el receptor mayoritario (Shughrue et al., 1996; Shughrue et al., 1997b; Shughrue et al., 1997a; Shughrue et al., 1998; Perez et al., 2003; Gonzales et al., 2008; Weiser et al., 2008).

1.3.2.3.1. Estrógenos y regulación central de la ingesta

Los estudios de lesión iniciales propusieron al VMH y al ARC como los núcleos responsables de las acciones de los estrógenos sobre la homeostasis energética. En estas investigaciones se observó como las lesiones localizadas en el VMH y en el ARC disminuían el incremento de peso corporal y la hiperfagia inducida tras la OVX. Además, cuando a estas ratas se las trató con estrógenos su respuesta era menos marcada (Beatty et al., 1975). Tras estos estudios clásicos, el ARC ha sido objeto de más investigaciones y por ejemplo el grupo de Horvath demostró como el E2 induce un incremento de la sinapsis escitatorias y del tono

de POMC. Esto se asocia además con un descenso en la ingesta y en el peso corporal de los animales. Interesantemente, los autores sugieren que este efecto está mediado por ER α y por el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Gao et al., 2007). En estudios independientes se ha descrito como ratones con ablación del ER α en las neuronas POMC desarrollan hiperfagia sin alteración ni del gasto energético ni de la distribución de la grasa corporal (Xu et al., 2011). Este incremento en la ingesta además parece tener asociación con una falta de respuesta a leptina e insulina ya que los ratones ER α KO globales tienen una expresión reducida de POMC a pesar de su hiperleptinemia y de su hiperinsulinemia (Hirosawa et al., 2008). Los GPER localizados en neuronas POMC del ARC se han visto involucrados en el efecto anorexigénico de E2 y también en la modulación de la temperatura de los animales (Qiu et al., 2006). Por otra parte, se ha planteado que la acción anorexigénica de los estrógenos podría tener lugar también a través de los neuropéptidos AgRP/NPY. Tras la OVX se produce un aumento de la expresión de NPY en el ARC que el tratamiento con E2 consigue revertir (Baskin et al., 1995; Ainslie et al., 2001; Martínez de Morentin et al., 2014). Estos hallazgos fueron refrendados *in vitro*, donde el tratamiento con E2 inducía un descenso en la expresión de AgRP/NPY que además se veía coordinado por la relación ER α /ER β en las neuronas hipotalámicas (Titolo et al., 2006; Dhillon and Belsham, 2011). Sin embargo otros autores han propuesto que la acción de E2 sobre AgRP/NPY, podría tener lugar a través de las neuronas Kiss1 (Olofsson et al., 2009).

En relación con el LHA se ha visto que el E2 inhibe la expresión de la hormona concentradora de melanina (MCH) en ratas macho, en ratas hembra y en ratones alimentados con HFD (Morton et al., 2004). Efecto que tiene un reflejo análogo en el dimorfismo sexual del efecto orexigénico de MCH. Además, se ha demostrado que la acción de MCH es más acentuada en diestro (niveles bajos de E2) que en estro (altos niveles de E2) lo cual se relaciona con las variaciones de la ingesta a lo largo del ciclo ovárico de las ratas (Brown and Clegg, 2010).

El NTS es un núcleo del tronco encefálico muy implicado en el control de la saciedad (ver sección 1.2.4). Se ha propuesto que la activación del ER α en las neuronas de este núcleo es suficiente para inhibir la ingesta de ratas OVX (Thammacharoen et al., 2008). Se ha visto también que el estradiol a través de los ER α localizados en NTS caudal incrementa el efecto saciante de CCK (Asarian and Geary, 2007).

En resumen, diversas áreas del CNS se han identificado como relevantes en la acción de los estrógenos sobre la ingesta pero los mecanismos de señalización no han sido demostrados con rotundidad. Sin embargo, a modo de síntesis podemos describir un modelo en el cual los estrógenos actúan en el ARC a través de la activación del ER α . La activación de estas neuronas provocará la expresión/inhibición de neuropéptidos anorexigénicos/orexigénicos que en último término evocarán la respuesta inhibitoria sobre la ingesta.

Aunque en los anteriores puntos se ha abordado el estado actual del conocimiento en cuanto a los efectos directos de los estrógenos sobre la ingesta. Existen evidencias de que los

estrógenos actúan además de manera indirecta sobre la acción de otras señales moduladoras de la ingesta. De esta manera por ejemplo se ha descrito que el E2 potencia el efecto saciante de CCK (Huang et al., 1993; Eckel and Geary, 1999) y del glucagón (Geary and Asarian, 2001). En cuanto a la interacción entre estrógenos y leptina, se confirmó al demostrarse la influencia de los estrógenos en la expresión del LEPR de manera que los niveles de este receptor se incrementan con el E2 (Diano et al., 1998; Bennett et al., 1999; Meli et al., 2004). Además, las hembras son más sensibles a leptina (Brown et al., 2010). Los estrógenos condicionan también la acción y la producción de ghrelin. Se ha visto por ejemplo que las ratas OVX poseen unos niveles de ghrelin más elevados que sus controles Sham y que la presencia de E2 en las ratas OVX o asociado a las oscilaciones hormonales del ciclo ovárico disminuye el efecto de ghrelin sobre la ingesta (Al-Massadi et al., 2010). Esta influencia sobre el efecto de ghrelin por parte de E2 se demostró también en las ratas macho (Clegg et al., 2007; Lage et al., 2010).

1.3.2.3.2. Estrógenos y regulación del gasto energético

Como adelantamos anteriormente los estrógenos producen un incremento marcado en el gasto energético que afecta a la masa corporal, efecto que se debe fundamentalmente a la activación de la termogénesis en el BAT. Además en consonancia con lo explicado en apartados anteriores, los estrógenos modulan la actividad del BAT actuando en áreas específicas del CNS, más concretamente en el VMH (Contreras et al., 2014a; Lopez and Tena-Sempere, 2015).

La acción de los estrógenos en el VMH se describió por primera vez mediante estudios electrofisiológicos en los que se vio que el E2 afectaba la excitabilidad neuronal del VMH a través de un mecanismo dependiente de AMP cíclico (AMPc) (Minami et al., 1990). Tras este estudio inicial no fue hasta los trabajos decisivos de Clegg y colaboradores cuando se demostró que el silenciamiento del ER α en el VMH tiene un efecto sobre el gasto energético de los animales (Musatov et al., 2007). Para ello se administraron adenovirus adenoasociados codificantes para RNA interferente contra el ER α específicamente en las neuronas del VMH. Los ratones y ratas *knock down* desarrollaron hiperglucemia y una obesidad que los autores atribuyeron al descenso en el gasto energético. En este sentido se observó que el silenciamiento del ER α en el VMH desencadenaba un descenso en los tres factores que componen el gasto energético, la actividad voluntaria, la tasa metabólica basal y la termogénesis inducida por dieta (Musatov et al., 2007). Curiosamente, en relación con la actividad voluntaria se ha publicado muy recientemente que una subpoblación de neuronas que expresan ER α localizadas en la región ventrolateral del VMH son las responsables de modular la actividad locomotora de las hembras (Correa et al., 2015). Evidencias que explicarían con mayor precisión los resultados obtenidos por silenciamiento génico. Los datos aportados por el modelo ER α KO en neuronas SF1 han sido claves también para establecer la asociación entre E2 y la termogénesis del BAT. Las hembras ER α SF1 KO desarrollan un incremento en el peso corporal y en la adiposidad visceral independiente de la ingesta, es

decir, que está causado por cambios en el gasto energético. Cuando los animales se someten a HFD el anterior fenotipo se ve agravado. Los resultados demostraron que el fenotipo obeso de las hembras ER α SF1 KO se asocia con hipometabolismo y una reducción de la termogénesis del BAT que produce una reducción en la producción de calor (Xu et al., 2011). La conexión entre ambos eventos es el SNS ya que estos ratones tienen un tono simpático hacia el BAT disminuido con la consecuente disminución en los marcadores termogénicos como UCP1, receptor activado por el proliferador del peroxisoma activado gamma (PPAR γ), coactivador tipo 1 alfa del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 α) y β 3-AR. En este mismo trabajo los autores generaron un doble KO en neuronas SF1 y POMC, provocando un fenotipo con hipometabolismo, hiperfagia y en consecuencia obesidad (Xu et al., 2011). Los efectos termogénicos centrales de E2 se mantienen en condiciones de HFD (Yonezawa et al., 2012).

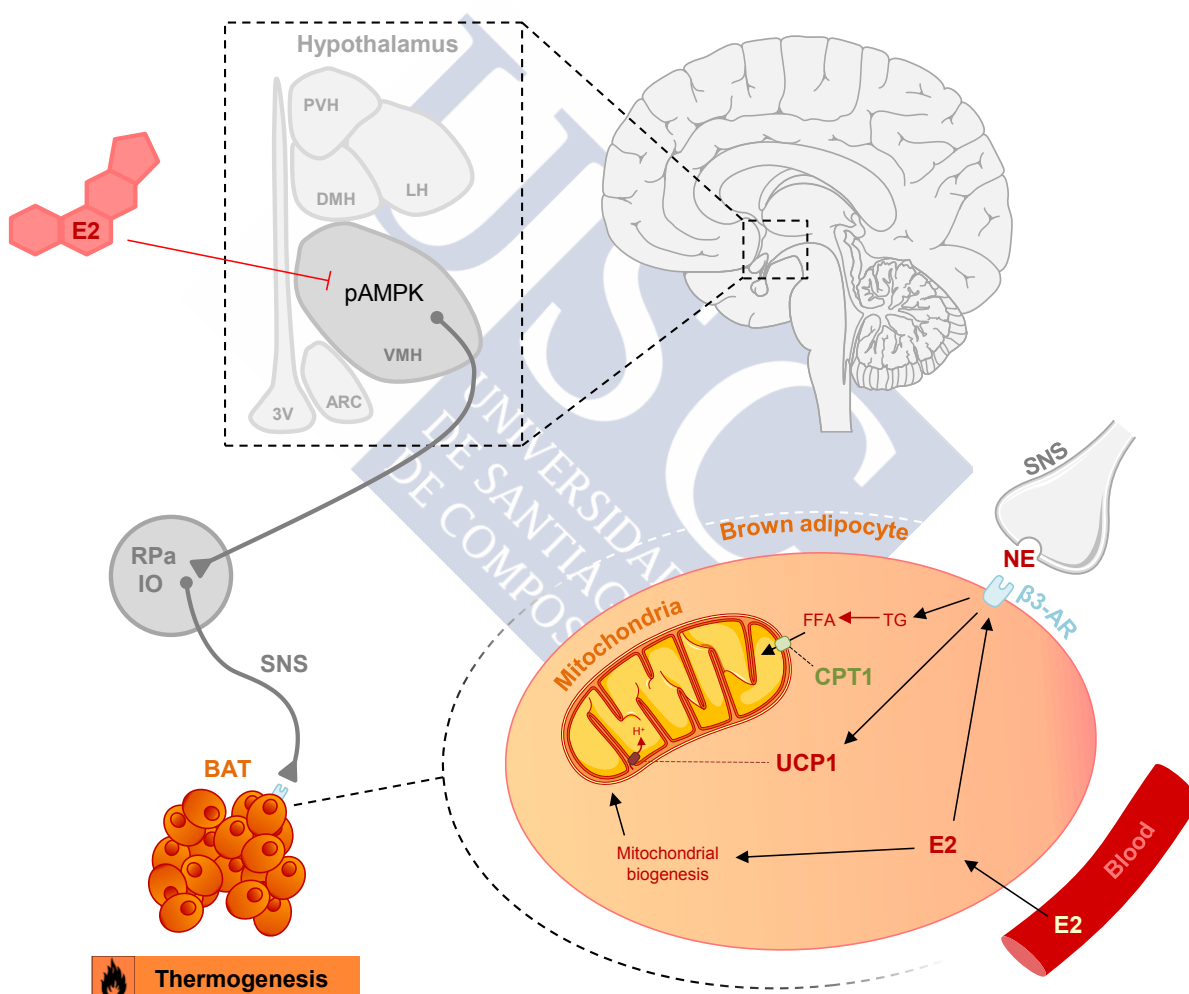


Figura 6. Esquema de los mecanismos a través de los cuales los estrógenos inducen la termogénesis del BAT (Gonzalez-Garcia et al., 2017b). Con permiso de Springer Nature.

En los últimos años, estudios de nuestro grupo han contribuido a esclarecer los mecanismos moleculares a través de los cuales la acción de los estrógenos en el VMH desencadena la respuesta termogénica (Figura 6) (Martinez de Morentin et al., 2014). La

administración de E2 específicamente en VMH induce una respuesta catabólica, caracterizada por un incremento en la actividad neuronal en el núcleo del rafe pálido (RPa) y en la oliva inferior (IO) (regiones clave en la activación simpática) y un incremento en el gasto energético que produce una pérdida de peso en las ratas. Molecularmente, E2 induce la inhibición de AMPK en el VMH para desencadenar las anteriores respuestas ya que la activación genética de la kinasa es suficiente para revertir el efecto termogénico de E2 (Martinez de Morentin et al., 2014). El eje AMPK(VMH)-SNS-BAT a través del cual actúa E2, es compartido por otras hormonas y fármacos como hormonas tiroideas, BMP8b, nicotina y liraglutide (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2012; Beiroa et al., 2014). No obstante, existe una situación fisiológica en la que el mecanismo anterior no está activado, durante la gestación. En ratas preñadas se ha visto como a pesar de tener unos niveles elevados de E2 y de la subsecuente reducción en la actividad de la AMPK hipotalámica, las ratas tienen una temperatura corporal y una termogénesis del BAT claramente disminuida. Además, la respuesta anorexigénica del E2 está ausente (Martinez de Morentin et al., 2015). Estos datos sugieren que la gestación induce un estado de resistencia a las señales tanto anorexigénicas como termogénicas del E2, con motivo de preservar las reservas energéticas necesarias para afrontar los requerimientos metabólicos del desarrollo embrionario y fetal.

1.4. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y BALANCE ENERGÉTICO

Como se ha descrito anteriormente, las señales periféricas ejercen su acción actuando a través de un punto común, el CNS y más concretamente actuando a dos niveles: en el hipotálamo y en el tronco del encéfalo (Figura 7) (Schneeberger et al., 2014; Lopez et al., 2016). Es necesario mencionar que más allá del control homeostático esencial que ejercen estas dos áreas cerebrales, hay otras partes del CNS que pueden influir o condicionar dicho control. Así pues, los aspectos hedónicos asociados a la comida articulados en la corteza límbica o los psicológico-cognitivos imbricados en el córtex prefrontal van a modular la manera en que el animal percibe y responde ante la ingesta de alimentos (Ampliamente revisados en: (Epstein et al., 2007; Lutter and Nestler, 2009; Shin et al., 2009; Berthoud, 2012; Morton et al., 2014;

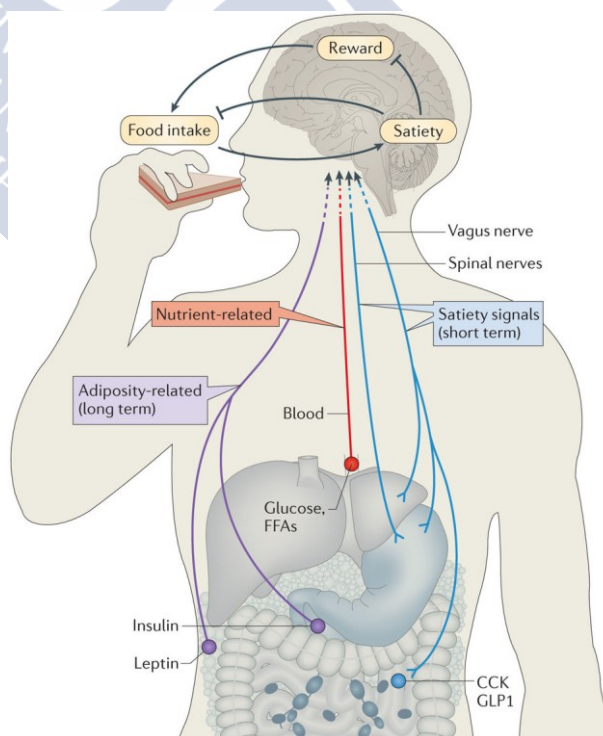


Figura 7. Integración central de la homeostasis energética (Morton et al., 2014). Con permiso de Springer Nature.

Ziauddeen et al., 2015)). Estos mecanismos, aunque largamente estudiados y de enorme importancia no se explicarán en esta introducción ya que nos centraremos en los sistemas fisiológicos homeostáticos que rigen el balance energético.

1.4.1. Regulación hipotalámica del balance energético

El hipotálamo es una estructura anatómico-funcional situada en el diencefalo, concretamente en la parte ventral del tálamo y está compuesto por diversos núcleos hipotalámicos. De estos, los más relevantes en el control del balance energético son: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el área lateral (LHA), el núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular (PVH) (Figura 8). Cada uno de estos núcleos está compuesto por poblaciones neuronales diferentes que dotarán a cada uno de ellos de una funcionalidad diferente. De esta manera, los núcleos hipotalámicos poseen funciones intrínsecas que van desde el control de la ingesta de alimentos, la función endocrina, reproducción, sueño, ingesta de agua, etc. (Kalsbeek et al., 2010; Lopez et al., 2013; Blevins and Ho, 2013; Lopez et al., 2016). Si bien, la interconexión entre las distintas poblaciones de neuronas de los núcleos hipotalámicos hace que la complejidad funcional del hipotálamo sea elevada y que debamos explicar algunos de los núcleos teniendo en cuenta sus proyecciones e interacciones con el resto de núcleos del hipotálamo.

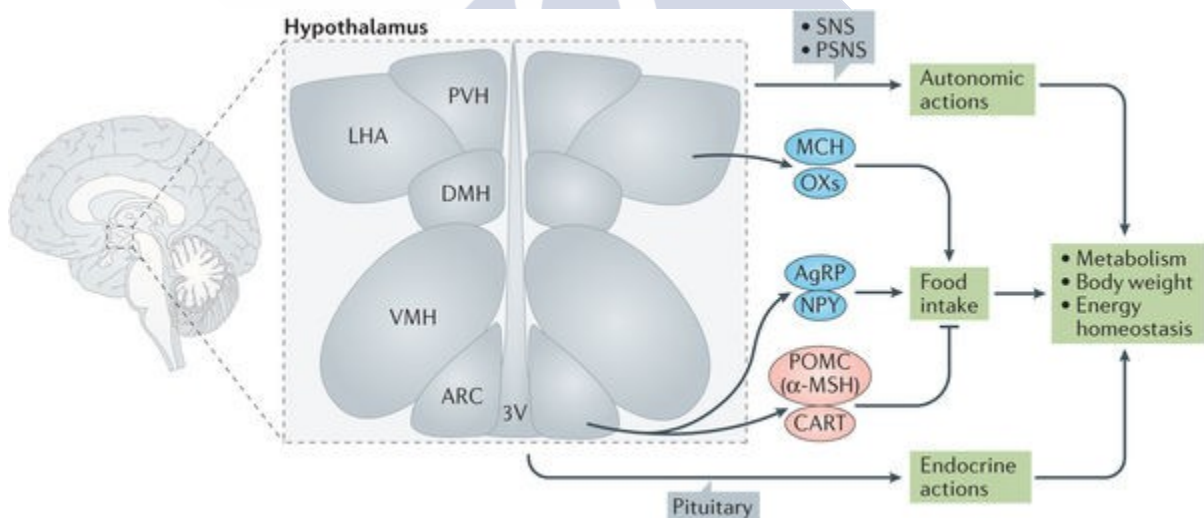


Figura 8. Localización de los distintos núcleos hipotalámicos implicados en la homeostasis energética y metabólica y los principales efectos a través de los cuales ejerce su acción (Lopez et al., 2016). Con permiso de Springer Nature.

1.4.1.1. Núcleo arcuato del hipotálamo

Situado a ambos lados del tercer ventrículo e inmediatamente dorsal a la eminencia media (ME) se define por dos poblaciones neuronales distintas: las que expresan NPY y AgRP y por otra parte las que expresan CART y la hormona estimulante del α -melanocito (α -

MSH) (Schneeberger et al., 2014). Los estudios clásicos de lesión propusieron al ARC como fundamental en el control de la ingesta ya que la ablación de este núcleo producía ratones hiperfágicos y obesos (Olney, 1969). La posición anatómica de este núcleo, adyacente a la ME lo hace un privilegiado a la hora de detectar y monitorizar las señales que viajan en el plasma sanguíneo (Broadwell and Brightman, 1976). El motivo es que la ME es un órgano circunventricular que posee una barrera hematoencefálica semipermeable o laxa y por tanto permite el acceso de la mayoría de señales anteriormente mencionadas a las neuronas del ARC (Schulz and Engelhardt, 2005).

Las neuronas AgRP y POMC integrarán por tanto todas estas señales periféricas para las cuales expresan receptores (leptina, ghrelin, insulina, etc.) así como también las señales que las neuronas vecinas emiten (neurotransmisores y neuropéptidos) (Schneeberger et al., 2014). La señal resultante de la señalización será conducida a través de las proyecciones neuronales a otros núcleos hipotalámicos (PVH, VMH, LHA y DMH) donde se encontrarán neuronas de segundo orden que expresan receptores de melanocortinas (Morton et al., 2006). Estas poblaciones recibirán la señal transmitiendo una respuesta nerviosa que desencadenará una inhibición o una activación de la ingesta.

Para ello otras áreas del tronco encefálico articulan todas estas señales neuronales iniciadas en las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART del ARC para desarrollar bien el acto de comer o bien para generar en el individuo la sensación de saciedad. A continuación se describirá más en profundidad como el sistema melanocortina (formado por las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART) desarrolla su función.

1.4.1.1.1. Neuronas AgRP/NPY

Las neuronas AgRP/NPY, expresan receptores para leptina e insulina y ambas hormonas tendrán como principal diana de acción estas células (Marks et al., 1990; Mercer et al., 1996). Estas interactuarán con sus respectivos receptores inhibiendo la actividad de dichas neuronas (Schwartz et al., 1992; Wang and Leibowitz, 1997). El receptor de ghrelin también se expresa en las neuronas AgRP/NPY, siendo a este nivel donde ejercerá su acción; pero contrariamente a leptina e insulina, ghrelin producirá una activación de esas neuronas cuando interactúa con su receptor (Figura 9) (Guan et al., 1997; Kamegai et al., 2001; Chen et al., 2004).

La activación selectiva de las neuronas AgRP/NPY mediante técnicas optogenéticas (Aponte et al., 2011) o mediante la tecnología de receptores diseñados exclusivamente para su activación mediante un fármaco de diseño (DREADD) (Krashes et al., 2011) induce de manera inmediata una ingesta voraz. A su vez, la inhibición de las neuronas AgRP/NPY es capaz de disminuir la ingesta de ratones en la fase oscura, su fase ingestiva (Krashes et al., 2011) y su ablación en fase adulta resulta en una aguda reducción de la ingesta (Gropp et al., 2005).

El neuropéptido AgRP, cuya expresión se restringe exclusivamente a las neuronas homónimas del ARC, actúa como antagonista de los receptores MC3R y MC4R (Ollmann et al., 1997). AgRP tiene actividad orexigénica demostrada en estudios donde se comprobó cómo su administración central estimula la ingesta de comida y disminuye el gasto energético generando un incremento del peso corporal (Small et al., 2003). En el mismo sentido, cuando se sobreexpresa AgRP genéticamente en ratones estos desarrollan obesidad (Graham et al., 1997). Si bien, la ablación genética de AgRP, ha ofrecido resultados inesperados, donde los ratones no mostraban alteraciones del balance energético (Palmiter et al., 1998; Qian et al., 2002; Corander et al., 2011); estudios posteriores que deleccionaron el gen en etapas adultas si encontraron un fenotipo anoréxico, sugiriendo que los efectos compensatorios en las etapas tempranas del desarrollo podrían explicar los anteriores resultados (Bewick et al., 2005; Luquet et al., 2005).

Por otra parte NPY, está presente de manera generalizada en todo el CNS aunque es en el ARC donde más intensamente se expresa (Gehlert et al., 1987). Esta expresión es dependiente del estado prandial de tal manera que en estados de saciedad se verá reducida y en estados de ayuno se verá incrementada (Beck et al., 1990; Kalra et al., 1991). NPY tiene cinco receptores sobre los que actúa (Y1, Y2, Y3, Y4 y Y5) pero las acciones sobre el balance energético estarán mediadas por el Y1 y el Y5 (Nguyen et al., 2012). NPY actúa a nivel central induciendo la ingesta y además disminuye la termogénesis del BAT contribuyendo a un descenso del gasto energético (Egawa et al., 1991; Vetter et al., 2010; Sohn et al., 2013).

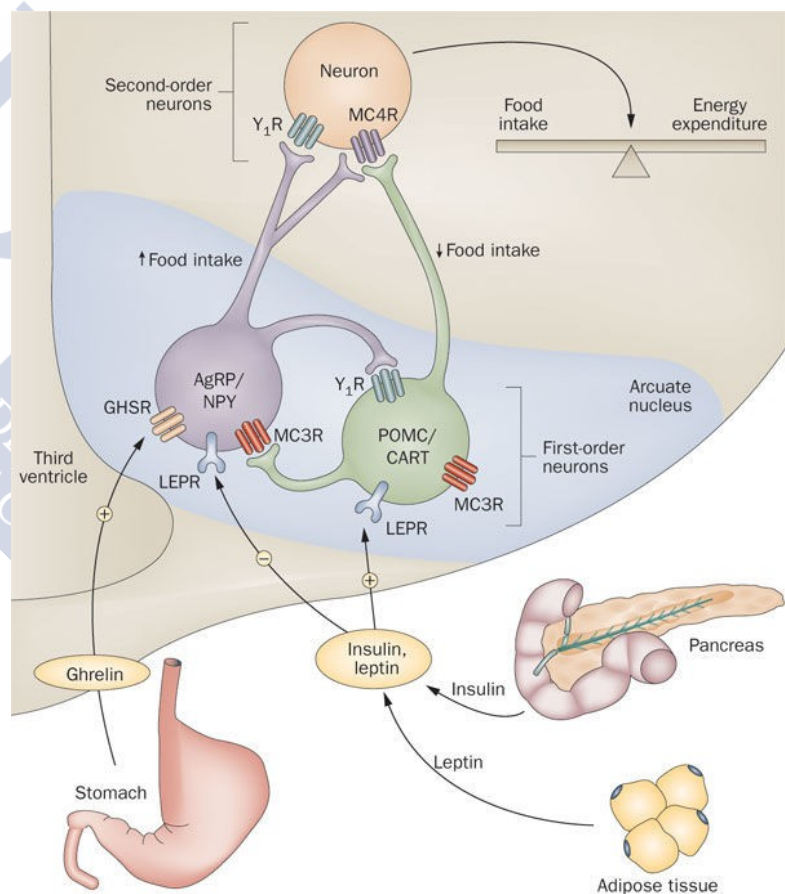


Figura 9. Mecanismo de acción de las principales hormonas implicadas en la homeostasis energética sobre las dos poblaciones neuronales del ARC (Vetter et al., 2010). Con permiso de Springer Nature.

1.4.1.1.2. Neuronas POMC/CART

Las neuronas POMC/CART, también expresan receptores para leptina e insulina cuya activación desencadena una respuesta anorexigénica (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998; Elias et al., 1999). Datos obtenidos con secuenciación de RNA de célula única han demostrado que dentro de las neuronas POMC es de destacar la existencia de heterogeneidad neuronal en cuanto a su grado de coexpresión con AgRP y del receptor de leptina (Lam et al., 2017). El hecho de que la heterogeneidad de estas neuronas, y en general de todas las del SNC, hace que los datos hasta ahora obtenidos simplemente reflejen los obtenidos en relación a la población más dominante.

Ghrelin actuará sobre las neuronas POMC/CART a dos niveles, de manera directa a través del incremento en el número de sinapsis inhibitorias GABAérgicas de las neuronas AgRP/NPY sobre las neuronas POMC/CART y de manera indirecta a través de la acción hiperpolarizante que AgRP y NPY tienen sobre las neuronas POMC/CART (Figura 9) (Nakazato et al., 2001).

Estudios electrofisiológicos han establecido de manera clara los efectos anorexigénicos de esta población del ARC (Aponte et al., 2011). En este mismo sentido la pérdida funcional de estas neuronas se correlaciona con fenotipos obesos tanto en humanos como en roedores (Krude et al., 1998; Yaswen et al., 1999; Challis et al., 2004; Lee et al., 2006; Zhan et al., 2013).

POMC, será procesado por las convertasas, dando lugar a varios péptidos con funciones fisiológicas diferentes (Mercer et al., 2013). En el contexto metabólico destacaremos la α -MSH que actuará tras su liberación sináptica en los receptores de melanocortinas (MCRs). De los cinco tipos de MCRs descritos, α -MSH se unirá a los receptores MC3-R y MC4-R para inducir un potente efecto anorexigénico (Mercer et al., 2013). La expresión de α -MSH se encuentra incrementada en momentos de saciedad mientras que en condiciones de ayuno disminuye (Schwartz et al., 1997).

Por otra parte CART, es un neuropéptido que se expresa de manera muy abundante en esta población neuronal colocalizando altamente con POMC, aunque su presencia está ampliamente distribuida en todo el cerebro (Elias et al., 1998). El tratamiento central con CART inhibe la ingesta y de igual modo que POMC su expresión oscila con el estado energético del animal incrementándose con las comidas y reduciéndose en su ausencia (Kristensen et al., 1998). Además se ha visto que CART es capaz de inducir la termogénesis del BAT (Kotz et al., 2000). Se ha observado que la delección genética de CART induce obesidad en animales alimentados con una dieta alta en grasa aunque en condiciones dietéticas normales los animales no presentaron alteraciones en el balance energético (Asnicar et al., 2001). En este sentido, algunos estudios han mostrado como la acción anorexigénica de CART debe ser matizada ya que bajo ciertas condiciones podría inducir el efecto contrario (Kong et al., 2003; Abbott et al., 2005). Recientemente se ha descrito como estas acciones antagónicas podrían tener una explicación morfológica, donde CART ejercerá acciones

catabólicas o anabólicas en función de si actúa en el ARC o en el LHA respectivamente (Lau et al., 2017).

1.4.1.2. Núcleo ventromedial del hipotálamo

Localizado justo por encima del ARC, el núcleo VMH fue descrito inicialmente como un centro de saciedad debido a que los primeros estudios de lesión desencadenaban en los animales estados de hiperfagia y obesidad (Hetherington and Ranson, 1940; Hetherington and Ranson, 1942; King, 2006). Hoy en día se sabe que el VMH, tiene una relevancia sobre el balance energético que va más allá de su implicación en la ingesta siendo de especial importancia su influencia sobre el gasto energético (Contreras et al., 2014a). Aparte de los aspectos metabólicos, el VMH está implicado en la regulación de otras funciones fisiológicas como la función sexual femenina. En particular, la respuesta de lordosis en animales es inhibida tras la lesión de las neuronas ventrolaterales del VMH (Emery and Moss, 1984; Leedy and Hart, 1985) y es activada tras la administración específica de estrógenos (Rubin and Barfield, 1983). El sistema cardiovascular puede ser regulado también por este núcleo hipotalámico, la estimulación de las neuronas del VMH modula la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Hirasawa et al., 1996). Su estimulación eléctrica induce analgesia en roedores mientras que su lesión causa hiperalgesia en ratas sugiriendo que también interviene en las vías del dolor (Rhodes and Liebeskind, 1978; Culhane and Carstens, 1988; Duysens et al., 1989).

En cuanto su identidad celular, el VMH se caracteriza por la expresión en una elevada proporción de sus neuronas del factor de transcripción esteroideogénico 1 (SF1) (Segal et al., 2005). Su presencia en el CNS es exclusiva del VMH aunque se puede detectar su expresión en otras zonas extrahipotalámicas como las glándulas suprarrenales y las gónadas (Luo et al., 1999). SF1 participa en el desarrollo del VMH y en su función neuroendocrina como regulador del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Figura 10) (Parker et al., 2002; Davis et al., 2004; McClellan et al., 2006; Choi et al., 2013). Los ratones *knock out* (KO) para SF1 presentan un fenotipo muy interesante. Estos animales carecen de glándulas adrenales lo cual hace que en ausencia de un trasplante los animales acaben falleciendo (Shinoda et al., 1995;

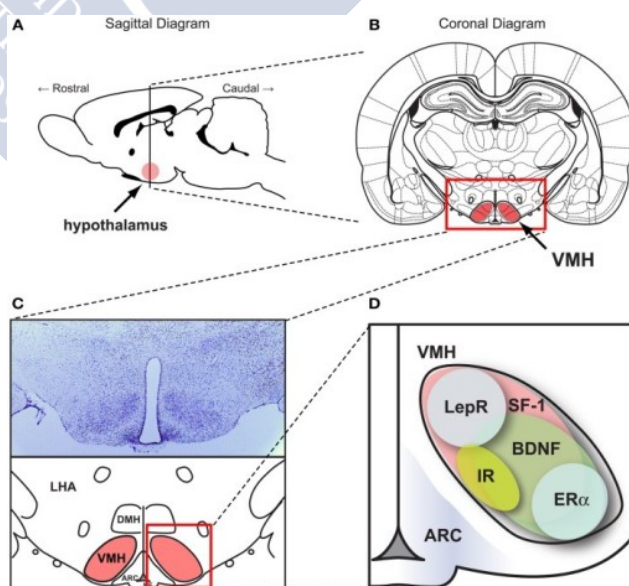


Figura 10. Características anatómo-histológicas del VMH (Choi et al., 2013). Licencia Creative Commons.

Luo et al., 1999). Más recientemente el grupo de Elmquist ha descrito como la ablación postnatal de SF1 de manera específica en el VMH, induce obesidad en los ratones a través de una alteración de la termogénesis y de la señalización de leptina en ese núcleo (Kim et al., 2011).

En el VMH, se expresa en elevados niveles una neurotrofina concreta, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Figura 10) (McClellan et al., 2006). Dicha expresión depende del estado energético y en un primer momento se describió que descendía en estados de ayuno (Rios et al., 2001). Posteriormente se comprobó como las señales asociadas a estados positivos de energía, glucosa y leptina, desencadenaban un aumento en su expresión (Komori et al., 2006). En su ausencia o en la de su receptor, los animales sometidos a una dieta alta en grasa presentan hiperfagia y obesidad (Lyons et al., 1999). Se sabe además que BDNF depende de la presencia de SF1 en tanto que regula su expresión y en tanto que los ratones KO para SF1 carecen de BDNF en las neuronas del VMH (Tran et al., 2003). En cuanto a su relevancia funcional, estudios han propuesto a BDNF como un efector de las neuronas POMC del ARC. En este sentido la inyección central o periférica de BDNF induce un descenso en la ingesta de comida y una pérdida de peso a través de los receptores MC4R (Pelleymounter et al., 1995; Xu et al., 2003).

Además, el VMH es un centro implicado en el control de la termogénesis. El VMH será capaz de actuar a través del SNS para activar la termogénesis del BAT, aumentando de esta manera la temperatura corporal de los animales (Contreras et al., 2014a). A través de este mecanismo donde se incrementa el gasto energético, el VMH se ha postulado como un regulador fundamental del balance energético. En este sentido se ha comprobado como multitud de señales hormonales y farmacológicas actúan a través del VMH para modular la termogénesis del BAT afectando de este modo al balance energético (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2014; Beiroa et al., 2014). La relevancia funcional del VMH en relación con el control de la temperatura será tratado en mayor profundidad en la sección 1.5 de esta introducción (Fisiología de la regulación térmica y BAT).

1.4.1.3. Área lateral del hipotálamo

El LHA se sitúa adyacente al VMH flanqueando la zona lateral opuesta al tercer ventrículo. En contraposición con el “centro de saciedad” referido al VMH, Anand y Brobeck postularon en 1951 al LHA como el “centro de la ingesta” (ANAND and BROBECK, 1951). En este estudio lesiones en el LHA de ratas y gatos desencadenaban estados de afagia y pérdida de peso. Con posterioridad se ha visto que esta región hipotalámica participa en la regulación de los ejes hipotálamo-hipofisarios, en la regulación de la sed, en la homeostasis de la glucosa, en la regulación de los ciclos sueño-vigilia y en los aspectos hedónicos asociados a la ingesta de comida (Sakurai et al., 1998; Sakurai, 2007; Lopez et al., 2010a; Gao

and Horvath, 2014; Sakurai, 2014; Ferno et al., 2015). A nivel neuronal el LHA está formado principalmente por dos poblaciones, las neuronas orexina y las neuronas MCH.

Las neuronas orexina, se denominan de esta forma por que producen el neuropéptido orexina, también llamado hipocretina, bajo dos isoformas distintas (la orexina A y la orexina B) (Sakurai et al., 1998). Su expresión en forma de prohormona se estimula en estados de ayuno y su administración central induce la ingesta actuando a través de sus receptores OX1R y OX2R (Alvarez-Crespo et al., 2013). Las neuronas orexina presentan proyecciones a distintas áreas hipotalámicas como son: LHA, ARC, VMH y PVH pero también a regiones como el NTS y otras áreas cerebrales implicadas en el control de la temperatura y del estado de consciencia (Peyron et al., 1998).

Las neuronas MCH, expresan la hormona-concentradora de melanina, y son exclusivas del LHA (Bittencourt et al., 1992). Altamente implicados en el control del metabolismo, los niveles de MCH se ven incrementados en estados de ayuno de igual modo que las orexinas (Qu et al., 1996). Su acción orexigénica se ha demostrado mediante tratamiento central con MCH y mediante la sobreexpresión genética de la misma (Qu et al., 1996; Ludwig et al., 2001). En cuanto a sus receptores, dos tipos (MCHR1 y MCHR2) han sido identificados en humanos (Tan et al., 2002). Cuando se interrumpe la señalización de MCH a través de la delección del *Mchr1* en ratones (el único tipo presente en roedores) estos desarrollan un fenotipo delgado (Marsh et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que MCH tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico tanto en el WAT como en el hígado a través de la modulación del tono simpático y vagal respectivamente (Imbernon et al., 2013).

1.4.1.4. Núcleo dorsomedial del hipotálamo

El DMH se localiza a ambos lados del tercer ventrículo (3V) inmediatamente dorsal al VMH. Los estudios de lesión en este núcleo mostraron su posible relación con el control de la ingesta ya que esta se veía inhibida cuando el área que comprende el DMH se lesionaba eléctricamente (Bernardis, 1970; Bernardis and Bellinger, 1987). Posteriormente se observó cómo distintas señales, tanto anorexigénicas (leptina) como orexigénicas (NPY) actúan en este núcleo produciendo una inhibición o una estimulación de la ingesta (Elmqvist et al., 1998a; Yang et al., 2009b; Bi et al., 2012).

Este núcleo recibe proyecciones neuronales de otros núcleos especialmente del ARC (Bai et al., 1985) y este a su vez envía proyecciones al PVH y al VMH (Thompson et al., 1996). Entre otros neuropéptidos en el DMH se expresa NPY, y esta se acentúa en modelos de obesidad (Guan et al., 1998; Bi et al., 2001). El DMH participa de manera muy relevante en la respuesta fisiológica al estrés exteroceptivo en ratas, en la modulación de los ritmos circadianos, en la regulación del apetito y en la termorregulación (Bellinger and Bernardis, 2002; Chou et al., 2003; Dimicco and Zaretsky, 2007; Simpson et al., 2009; Bi, 2013; Dodd et

al., 2014). En relación con este último punto se ha descrito recientemente como la ausencia de NPY en el DMH incrementa la termogénesis en los animales y en consecuencia el gasto energético (Chao et al., 2011). Más concretamente, se vio como se induce *browning* en el tejido adiposo blanco, un incremento en la actividad de los adipocitos marrones y un desarrollo de estos (Chao et al., 2011).

1.4.1.5. Núcleo paraventricular del hipotálamo

Es el núcleo más dorsal, localizándose a ambos lados del techo del tercer ventrículo y en una posición anterior respecto a los otros núcleos. El PVH es un núcleo integrativo que recibe proyecciones de poblaciones neuronales localizadas en el ARC así como también en regiones extrahipotalámicas como el NTS (Swanson and Sawchenko, 1980; Cowley et al., 1999). Funcionalmente cuando se lesiona el PVH, los animales se vuelven hiperfágicos y acaban desarrollando obesidad (Aravich and Sclafani, 1983; Tokunaga et al., 1986). En este sentido se ha visto que el PVH expresa altos niveles del MC3R y MC4R haciéndolo altamente sensible a la administración de neuropéptidos como NPY, AgRP y α -MSH (Stanley et al., 1986; Kim et al., 2000). Por otra parte se ha visto que la administración localizada en este núcleo de agonistas de melanocortinas induce un incremento en el gasto energético (Cowley et al., 1999).

Una de las poblaciones más importantes del PVH son las que expresan la hormona liberadora de tirotrina (TRH). La TRH, estimula la liberación de tirotrina u hormona estimulante de la tiroides (TSH) actuando en la hipófisis y esta a su vez actuará en la glándula tiroidea activando la liberación de las hormonas tiroideas (T4 y T3) (Hall, 2016). TRH afecta a la regulación del balance energético en primer lugar a través de la modulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo y en segundo lugar a través de su acción anorexigénica (Lopez et al., 2013). Las neuronas TRH, serán activadas por α -MSH e inhibidas por AgRP (Fekete et al., 2000; Fekete et al., 2002) y estas a su vez inhiben la actividad de las neuronas MCH del LHA a través de conexiones GABAérgicas (Zhang and van den Pol, 2012).

La otra población neuronal remarcable es la que expresa la hormona liberadora de corticotropina (CRH). CRH llega a través del sistema porta-hipofisario a las células corticotropas de la hipófisis estimulando la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH) que entrará en el torrente circulatorio y estimulará en la corteza suprarrenal la liberación de cortisol o corticoesterona dependiendo de la especie (Hall, 2016). La CRH además, tiene un efecto anorexigénico *per se* comprobado mediante su administración central (Krahn et al., 1988; Monnikes et al., 1992). Cuando existen defectos en la síntesis y liberación de CRH los animales desarrollan obesidad (Mastorakos and Zapanti, 2004).

1.5. FISIOLÓGIA DE LA REGULACIÓN TÉRMICA Y TEJIDO ADIPOSEO PARDO

Cuando hablamos anteriormente de los componentes del gasto energético enumeramos: el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis adaptativa. La termogénesis adaptativa forma parte de la respuesta fisiológica del organismo en la regulación de la temperatura corporal y dicha regulación tiene una especial relevancia en esta tesis doctoral, motivo por el cual se introducirá a continuación.

En los animales homeotermos la temperatura central del organismo, la que tienen los órganos profundos, se mantiene constante entre los 36.5°C y los 37°C salvo situaciones febriles, ejercicio extremo o condiciones climáticas muy adversas (Kenney and Munce, 2003; Hall, 2016). En una situación de termoneutralidad, la termogénesis obligatoria (el calor generado por la tasa metabólica) es suficiente para conservar la temperatura corporal sin necesidad de otros mecanismos termoregulatorios (Morrison, 2004; Cannon and Nedergaard, 2004). La temperatura ambiental más baja a la que esto ocurre se denomina la temperatura termoneutral. Los animales de pequeño tamaño como los roedores tienen una mayor temperatura termoneutral (30°C en ratones y 28°C en ratas) debido a que su mayor relación área/volumen los hace propensos a perder más calor (Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006). En los humanos esta temperatura se sitúa en los 23°C (Kingma et al., 2014).

Los mecanismos para el control de la temperatura corporal tendrán dos vertientes la primera, conductual y la segunda, autónoma. En esta tesis no se hará mayor hincapié en los aspectos conductuales por no ser objeto de su estudio. Los mecanismos autónomos, altamente conservados en la evolución se desencadenarán cuando los centros hipotalámicos de termorregulación detecten una temperatura fuera del rango fisiológico. Estos mecanismos, iniciados en el hipotálamo actuarán a través del sistema nervioso simpático y parasimpático, modificando fundamentalmente la pérdida y la generación de calor.

1.5.1. Mecanismos disipadores de calor

Cuando la temperatura del organismo excede el rango fisiológico se desencadenan tres mecanismos de disipación mediante los cuales se pierde calor. En primer lugar, la dilatación de los vasos sanguíneos cutáneos facilita la transferencia de calor desde la superficie corporal al exterior. Se ha descrito como la inhibición de los centros simpáticos del hipotálamo posterior desencadenan la vasodilatación cutánea. En segundo lugar, la sudoración genera un aumento de la tasa de evaporación. Este fenómeno físico endotérmico, obtendrá la energía del calor contenido en la superficie corporal produciendo su enfriamiento. La estimulación de las glándulas sudoríparas ocurrirá mediante la inhibición del SNS desde el hipotálamo. Por último, el organismo inhibe todo mecanismo generador de calor: la termogénesis bioquímica y la tiritona principalmente (Crowe and Moore, 1974; Kenney and Munce, 2003; Hall, 2016).

1.5.2. Mecanismos generadores de calor

Cuando el organismo se expone a una temperatura por debajo de la zona de termoneutralidad se activan los mecanismos termorreguladores para, por un lado, disminuir la pérdida de calor y por otra parte para generar calor. Así pues, se desencadenará una vasoconstricción de los plexos sanguíneos de la piel (Tattersall et al., 2012). De manera opuesta a la vasodilatación, el hipotálamo posterior desencadenará una respuesta simpática que ejercerá una contracción de la musculatura vascular y en consecuencia una reducción del flujo a esos vasos. Al reducirse el paso de sangre desde las zonas más profundas del organismo a las zonas más superficiales la pérdida de calor por transferencia se verá reducida. La piloerección, desencadenada conjuntamente por la estimulación simpática de los músculos erectores pilosos, atrapa una capa de aire que disminuye la transferencia de calor al exterior (Hall, 2016). Cuando estos mecanismos no son suficientes para mantener la temperatura corporal se estimulan la termogénesis facultativa o adaptativa. En primer lugar se estimula la tiritona, la reacción más primitiva y temprana para producir calor (Nakamura and Morrison, 2011). Los animales homeotermos han desarrollado mecanismos a largo plazo y más eficientes para la producción de calor (Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006; Lopez et al., 2013). Estos constituyen la termogénesis facultativa sin tiritona y permiten el consumo de reservas energéticas para la producción de calor. En los mamíferos, incluyendo humanos, el órgano responsable de esta termogénesis facultativa es el tejido adiposo pardo (Lowell and Spiegelman, 2000; Cannon and Nedergaard, 2004).

1.5.2.1. Termogénesis del tejido adiposo pardo y *browning* del tejido adiposo blanco

Como hemos visto anteriormente la termogénesis del BAT será la respuesta adaptativa más efectiva a la hora de defender el organismo de la exposición al frío. En pequeños mamíferos, como los roedores el BAT se localiza de manera muy evidente en la región interescapular, pero también la zona periaórtica, perirrenal e intercostal (Cannon and Nedergaard, 2004). En humanos durante años se pensó que estaba presente solo en la etapa neonatal y que después sufría un proceso de atrofia, siendo no detectable en la etapa adulta. Pero recientemente se ha demostrado la existencia de BAT metabólicamente activo en humanos adultos (Nedergaard et al., 2007; Cypess et al., 2009; Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Mediante tomografía de emisión de positrones se ha demostrado la existencia de áreas definidas en regiones cervical, supraclavicular, perirrenal, intercostal y periaórtica con un elevado marcaje por 18-fluorodeoxiglucosa que se corresponden a la presencia de adipocitos marrones (Nedergaard et al., 2007; Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Cypess et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). El BAT está compuesto por adipocitos marrones caracterizados por la presencia de gotas lipídicas multiloculares, una gran cantidad de mitocondrias, una elevada innervación por parte del SNS, que modula su funcionamiento por parte del CNS y una densa vascularización que facilita la disipación del calor producido (Contreras et al., 2014a).

Funcionalmente, las mitocondrias presentes en el BAT expresan de manera singular UCP1 (Nicholls and Locke, 1984; Golozoubova et al., 2001; Golozoubova et al., 2006). Situada en la membrana interna mitocondrial esta proteína permite el paso a su través de los protones que se encuentran en el espacio intermembrana (Nicholls and Locke, 1984). Cabe recordar que en la membrana interna mitocondrial se encuentra la cadena de transporte electrónico que genera el gradiente de protones necesario para la producción de adenosin trifosfato (ATP) a partir de adenosin difosfato (ADP). UCP1 permite el paso a su través y a favor de gradiente de los protones, desacoplando el transporte de electrones de la producción de ATP. En este proceso de pérdida de protones a favor de gradiente es un proceso exergónico, cuya energía es disipada en forma de calor (Figura 11) (Nicholls and Locke, 1984; Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006; Porter et al., 2015). La deficiencia de UCP1 en ratones genera una elevada sensibilidad al frío; sin embargo, estos animales no tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad ni tan siquiera en presencia de una dieta alta en grasa (Enerback et al., 1997; Nedergaard et al., 2001). Es necesario someter a los animales a termoneutralidad para que desarrollen un fenotipo obeso efecto que se magnifica en presencia de una dieta alta en grasa (Kontani et al., 2005; Feldmann et al., 2009). La explicación es que estos animales por debajo de la temperatura de termoneutralidad tienen un estrés térmico que potencia su metabolismo basal.

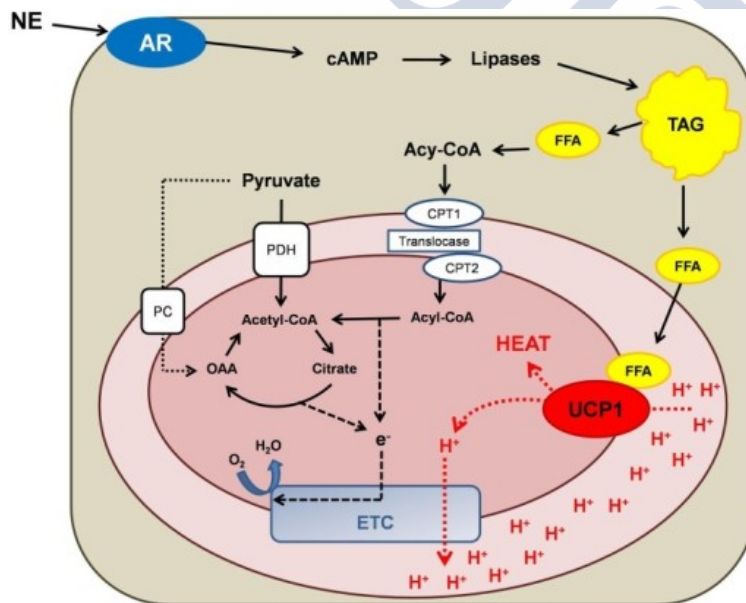


Figura 11. Mecanismo molecular de la función termogénica en el adipocito pardo (Porter et al., 2015). Licencia Creative Commons.

Se ha descrito como los nucleótidos di- y trifosfato inhiben la actividad de UCP1 uniéndose a su cara citosólica mientras que los ácidos grasos estimulan su actividad (Cannon and Nedergaard, 2004). El mecanismo por el cual los ácidos grasos activan UCP1 no está claro del todo y se han planteado varias hipótesis, en las que se proponen como cofactores del transporte de H^+ , como aniones que se traslocan a la matriz mitocondrial o como inductores de cambios conformacionales en la estructura proteica de UCP1

(Winkler and Klingenberg, 1994; Garlid et al., 1998; Fedorenko et al., 2012). Recientemente, se ha publicado que los ácidos grasos no parecen ser fundamentales para el funcionamiento de UCP1 ya que ratones sin lipólisis en el BAT mantienen su actividad termogénica (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017).

La actividad del BAT está regulada por el CNS que a través del SNS inerva densamente el BAT (Lafontan and Berlan, 1993; Robidoux et al., 2004; Cannon and Nedergaard, 2004). El control nervioso permite que la respuesta del BAT sea inmediata, facilitando la respuesta termogénica ante cambios repentinos en la temperatura exterior. Cuando los nervios simpáticos que inervan el BAT reciben la señal activadora se despolarizan y liberan la norepinefrina de sus terminales (Cannon and Nedergaard, 2004). La norepinefrina interacciona con los receptores β 3-adrenérgicos (β 3-AR) (receptores acoplados a proteínas G) de los adipocitos marrones activándolos (Bronnikov et al., 1999). Tras esto la proteína G estimula la adenilato ciclasa (AC), produciendo un incremento del AMPc que activa la proteína quinasa A (PKA) y estimula la termogénesis. Para ello la PKA estimula la lipólisis activando de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la lipasa monoacilglicerol (MGL), que hidrolizan los triglicéridos en ácidos grasos libres (FFAs) (Cannon and Nedergaard, 2004). La carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a) introduce en la mitocondria los FFAs que entrarán en la β -oxidación primero y posteriormente en el ciclo de Krebs como subproductos, dando lugar a la formación de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH), que serán oxidados en la cadena de transporte electrónico. Su oxidación en los complejos transportadores mitocondriales suministra la energía necesaria para transportar los protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico. Esta energía acumulada en forma de gradiente de protones es usado normalmente por la ATP sintetasa para formar ATP a partir de ADP y una molécula de fosfato (Futai et al., 1989; Boyer, 1997; von et al., 2009). Alternativamente, en los adipocitos marrones UCP1 libera la energía del gradiente permitiendo el paso de protones hacia la matriz mitocondrial, energía que es liberada en forma de calor (Nicholls and Locke, 1984; Cannon and Nedergaard, 2004; Silva, 2006). Por otra parte la activación crónica de la PKA induce la biogénesis mitocondrial, la hiperplasia e hipertrofia del BAT y el aumento de la expresión de UCP1 efectos que están mediados por la activación de las proteínas quinasa del mitógeno activado p38 (MAPK) (Cao et al., 2001; Cannon and Nedergaard, 2004).

Así pues, la termogénesis representa un mecanismo homeostático en la regulación de la temperatura corporal pero intrínsecamente a su gasto energético se ha planteado que su actividad puede tener un impacto significativo en el balance energético del organismo (Whittle et al., 2011). Además, metabólicamente el BAT contribuye al aclaramiento de triglicéridos y mejora la homeostasis de la glucosa debido a su capacidad de captar y catabolizar lípidos y carbohidratos presentes en la sangre (Bartelt et al., 2011; Contreras et al., 2014a). Ambas características, su contribución al gasto energético y su mejora del metabolismo, han hecho que el BAT se proponga como una estrategia terapéutica para combatir la obesidad y sus patologías asociadas (Whittle et al., 2011; Villarroya and Vidal-Puig, 2013; Kim and Plutzky, 2016). Si bien, el uso del BAT como tratamiento anti-obesidad en humanos requiere de un desarrollo cuidadoso y de hecho algunas evidencias plantean que aumentos en la actividad del BAT podría tener asociado la aparición de efectos adversos

como el crecimiento de placas ateromatosas (Dong et al., 2013) o neuropatía periférica (Xiong et al., 2017; Lopez, 2017).

Por otra parte, existe un mecanismo de diferenciación que da lugar a la aparición de un segundo tipo de adipocitos marrones, el fenómeno de *browning* del WAT. El *browning* consiste en la aparición de adipocitos *beige* o *brite* (del inglés: *brown in white*) en los depósitos de WAT tras la estimulación por frío, por el SNS o por agonistas adrenérgicos (Seale et al., 2008; Petrovic et al., 2010; Shabalina et al., 2013; Kajimura et al., 2015). Estos adipocitos *beige/brite* expresan marcadores termogénicos y poseen características anatómico-funcionales intermedias entre los adipocitos marrones y los blancos (Figura 12) (Harms and Seale, 2013; Shabalina et al., 2013). Su origen embrionario, de hecho, es diferente del linaje miogénico (Myf5+) de los adipocitos marrones y expresan una serie de marcadores específicos como PRDM16 y CIDEA (Seale et al., 2008; Wu et al., 2012; Wang and Seale, 2016). Su inducción tras la activación de los β_3 -AR evidencia que el SNS es responsable de su activación, al igual que sucede con el BAT (Contreras et al., 2014a).

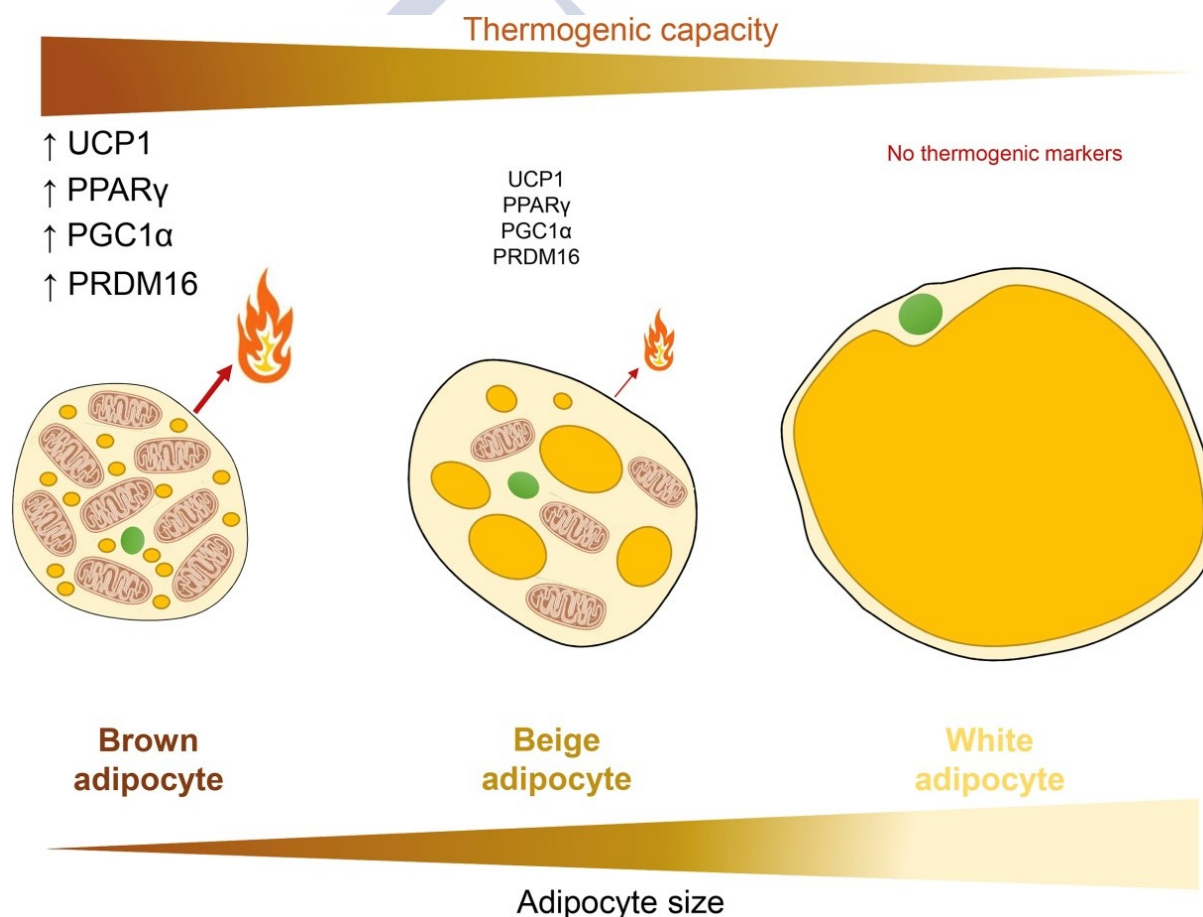


Figura 12. Representación gráfica del proceso de *browning* mediante el cual los adipocitos blancos se transforman en adipocitos *beige/brite* adquiriendo en este proceso las características intermedias entre los primeros y los adipocitos marrones (Contreras et al., 2016). Con permiso de Elsevier.

1.5.3. Detección de la temperatura corporal

En primer lugar para que los mecanismos reguladores se desencadenen, o no, el organismo debe conocer su temperatura corporal. Con este fin, existen una serie de detectores o sensores que se encargan de percibir la temperatura a la que se encuentra un animal (McGlone and Reilly, 2010). A nivel cutáneo la familia de canales iónicos del receptor de potencial transitorio (TRP), como por ejemplo el TRPA1 y TRPM8 que detectan el frío o el TRPV3 y TRPV4 que detectan el calor (Bernd and Flockerzi, 2014). Estos receptores localizados en las neuronas somatosensoriales primarias de la piel detectarán las variaciones de temperatura propagando la señal nerviosa por la medula espinal hasta el área preóptica del hipotálamo (POA) donde se las señales periféricas y centrales serán integradas para desencadenar una respuesta que defienda la temperatura corporal dentro del rango fisiológico (Nakamura and Morrison, 2008; Morrison and Nakamura, 2011).

Además de las terminaciones cutáneas, existen aferencias termorreceptoras en las vísceras del abdomen y también a nivel de la médula espinal donde las terminaciones somatosensoriales detectan la temperatura de estas regiones más profundas (Guieu and Hardy, 1970). Esta información térmica se integra con la que viene de las aferencias cutáneas de manera que como los cambios en regiones más internas del cuerpo son menos susceptibles a cambios en la temperatura exterior su señal será usada para potenciar la señal térmica cutánea (Morrison and Nakamura, 2011).

En el CNS también existen neuronas sensibles a cambios en la temperatura. Entre ellas, las localizadas en el POA son las más estudiadas y a las que se les atribuye una mayor relevancia en la detección central de la temperatura (Boulant and Dean, 1986). El POA contiene neuronas sensibles al calor capaces de incrementar su actividad cuando se calienta localmente esa zona (Boulant, 1974). Estas neuronas ven disminuidas sus descargas cuando la piel se enfría (Boulant and Hardy, 1974). Se ha demostrado que la aplicación de frío directamente en el POA desencadena la activación simpática del BAT así como la tiritona (Hammel et al., 1960; Imai-Matsumura et al., 1984).

1.5.4. Regulación central de la termogénesis

Como hemos visto hasta ahora en esta sección, la detección de la temperatura corporal por parte de las neuronas localizadas en las terminaciones cutáneas, viscerales, espinales y del POA informarán de manera directa acerca de los cambios en la temperatura a los que está sometido un organismo. Pero todas esas señales informativas serán integradas de manera central junto con otras muchas señales de tipo hormonal para emitir una respuesta coordinada y única en forma de disipación o generación de calor. El hipotálamo, será el encargado de esa coordinación y sus distintos núcleos los responsables de ejecutar una regulación homeostática de la temperatura (Figura 13). A continuación se expondrá como los distintos núcleos hipotalámicos participan en la regulación central de la termogénesis.

El VMH, fue el primer núcleo implicado en la regulación de la termogénesis. Su estimulación eléctrica desencadenaba un incremento en la temperatura del BAT (Perkins et al., 1981), efecto que desaparecía a través del bloqueo de los ganglios simpáticos o la denervación simpática (Saito et al., 1987). Posteriormente se ha visto que la inyección nucleoespecífica de glutamato, hidroxibutirato, norepinefrina, serotonina y triptófano en el VMH activa la termogénesis del BAT (Sakaguchi et al., 1988; Sakaguchi and Bray, 1989; Hugie et al., 1992; Yoshimatsu et al., 1993). Las evidencias genéticas, publicadas más recientemente, también correlacionan al VMH con la termogénesis del BAT. En este sentido la delección específica de SF1 en las neuronas del VMH desencadena un descenso en el gasto energético y en la expresión de UCP1 en el BAT (Kim et al., 2011; Jo, 2012). La acción termogénica de los estrógenos, que será explicada más adelante, es mediada fundamentalmente en el VMH. En este sentido se ha visto como el silenciamiento del receptor de estrógenos α (ER α) en el VMH disminuye la termogénesis del BAT (Musatov et al., 2007). El ratón KO para ER α en las neuronas SF1 del VMH, recapitula el anterior fenotipo, observando una reducción en la actividad del BAT y un descenso en la expresión de sus marcadores termogénicos UCP1, PPAR γ , PGC1 α , and β 3-AR (Xu et al., 2011). En los últimos años, se ha demostrado además como el VMH es un núcleo que media la respuesta termogénica de múltiples señales tanto hormonales (hormonas tiroideas, estrógenos, BMP8b) (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2014) como farmacológicas (nicotina, liraglutide) (Martinez de Morentin et al., 2012; Beiroa et al., 2014). Dicha acción se realiza a través de un mecanismo en el cual la AMPK de las neuronas del VMH responderá a la presencia de dichas moléculas desencadenando una activación simpática de la termogénesis del BAT. Dichos efectos sobre la actividad de BAT modulan la temperatura corporal y el gasto energético afectando de manera importante al balance energético y al metabolismo (Lopez et al., 2016). Si bien las vías neuronales que transmiten la información desde el VMH al BAT no han sido definidas con precisión, estudios de nuestro grupo han propuesto que proyecciones de tipo glutamatergico hacia las neuronas orexigénicas del LHA serán las responsables de mediar la activación simpática de la grasa parda (Martins et al., 2016). Por otra parte la conexión VMH-BAT, ha sido demostrada a través de estudios de retroinfección trans-sináptica con virus pseudorrávic (Bamshad et al., 1999). Además, se conoce que las neuronas del VMH proyectan sus axones a centros de control del sistema nervioso autónomo así como también a áreas del tronco encefálico como el RPa y la IO, estas últimas claramente asociadas con la actividad termogénica del BAT (Morrison, 1999; Uno and Shibata, 2001; Lindberg et al., 2013).

El DMH también participa en la regulación de la termogénesis del BAT. Se ha visto como la desinhibición de las neuronas del DMH incrementa la activación simpática del BAT y su actividad termogénica (Cao et al., 2004). Anatómicamente, la conexión DMH-BAT parece estar mediada a través de proyecciones al rRPa y se ha visto que la inhibición de las neuronas del DMH o el bloqueo de los receptores de glutamato en el DMH revierte la activación febril y por frío del SNS y de la termogénesis del BAT (Zaretskaia et al., 2002; Cao and Morrison, 2006). Además la IO también se ha postulado como área de paso para las

proyecciones DMH-BAT. Recientemente se ha descrito que tanto leptina como CRH puede actuar sobre las neuronas del DMH desencadenando la estimulación del rRPa y de la de inervación simpática del BAT (Enriori et al., 2011; Zhang et al., 2011).

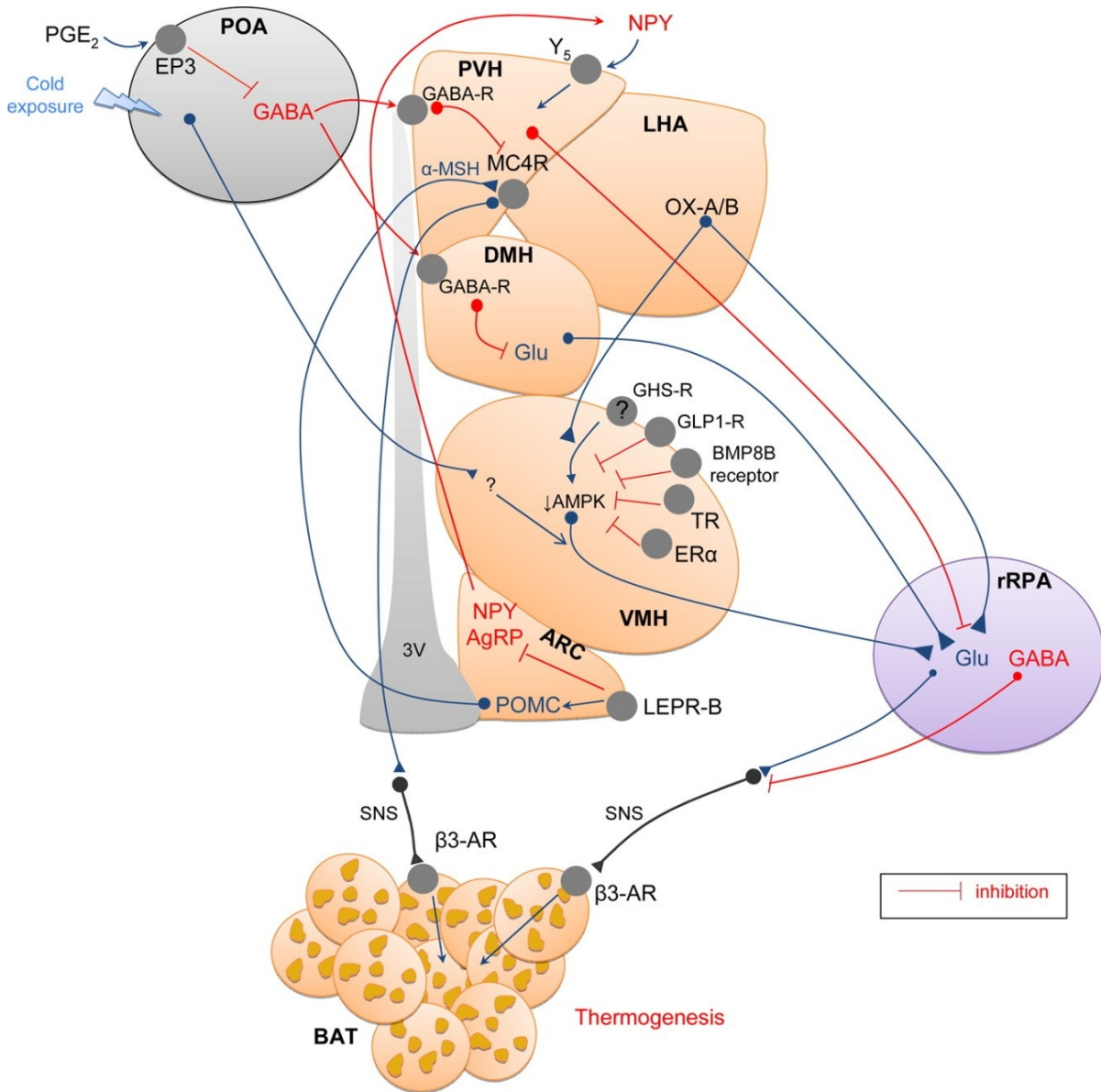


Figura 13. Esquema representativo de las vías neuronales que modulan la termogénesis del BAT (Contreras et al., 2014a). Licencia Creative Commons.

El PVH, modula la termogénesis del BAT, en la respuesta febril. Se ha visto como neuronas del PVH que proyectan hacia las células preganglionares simpáticas se activan durante la fiebre y que las lesiones en el PVH son capaces de atenuarla (Horn et al., 1994; Zhang et al., 2000). Los datos de retroinfección por virus pseudorrávido también apoyan la funcionalidad del PVH en la termogénesis del BAT (Bamshad et al., 1998; Oldfield et al., 2002; Bartness et al., 2010). La acción del PVH sobre la actividad del BAT parece, eso sí,

más relacionada con un papel modulador más que con una actividad reguladora directa. En este sentido se ha visto que la estimulación directa del PVH no produce acciones sobre BAT (Holt et al., 1988; Madden and Morrison, 2009), sino que es la existencia de proyecciones inhibitorias desde el PVH hasta el rRPa los que disminuyen la actividad simpática del BAT (Madden and Morrison, 2009; Madden et al., 2013).

Por último el ARC, cuyo papel en el control de la ingesta se ha explicado anteriormente, también parece participar en la regulación de la termogénesis del BAT. En este sentido se ha visto como las poblaciones orexigénicas inhiben la termogénesis ya que la pérdida parcial de las neuronas AgRP/NPY induce una activación simpática del BAT (Bewick et al., 2005). La acción parece estar mediada por el sistema melanocortina en el PVH y se ha visto que la deficiencia de MC4R impide la acción termogénica de la leptina (Zhang et al., 2005). Las acciones termogénicas de la leptina están mediadas a su vez por sus receptores en el ARC ya que su delección genética bloquea dicho mecanismo (Harlan et al., 2011). Las neuronas GABAérgicas RIP-Cre en el ARC contribuyen a su vez en las acciones termogénicas de la leptina (Kong et al., 2012).

1.6. LIPOTOXICIDAD Y ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN EL HIPOTÁLAMO

1.6.1. Alteraciones metabólicas inducidas por la lipotoxicidad

Se entiende por lipotoxicidad, el mecanismo patológico a través del cual la excesiva acumulación de algunas especies lipídicas en tejidos periféricos, no apropiados para el almacenamiento, producen alteraciones metabólicas (Unger, 2002; Schaffer, 2003; Virtue and Vidal-Puig, 2008; Vidal-Puig and Unger, 2010). La diabetes mellitus fue una de las primeras patologías en asociarse a la lipotoxicidad (Unger and Orci, 2000). De hecho, el término lipotoxicidad fue acuñado por R. Unger tras un estudio donde los FFAs se correlacionaban con alteraciones de la célula β pancreática (ausencia de secreción de insulina tras la estimulación con glucosa, disminución de la expresión del transportador de glucosa GLUT2 y aumento de triglicéridos en los islotes) (Lee et al., 1994). Tras este estudio seminal, más evidencias han sido publicadas probando que los FFAs afectan al funcionamiento de las células β en ratas y también en humanos (Zhou and Grill, 1994; Zhou and Grill, 1995; Shimabukuro et al., 1998; Cnop et al., 2001; Maedler et al., 2001). Además la resistencia a insulina ha sido asociada a la acumulación de ciertas especies lipotóxicas como las ceramidas mientras que la inhibición de su síntesis mejora dicha resistencia (Turinsky et al., 1990; Summers et al., 1998; Wang et al., 1998; Holland et al., 2007; Hajduch et al., 2008). En los tejidos periféricos la lipotoxicidad se ha propuesto como un mecanismo común a disfunciones en los cardiomiocitos, aterosclerosis y esteatohepatitis principalmente mediado por la acumulación de palmitato y ceramidas (Figura 14) (Kurtz et al., 1998; Zhou et al., 2000; Chiu et al., 2001; Yagy et al., 2003; Park et al., 2008; Gao et al., 2012; Li et al., 2014; Raichur et al., 2014; Kasumov et al., 2015). A su vez, se ha demostrado que la disminución farmacológica o genética de los niveles de ceramidas mejora todas esas alteraciones (Park et

al., 2004; Kurek et al., 2014; Correnti et al., 2014; Xia et al., 2015). Conceptualmente, podemos plantear que la lipotoxicidad se produce cuando el tejido adiposo ve sobrepasada su capacidad de expansión y en consecuencia el exceso de lípidos se vehiculiza hacia tejidos cuya capacidad de almacenamiento es limitada. En estos tejidos, que funcionalmente no están preparados para albergar reservas adiposas, el exceso de lípidos es metabolizado en vías no oxidativas generando especies lipídicas reactivas como las ceramidas o los diacilgliceroles (DAG) que inducen respuestas deletéreas que de ser mantenidas pueden desencadenar en muerte celular.

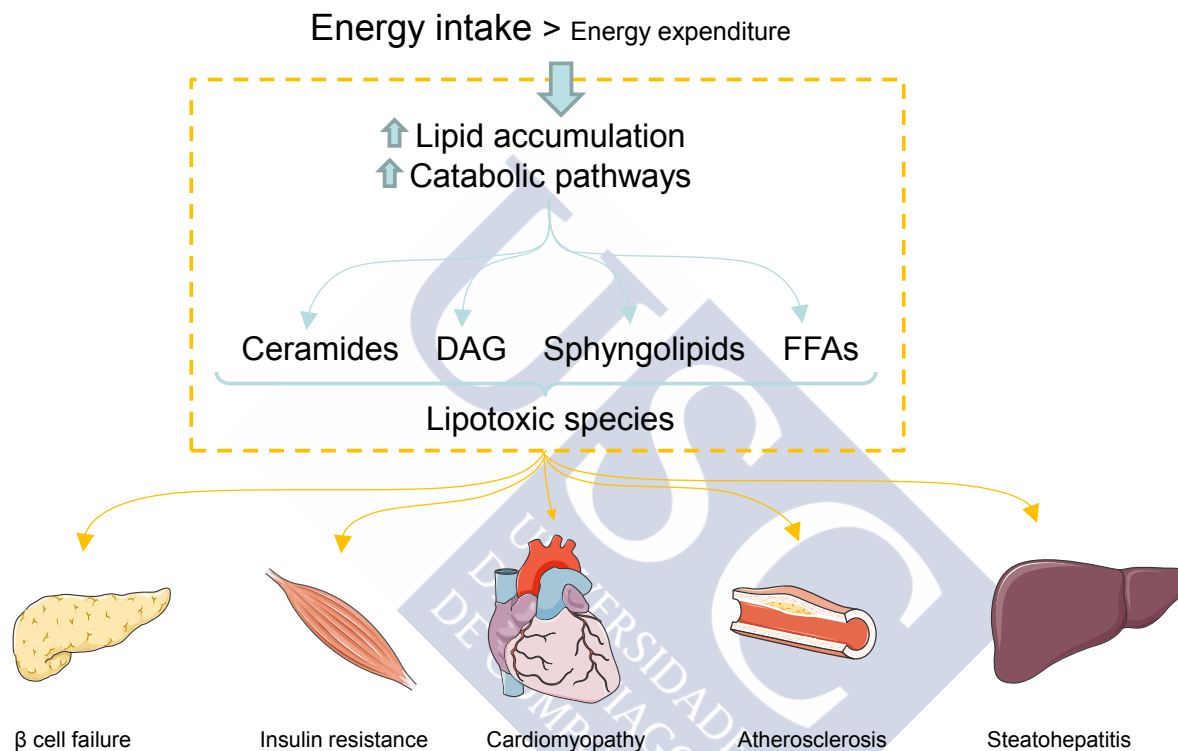


Figura 14. Esquema representativo de la lipotoxicidad en los tejidos periféricos (Gonzalez-Garcia et al., 2017a). Con permiso de S.KARGER AG.

Como se ha introducido, la lipotoxicidad en la patología metabólica está muy estudiada en los tejidos periféricos pero recientemente se ha visto como la lipotoxicidad en el CNS puede estar jugando un papel relevante. Así, los estudios iniciales demostraron que la acumulación de palmitoil y estearoil-CoA en animales alimentados con HFD se asocia con resistencia a insulina y activación de la vía del inhibidor de la beta-kinasa kappaB (IKK β) (Posey et al., 2009), un regulador esencial de la inmunidad innata y de la inflamación (Hayden and Ghosh, 2008). Además, se vio como la administración central de palmitato replicaba estas alteraciones mientras que la inhibición de la inflamación provocaba la reversión de los efectos, con una reducción de la ingesta y un incremento de la sensibilidad hipotalámica a insulina en ratas alimentadas con HFD (Posey et al., 2009). Este modelo inicial planteaba que la exposición central a especies lipotóxicas y no la ingesta calórica desencadena la inflamación celular y la resistencia a insulina que produce obesidad. Posteriormente se

observó que el palmitato central media la resistencia hipotalámica a insulina causada por la HFD a través de la activación de la proteína kinasa C- θ (PKC- θ) (Benoit et al., 2009). El silenciamiento de la PKC- θ específicamente en neuronas del ARC mejora el fenotipo de los animales alimentados con HFD (Benoit et al., 2009). En el mismo contexto, obesidad inducida por dieta (DIO), los ácidos grasos saturados parecen jugar un papel también relevante en la resistencia a leptina. Estos, son capaces de activar el receptor similar a *toll* (TLR4) hipotalámico (Milanski et al., 2009), un receptor de interleukina 1 muy asociado con patologías inflamatorias y autoinmunes (Kawai and Akira, 2010). La activación de TLR4 induce un mal funcionamiento del retículo endoplasmático (ER) y este a su vez acaba generando una respuesta inflamatoria que altera la respuesta a leptina (Milanski et al., 2009).

Hasta aquí, los estudios planteados establecen que la lipotoxicidad hipotalámica inducida por la acumulación de ácidos grasos saturados en la obesidad inducida por HFD es un evento clave para la alteración del balance energético. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, a nivel periférico otras especies lipídicas como los esfingolípidos y las ceramidas han sido comúnmente asociadas al desarrollo de lipotoxicidad. Recientemente se ha demostrado que en el hipotálamo de ratones alimentados con HFD (Borg et al., 2012) y en los cerebros de ratas diabéticas inducidas con estreptozocina (Car et al., 2012) hay un aumento de los niveles de ceramidas, dihexosilceramidas, DAG y ésteres de colesterol. En coherencia, cuando un incremento en la oxidación hipotalámica de ácidos grasos que previene la producción de acilgliceroles, ceramidas y ésteres de colesterol promueve a la vez, una reducción de la lipotoxicidad y del estrés del retículo endoplasmático (ER stress) (más adelante explicado en detalle) (McFadden et al., 2014). Ambos eventos, íntimamente relacionados, hacen que disminuya la ingesta y el peso corporal, mejorando el metabolismo general del organismo.

Las ceramidas son las moléculas precursoras de esfingolípidos predominantes en la célula como las esfingomielinas y los gangliosidos. Además, las ceramidas forman parte de las membranas celulares y hasta hace poco se creía que su principal función era estructural. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que son uno de los lípidos más importantes en el desarrollo de lipotoxicidad. En este sentido, se ha visto que el incremento de la síntesis de ceramidas forma parte de una respuesta celular al estrés que ha sido conservada evolutivamente (Sawai and Hannun, 1999; Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002). Los esfingolípidos y las ceramidas como parte de estos, no se absorben de manera apreciable en la dieta, sino que son producidos por el metabolismo de otros compuestos como las grasas saturadas y las proteínas (Chaurasia and Summers, 2015).

La producción de ceramidas tiene lugar a través de tres vías, la más importante y mejor caracterizada es la síntesis *de novo* (Figura 15). Esta tiene lugar en el interior del retículo endoplasmático y el primer paso, limitante, consiste en la unión de una molécula de palmitato con una serina para dar lugar a 3-ketoesfinganina (también denominada 3-oxodihidroesfingosina). Este primer paso es catalizado por la serina palmitoiltransferasa (SPT), enzima limitante en esta vía. La SPT está compuestas por las subunidades 1 y 2 de la

cadena larga de la serina palmitoiltransferasa (SPTLC1 y 2), ambas son esenciales para la función de la enzima porque constituyen su núcleo catalítico (Hanada, 2003; Yard et al., 2007; Watson et al., 2009). La inclusión de una tercera subunidad SPTLC amplía la especificidad para acil-CoA (por ejemplo, miristoil-CoA), permitiendo la generación de diferentes longitudes de cadena. Sin embargo la relevancia funcional de esta tercera subunidad es menor (Chaurasia and Summers, 2015). Posteriormente, la 3-ketosfinganina es reducida a esfinganina (también denominada dihidroesfingosina) por la 3-keto-esfinganina reductasa, la cual es acilada a su vez por la enzima ceramida sintasa (CerS) para producir dihidroceramida. Es interesante mencionar que las seis diferentes enzimas CerS de mamíferos producen dihidroceramidas de longitudes variables de cadena, que van de 14 a 34 átomos de carbono. Estas CerS difieren en la especificidad del sustrato y la distribución del tejido, lo que permite la formación de grupos de esfingolípidos distintos en diferentes tejidos y tipos celulares (Chaurasia and Summers, 2015). Por último, la dihidroceramida desaturasa (Des) transforma la dihidroceramida en ceramida. Se sabe que algunas enzimas implicadas en la síntesis *de novo* por procesos inflamatorios asociados a la obesidad (Bikman and Summers, 2011). La inhibición farmacológica o la ablación genética global de algunas de estas enzimas origina un marcado efecto sobre el metabolismo energético celular, así como una mejora en la sensibilidad a insulina y en la homeostasis de la glucosa (Summers et al., 1998; Holland and Summers, 2008; Yang et al., 2009a).

La segunda vía para la producción de ceramidas es la hidrólisis de esfingomielinas a través de la enzima esfingomielinasa (o esfingomielina fosfodiesterasa, SMasa) (Figura 15). Se ha visto que los ratones obesos presentan niveles elevados de SMasa (Samad et al., 2006). Además, se conoce una patología genética en humanos (el síndrome de Niemann-Pick tipo I) que se origina por la ausencia de la actividad de la SMasa. Estos pacientes tienen problemas para ganar y mantener el peso corporal, de manera análoga a lo que ocurre en los modelos animales (CROCKER and FARBER, 1958; Garver et al., 2007).

Por último en la tercera vía, denominada de rescate, de recuperación o salvaje, las ceramidas se generan a partir del catabolismo de otros esfingolípidos. Degradación que tiene lugar en los endosomas y lisosomas, orgánulos celulares con naturaleza ácida que degradan en su interior a los esfingolípidos para formar ceramidas a través de las enzimas residentes (SMasa ácida y ácido β -glucosidasa 1). Las ceramidas serán degradadas a esfingosina y ácidos grasos libres para entrar en el citosol y una vez allí, ser transformada de nuevo en ceramidas por la ceramidasa (Figura 15) (Bikman and Summers, 2011).

Como veremos a continuación los incrementos en la producción de ceramidas son el principal evento que da lugar a ER estrés (Kahn et al., 2006; Holland and Summers, 2008; Bikman and Summers, 2011).

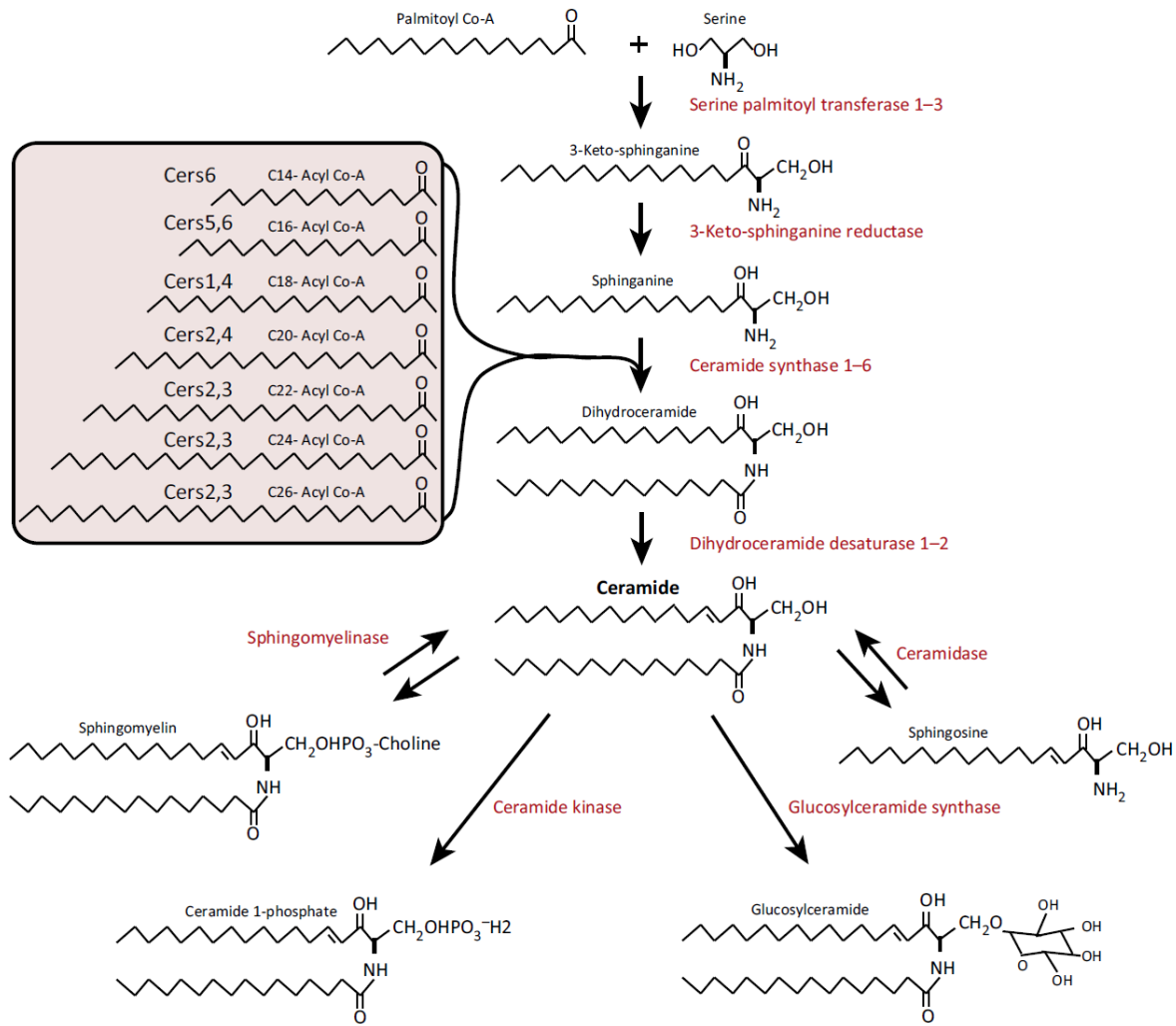


Figura 15. Representación esquemática de las tres vías de síntesis de ceramidas: la síntesis *de novo*, la hidrólisis de esfingomielina y la vía de rescate (Chaurasia and Summers, 2015). Con permiso de Elsevier.

1.6.2. Mecanismos moleculares de ER stress

Como se acaba de mencionar, el ER stress es el principal mecanismo fisiopatológico desencadenado por la lipotoxicidad. El ER es un orgánulo celular estructurado por una compleja red de membranas en forma de sacos aplanados y túbulos que comparten un espacio interno. El ER es responsable de importantes funciones celulares como son: el metabolismo de lípidos, el transporte intracelular, el almacenamiento de calcio y la síntesis, plegamiento, ensamblamiento, modificación post-transcripcional de proteínas secretoras, lumbales y de membrana (Ellgaard and Helenius, 2003; Schroder and Kaufman, 2005; Marciniak and Ron, 2006). Cuando se produce una alteración en la homeostasis del ER se puede dar lugar a una acumulación de proteínas mal-plegadas o no-plegadas en el lumen del ER debido a un desequilibrio entre la síntesis de proteínas y la capacidad del ER para plegarlas y/o degradarlas, situación denominada ER stress (Ron and Walter, 2007). Ocurre entonces que el ER desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) con la finalidad de aumentar la

capacidad de plegamiento, inhibir la síntesis de nuevas proteínas y aumentar la degradación de las mal-plegadas (Walter and Ron, 2011; Lee and Ozcan, 2014). Además cuando el ER stress se mantiene durante un período de tiempo tal que la homeostasis del ER no consigue ser restaurada, la UPR puede inducir procesos de muerte celular como la autofagia y la apoptosis (Schroder and Kaufman, 2005).

El plegamiento y ensamblaje de las proteínas en el ER es realizado por las chaperonas. El ER posee un ambiente particular en el que residen un alto número de chaperonas que facilitan y promueven el plegado de proteínas y complejos proteicos a pesar de la presencia de elevadas concentraciones de proteína que de otra manera interferirían con las reacciones de plegamiento (Ron and Walter, 2007). Funcionalmente las chaperonas actúan a través de dos mecanismos, catalizando las reacciones de plegado proteico incrementando la ratio de proteínas que alcanzan su conformación final y por otra parte hay chaperonas que no realizan un plegamiento activo si no que mantienen a las proteínas en un estado de plegamiento-competente (Gething and Sambrook, 1992; Ni and Lee, 2007). En este caso las proteínas previenen la formación de plegamientos intermedios a través de la agregación y estabilización de conformaciones desfavorables energéticamente que minimizan el mal-plegamiento irreversible de proteínas (Dill and Chan, 1997).

La chaperona más importante y mejor caracterizada es la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78) también denominada proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) (Lee, 2005). Esta chaperona, fue descubierta a finales de los 70 junto con GRP94 y GRP58 como proteínas celulares inducidas por la deprivación de glucosa (Lee, 2001). GRP78 presenta una débil actividad ATPasa que es estimulada por los péptidos que contienen aminoácidos hidrofóbicos como la leucina y la fenilalanina (Flynn et al., 1991; Blond-Elguindi et al., 1993). GRP78 tiene un dominio ATPasa en su zona amino terminal y un dominio de unión a péptidos en su zona carboxilo terminal. Su interacción transitoria con las regiones hidrofóbicas expuestas de los plegamientos intermedios previene su agregación manteniendo al mismo tiempo la proteína en un estado de plegamiento competente (Hurtley and Helenius, 1989).

La localización de GRP78 en el ER es esencial en la regulación del ER stress ya que además de localizarse asociado a las proteínas en el proceso de plegamiento, GRP78 se asocia en la cara interna del ER a tres proteínas que actúan como sensores de la UPR (Bertolotti et al., 2000; Hendershot, 2004). En una situación de ER stress donde la ratio de proteínas mal-plegadas aumenta, esta chaperona se disocia de los sensores para contribuir al buen plegamiento de estas. Dicha disociación actúa como elemento activador de la las vías UPR que regulan los tres sensores que a continuación se explicarán (Figura 16) (Lee, 2005; Ron and Walter, 2007).

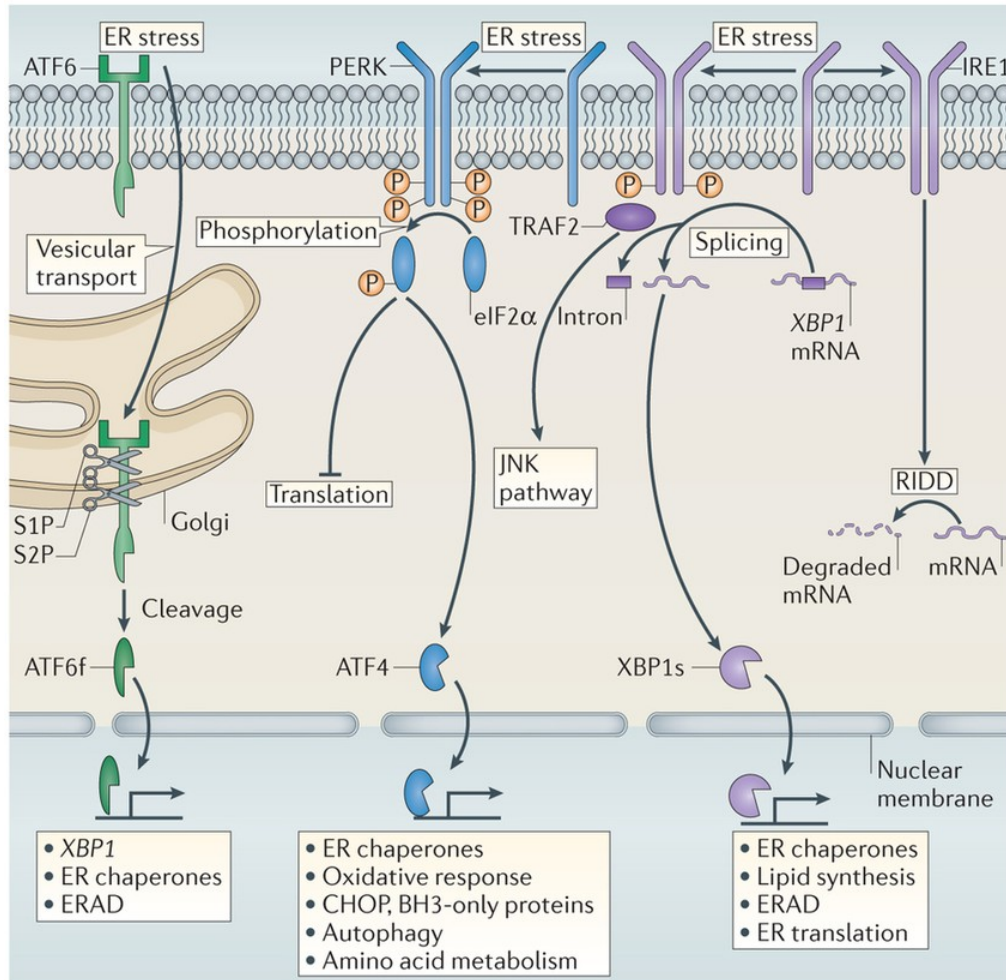


Figura 16. Representación gráfica de las tres vías que componen la UPR (Hetz and Mollereau, 2014). Con permiso de Springer Nature.

1.6.2.1. La vía de IRE (*Inositol-requiring protein-1*)

La más conservada de las tres evolutivamente, se activa tras la disociación de GRP78 o también detectando la presencia de proteínas no plegadas dimerizándose lateralmente y autofosforilándose (Gardner and Walter, 2011). Tras su activación, IRE que es una endonucleasa tipo I, cataliza el *splicing* del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de la proteína de unión a box-X 1 (XBP1), luego se produce la ligación y XBP1 es traducido a proteína actuando como un factor de transcripción que promueve la expresión de chaperonas, la síntesis de lípidos y proteínas que fomentan la degradación de proteínas no plegadas del ER. XBP1 también contribuye a la disminución de nuevas proteínas en el ER a través de su actividad ribonucleasa que degrada los mRNA de unión a ER limitando la traducción proteica hacia el interior del lumen (Bertolotti et al., 2000; Lee et al., 2002; Gardner and Walter, 2011).

1.6.2.2. La vía de ATF6 (*Activating transcription factor 6*)

ATF6 es un factor de transcripción que se encuentra embebido en la membrana del ER (Haze et al., 1999). Tras su activación, mediada también por la disociación de GRP78, se empaqueta en vesículas de transporte hacia el Golgi. Allí es procesado por proteasas que lo escinden en fragmentos (Haze et al., 1999; Shen et al., 2002). De ellos el extremo N-terminal se trasloca al núcleo celular donde ejerce su función incrementando la transcripción de chaperonas como GRP78 así como de otras proteínas como XBP1 (Haze et al., 1999; Adachi et al., 2008).

1.6.2.3. La vía de PERK (*PKR-like ER kinase*)

Tras su activación, esta kinasa se dimeriza y se autofosforila, fosforilando a su vez al factor alfa 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 α) necesario para la unión del ácido ribonucleico transferente (tRNA) a los ribosomas. La fosforilación de eIF2 α inhibe su función reduciendo la síntesis proteica y reduciendo por tanto el flujo de nuevas proteínas al ER (Harding et al., 2000). Por otra parte, en situaciones celulares de ER stress sostenido e irreversible, PERK produce un incremento de ATF4 que actúa como un factor de transcripción que aumenta la expresión de la proteína C/EBP homologa (CHOP). La acción de CHOP desencadena mecanismos de apoptosis que conducen a la muerte celular (Ma et al., 2002; Ron and Walter, 2007).

1.6.3. ER stress en obesidad y patologías asociadas

En estos últimos años el ER stress ha emergido como un evento molecular esencial de patologías metabólicas como la diabetes, el síndrome metabólico y la obesidad (Ozcan et al., 2006; Boden et al., 2008; Zhang et al., 2008; Yang and Hotamisligil, 2008; Ozcan et al., 2009; Hotamisligil, 2010; Martinez de Morentin and Lopez, 2010; Purkayastha et al., 2011; Ramirez and Claret, 2015). En cuanto al desarrollo de esteatosis hepática, se ha visto como tanto los ratones con obesidad inducida por dieta como los ratones *ob/ob* (ratones mutantes para el gen de leptina) presentan una elevación de ER stress en el tejido adiposo y en el hígado en comparación con sus animales control (no obesos) (Ozcan et al., 2004). Además, la resistencia a insulina se asoció con el ER stress a través de estudios *in vitro* e *in vivo* que demostraron como la deficiencia de XBP1 son más susceptibles a la inducción farmacológica de ER stress hecho que aumenta la resistencia a insulina. Los ratones deficientes para XBP1 recapitulan el anterior fenotipo siendo más susceptibles a ER stress y desarrollando alteraciones en la homeostasis de la glucosa y un incremento de peso corporal (Ozcan et al., 2004). Cuando se sobreexpresa GRP78 en el hígado de ratones *ob/ob* a través de la administración de adenovirus, los niveles de triglicéridos y colesterol hepáticos se reducen produciéndose una mejora de la sensibilidad a insulina (Kammoun et al., 2009). La disrupción de la UPR en el hígado de ratones mediante una mutación que interrumpe la vía de

señalización de eIF2 α , genera una mejora en la tolerancia a glucosa y una disminución de la esteatosis hepática cuando se someten a HFD (Oyadomari et al., 2008). Varios estudios apoyan este mismo modelo y han demostrado, a través de la manipulación genética de las vías de IRE1 y ATF6, la relación entre ER stress y esteatosis hepática inducida por HFD (Rutkowski et al., 2008). Además, se ha demostrado recientemente que la vía p63/IKK/ER stress es esencial en el desarrollo de esteatosis hepática (Porteiro et al., 2017).

Es necesario mencionar también que el ER stress se ha relacionado claramente con la apoptosis de las células β pancreáticas en la diabetes tipo2 (Huang et al., 2007). En este caso, CHOP como elemento terminal en la vía parece jugar un rol clave, pues su disrupción dota de protección a los islotes en modelos genéticos de diabetes (Oyadomari et al., 2002). Cuando ratones KO para CHOP se cruzan con ratones *db/db* se previene la muerte de las células β pancreáticas característica del segundo genotipo (Song et al., 2008).

El tejido adiposo no escapa a esta casuística y existen en la bibliografía diversos estudios que soportan la asociación entre ER stress y obesidad (Ozcan et al., 2004; Boden et al., 2008; Sharma et al., 2008; Gregor et al., 2009). Si bien, también existe cierta controversia en relación con el papel que el ER stress juega en la función del tejido adiposo y se ha observado que los ratones GRP78(+/-) están más protegidos frente a la obesidad inducida por HFD y la diabetes tipo 2 que sus controles *wild type* (Ye et al., 2010). En este caso los autores argumentan que las adaptaciones en la UPR podrían contribuir a esa mejora. En la misma dirección, el tratamiento con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), una chaperona química derivada de los ácidos biliares, en pacientes obesos no mejora la sensibilidad a insulina ni la expresión de marcadores de ER stress en el WAT de estos pacientes (Kars et al., 2010). Incluso recientemente la resistencia a insulina se ha asociado a bajos niveles de ER stress (Boden et al., 2014). En frente de estas evidencias, diversos estudios han establecido el papel de ER stress como mecanismo deletéreo. Por ejemplo, se ha visto como la actividad física reduce el ER stress y la resistencia a insulina de ratas obesas (da et al., 2011). En tejidos como el músculo también se ha establecido la anterior relación, donde la obesidad inducida por HFD se asocia a mayores niveles de ER stress (Deldicque et al., 2011) y la disminución del mismo a través de tratamientos farmacológicos mejora el estado de resistencia a insulina en humanos (Kars et al., 2010).

Los datos en humanos también respaldan el papel del ER stress en la patología metabólica. En el páncreas, por ejemplo, la integridad de la vía PERK-eIF2 α es fundamental para su correcto funcionamiento y se ha descrito como en el síndrome de Wollcot-Rallinson una mutación en el gen de PERK causa una forma de diabetes juvenil asociada además con severos defectos en las células β pancreáticas (Julier and Nicolino, 2010). Más allá de las mutaciones puntuales, el ER stress ha suscitado mucho interés debido a que las personas obesas tienen unos niveles muy elevados de los marcadores de ER stress, hecho que además tiene una correlación positiva con el índice de masa corporal (BMI) (Boden et al., 2008; Sharma et al., 2008). Además de la activación de la UPR y el ER stress en el tejido subcutáneo de las personas obesas, el hígado de estas también presenta estos marcadores.

Curiosamente, tras la cirugía bariátrica el ER stress en esos pacientes disminuye de manera clara (Gregor et al., 2009).

1.6.4. ER stress hipotalámico y balance energético

De igual manera que en el caso de la lipotoxicidad, los estudios iniciales que asociaron el ER stress con las alteraciones metabólicas empezaron en los tejidos periféricos. Sin embargo, en los últimos años diversos grupos han centrado sus investigaciones en el papel que juega el ER stress hipotalámico en el desarrollo de las alteraciones metabólicas. El primer estudio que planteó la relación entre ER stress hipotalámico y obesidad fue publicado hace una década por Zhang y colaboradores. En un contexto de inflamación metabólica se cuestionó si estos procesos de base inflamatoria y sus mediadores podían estar afectando al hipotálamo con la posible implicación que esto pudiese tener en la obesidad y patologías asociadas. Sus primeras observaciones fueron que el factor nuclear κ B/kinasa I κ B (IKK β /NF- κ B) está altamente expresado en el hipotálamo y que permanece inactivo bajo condiciones no obesogénicas pero cuando los animales se someten a una HFD está vía molecular es activada (Zhang et al., 2008). A continuación, demostraron como la activación genética de la vía inducía incrementos en la ingesta y en el peso de los animales mientras que cuando la vía era inhibida se producía una protección frente a la obesidad inducida por dieta. Los autores encontraron además que es el ER stress, el que tras la exposición a HFD activa la vía de IKK β /NF- κ B y que curiosamente cuando este ER stress se revierte con TUDCA los animales pierden peso y comen menos (Zhang et al., 2008). La asociación entre NF- κ B y ER stress ha sido reafirmada en varios estudios posteriores (Ropelle et al., 2010; Purkayastha et al., 2011; Hagimoto et al., 2013). Tras este primer estudio se demostró posteriormente la relación entre ER stress y resistencia a leptina, donde los niveles elevados de ER stress son capaces de inhibir la señalización del receptor de leptina generando una resistencia a la misma específicamente en el hipotálamo. Además, la disminución del ER stress facilita una mejora de la sensibilidad a leptina que influye de manera directa en la ingesta (Hosoi et al., 2008). Cuando se realiza una delección genética de XBP1 en neuronas, se produce en consecuencia un aumento del ER stress y los animales desarrollan un mayor peso corporal y una mayor ingesta cuando se someten a HFD. Otros parámetros metabólicos como la glucosa plasmática y la adiposidad también se ven afectados tras esta ablación de XBP1. En ratones *ob/ob*, cuyos niveles de ER stress hipotalámico están elevados, la administración de chaperonas químicas mejora su resistencia a leptina (Ozcan et al., 2009). Estos resultados permitieron a Ozcan y colaboradores establecer la hipótesis de que el ER stress es el evento molecular responsable de la resistencia a leptina en el hipotálamo y constituyen además, el primer tratamiento que aumenta la sensibilidad central a leptina. En la misma dirección se ha publicado que la inducción de ER stress en el hipotálamo mediante el tratamiento con taspigargina reduce la sensibilidad a insulina y a leptina produciendo un aumento de la ingesta y del peso corporal (Won et al., 2009). En coherencia con el estudio de Ozcan la administración de chaperonas químicas permitía la reversión del fenotipo en ratones con obesidad inducida por dieta. La

acción positiva del ejercicio sobre el metabolismo ha sido también asociada al ER stress en el hipotálamo. Así, se ha visto como el ejercicio ejerce una mejora en la resistencia a insulina y leptina a través de la reducción de las vías de IKKb/NF-kB y del ER stress en ratas con obesidad inducida por dieta, un mecanismo que parece estar mediado por interleukina 6 (IL6) (Ropelle et al., 2010; Martínez de Morentin and Lopez, 2010). Aunque es necesario también mencionar que hallazgos en el sentido opuesto plantean que la vía de UPR está incrementada por el ejercicio voluntario de ratones con obesidad inducida por dieta (Kim et al., 2010). En consecuencia, los efectos del ejercicio sobre el ER stress hipotalámico necesitan mayor estudio. Es necesario apuntar también la posible acción del ER stress en regiones extrahipotálamicas. Particularmente, se ha visto como el ER stress induce la resistencia a insulina en la amígdala causada por la obesidad inducida por dieta. Este ER stress genera una alteración en la respuesta anorexigénica de la insulina que explica el desarrollo del fenotipo obeso (Castro et al., 2013).

Como hemos visto hasta ahora el ER stress hipotalámico ha sido propuesto en la literatura como un evento molecular esencial en el desarrollo de obesidad, pero el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales esta alteración neuronal desencadena los cambios fenotípicos es desconocida. Algunos autores han propuesto que el neuropéptido POMC es un posible actor de la ecuación debido a que ratones con obesidad inducida por dieta presentan una alteración en el procesamiento postranscripcional de POMC. El ER stress, elevado en estos animales, produce una disminución en los niveles de prohormona convertasa 2, la enzima que cataliza la conversión de ACTH a α -MSH (Cakir et al., 2013). Recientemente, también se ha propuesto a esta misma población del ARC como responsable a la hora de asociar el ER stress hipotalámico y la obesidad. El grupo de Claret ha descrito como los ratones a los que se les delecciona mitofusina 2 (Mfn2) de manera específica en las neuronas POMC, presentan unos niveles elevados de ER stress. Mitofusina 2 es una proteína mitocondrial esencial en el proceso de fusión de las mitocondrias y en la interacción mitocondria-ER; en su ausencia los contactos mitocondria-ER se alteran y se desencadena ER stress. Estos animales desarrollan un fenotipo resistente a leptina, hiperfágico, con un gasto energético reducido que desemboca en obesidad. El tratamiento de estos ratones con chaperonas químicas revierte el fenotipo demostrando que es el ER stress el causante de las alteraciones metabólicas (Schneeberger et al., 2013).

Por último, es necesario mencionar la capacidad del ER stress hipotalámico para producir alteraciones a nivel periférico. En este sentido se ha visto como la inducción aguda de ER stress es capaz de generar resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa en el hígado, aumentos en la presión arterial (debido a aumentos del tono simpático) (Purkayastha et al., 2011). En cuanto a la regulación de la acción de la insulina, la infusión intracerebroventricular de adenovirus codificantes de ATF4 genera una resistencia a insulina en los animales a través de las vías vagales que conectan el CNS con el hígado. Cuando se inyecta un dominante negativo de ATF4 en el hipotálamo la sensibilidad a insulina del hígado mejora (Zhang et al., 2013).



2. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral fueron:

1. Determinar si las ceramidas centrales inducen ER stress en el hipotálamo y si este mecanismo explica los cambios en el balance energético asociados con la obesidad.
2. Investigar los mecanismos fisiológicos a través de los cuales el ER stress hipotalámico modula la homeostasis energética.
3. Determinar si el ER stress es una causa de las alteraciones en el balance energético producidas por la obesidad inducida por dieta.
4. Determinar si el ER stress es una causa de las alteraciones en el balance energético producidas por la deficiencia estrogénica.





3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

Los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron aprobados por el comité ético de la universidad de Santiago de Compostela bajo la responsabilidad de Miguel A. López Pérez y registrados con los números de procedimiento: ID 15005AE/10/FUN/FISIO2/MLP2 (bajo el cumplimiento del RD 1201/2005 del 10 de octubre) y el ID 15010/14/006 (bajo el cumplimiento del actual y vigente RD 53/2013 del 1 de febrero). Dichos procedimientos se han realizado por tanto bajo el amparo del marco legislativo vigente: Directiva 2010/63/UE del Parlamento y Consejo Europeo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos; traspuesto a la norma española con el Real Decreto 53/2013, del 1 de Febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Todos los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron realizados en el centro usuario: ANIMALARIO DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, situado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela cuyo número de registro es el ES 150780263401.

Además, considerando las implicaciones éticas asociadas al uso de animales con fines científicos, los diseños experimentales se realizaron teniendo en cuenta el principio de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento). En base a estos principios, en esta tesis doctoral se procuró usar el menor número de animales para obtener los datos suficientes que respondiesen a la cuestión investigada y maximizar la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso de otros animales. Asimismo, se trató de minimizar el dolor y la angustia de los animales, maximizando en la medida de lo posible su bienestar.

3.1.1. Modelos animales

En esta tesis doctoral se han empleado:

- Ratas hembra y macho (*Rattus Norvergicus*) de la cepa Sprague-Dawley suministrados por el Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela, con una masa corporal de unos 250 gramos aproximadamente.

- Ratas macho (*Rattus Norvergicus*) de la cepa Zucker obesas (OZR, fa/fa) y sus controles, ratas Zucker delgadas (LZR, fa/-) ambas proporcionadas por *Charles River* (Barcelona, España), con una masa corporal de unos 300-350 y 250-300 gramos respectivamente.

Los animales fueron estabulados en condiciones estables de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas-20:00 horas) y con un período de aclimatación a las instalaciones de unos 7 días aproximadamente, previo a cualquier procedimiento.

Durante todo este tiempo, los animales fueron mantenidos en condiciones de acceso libre a dieta estándar y a agua, con excepción de aquellos procedimientos experimentales en los que se especifique. Para verificar el correcto bienestar de los animales, estos fueron monitorizados periódicamente mediante un seguimiento controlado de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico, acostumbrarlos al manejo por el personal de laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés generado durante los experimentos llevados a cabo. La estabulación de los animales fue colectiva o individual en función de las características de cada procedimiento y siempre teniendo en cuenta el comportamiento social de estos animales. Así en la mayoría de los experimentos en los que se requirió un seguimiento de la masa corporal o ingesta, se estabularon individualmente.

3.1.2. Procedimientos no quirúrgicos

3.1.2.1. Administración de compuestos a través de diferentes vías

3.1.1.1.1. Vía Subcutánea

No requiere anestesia y se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata posterior. Se inmoviliza el animal con la ayuda de un trapo cubriéndole la cabeza, se pellizca el lomo del animal con la misma mano; con la otra mano se introduce la aguja, paralelamente a la columna vertebral. Este procedimiento puede ser llevado a cabo durante varios días seguidos.

3.1.1.1.2. Vía intraperitoneal

Esta vía no requiere anestesia; se realiza en la parte ventro-caudal de la rata por debajo del peritoneo. Se coge al animal por la espalda con ayuda de un trapo para poder inmovilizarlo intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras y se inserta la aguja (BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16mm, *BD Medical Surgical Systems*) acoplada a una jeringa (1 mL BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, *BD Medical Surgical Systems*) prácticamente de manera perpendicular a este, preferiblemente por su costado derecho.

3.1.1.1.3. Vía intracerebroventricular

Tampoco es necesaria anestesia en este procedimiento, el animal está totalmente consciente. Con ayuda de un trapo se inmoviliza de forma leve al animal presionándolo suavemente contra la base de su jaula intentando evitarle un excesivo estrés; se abre la cánula implantada con ayuda de una tijera por el extremo sellado, se introduce una jeringuilla Hamilton (Model 7001KH 25s, *Hamilton*) y se produce a su vaciado una vez que está correctamente insertado. Al retirar la aguja es necesario extremar el cuidado sujetando la cánula para evitar su desplazamiento del lugar de inserción. Este procedimiento se repite en el mismo individuo durante varios días consecutivos, pero nunca más de 8-10 días desde la implantación de la cánula.

La vía ICV se ha usado en esta tesis para la administración crónica y constante de sustancias mediante bombas osmóticas. La cánula se conecta mediante un catéter de silicona de grado médico (Degania) a la bomba osmótica (Modelo 2001, *Alzet Osmotic Pumps*, Cupertino, CA, USA) y se sella la unión con cianoacrilato (*SuperGlue-3, Loctite*). La bomba osmótica, que contiene la sustancia de interés se coloca en el espacio interescapular del animal y se sutura mediante seda quirúrgica. Esto nos permite un flujo constante de la sustancia inoculada a un ritmo según indica el fabricante (1 μL /hora aproximadamente) durante 6-7 días.

Antes de la implantación en el animal, las bombas se cargaron con las sustancias a inyectar o con su correspondiente vehículo; posteriormente se les colocó el catéter en la zona de expulsión (para la posterior conexión con las cánulas ICV). Luego se colocaron en un baño a 37°C durante toda la noche, para que se hidratasen y comenzaran a expulsar la sustancia desde el mismo momento que se implantan en el animal.

3.1.2.2. Monitorización de la ingesta y de la masa corporal

La determinación de la masa corporal y de la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión; los animales fueron pesados diariamente así como su comida, siempre más o menos a la misma hora en cada experimento (aproximadamente cercano a la hora de inicio de la fase oscura). En el caso en que los animales fueron mantenidos en grupo en una misma caja (durante la fase de ganancia de peso en HFD), la ingesta se promedió en función del número de individuos de cada caja

3.1.2.3. Determinación de la temperatura corporal y del BAT

La determinación de la temperatura corporal central de los animales se registró mediante la introducción vía rectal de una sonda conectada a un termómetro digital (BAT-12 Microprobe-Thermometer, *Physitemp*, NJ, US).

Con objeto de obtener una medida en tiempo real, no invasiva y precisa de la temperatura del BAT, se recurrió al uso de cámara térmica para registrar en forma de imagen la radiación infrarroja de la zona interescapular del individuo vivo, donde se localiza el BAT. Para ello se utilizó una cámara termográfica (B335 Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera, *FLIR*, West Malling, Kent, UK) situada a 50 cm de la zona interescapular previamente rasurada y se obtuvieron las termografías con un rango de temperatura entre 26°C y 39°C. Las imágenes obtenidas se analizaron con un software específico suministrado por la casa comercial (*FLIR-Tools-Software*, *FLIR*, West Malling, Kent, UK).

3.1.2.4. Determinación de la composición corporal

El análisis de la composición corporal se hizo a través de una técnica de resonancia magnética nuclear (Whole Body Composition Analyzer, *EchoMRI*, Houston, Texas, USA); con ella se obtuvieron datos de la composición de masa grasa y masa magra de cada animal. *EchoMRI* es un analizador de composición corporal para sujetos vivos que miden la grasa corporal y las masas magras con tiempos de escaneo cortos para mantener el confort de los animales.

3.1.2.5. Test de tolerancia oral a glucosa

Tras una noche de ayuno se realizó la administración de glucosa (2 mg/g de D-glucosa (*Sigma*, St Louis, MO, EUA)) mediante una sonda de *gavage* oral. La glucemia se midió a los 0, 30, 60, 90 y 120 min después de administrar la glucosa con un glucómetro (*Accucheck*, *Roche*, Barcelona, España).

3.1.2.6. Test de tolerancia a insulina

En animales *ad libitum* se realizó la administración de insulina (0.75 U/kg de insulina (*Actrapid*, *Novonordisk*, Bagsvaerd, Dinamarca)) mediante inyección intraperitoneal. La glucemia se midió a los 0, 15, 30 y 60 min después de administrar la insulina con un glucómetro (*Accucheck*, *Roche*, Barcelona, España).

La evaluación del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó de la siguiente manera: $HOMA-IR = (FPI \times FPG) / 22.5$ (FPI: insulina en plasma en ayunas (mU/L), FPG, glucosa en plasma en ayunas (mmol/L)).

3.1.2.7. Test de tolerancia a leptina

Tras una noche de ayuno se realizó la administración de leptina (10 μg , *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.) vía ICV en ratas previamente canuladas. La ingesta de los animales se midió al cabo de 12 horas.

3.1.2.8. Análisis por calorimetría indirecta

Para el análisis del estado metabólico de los animales se usó el sistema de calorimetría indirecta. Esta metodología nos permitió cuantificar de manera indirecta el gasto energético (EE) y el cociente respirato (RQ) a partir de los valores medidos de consumo de O_2 ($v\text{O}_2$) y producción de CO_2 ($v\text{CO}_2$). El EE se puede estimar mediante la ecuación de Weir: $\text{EE}=[3.941(v\text{O}_2)+1.106(v\text{CO}_2)]\times 1.44$. Por otra parte el RQ de cada individuo se calculó dividiendo el $v\text{CO}_2$ entre el $v\text{O}_2$ ($\text{RQ}=v\text{CO}_2/v\text{O}_2$). El RQ tiene una relación directa con el tipo de sustrato que se está metabolizando en un momento determinado ya que la relación estequiométrica entre CO_2 y O_2 para oxidar un mol de lípidos, carbohidratos o proteínas es diferente para cada uno de ellos. Así pues, el RQ oscila normalmente entre 0.7 y 1.0 en función de si se están metabolizando lípidos o carbohidratos respectivamente.

Para llevar a cabo la calorimetría indirecta (LabMaster, *TSE Systems*, Bad Homburg, Alemania) los animales se estabularon individualmente durante 48 h, para su adaptación al nuevo ambiente, en cajas metabólicas termostalizadas (24°C) a través de la cuales se bombeó aire. Previamente se calibró el sistema con los gases de referencia (20.9% de O_2 , 0.05% de CO_2 y 79.05% de N_2). A partir de ese momento se registró cada 30 minutos, durante 72 horas, el consumo de O_2 ($v\text{O}_2$) y la producción de CO_2 ($v\text{CO}_2$). Con los valores obtenidos, se calculó el RQ de cada individuo durante cada medición. El valor de gasto energético (EE) estimado fue normalizado por la masa magra del animal, determinada al final de la calorimetría indirecta mediante NMR.

3.1.3. Procedimientos quirúrgicos

3.1.3.1. Anestesia y analgesia

Previamente a la realización de un procedimiento quirúrgico se indujo una anestesia general a todos los animales. La composición de la anestesia fue de 42.5% de ketamina (Imalgene 1000 inyectable, *Merial*, Barcelona, España), 20% xilazina (Rompún 2%, *Bayer Health Care*, Berlin, Alemania) y 37.5% de suero salino fisiológico (Suero fisiológico isotónico, *Physan*, Madrid, España), a una dosis de 200 $\mu\text{L}/100$ gramos de masa corporal por vía IP, a excepción de procedimiento de registro de la actividad simpática. La confirmación del estado de anestesia de cada animal, se comprobó mediante el reflejo podal y palpebral, siendo su ausencia indicativo de un estado de anestesia óptimo.

Posteriormente a la realización de un procedimiento quirúrgico se administró un tratamiento analgésico a los animales con ketoprofeno (ketoprofeno-Orudis 100 mg, *Sanoli aventis*, Barcelona, España), a una dosis de 2.5 mg por Kg de masa corporal por vía subcutánea (SC).

3.1.3.2. Canulación ICV

Se llevó a cabo este procedimiento en todos aquellos experimentos que requerían la administración de sustancias a nivel central, directamente en el cerebro, en el ventrículo lateral. Las cánulas usadas para este efecto, consistían en un tubo de polietileno (PE-20, BD Intradermic Polyethylene tubing (Non-Sterile), *Becton Dickison and Company*, Franklin Lakes, NJ, USA) de 1.09 mm de diámetro exterior y 0.38 mm de diámetro interior. Se cortó uno de los extremos en forma de bisel con un ángulo de 45° y con una longitud de 0.5 mm, a 4 mm de este bisel donde se insertó un tope. La longitud total de la cánula es de 3.5 mm. El otro extremo se selló hasta el momento de la administración del tratamiento. Una vez anestesiados los animales y comprobado su estado de anestesia, se les practicó un corte transversal en la piel de la cabeza (por delante de las orejas) perpendicular a la sutura sagital de aproximadamente 1.5 cm. Con ayuda de un mosquito se mantuvo la piel retirada para tener una óptima visión del plano quirúrgico. Posteriormente se separó el tejido subcutáneo del cráneo dejando al descubierto la inserción entre la sutura sagital y la sutura coronal, es decir, el bregma; si se producía sangrado se presionó el cráneo con una gasa durante unos segundos hasta el cese de dicho sangrado. Tras la correcta localización del bregma, se realizó una perforación en el cráneo (al lado derecho o izquierdo del bregma) con una broca quirúrgica a una distancia lateral de 1.5 mm de la sutura sagital y 0.9 mm posterior al bregma. Tras reducir el eventual sangrado con una gasa, se introdujo la cánula en el orificio por el extremo biselado, de manera paralela al eje dorso-ventral del animal. Finalmente, la cánula se fijó al cráneo del animal con el adhesivo cianoacrilato (*SuperGlue-3, Loctite*). Tras la canulación los animales se estabularon individualmente y se dejó un periodo de recuperación de entre 3-4 días antes de proceder a la inyección de las sustancias.

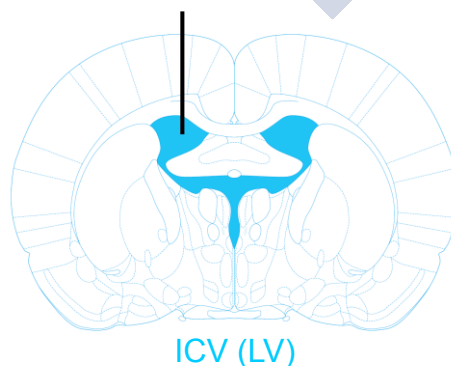


Figura 17. Representación esquemática del emplazamiento de la cánula en el ventrículo lateral de rata. Modificada de (Paxinos and Watson, 2007), con permiso de Elsevier.

3.1.3.3. Estereotaxia

Este procedimiento quirúrgico se realizó en aquellos animales donde el procedimiento experimental requería la inoculación de sustancias en núcleos específicos del hipotálamo. Tras la anestesia general de los animales se les realizó un corte transversal en la piel de la cabeza por detrás de las orejas. Se retiró la piel con ayuda de un mosquito para mantener visible el plano quirúrgico y se les separó el tejido subcutáneo del cráneo dejando al descubierto la zona circundante al bregma. Posteriormente se marcó el bregma para tomarlo como punto de referencia para la posterior localización de las coordenadas y se colocó al animal en un instrumento de estereotaxia (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA, USA). Una vez fijada la rata en el aparato se anotaron las coordenadas de referencia correspondientes al punto bregma.

Núcleo hipotalámico	Eje antero-posterior	Eje lateral	Eje dorso-ventral
VMH	2.4-3.2 mm	0.6 mm	10.1 mm
ARC	2.8 mm	0.3 mm	10.2 mm

Tabla 1. Coordenadas estereotáxicas de referencia.

Posteriormente, se perforó el cráneo en cada punto de las coordenadas con una broca quirúrgica y se procedió a la inyección de la sustancia. En cada inyección se inoculó 1 μ L de sustancia durante 5 minutos para el caso de ratas (velocidad de administración: 200nL/min). Una vez terminada la inoculación se procedió a la sutura del corte en la piel mediante la ayuda de seda de sutura (*Ethicon Mersilk Soie*, Special 2-0, *Johnson and Johnson company*, Alemania) y se estabularon los animales de forma individual.

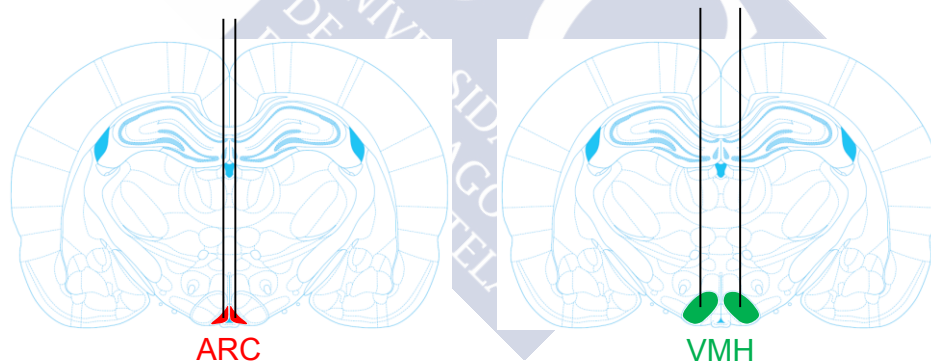


Figura 18. Representación esquemática de la localización de las inyecciones estereotáxicas en el ARC y en el VMH de rata. Modificada de (Paxinos and Watson, 2007), con permiso de Elsevier.

3.1.3.4. Ovariectomía

Tras la anestesia general de los animales se procedió a realizar una ovariectomía bilateral. En el costado de la rata se rasuró un área a la altura del tercio caudal, entre la cadera y las costillas y se desinfectó la piel con povidona yodada (Betadine). Se realizó una laparotomía media para acceder a la región ovárica, se hizo una ligadura en la parte distal del útero, se

aisló del tejido adiposo adyacente, se extirpó el ovario y se devolvió a la cavidad abdominal. La pared abdominal se suturó mediante puntos simples con seda quirúrgica y la piel se suturó con grapas quirúrgicas (Ethicon Endo-Surgery Skin Stapler, 35 wide, *Jonson and Jonson company*, Alemania). Se repitió el mismo procedimiento para extirpar el otro ovario. Para generar los animales control de las ratas OVX, se realizó una simulación quirúrgica en otros individuos (Sham), a los que no se les extirparon los ovarios. Una vez realizado el procedimiento quirúrgico se estabularon las ratas en cajas colectivas y todos los tratamientos (centrales o periféricos) en ratas OVX se llevaron a cabo dos semanas después de la cirugía para asegurar un aclaramiento total de los estrógenos producidos por los ovarios.

3.1.3.5. Registro de la actividad simpática

Una vez anestesiados los animales del modo previamente descrito, se les mantuvo bajo anestesia mediante el uso de α -cloralosa (dosis inicial: 25 mg/kg, dosis repetidas: 50 mg/kg/h) administrada vía catéter en la vena femoral. Se les practicó una traqueotomía para permitir la correcta respiración y se monitorizó y mantuvo la temperatura rectal a 37.5°C usando una mesa quirúrgica de temperatura controlada y una lámpara. Se identificó e inervó una fibra nerviosa interescapular en el BAT usando un microscopio de disección y se colocó sobre un electrodo bipolar de platino-iridio unido a una sonda de alta impedancia (HIP-511, *Grass Instruments*, West Warwick, RI, USA). La señal se amplificó 105 veces con la ayuda de un preamplificador (Grass P5 AC). Tras la amplificación, se filtró la señal a 100 y 1000 Hz. A continuación, la señal del nervio se acopló a un osciloscopio (54501A, *Hewlett-Packard*, Iowa, USA) para monitorizar la calidad del registro del nervio. Las medidas de actividad del SNS en el BAT se realizaron cada 15 minutos durante 6 horas tras las inyecciones ICV. Para asegurar que el ruido eléctrico era excluido durante el estudio, cada registro se corrigió por la actividad del nervio post-mortem.

El protocolo experimental de registro de la actividad simpática fue realizado por el Dr. Kamal Rahmouni, Departments of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, 52242, USA.

3.1.3.6. Ensayo de sensibilidad a insulina

Tras la anestesia general de los animales se realizó una laparotomía para acceder a la vena porta. Treinta segundos después de la inyección de insulina en la vena porta (100 U/mL, Actrapid, *Novonordisk*, Bagsvaerd, Dinamarca) se disecó el hígado y 90 segundos más tarde se disecó el músculo gastrocnemio. Todas las muestras se homogeneizaron inmediatamente en hielo.

3.1.3.7. Perfusión intracardiaca

El cerebro de la rata se fija mediante perfusión intracardiaca como paso previo al estudio inmunohistoquímico. Tras la anestesia general del animal con el anestésico habitual se coloca el animal en posición decúbito dorsal y se procede a la apertura de la cavidad abdominal. Tras la localización del apéndice xifoides, este se levanta ligeramente con unas pinzas procediendo a la rotura del diafragma y al corte de las parrillas costales. Tras la apertura de la caja torácica y del pericardio, se administraron en una inyección intracardiaca 200 μ L de heparina (Heparina sódica Mayne 5%, *Mayne Pharma*) en el ventrículo izquierdo, con el fin de evitar problemas de coagulación en los vasos durante la perfusión.

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

3.1.3.8. Sacrificio y disección de tejidos

Al término de cada procedimiento experimental se sacrificaron los individuos por luxación cervical y decapitación posterior según las normas y leyes de experimentación animal. Se extrajeron los tejidos pesando los acúmulos adiposos y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis. En los casos en los que se requiriera hacer microdisección, se llevó a cabo bajo una lupa óptica de 20 aumentos.

3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Tratamiento ICV crónico con ceramida C6

Para determinar los efectos metabólicos tras el incremento central de los niveles de ceramidas se procedió al tratamiento ICV crónico con ceramida C6. Para ello, se canuló el ventrículo lateral de ratas Sprague-Dawley macho y se implantó una bomba osmótica conectándola a la cánula ICV. Durante los 5 días posteriores se administró ceramida C6 (N-hexanoyl-D-sphingosine; 1.25 mg/mL, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (solución salina conteniendo un tercio de DMSO). La dosis usada se basó en estudios anteriores (Ramirez et al., 2013).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Vehículo (ICV)
- Ceramide 6 (ICV)



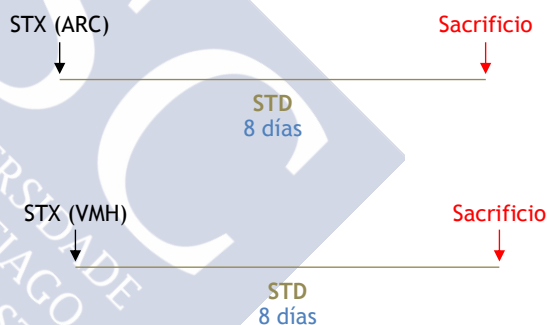
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.2. Inyección estereotáxica en VMH y ARC de Ad GRP78

Con el objetivo de evaluar la función de GRP78 en el hipotálamo sobre el balance energético, sobreexpresamos genéticamente dicha chaperona. Para ello, se inyectó mediante estereotaxia en el ARC de ratas Sprague-Dawley macho adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control.

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Ad GFP (ARC)
- Ad GRP78 (ARC)
- Ad GFP (VMH)
- Ad GRP78 (VMH)



Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

Para investigar la contribución del ER stress inducido por ceramidas en un contexto de obesidad genética, modulamos los niveles de ER stress hipotalámico en animales con una mutación en el receptor de leptina, ratas Zucker obesas (OZR). Para ello, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH de ratas Zucker macho obesas (OZR, *fa/fa*) y ratas Zucker macho delgadas (LZR, *fa/-*) (*Charles River*, Barcelona, España), adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control.

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- LZR Ad GFP (VMH)
- LZR Ad GRP78 (VMH)
- OZR Ad GFP (VMH)
- OZR Ad GRP78 (VMH)



Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.3. Inyección estereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento ICV crónico con ceramida C6

Con el objetivo de evaluar el papel del ER stress hipotalámico sobre las acciones inducidas por las ceramidas en el balance energético y además esclarecer qué núcleo hipotalámico era el encargado de mediar estos efectos sobreexpresamos la chaperona GRP78. Para ello, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH de ratas Sprague-Dawley macho adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE.UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control. En la misma cirugía se canuló el ventrículo lateral y se implantó una bomba osmótica conectándola a la cánula ICV. Durante los 6 días posteriores se administró ceramida C6 (N-hexanoyl-D-sphingosine; 1.25 mg/mL, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (solución salina conteniendo un tercio de DMSO). La dosis usada se basó en estudios anteriores (Ramirez et al., 2013).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Vehículo Ad GFP (VMH)
- Vehículo Ad GRP78 (VMH)
- Ceramida Ad GFP (VMH)
- Ceramida Ad GRP78 (VMH)



Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.4. Inyección extereotáxica en VMH y ARC de Ad GRP78 DN

Para estudiar el efecto de la inducción de ER stress hipotalámico sobre el balance energético y sobreexpresamos GRP78 DN, una forma inactiva de la proteína GRP78. Para ello, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH o el ARC de ratas Sprague-Dawley macho adenovirus codificantes para GRP78 DN (10^8 partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control.

Los grupos generados en estos diseños experimentales fueron:

- Ad GFP (ARC)

- Ad GRP78 DN (ARC)

- Ad GFP (VMH)

- Ad GRP78 DN (VMH)

STX (ARC)

Sacrificio

STD
8 días

STX (VMH)

Sacrificio

STD
8 días

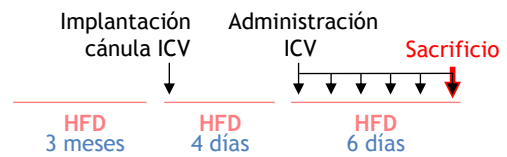
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.5. Inducción de obesidad por HFD y tratamiento ICV crónico con TUDCA

Para investigar los efectos de la reducción del ER stress en un contexto de obesidad inducida por dieta, administramos a nivel central una chaperona química en animales alimentados con dieta HFD. Las ratas Sprague-Dawley macho se distribuyeron en dos grupos principales de alimentación: 1) dieta estándar de laboratorio (STD, SAFE A04: 3.1% grasa, 59.9% carbohidratos, 16.1% proteínas, 2.791 kcal/g; *Scientific Animal Food & Engineering*, Nantes, Francia) y 2) dieta alta en grasas (HFD, D12451: 45% de grasa, 35% de carbohidratos, 20% de proteínas, 4.73 kcal/g; *Research Diets, Inc*, New Brunswick, EE.UU.). Los animales fueron estabulados colectivamente (n=4 animales/jaula) durante 3 meses con ambas dietas hasta que comenzaron los procedimientos experimentales. En ese momento, se implantó una cánula en el ventrículo lateral de las ratas y se estabularon individualmente durante 4 días para su recuperación. Una vez pasado ese tiempo, se procedió a la inyección diaria de ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA, 10 mg/día, *Calbiochem*, Billerica, MA, EE.UU.) o vehículo (PBS) durante 6 días consecutivos. La dosis usada se basó en estudios anteriores (Zhang et al., 2008; Schneeberger et al., 2013).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- STD (3 meses) Vehículo (ICV)
- STD (3 meses) TUDCA (ICV)
- HFD (3 meses) Vehículo (ICV)
- HFD (3 meses) TUDCA (ICV)



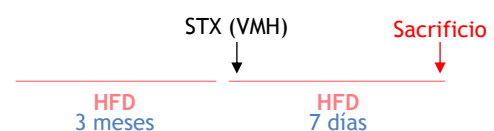
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.6. Inducción de obesidad por HFD e inyección estereotáxica en VMH de Ad GRP78

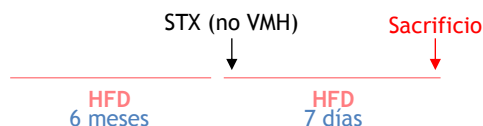
Para determinar el papel de la modulación genética del ER stress en un contexto de obesidad inducida por dieta, sobreexpresamos genéticamente la chaperona GRP78 en dos modelos distintos, por su tiempo de duración, de obesidad inducida por dieta. Las ratas Sprague-Dawley macho se distribuyeron en dos grupos principales de alimentación: 1) dieta estándar de laboratorio (STD, SAFE A04: 3.1% grasa, 59.9% carbohidratos, 16.1% proteínas, 2.791 kcal/g; *Scientific Animal Food & Engineering*, Nantes, Francia), y 2) dieta alta en grasas (HFD, D12451: 45% de grasa, 35% de carbohidratos, 20% de proteínas, 4.73 kcal/g; *Research Diets, Inc*, New Brunswick, EE. UU.). Los animales fueron alojados colectivamente (n=4 animales/jaula) durante 3 o 6 meses con estas dietas hasta que comenzaron los procedimientos experimentales. En ese momento, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control. En los animales con HFD durante 3 meses también se realizó un experimento de inyección en áreas hipotálamicas próximas al VMH, evitando infectar las poblaciones neuronales que componen el VMH.

Los grupos generados en estos diseños experimentales fueron:

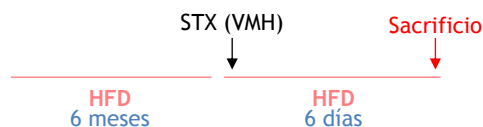
- STD (3 meses) Ad GFP (VMH)
- STD (3 meses) Ad GRP78 DN (VMH)
- HFD (3 meses) Ad GFP (VMH)
- HFD (3 meses) Ad GRP78 DN (VMH)



- HFD (3 meses) Ad GFP (no VMH)
- HFD (3 meses) Ad GRP78 DN (no VMH)



- STD (6 meses) Ad GFP (VMH)
- STD (6 meses) Ad GRP78 DN (VMH)
- HFD (6 meses) Ad GFP (VMH)
- HFD (6 meses) Ad GRP78 DN (VMH)



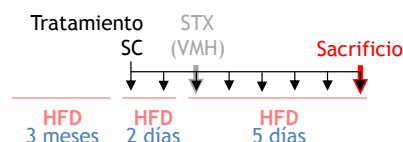
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.7. Inducción de obesidad por HFD, inyección extereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento SC con SR59230A

Para esclarecer si los efectos del ER stress hipotalámico pudieran estar mediados por el SNS, sobreexpresamos genéticamente la chaperona GRP78 y bloqueamos farmacológicamente la activación del BAT. Las ratas Sprague-Dawley macho fueron alojados colectivamente (n=4 animales/jaula) durante 3 meses con dieta alta en grasas (HFD, D12451: 45% de grasa, 35% de carbohidratos, 20% de proteínas, 4.73 kcal/g; Research Diets, Inc; New Brunswick, EE. UU.) hasta que comenzaron los procedimientos experimentales. En ese momento, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control. Paralelamente se administró por vía subcutánea el antagonista específico del β 3-AR (SR59230A; 3-(2etilfenoxi)-1-[(1,S)-1,2,3,4-tetrahidronaft-1-ilamino]-2S-2-propanol-oxalato; 3 mg/kg/día, *Tocris Bioscience*, Bristol, UK) o el vehículo (solución salina:DMSO [1:50]) durante los 7 días y comenzando 2 días antes de las inyecciones estereotáxicas con Ad GRP78. La dosis usada se basó en estudios anteriores (Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- HFD (3 meses) Ad GFP (VMH) Vehículo (SC)
- HFD (3 meses) Ad GRP78 DN (VMH) Vehículo (SC)
- HFD (3 meses) Ad GRP78 DN (VMH) SR59230A (SC)



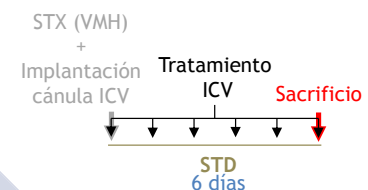
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.8. Tratamiento ICV crónico con taspigargina e inyección estereotáxica en VMH de Ad GRP78

Con el objetivo de investigar la función de GRP78 en un modelo de ER stress inducido farmacológicamente, sobreexpresamos genéticamente la chaperona GRP78 en animales tratados con un inhibidor no competitivo de la Ca^{2+} ATPasa del ER (SERCA) que desencadena ER stress. Para ello, se inyectó mediante estereotaxia en el VMH de ratas Sprague-Dawley macho adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*; North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control. En la misma cirugía se implantó una cánula en el ventrículo lateral de las ratas y se procedió a la inyección diaria de taspigargina (0.2 mg/día, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (DMSO) durante 6 días consecutivos.

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Vehículo (ICV) Ad GFP (VMH)
- Taspigargina (ICV) Ad GFP (VMH)
- Taspigargina (ICV) Ad GRP78 (VMH)



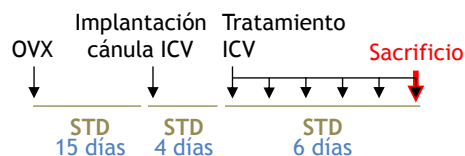
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.9. OVX y tratamiento ICV crónico con E2

Con la intención de estudiar los efectos centrales del E2 en la homeostasis energética, generamos un modelo de deficiencia estrogénica y sometimos a estos animales a un tratamiento de reemplazo con estrógenos. Para ello, se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) o Sham-operadas 15 días antes de la canulación ICV. En ese día se implantó una cánula en el ventrículo lateral de las ratas y se estabularon individualmente durante 4 días para su recuperación. Una vez pasado ese tiempo, se procedió a la inyección diaria de E2 (17β -estradiol; 1 nmol disuelto en 5 μL de vehículo; *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (5 μL de solución salina conteniendo un 10% de DMSO) durante 6 días consecutivos. La dosis de E2 se seleccionó por haberse demostrado anteriormente que se encuentra en el rango fisiológico y que no se filtra a la periferia desde el líquido cefalorraquídeo (Martinez de Morentin et al., 2014; Martinez de Morentin et al., 2015).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Sham Vehículo (ICV)
- OVX Vehículo (ICV)
- OVX E2 (ICV)



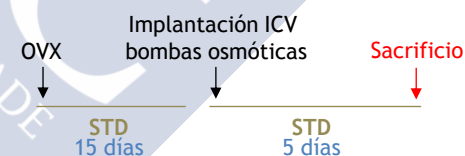
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.10. OVX y tratamiento ICV crónico con miriocina

Para determinar la importancia funcional de las ceramidas en el contexto de la deficiencia estrogénica, administramos a nivel central un inhibidor farmacológico de la síntesis *de novo* de ceramidas en animales hembra sin estrógenos endógenos. Para ello, se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) o Sham-operadas 15 días antes de la implantación de las bombas osmóticas. En ese día, se canuló el ventrículo lateral de las ratas y se implantó una bombas osmótica conectándola a la cánula ICV. Durante los 6 días posteriores se administró miriocina (4 µg/día, *Sigma*; St Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (solución salina conteniendo un tercio de DMSO). La dosis usada se basó en estudios anteriores (Ramirez et al., 2013).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Sham Vehículo (ICV)
- OVX Vehículo (ICV)
- OVX Miriocina (ICV)



Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

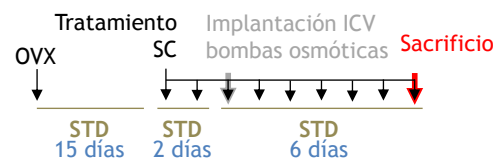
3.2.11. OVX, tratamiento ICV crónico con miriocina y tratamiento SC con SR59230A

Para esclarecer si los efectos metabólicos de los estrógenos que están modulados a través de las ceramidas pudieran estar mediados por el SNS, administramos a nivel central un inhibidor farmacológico de la síntesis *de novo* de ceramidas en animales hembra sin estrógenos endógenos y bloqueamos farmacológicamente la activación del BAT. Para ello, se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) 15 días antes de la implantación de las bombas osmóticas. En ese día, se canuló el ventrículo lateral de las ratas y se implantó una bomba osmótica conectándola a la cánula ICV. Durante los 6 días posteriores

se administró miriocina (4 µg/día, *Sigma*, St Louis, MO, EE.UU.) o vehículo (solución salina conteniendo un tercio de DMSO). La dosis usada se basó en estudios anteriores (Ramirez et al., 2013). Paralelamente se administró por vía subcutánea el antagonista específico del β3-AR (SR59230A; 3-(2etilfenoxi)-1-[(1,S)-1,2,3,4-tetrahidronaft-1-ilamino]-2S-2-propanol-oxalato; 3 mg/kg/día; *Tocris Bioscience*, Bristol, UK) o el vehículo (solución salina:DMSO [1:50]) durante los 6 días y comenzando 2 días antes de las inyecciones estereotáxicas con Ad GRP78. La dosis usada se basó en estudios anteriores (Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- OVX Vehículo (ICV) Vehículo (SC)
- OVX Vehículo (ICV) Vehículo (SC)
- OVX Miriocina (ICV) SR59230A (SC)



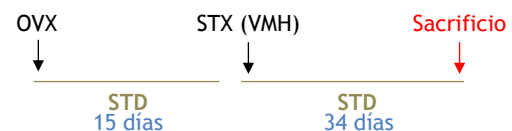
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.12. OVX e inyección extereotáxica en VMH de Ad shSPTLC1

Con intención de averiguar el núcleo hipotalámico responsable de las acciones de los estrógenos, realizamos un silenciamiento genético de la enzima limitante de la síntesis *de novo* de ceramidas en modelos de deficiencia estrogénica. Para ello, en ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) y Sham operadas con 15 días de antelación se inyectaron mediante estereotaxia en el VMH adenovirus codificantes para shSPTLC1 (*short hairpin serine palmitoyltransferase long chain subunit 1*; 1.1×10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control.

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Sham Ad GFP (VMH)
- Sham Ad shSPTLC1 (VMH)
- OVX Ad GFP (VMH)
- OVX Ad shSPTLC1 (VMH)



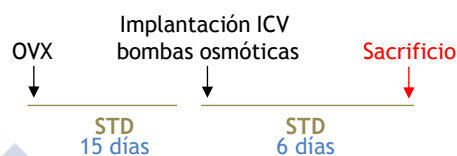
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.13. OVX y tratamiento ICV crónico con TUDCA

Para investigar los efectos de la reducción del ER stress en un contexto de deficiencia estrogénica, administramos a nivel central una chaperona química en animales hembra sin estrógenos endógenos. Para ello, se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) 15 días antes de la implantación de las bombas osmóticas. En ese día, se canuló el ventrículo lateral y se implantó una bomba osmótica conectándola a la cánula ICV. Durante los 6 días posteriores se administró ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA, 10 mg/día, *Calbiochem*, Billerica, MA, EE.UU.) o vehículo (PBS). La dosis usada se basó en estudios anteriores (Zhang et al., 2008; Schneeberger et al., 2013).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Sham Vehículo (ICV)
- Sham TUDCA (ICV)
- OVX Vehículo (ICV)
- OVX TUDCA (ICV)



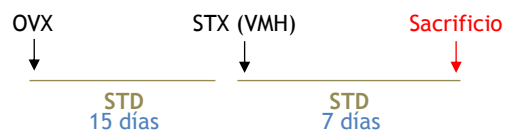
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.14. OVX e inyección estereotáxica en VMH de Ad GRP78

Para determinar el papel del ER stress en las acciones metabólicas centrales de los estrógenos, sobreexpresamos genéticamente una chaperona en un modelo de deficiencia estrogénica. Para ello, en ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) y Sham operadas con 15 días de antelación se inyectaron mediante estereotaxia en el VMH adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control.

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- Sham Ad GFP (VMH)
- Sham Ad GRP78 (VMH)
- OVX Ad GFP (VMH)
- OVX Ad GRP78 (VMH)



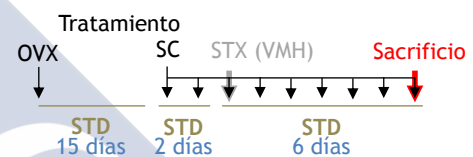
Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.2.15. OVX, inyección estereotáxica en VMH de Ad GRP78 y tratamiento SC con SR59230A

Para estudiar si la reducción del ER stress hipotalámico que producen los estrógenos es capaz de modular la actividad del SNS y si esto es relevante metabólicamente, realizamos un bloqueo del SNS en un modelo de deficiencia estrogénica en el que se sobreexpresó genéticamente una chaperona. Para ello, en ratas Sprague-Dawley hembra ovariectomizadas (OVX) y Sham operadas con 15 días de antelación se inyectaron mediante estereotaxia en el VMH adenovirus codificantes para GRP78 (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, EE. UU.) o GFP (10^{12} partículas/mL, *Viraquest*, North Liberty, IA, USA) como control. Paralelamente se administró por vía subcutánea el antagonista específico del β 3-AR (SR59230A; 3-(2etilfenoxi)-1-[(1,S)-1,2,3,4-tetrahidronaft-1-ilamino]-2S-2-propanol-oxalato; 3 mg/kg/día disuelto en solución salina/DMSO [1:50]; *Tocris Bioscience*, Bristol, UK) o el vehículo (solución salina:DMSO [1:50]) durante los 6 días y comenzando 2 días antes de las inyecciones estereotáxicas con Ad GRP78. La dosis usada se basó en estudios anteriores (Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014).

Los grupos generados en este diseño experimental fueron:

- OVX GFP (VMH) Vehículo (SC)
- OVX GRP78 (VMH) Vehículo (SC)
- OVX GRP78 (VMH) SR59230A (SC)



Tras el procedimiento quirúrgico las ratas se estabularon individualmente y se monitorizó de manera diaria el peso corporal y la ingesta de comida.

3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

3.3.1. Western Blot

3.3.1.1. Extracción de proteína

En el momento inicial de la extracción se separó una porción de tejido para ser procesado y el resto de la muestra se volvió a congelar a -80°C . Durante todo el proceso de extracción, las muestras estuvieron refrigeradas a 0°C para evitar la degradación de las proteínas. En un tubo eppendorf de 2 mL con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2.0 mL, *Eppendorf*, Hamburgo, Alemania) se le añadió un volumen determinado de tampón de lisis (composición en tabla) con inhibidor de proteasas (Complete TM, *Roche*, Mannheim, Alemania), dependiendo del tejido del que se fuera a extraer proteína (volumen entre 200 μL y 1000 μL). Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (TissueLyser II, *Qiagen*, Germantown, MD, USA) durante 2-3 minutos con una frecuencia de unas 30 Hz. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 minutos a 13200 rpm y a 4°C (en el caso de WAT y BAT se realizó otra centrifugación de

unos 10 minutos para eliminar mejor la grasa). Se retiró el sobrenadante en varias alícuotas y se congelaron a -80°C , hasta el momento de su análisis.

Tampón de lisis (pH 7.5)	
Tris-HCL (pH 7.5)	2.5 mL
EGTA (0.2 M, pH8)	2.5 mL
EDTA (0.2 M, pH8)	2.5 mL
Tritón X-100	5 mL
Na_3VO_4 (0.1 M)	5 mL
NaF	1 g
Na_4OP_2	1.1 g
Sacarosa	46 g
H_2O	c.s.p. 500mL
Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE)	1 comprimido por cada 50 mL

Tabla 2. Composición del tampón de lisis.

3.3.1.2. Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas en la extracción se mantuvieron a 4°C en hielo y se utilizó procedimiento realizado por el método colorimétrico de Bradford, utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (Protein Assay Dye Reagent, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA). Para ello, se procedió a diluir cada muestra por un factor de 1:26 en H_2O destilada tubos eppendorfs. En una placa de 96 pocillos, se cargaron por duplicado 10 μL de cada muestra, y posteriormente 250 μL de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:4 en H_2O destilada y a una temperatura de 37°C . Además en cada placa, se realizó una recta de calibrado, mediante una dilución seriada de BSA (Albumin bovine fraction V powder, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) con 7 puntos duplicados (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.125, 0.25, 0.5, 0.7 y 1mg/mL). Luego en un lector de placas (Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, *Thermo Scientific*, Rockford, IL, USA) se incubó la placa durante 5 min a 37°C y se midió la colorimetría en OD (optical density) en cada pocillo a una longitud de onda de $\lambda=595\text{nm}$. A través de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra. Una vez determinada la cantidad de proteína de cada muestra se prepararon alícuotas a la concentración necesaria para cada análisis (10-20 $\mu\text{g}/16 \mu\text{L}$).

3.3.1.3. Preparación de las muestras

Las proteínas son separadas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis). Al tratarse de una técnica que se basa en la separación de proteínas por su masa molecular, en base a su migración en un campo eléctrico, es necesario neutralizar una serie de características de las proteínas que darían lugar a patrones de migración erróneos e identificaciones incorrectas. Por un lado, es necesario eliminar la estructura cuaternaria de la proteína para poder reproducir una migración en el gel lo más proporcional posible a su tamaño. Y por otro lado, dado que las proteínas van a estar sometidas a un campo eléctrico, es necesario eliminar

la carga intrínseca de los polipéptidos, (desnaturalizarlos) y otorgarles el mismo signo de carga.

Para ello, se preparó una alícuota de cada muestra, con la misma concentración de proteína total (10-20 μg) en tampón de lisis con inhibidor de proteasas. A cada muestra además se le añadió la misma proporción de solución de carga 5X. Este tampón de carga proporciona a la alícuota la eliminación de la estructura cuaternaria de las proteínas (β -mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA), uniformiza su carga eléctrica de forma proporcional a su longitud (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA), una densidad mayor que facilita su carga en el gel (Glicerol, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). Además posee un colorante para identificar el frente de migración (azul de bromofenol, *MERK*, Darmstadt, Alemania).

Tampón de carga 5X (pH 6.8)	
SDS	2 mL
Trizma-base	8 mL
β -mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 mL
H ₂ O miliQ	c.s.p. 20 mL

Tabla 3. Composición del tampón de carga.

3.3.1.4. Electroforesis

La electroforesis se realizó en un gel que consiste de una estructura tridimensional, en forma de red, formada por la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida). El proceso de polimerización se cataliza por amonio persulfato (APS) (Ammonium persulfate, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) y TEMED (N,N,N,N-tetramethyletilenediamina, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). La concentración de acrilamida y bis-acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas según su tamaño. El gel consiste de dos fracciones, una fracción concentradora con 4% de acrilamida/bis-acrilamida, en la que se agrupan las muestras a cargar, de manera que la separación de las proteínas de las diferentes muestras ocurra de forma simultánea, y una fracción separadora con 6%, 8% y 10% en función del tamaño de la proteína de interés.

Gel concentrador 4%	
H ₂ O destilada	3.4 mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	0.83 mL
Tris (1.5 M, pH 8.8)	0.63 mL
SDS (10%)	50 μL
APS (10 %)	50 μL
TEMED	5 μL

Tabla 4. Composición del gel de acrilamida concentrador.

Gel separador	6%	8%	10%
H ₂ O destilada	5.3 mL	4.6 mL	4 mL
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	2 mL	2.7 mL	3.3 mL
Tris (1.5 M, pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS (10%)	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL
APS (10 %)	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL
TEMED	8 µL	6 µL	4 µL

Tabla 5. Composición de los geles de acrilamida separadores.

Los geles se montaron en un kit de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra Cell, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) y se sumergieron en tampón *running* 1X.

Tampón de <i>running</i> 5X	
Glicina	72 g
Trizima base	15 g
SDS	5 g
H ₂ O destila	c.s.p. 1 L

Tabla 6. Composición del tampón de *running*.

Previamente a la carga de las muestras en el gel se agitaron y se calentaron a 95°C durante 10 minutos y se volvieron a agitar. En cada pocillo del gel se cargaron 16 µL de muestra. En uno de los carriles se cargaron 5 µL de un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Standards-Dual Color, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA). En cada gel se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales. Una vez hecho esto, se sometieron las muestras a un campo eléctrico (voltaje constante de 140V-120V y amperaje de 180 mA), conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (PowerPac HC High Current Power Supply, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA), en el que se indujo la migración de las proteínas hacia el cátodo. Se detuvo la electroforesis cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de unos 0.5 cm del final del gel.

3.3.1.5. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas deben ser transferidas a una membrana para poder realizar el análisis de expresión de cada proteína; para ellos son sometidas a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde quedaran adsorbidas y donde se realizaran las incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo semi-seca, donde la membrana y el gel se situaban una debajo del otro y separadas por papeles absorbentes estos y las placas que creaban el voltaje (Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, *Bio-Rad*). Se utilizaron membranas de PVDF (Polivinylidene Fluoride Immobilion-P membrane, *Millipore*), cortadas con unas dimensiones de 8.5x6.5 cm, activadas previamente durante 4 min en metanol, 5 min en H₂O destilada y 5 min en tampón de transferencia.

Tampón de transferencia 25X		Tampón de transferencia 1X	
Glicina	36.5 g	Tampón de transferencia 25X	40 mL
Trizma base	72.5 g	Metanol	200 mL
SDS	4.5 g	H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 mL		

Tabla 7. Composición del tampón de transferencia.

El papel transferencia (Extra Thick Blot Paper, *Bio-Rad*) se empapó en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para la transferencia; el gel y la membrana se colocaron entre dos piezas de papel de transferencia de manera que así se creó un campo eléctrico necesario para la correcta transferencia; se eliminaron las posibles burbujas que podían quedar entre esta, el papel y el gel con un rodillo. Se realizó la transferencia durante 1h y 40min a un amperaje constante de 250 mA conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (PowerPac HC High Current Power Supply, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA). Para comprobar la correcta transferencia se tiñeron las membranas con colorante Rojo de Ponceau (Ponceau S Red, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). Para eliminar la tinción fue suficiente con hacer un par de lavados con tampón de lavado.

3.3.1.6. Inmunodetección de proteínas

Tras la transferencia la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 1h con tampón de bloqueo.

Tampón de bloqueo	
BSA	3 g
Tampón de lavado	100 mL

Tabla 8. Composición del tampón de bloqueo.

De esta manera se eliminaron las uniones inespecíficas ofrecidas por la membrana en todas aquellas áreas donde no existía proteína transferida. Posteriormente, se cortó la membrana tomando como referencia el marcador de pesos moleculares, de manera que, pudiéramos detectar en una misma membrana proteínas diferentes, de esta forma se pudieron detectar diferentes proteínas simultáneamente. Cada fragmento de membrana se incubó durante 1h a temperatura ambiente (en el caso concreto de los anticuerpos anti-UCP1 y anti- α -tubulin) o bien toda la noche a 4°C (en el resto de anticuerpos) con el anticuerpo primario diluido previamente en el tampón de bloqueo (referencias y diluciones específicas en Tabla 10). Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se retiró y se hicieron 3 lavados de 5 min con tampón de lavado a temperatura ambiente.

Tampón de lavado 10X (pH 7.6)		Tampón de lavado 1X	
Trizma base	24.2 g	Tampón de lavado 10X	100 mL
NaCl	80 g	Tween 20	1 mL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L	H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 9. Composición del tampón de lavado.

Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con Horseradish Peroxidase (referencias y diluciones específicas en Tabla 10), capaz de reconocer y unirse específicamente al anticuerpo primario utilizado.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Rabbit Anti-UCP1	Abcam (ab10983)	1:20000
Rabbit Anti-SPTLC2	Abcam (ab23696)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-IRE1 α (Ser724)	Abcam (ab48187)	1:1000
Rabbit Anti-IL6	Abcam (ab6672)	1:500
Rabbit Anti-SPTLC1	Abcam (ab84585)	1:1000
Rabbit Anti-IL1 β antibody	Abcam (ab9722)	1:1000
Rabbit Anti-TNF- α (D2D4)	Cell Signaling Technology (11948)	1:1000
Rabbit Anti-GRP78	Cell Signaling Technology (31835)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-PI3K (Tyr458)	Cell Signaling Technology (42285)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-Stat3 (Ser727)	Cell Signaling Technology (91345)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology (92715)	1:1000
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako (P0448)	1:5000
Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako (P0448)	1:5000
Rabbit Anti-Phospho-eIF2 α (Ser52)	Santa Cruz Biotechnology (sc-101670)	1:1000
Rabbit Anti-ATF6 α (H-280)	Santa Cruz Biotechnology (sc-22799)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-PERK (Thr981)	Santa Cruz Biotechnology (sc-32577)	1:500
Rabbit Anti-p-IKK α /B	Santa Cruz Biotechnology (sc-52)	1:1000
Rabbit Anti-GADD 153 (R-20)	Santa Cruz Biotechnology (sc-793)	1:1000
Rabbit Anti-SOCS3(H-103)	Santa Cruz Biotechnology (sc-9023)	1:1000
Mouse Anti- β -Actin	Sigma-Aldrich (A5316)	1:5000
Mouse Anti- α -tubulin	Sigma-Aldrich (T5168)	1:5000

Tabla 10. Relación de anticuerpos usados y dilución de los mismos.

3.3.1.7. Revelado y fijación de la señal

Se retira el anticuerpo secundario y se vuelven a hacer tres lavados; para proceder al revelado de la membrana se utilizó 1 mL de un sustrato de revelado que detecta el Horseradish Peroxidase en proporción 1:1 (Pierce ECL Western Blotting Substrate, *Cultek*). Se incuban las membranas durante 2 min en oscuridad con este sustrato. Una vez pasado el tiempo de incubación se colocaron las membranas en una casete de revelado (Hypercassette, *Amersham Biosciences*, Little Chalfont, Reino Unido) y se impermeabilizaron con la ayuda de papel transparente.

Se procedió a su revelado en una sala oscura destinada a tal fin. Se introdujo una hoja de revelado (FujiMedical X-Ray Film Super RX, *Fujifilm Corporation*, Tokio, Japón) sobre las membranas y se cerró el casete; se dejó exponer la señal quimioluminiscente durante unos segundos/minutos en función de la proteína. Luego se retiró la película y se sumergió en una solución reveladora (dilución 1:10) (G150, Developer/Replenisher, *Agfa-Gevaert Group*, Dubendorf, Suiza) hasta que se visualiza la señal buscada y en ese momento se sumerge la película en líquido fijador (dilución 1:5) (G354, Manual Fixing Bath, *Agfa-Gevaert Group*, Dubendorf, Suiza) durante un par de minutos con el fin de fijar la señal. Por último se lava la película con agua corriente y se deja secar.

3.3.1.8. Cuantificación

La cuantificación de la señal se realizó mediante la medición de la densidad óptica de la señal de cada muestra, a partir de las imágenes escaneadas (resolución 400 ppp, CanonScan 9900F, *Canon*, Tokio, Japón) de las películas autorradiografiadas, con el software informático ImageJ (*ImageJ-1.33 software*, Wayne Rasband, NIH, USA).

Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica de una región adyacente a la señal de las muestras.

3.3.2. RT-PCR

3.3.2.1. Extracción de RNA

Un pequeño fragmento de las muestras congeladas fue homogeneizado mecánicamente junto con 1000 μ L de Trizol (TRIZOL Reagent, *Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) durante 3 min (con el mismo sistema usado en el caso de la extracción proteica). Después de la homogeneización las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante unos 5 minutos. A continuación se añadió 1 mL de cloroformo (Chloroform, *Sigma-Aldrich*, St Louis, USA) a cada muestra y se agitaron fuertemente durante varios segundos con un posterior tiempo de reposo de unos 5 minutos. Luego, se centrifugaron 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se observó ya claramente 2 fases: una fase acuosa (donde se halla el RNA) y una fase orgánica (que contiene las proteínas y los lípidos). Entre ambas se sitúa la inter-fase (donde está el DNA). Se retira la fase acuosa con cuidado pasándola a otro tubo autoclavado y se desprecia la fase orgánica. De esa manera se separó el RNA del resto de los componentes celulares.

Una vez separado el RNA, se le añadió 1 mL de isopropanol (2-propanol, *Sigma-Aldrich*, St Louis, USA) a cada muestra, se agitaron y se colocaron a -20°C durante unos 10 minutos (consiguiendo así que el RNA precipite). Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras 10 minutos a 12000 rpm a 4°C para concentrar el RNA en el fondo. Una vez eliminado el sobrenadante se añadió 1 mL de etanol (Ethanol absolute PA, *Applichem/Pancreac*, Darmstadt, Alemania) al 70% en H₂O DEPC y tras una agitación corta se centrifugó durante unos 5 minutos a 12000 rpm y 4°C. Para eliminar la mayor cantidad de etanol posible, se volvió a centrifugar 1 minuto a 13500 rpm y 4°C, y posteriormente se retiró el sobrenadante con una pipeta. Finalmente se re-suspendió en H₂O DEPC calentándolo a 60°C durante 15 minutos.

3.3.2.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm proporcionó la

cantidad de ácidos nucleicos y a 280nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinó estudiando el ratio 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1.4 y 1.8. Todas las muestras se alicuotearon a una concentración de 100 ng/ μ L.

3.3.2.3. Retrotranscripción (RT)

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen total de 30 μ L (Ver componentes de la RT). Se realizó una un control negativo (RT-) (30 μ L de mezcla de reacción excepto m-MLV, cuyo volumen fue sustituido por H₂O miliQ). Una vez preparadas las mezclas de reacción, se incubaron en un termociclador, con los siguientes parámetros: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C o bien congeladas -20°C hasta su uso.

Compuesto	Casa comercial		Composición	
Tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	6 μ L	Tris-HCl (pH 8.3)	250 nM
			KCl	375 nM
			MgCl	15 mM
			DDT	50 nM
Mg ₂ Cl (50mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1.5 μ L		
Mezcla de dNTPs	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	6 μ L	dTTP	10 mM
			dCTP	10 mM
			dGTP	10 mM
			dATP	10 mM
<i>Random primers</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0.17 μ L		
Inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/ μ L)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0.25 μ L		
Reversotranscriptasa (m-MLV, 200 U/ μ L)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1 μ L		
H ₂ O DEPC		c.s.p. 30 μ L	Dietilpirocarbonato	0.1 %
			H ₂ O destilada	c.s.p 1 L

Tabla 11. Componentes de la reacción de retrotranscripción.

3.3.2.4. PCR en tiempo real

Se utilizó como sistema de detección las sondas TaqMan (sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) entre las dos moléculas. El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR fue TAMRA, que posee un máximo de absorción de 560 nm y un máximo de emisión de 580 nm. Los *primers* usados fueron diseñados con el programa Primer Express (*Applied biosystems*, Foster City, CA, USA) y cotejados según la base de datos BLAST. La mezcla de reacción de PCR usada tenía un volumen final de reacción de 12 μ L.

Compuesto	Casa comercial	
H ₂ O mQ		2.92 µL
Forward primer (10 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36 µL
Reverse primer (10 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36 µL
Probe o sonda (5 µM)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	0.36 µL
Taqman Universal PCR master mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	6 µL
Muestra (RT)		2 µL

Tabla 12. Componentes de la reacción de PCR en tiempo real

Además de las muestras, se cargó un control negativo (RT-), un blanco y una curva patrón tanto para el gen problema como para el control o gen de expresión constitutiva; todo ello se realizó por duplicado. La curva patrón constó de 6 puntos realizados por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40 µL resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2 µL de distintos productos de RT, pero siempre del mismo tratamiento o tejido). Las condiciones de amplificación fueron de 50°C (2 min), 95°C (10 min), 95°C (15 seg) y 60°C (1 min) durante 40 ciclos, en un sistema de PCR Tiempo Real (7300 Real Time PCR System, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). El análisis de los datos se realizó comparando el ratio entre un gen de referencia y el gen problema entre los diferentes grupos experimentales. En este caso, el gen de referencia fue la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Hprt).

mRNA	Código GenBank		Secuencia
Fabp3	NM_024162	Fw Primer	5'-ACGGAGGCAAACCTGGTCCAT-3'
		Rv Primer	5'-CACTTAGTTCCCGTGTAAGCGTAGTC-3'
		Probe	FAM-5'-TGCAGAAGTGGGACGGGCAGG-3'-TAMRA
Hprt	NM_012583	Fw Primer	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Rv Primer	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Probe	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'-TAMRA
Pgc1α	NM_031347	Fw Primer	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Rv Primer	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Probe	FAM-5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'-TAMRA
Pgc1β	NM_176075	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
Ucp1	NM_012682	Fw Primer	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Rv Primer	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Probe	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
Ucp3	NM_013167	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00565874_m1
Cidea	NM_001170467	Assay ID	ThermoFisher TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn04181355_m1
Prdm16	XM_008764418	Assay ID	ThermoFisher TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Mm01266512_m1

Tabla 13. Relación de primers y sondas para RealTime PCR.

3.3.3. Fluorescencia directa de GFP

La detección directa de la fluorescencia de GFP se realizó después de la perfusión de los animales; en secciones de 40 µm. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia Olympus IX51 (*Olympus Corporation*, Tokio, Japón).

3.3.4. Determinaciones séricas

Las concentraciones séricas de NEFAs se determinaron usando un kit Wako NEFA-HR (*Wako Chemicals GmbH*; Neuss, Alemania). Los niveles de triglicéridos y colesterol se determinaron usando un kit Spinreact (*Spinreact SA*, San Esteve de Bas, España). Los niveles de insulina en suero se midieron usando un kit ELISA para insulina de Rata/Ratón EZMRI-13K (*Millipore*, Billerica, MA, EE.UU.). Los niveles de leptina se determinaron usando un kit ELISA para leptina de Rata EZRL-83K (*Millipore*, Billerica, MA, EE.UU.). En todos los casos las determinaciones se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial.

3.3.5. Cuantificación de ceramidas

Las ceramidas se extrajeron y analizaron utilizando el sistema ESI-MS LC/MS: una cromatografía líquida-espectrómetro de masas constituido por un sistema Waters Acquity UPLC conectado a un espectrómetro de masas Waters LCT Premier Orthogonal Accelerated Time of Flight (*Waters*, Millford, MA, EE.UU.), operado en modo de ionización por electrospray positivo. Se adquirieron espectros de escaneo completo de 50 a 1500 Da y se sumaron espectros individuales para producir puntos de datos cada 0.2 s. La precisión de masa y la reproducibilidad se mantuvieron utilizando un spray de referencia independiente mediante la interferencia LockSpray. La columna analítica fue una Acquity UPLC BEH de 100 mmL2.1mmi.d., 1.7 mmC8 (*Waters*, Millford, MA, EE. UU.). Las dos fases móviles fueron fase A: metanol; fase B: agua, ambas contenían 0.2% de ácido fórmico (v/v) y formato de amonio 2 mM. Se programó un gradiente lineal (0.0 min: 20% de B; 3 min: 10% de B; 6 min: 10% de B; 15 min: 1% de B; 18 min: 1% de B; 20 min: 20% de B; 22 min: 20% B). El caudal fue de 0.3 mL/min. La columna se mantuvo a 30°C. La cuantificación se llevó a cabo usando el cromatograma de iones extraído de cada compuesto, utilizando ventanas de 50 mDa. El rango dinámico lineal se determinó inyectando mezclas estándar. La identificación positiva de los compuestos se basó en la medición de masa precisa con un error <5 ppm y su tiempo de retención de LC, en comparación con un estándar ($\pm 2\%$). Las concentraciones se midieron mediante múltiples experimentos de monitorización de reacción usando N-lauroil-D-eritroesfingosina (ceramida C12) y N-heptadecanoil-D-eritrofosfamina (ceramida C17) como patrones internos y usando N-palmitoil-D-eritroesfingosina (ceramida C16), N-estearoil-D-eritroesfingosina (ceramida C18), N-lignocerol-D-eritroesfingosina (ceramida C24) y N-nervonoil-D-eritroesfingosina (ceramida C24:1) (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL, EE.UU.) como patrones.

Los análisis de ceramida se realizaron en el laboratorio de la Dra. Nuria Casals (Departament de Ciències Bàsiques Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya), en el laboratorio del Dr. Christophe Magnan (Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, Paris,

75205, France) y en la Unidad de Investigación de Moléculas Bioactivas (RUBAM) del Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC).

3.3.6. Tinción Oil-Red O

La tinción Oil-Red O se realizó en fragmentos de hígado congelados. Se realizaron cortes en un criostato de un grosor de 10 μm . Posteriormente se fijaron las muestras toda la noche en formalina neutra tamponada al 10%. Luego fueron teñidas con Solución Oil Red durante 20 minutos (Oil red color solution, *Merck*) y posteriormente se lavaron con agua destilada. Se someten a otro colorante y se contratiñen con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos. (Hematoxilina de Harris, *Bio-optica*). Se vuelven a lavar y se montan en un medio de montaje acuoso. Luego se realizan fotos en un microscopio óptico conectado a una cámara Olympus XC50 (*Olympus Corporation*, Tokio, Japón) a 20X y 40X. Para finalizar las fotos fueron medidas mediante el programa Image J (*ImageJ-1.33*, Wayne Rasband, NIH, USA).

3.3.7. Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido adiposo extraído en el momento del sacrificio se fijaron en formaldehído tamponado al 10% y posteriormente se deshidrataron (en concentraciones crecientes de alcohol) para su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina. Para la inmunohistoquímica de UCP1, los bloques de parafina se cortaron en secciones de 3 μm que se procesaron, desparafinando en xileno, rehidratando y enjuagando en agua destilada. A continuación las secciones se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario (UCP1, dilución 1:500, *Abcam*, Cambridge), se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario (ENVISION (una mezcla de anti-ratón y anti-conejo de *Dako*, Glostrup, Dinamarca)). Las imágenes se tomaron en un microscopio óptico con una cámara digital Olympus XC50 (*Olympus Corporation*, Tokio, Japón) a 40X. El área de los adipocitos y de la tinción con UCP1 se cuantificó utilizando el software ImageJ 1.33 (*ImageJ-1.33*, Wayne Rasband, NIH, USA).

3.3.8. Estadística

Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante el software estadístico GraphPad Instad (*GraphPad Instad Software v5*, La Jolla, CA, USA). Los resultados se representaron en porcentaje en función del control, tomándose como valor la media (M) y la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{media} \pm \text{SEM}$). En los experimentos en los que se monitorizaron parámetros como la ingesta de alimento, masa corporal y concentraciones de analitos, estos datos se representaron brutos sin realizar ningún tipo de relación porcentual de comparación.

En el análisis, primero se ha aplicado un test de normalidad para contrastar la normalidad de un conjunto de datos. Como hipótesis nula se planteó que la muestra del conjunto de datos proviene de una población normalmente distribuida; siendo el test Shapiro-Wilks utilizado para conjuntos de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 , y el test Kolgomorov-Smirnof cuando el $n \leq 6$. Si las poblaciones analizadas muestran una distribución normal se realizan test estadísticos paramétricos. Si la población no sigue una distribución normal se realizan test estadísticos no paramétricos; evento no ocurrido durante el análisis de los datos de la presente tesis.

En segundo lugar se realizaron dos test paramétricos diferentes para el contraste de hipótesis en función de las muestras/grupos experimentales analizados. De manera que en los experimentos con dos muestras/grupos experimentales que seguían una distribución normal se empleó el t-test que compara las medias de dos poblaciones despareadas asumiendo que siguen una distribución normal. En los experimentos con tres o más muestras/grupos experimentales que seguían una distribución normal se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si había diferencia entre las medias. Una vez realizado el test, en caso de aceptar la hipótesis alternativa que indica que sí hay diferencias entre las medias, se realizó un test post-hoc de Bonferroni para comprobar qué medias son las que causaron significación. Se consideraron significativos todos los resultados con una $P < 0.05$; muy significativos con una $P < 0.01$ y extremadamente significativos con $P < 0.001$.







4. RESULTADOS

4.1. LA LIPOTOXICIDAD Y EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDOS POR CERAMIDAS REGULAN EL BALANCE ENERGÉTICO

4.1.1. El tratamiento central con ceramidas indujo ER stress hipotalámico y aumento de peso corporal a través de la inhibición simpática del BAT

Para estudiar el efecto de una acumulación central de ceramidas, administramos vía ICV ceramida C6, una ceramida permeable a las células que se convierte parcialmente en ceramidas de cadena larga dentro de la célula (Mitoma et al., 1998; Gao et al., 2011; Ramirez et al., 2013; Contreras et al., 2014b; Martínez-Sánchez et al., 2017). Como resultado, la concentración de ceramida C16 aumentó en el hipotálamo mediobasal (MBH=ARC+VMH), lo que confirma la eficacia del tratamiento (Figura 19A). Este efecto se asoció con un mayor ER stress, como lo demuestran los niveles elevados de GRP78, pIRE1, pPERK, pEIF2 α , ATF6 α y CHOP (proteínas de la UPR) en el MBH (Figura 19B). Cabe destacar que la administración central de ceramidas indujo un marcado aumento de peso independiente de la ingesta (Figura 19C).

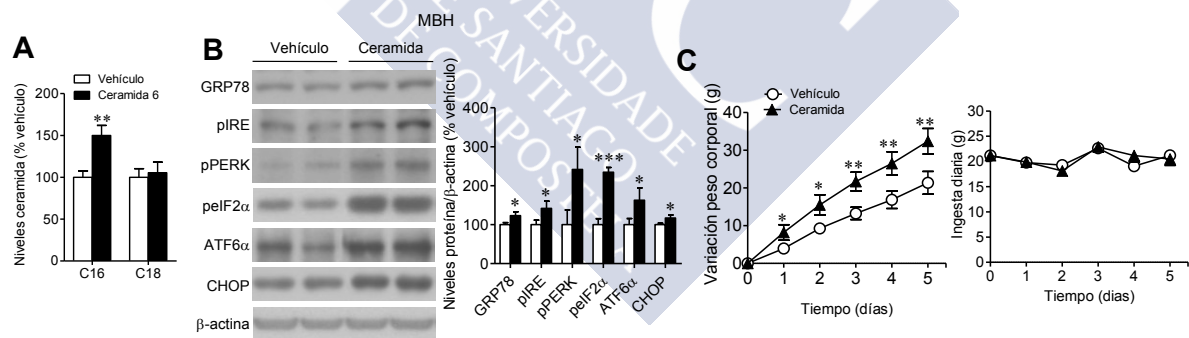


Figura 19. Efecto de la administración central de ceramida en el balance energético. (A) Niveles de ceramida en el MBH, (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR (panel derecho) y (C) variación del peso corporal (panel izquierdo) e ingesta de comida (panel derecho). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-26 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, y ***p<0.001 versus vehículo.

Los anteriores cambios fenotípicos se asociaron con niveles disminuidos del mRNA de marcadores termogénicos en BAT, como UCP1, UCP3, PGC1 α y FABP3 (Figura 20A). Esto se confirmó a nivel de proteína como se indica por la reducción en los niveles de UCP1 en BAT (Figura 20B). De acuerdo con la expresión disminuida de los marcadores termogénicos, las ratas tratadas con ceramidas a nivel central mostraron una temperatura corporal más baja

(Figura 20C). Además, la administración central de ceramidas redujo la activación simpática del BAT registrada directamente por microneurografía (Figuras 20D y 20E).

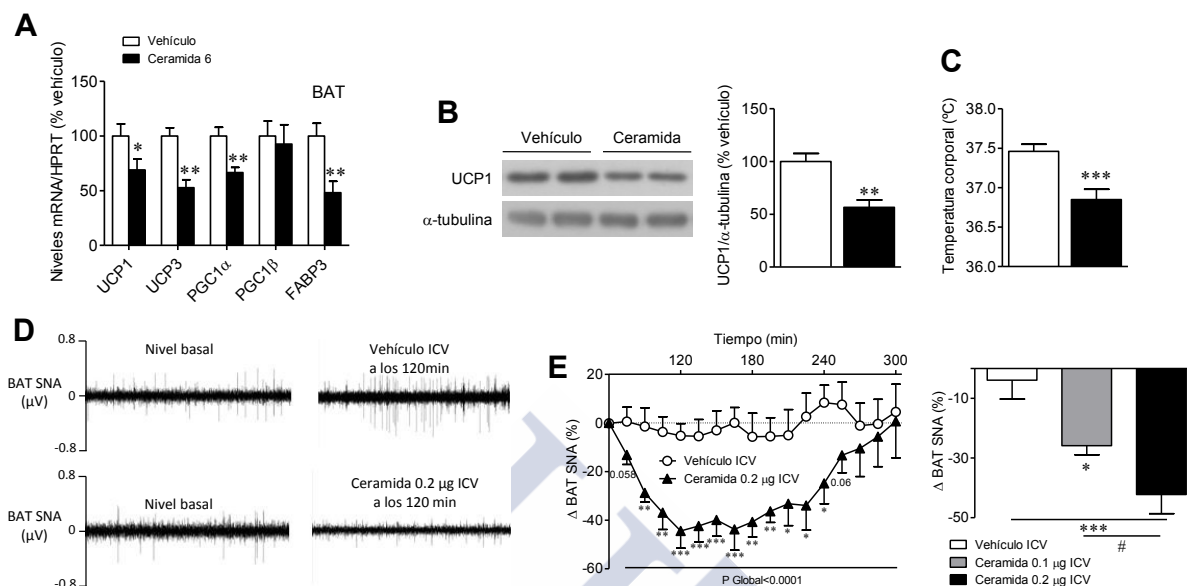


Figura 20. Efecto de la administración central de ceramida en la activación simpática del BAT. (A) Expresión de mRNA en el BAT, (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo; bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en BAT (panel derecho), (C) temperatura rectal, (D) registros de la actividad nerviosa simpática (SNA) del BAT y (E) variación en la SNA del BAT de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida 6. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=5-7 (grabaciones de la SNA) o n=7-26 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, y ***p<0.001 versus vehículo, #p<0.05 ceramida 0.2 μg ICV versus ceramida 0.1 μg ICV.

4.1.2. GRP78 en el VMH revirtió el efecto central con ceramidas sobre el peso corporal y la termogénesis del BAT

Para evaluar el papel del ER stress hipotalámico sobre las acciones inducidas por las ceramidas en el balance energético sobreexpresamos genéticamente GRP78. Como se explicó en la introducción, GRP78 es una chaperona del ER que facilita el correcto plegamiento de proteínas y reduce el ER stress (Schroder and Kaufman, 2005; Ron and Walter, 2007). Así se inyectaron mediante estereotaxia nucleoespecífica adenovirus codificantes para GRP78 o adenovirus control que expresan GFP, en el VMH, un sitio clave en la modulación del BAT (Contreras et al., 2014a; Lopez et al., 2016). La eficacia de la infección en el VMH se evaluó mediante la expresión de GFP (Figura 21A) y una mayor concentración de GRP78 en el VMH (Figura 21B). El adenovirus de GRP78 provocó una disminución marcada en de la UPR en el VMH (Figura 21B), sin cambios en los niveles de ceramidas (Figura 21C) lo que indica que GRP78 estaba actuando *upstream* de las ceramidas.

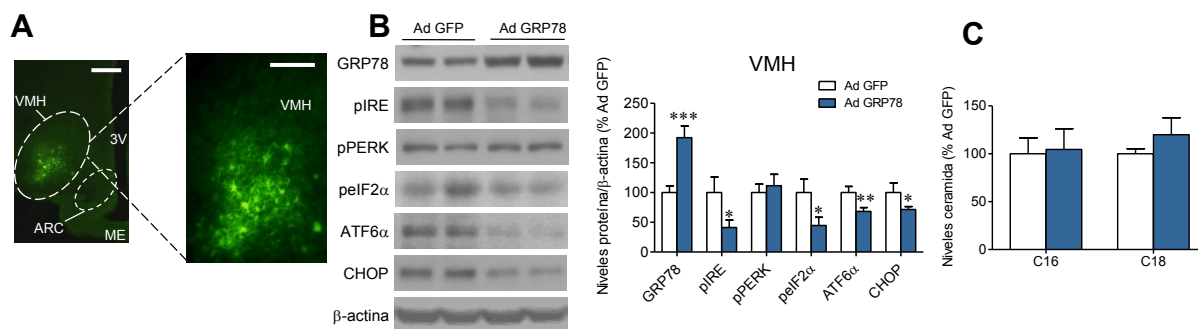


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre el ER stress. (A). Fluorescencia directa representativa de la expresión de GFP en el VMH (panel izquierdo: 4X, barra de escala: 300 μ m; panel derecho: 20X, barra de escala: 100 μ m), (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho) y (C) niveles de ceramidas en el MBH de ratas tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-47 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, y ***p<0.001 versus Ad GFP.

Es de destacar que el tratamiento central con ceramidas aumentó la expresión de marcadores inflamatorios en el hipotálamo como IL6, pIKK α / β y TNF α , lo cual es indicativo de lipotoxicidad (Figura 22A). Sorprendentemente, estos efectos de las ceramidas no se vieron afectados por la sobreexpresión de GRP78 (Figura 22A), lo que confirma la evidencia previa de que la inflamación está *upstream* del ER stress en el hipotálamo (Zhang et al., 2008). El adenovirus GRP78 no afectó el peso corporal ni la ingesta en ratas tratadas con vehículo (Figuras 22B y 22C).

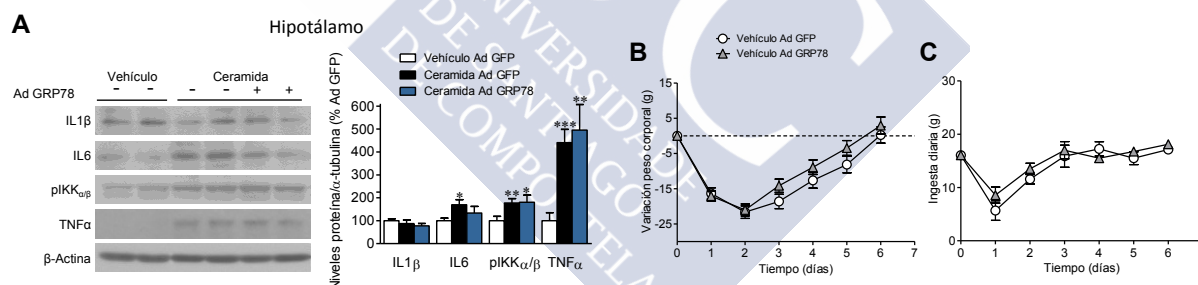


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre la inflamación y el balance energético. (A) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de marcadores de inflamación en el hipotálamo (panel derecho) de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida y tratadas con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. (B) Variación del peso corporal y (C) ingesta de comida de ratas tratadas centralmente con vehículo y administración estereotáxica de adenovirus Ad GFP o Ad GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=5-6 (*western blot* de marcadores de inflamación), o n=8-53 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus Vehículo Ad GFP.

Además, observamos que la administración de los adenovirus codificantes para GRP78 en el VMH revirtió el aumento de peso inducido por ceramidas sin cambios en la ingesta de los animales (Figura 23A). Las ceramidas centrales promovieron un aumento en el peso de los acúmulos de tejido adiposo blanco gonadal e inguinal (gWAT e iWAT, respectivamente), un efecto que fue revertido por la sobreexpresión de GRP78 en el VMH (Figura 23B).

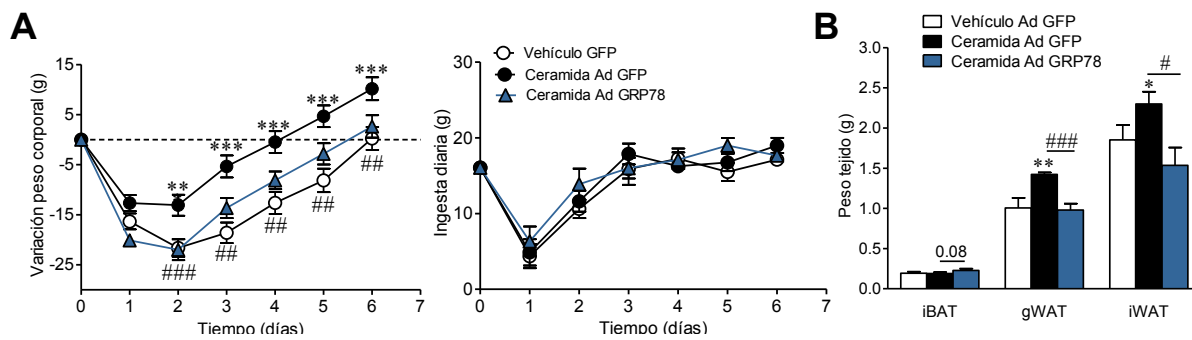


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre el balance energético. (A) Variación del peso corporal (panel izquierdo) e ingesta de comida (panel derecho), (B) peso del iBAT, gWAT e iWAT de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida y administración estereotáxica de adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Para simplificar, se ha omitido el grupo Ad GRP78 WT del vehículo; en cualquier caso, es importante señalar que no se encontraron diferencias en ese grupo cuando se comparó con el vehículo Ad GFP (véanse las Figuras 4B y 4C). Todos los datos se expresan como media±SEM. n=6 (peso tejido) o 7-47 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, y ***p<0.001 versus vehículo Ad GFP; #p<0.05, ##p<0.01, y ###p<0.001 versus ceramida Ad GRP78 WT.

En asociación con el aumento de la adiposidad, las ratas tratadas con ceramidas mostraron una tendencia a tener niveles más altos de leptina y triglicéridos (TAG) circulantes que se revirtieron parcialmente por los adenovirus GRP78 (Tabla 14).

	Vehículo Ad GFP	Ceramida Ad GFP	Ceramida Ad GRP78
Leptina (ng/mL)	1.88 ± 0.54	2.78 ± 0.5 (P=0.1 vs. Vehículo Ad GFP)	2.17 ± 0.38
Insulina (ng/mL)	1.48 ± 0.31	1.34 ± 0.21	1.64 ± 0.26
Colesterol (mg/dL)	76.75 ± 3.14	73.99 ± 3.16	78.29 ± 4.23
NEFAs (mg/dL)	13.30 ± 2.70	14.12 ± 0.72	14.40 ± 1.73
TAG (mg/dL)	40.72 ± 3.52	53.08 ± 8.80 (P=0.1 vs. Vehículo Ad GFP)	42.18 ± 5.54 (P=0.1 vs. Ceramida Ad GFP)

Tabla 14. Parámetros séricos de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida y administración estereotáxica de adenovirus GFP o GRP78 WT en el VMH. Los datos se expresan como media ± SEM. n=7-10 animales por grupo experimental.

La disminución mediada por las ceramidas en los niveles de proteína UCP1 en el BAT (Figura 24A), la temperatura del BAT (Figura 24B) y la temperatura corporal (Figura 24C) también se atenuaron mediante la administración de adenovirus GRP78 en el VMH. En general, estos cambios indican que el ER stress inducido por las ceramidas a nivel central modula de manera efectiva la termogénesis de BAT.

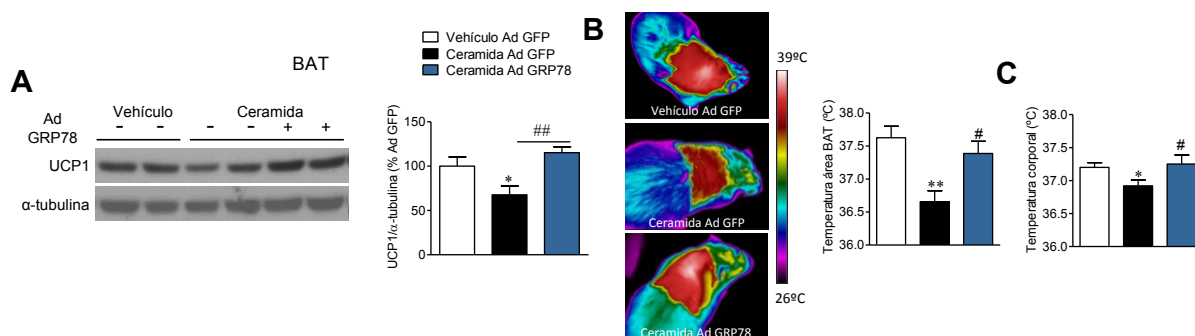


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre la termogénesis del BAT. (A) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho), (B) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho) y (C) temperatura rectal de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida y administración estereotáxica de adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=6 animales por grupo experimental. * p <0.05 y ** p <0.01 versus vehículo Ad GFP; # p <0.05 y ## p <0.01 ceramida Ad GFP versus ceramida Ad GRP78 WT.

A continuación, los adenovirus GRP78 se inyectaron dentro del ARC (Figura 25A), donde promovieron un aumento de la concentración de GRP78, que fue concomitante con una reducción en los niveles de los marcadores de ER stress (Figura 25B). Cuando se administró en el ARC, el adenovirus GRP78 no afectó el peso de las ratas (Figura 25C), la ingesta (Figura 25D) o los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 25E).

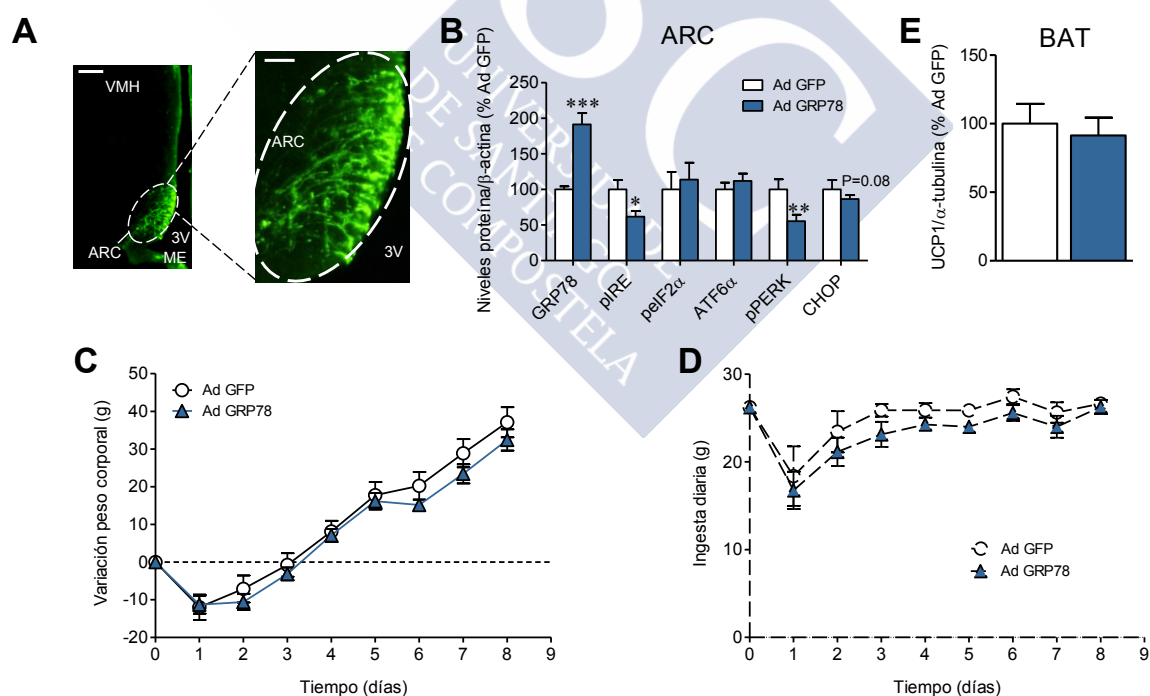


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el ARC sobre el balance energético. (A) Fluorescencia directa representativa de la expresión de GFP en el ARC (panel izquierdo: 4X, barra de escala: 300 μ m; panel derecho: 20X, barra de escala: 100 μ m), (B) niveles de proteína de la UPR en el ARC, (C) variación del peso corporal y (D) ingesta de comida de ratas tratadas con adenovirus GFP o GRP78 en el ARC. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-8 (*western blot* de la UPR) o n=8-53 animales por grupo experimental. * P <0.05, ** P <0.01 y *** p <0.001 versus Ad GFP.

4.1.3. GRP78 en el VMH revirtió el efecto central con ceramidas sobre la resistencia a la insulina

Dados los efectos de la administración central de ceramidas sobre el peso corporal y la termogénesis del BAT, evaluamos a continuación su impacto en la homeostasis de la glucosa y la acción de la insulina. Nuestros datos mostraron que las ceramidas centrales no tuvieron impacto en la tolerancia a la glucosa (Figura 26A), pero la sensibilidad a la insulina disminuyó con su administración, lo cual se invirtió con la sobreexpresión de GRP78 en el VMH (Figuras 26B y 26C).

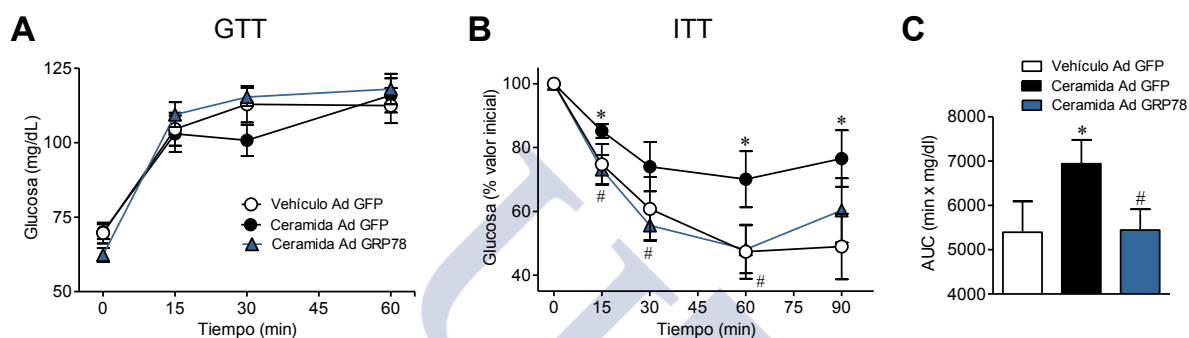


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre las acciones centrales de las ceramidas en la homeostasis de glucosa y sensibilidad a la insulina. (A) Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT), (B) prueba de tolerancia a la insulina (ITT) y (C) área bajo la curva (AUC) de la ITT de ratas tratadas centralmente con vehículo o ceramida y administración estereotáxica de adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *p<0.05 versus vehículo Ad GFP; #p<0.05 versus ceramida Ad GRP78.

4.1.4. La inactivación de GRP78 en el VMH indujo ER stress, aumento de peso y disminución de UCP1 en BAT

Habiendo demostrado que la sobreexpresión de GRP78 en el VMH inhibía las acciones anabólicas de las ceramidas centrales, a continuación, investigamos si la inactivación de GRP78 en el mismo núcleo hipotalámico tendría el efecto opuesto sobre el peso corporal y los marcadores termogénicos del BAT. Para esto, tratamos a las ratas en el VMH o en el ARC con un adenovirus que albergaba una isoforma dominante negativa de GRP78 (GRP78 DN). Nuestros datos demostraron que la administración estereotáxica de GRP78 DN indujo una activación significativa de la UPR en el VMH (Figura 27A), que indicaba la presencia de ER stress, aumentando el peso de los animales de manera independiente a la ingesta (Figuras 27B y 27C). Además, los animales en los que se sobreexpresó GRP78 DN en el VMH tenían unos menores niveles de UCP1 en BAT (Figura 27D). Es interesante mencionar que los niveles proteicos de GRP78 aparecen elevados, ya que la isoforma GRP78 DN también era reconocida por el anticuerpo de GRP78 (Figura 27A)

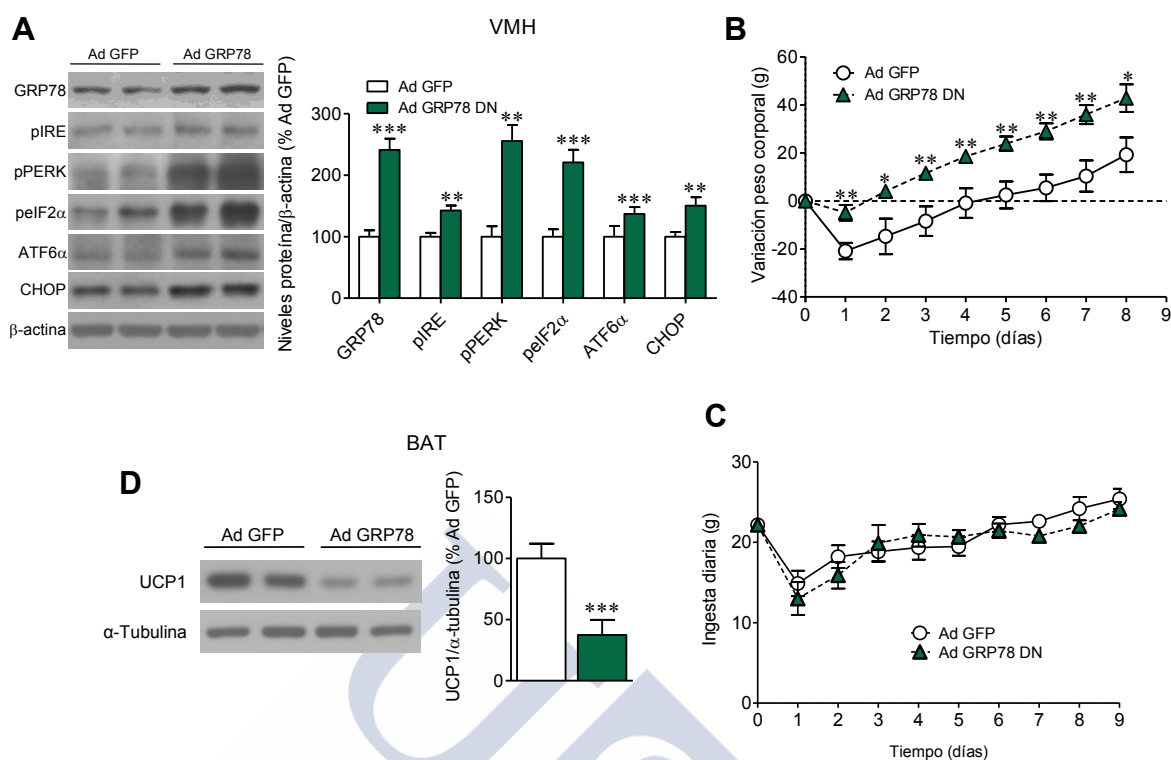


Figura 27. Efecto de la inhibición de GRP78 en el VMH sobre el balance energético. (A) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho), (B) variación del peso corporal, (C) ingesta de comida y (D) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT de ratas tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 DN en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 versus Ad GFP.

Por otro lado, a pesar de la inducción de ER stress en el ARC (Figura 28A), la inoculación con adenovirus GRP78 DN no modificó ni el peso corporal (Figura 28B), ni la ingesta (Figura 28C) ni los niveles de proteína de UCP1 en BAT (Figura 28D).

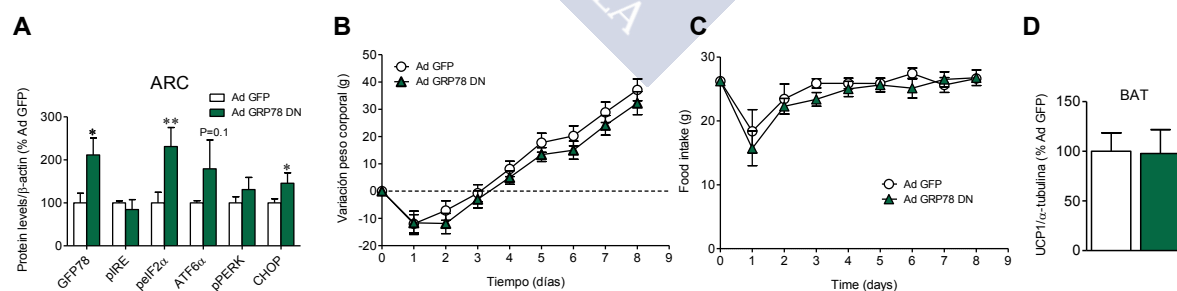


Figura 28. Efecto de la inhibición de GRP78 en el ARC sobre el balance energético. (A) Niveles de proteína de la UPR en el ARC, (B) variación de peso corporal, (C) ingesta de comida y (D) niveles de UCP1 en el BAT de ratas tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 DN en el ARC. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus Ad GFP.

4.1.5. GRP78 en el VMH revirtió el ER stress inducido por ceramidas en ratas Zucker obesas

Para dilucidar la contribución del ER stress inducido por ceramidas en un contexto de obesidad, utilizamos ratas Zucker obesas (OZR). Nuestros datos mostraron una mayor concentración de ceramida C16 y C18 en el MBH de OZR, en comparación con las ratas Zucker delgadas (LZR) (Figura 29A). Además, la vía de UPR se incrementó en el VMH de las OZR (Figura 29B), lo que indica una elevación del ER stress.

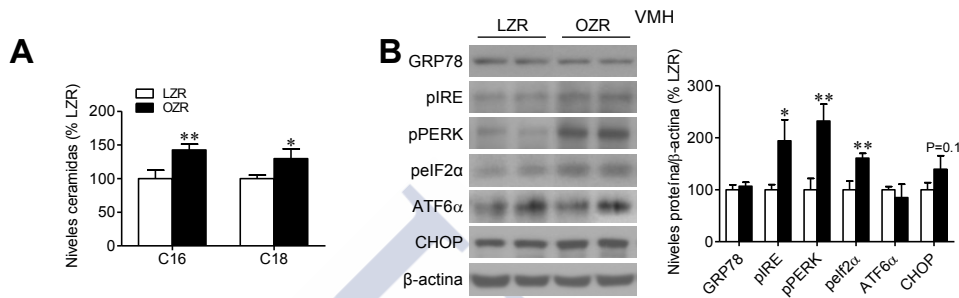


Figura 29. Niveles centrales de ceramidas y de ER stress en las ratas LZR y OZR. (A) Niveles de ceramidas en el hipotálamo mediobasal y (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho) de LZR y OZR. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-8 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus LZR.

A continuación, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de LZR y OZR. La inyección estereotáxica de adenovirus GRP78 en el VMH indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta en las OZR pero no en las LZR (Figuras 30A y 30B) con una mejora concomitante del ER stress hipotalámico (Figura 30C) sin cambios en los niveles de ceramidas del hipotálamo (Figuras 30D y 30E).

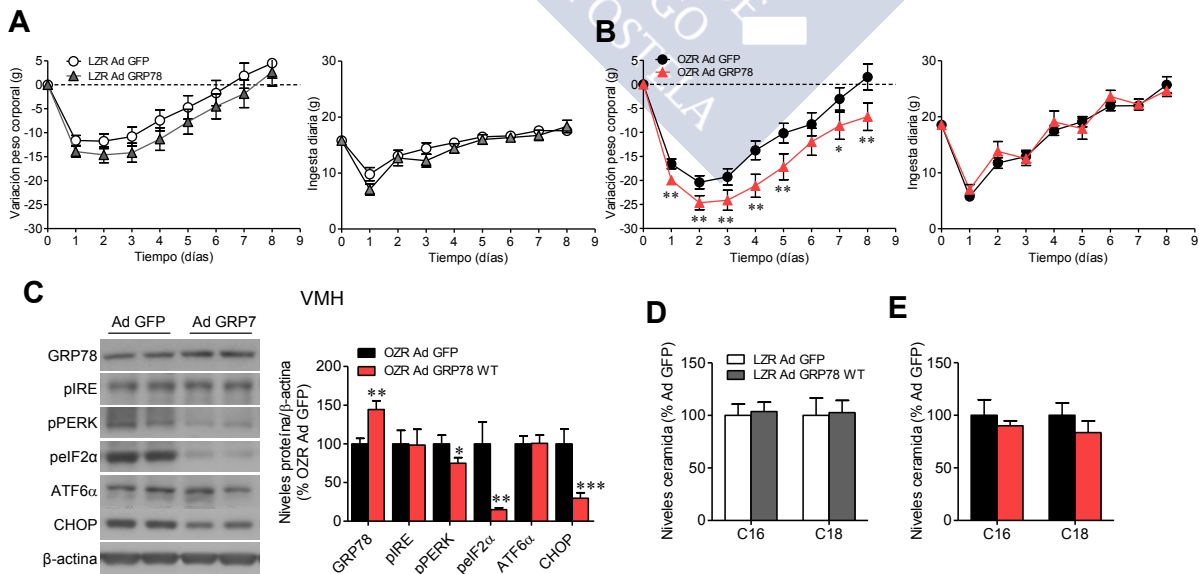


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de las ratas obesas Zucker sobre el balance de energía. (A y B) Variación de peso corporal (paneles izquierdos) y (A y B) ingesta de comida (paneles derechos),

(C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho) y (D y E) niveles de ceramida en el hipotálamo mediobasal de LZR y OZR tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-33 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus LZR u OZR Ad GFP.

4.1.6. GRP78 en el VMH aumentó la termogénesis del BAT y mejoró el perfil metabólico de las ratas Zucker obesas

A continuación, investigamos el efecto del adenovirus GRP78 sobre la termogénesis. Nuestros datos mostraron que la reversión del ER stress hipotalámico con GRP78 indujo un aumento marcado en los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 31A), así como de la temperatura del BAT (Figura 31D) y la temperatura central (Figura 31E) en las OZR.

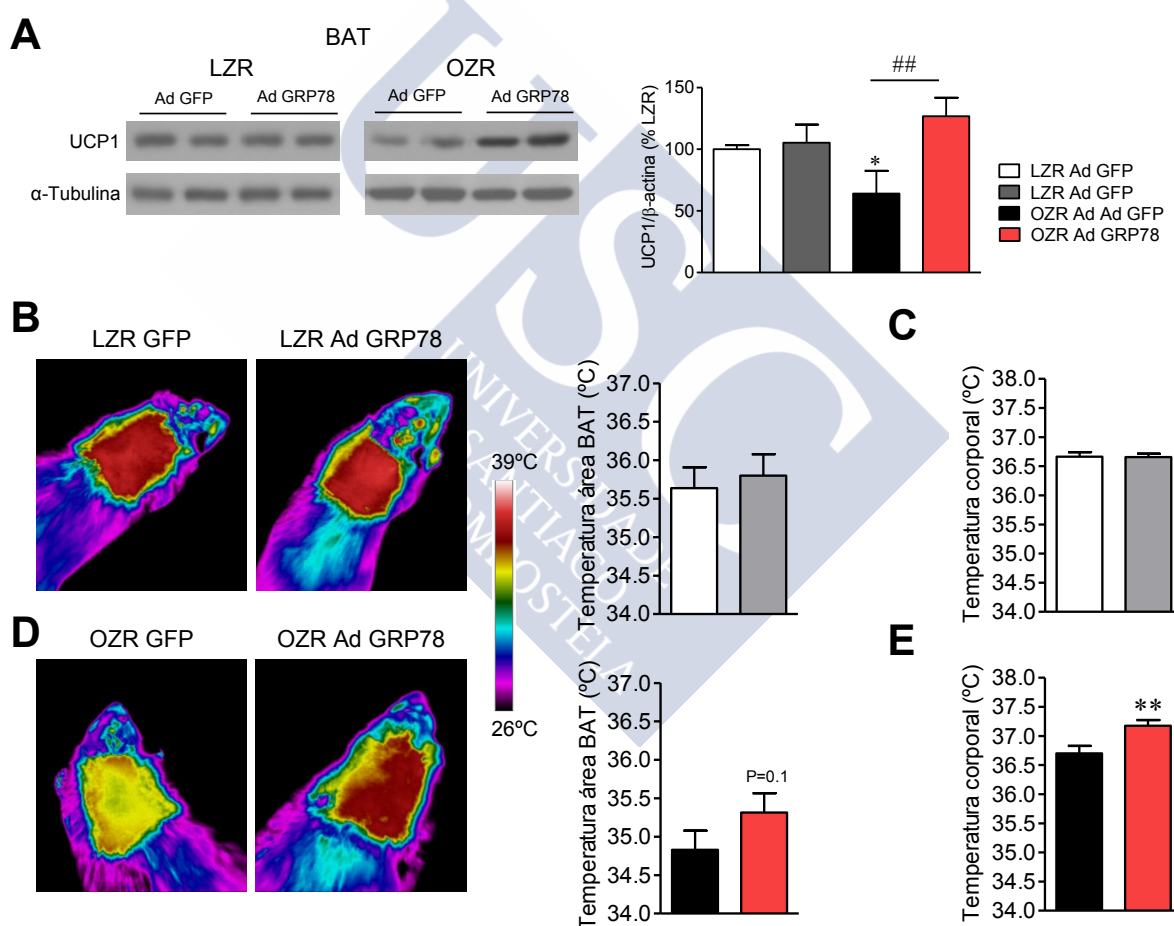


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas Zucker obesas sobre la termogénesis de BAT. (A) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho), (B y D) imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos), (C y E) temperatura rectal de LZR y OZR tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *p<0.05 y **p<0.01 versus LZR u OZR Ad GFP; ##p<0.01 versus OZR Ad GFP.

Estos efectos se asociaron con una mejora en el fenotipo metabólico de las OZR, como lo demuestra la disminución de la esteatosis hepática (Figura 32C), la reducción del peso del iWAT (Figura 32D) así como los niveles reducidos de colesterol y TAG circulantes (Tabla 15). Cabe destacar que no se detectaron cambios en las LZR tratadas con el adenovirus GRP78 (Figuras 31A, 31B, 31C, 32A y 32B).

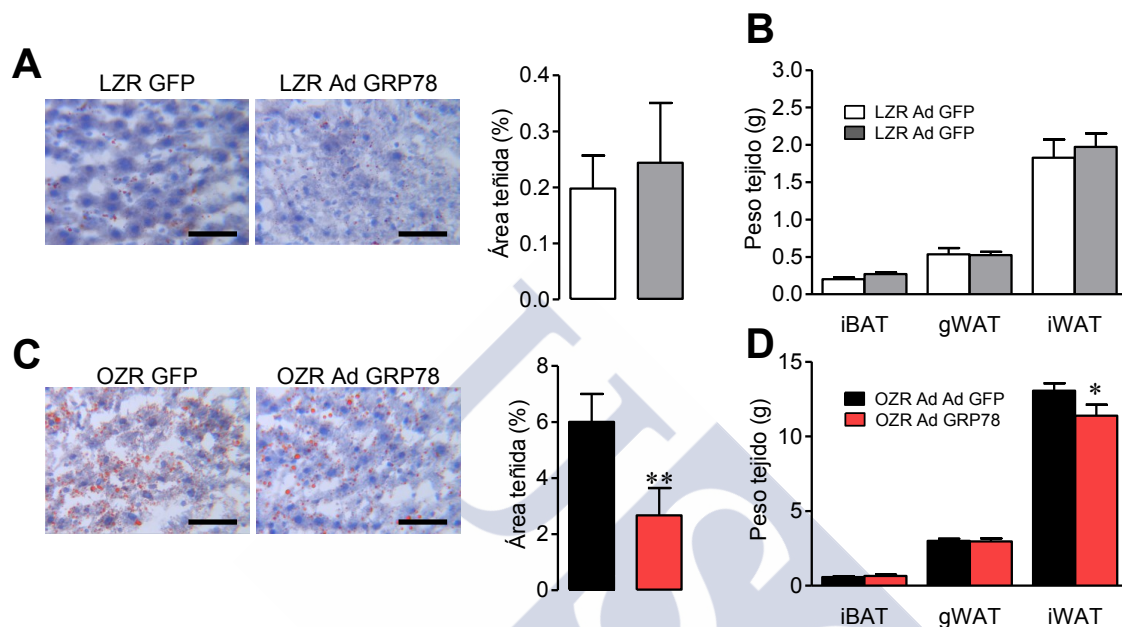


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas Zucker obesas sobre la esteatosis hepática y la adiposidad. (A y C) Secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (paneles izquierdos, barra de escala: 50 μ m) y su cuantificación (paneles derechos) y (By D) peso de iBAT, gWAT e iWAT de LZR y OZR tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *p<0.05 y **p<0.01 versus LZR u OZR Ad GFP.

	LZR Ad GFP	LZR Ad GRP78	OZR Ad GFP	OZR Ad GRP78
Leptina (ng/mL)	5.61 \pm 0.73	6.55 \pm 1.08	33.72 \pm 1.27 ***	34.37 \pm 1.34 ***
Insulina (ng/mL)	1.58 \pm 0.18	1.29 \pm 0.17	9.15 \pm 0.97 ***	11.06 \pm 1.06 ***
Colesterol (mg/dL)	137.03 \pm 8.40	115.70 \pm 3.18 *	199.30 \pm 12.84 ***	168.61 \pm 6.83 ** #
NEFAs (mg/dL)	9.47 \pm 0.56	9.56 \pm 1.37	15.53 \pm 1.15 ***	16.23 \pm 1.63 ***
TAG (mg/dL)	76.98 \pm 7.35	66.14 \pm 6.30	213.14 \pm 23.91 ***	171.30 \pm 6.45 *** (P=0.06 vs. OZR Ad GFP)

Tabla 15. Parámetros metabólicos séricos de LZR y OZR tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 WT en el VMH. Los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *p<0.05 y **p<0.01 y ***P<0.05, 0.01 versus LZR Ad GFP. #P<0.05 versus OZR Ad GFP.

4.1.7. GRP78 en el VMH mejoró la señalización de la leptina y la resistencia a la insulina en ratas Zucker obesas

La administración de adenovirus GRP78 en el VMH no afectó los niveles de proteína de STAT3 fosforilada, PI3K fosforilada, proteína quinasa B (AKT) fosforilada y supresor de la señalización de la citokina 3 (SOCS3) en el VMH de las LZR (Figura 33A). En cambio, los adenovirus GRP78 incrementaron significativamente los niveles de pSTAT3, pPI3k y pAKT en el VMH de las OZR, mientras que los niveles de SOCS3 se vieron reducidos (Figura 33B).

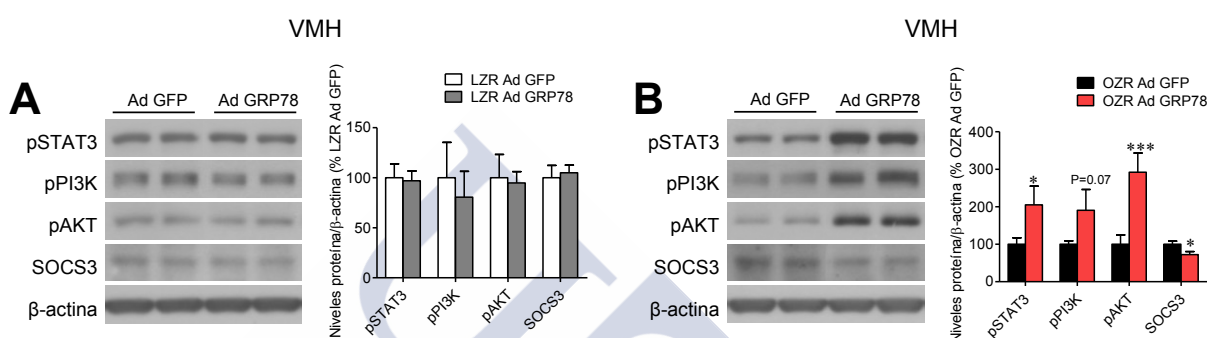


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas Zucker obesas sobre la señalización de la leptina. (A y B) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la vía de señalización de la leptina en el VMH (panel derecho) de LZR y OZR tratados estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-10 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 versus LZR Ad GFP u OZR Ad GFP.

La administración de adenovirus GRP78 en el VMH no afectó la tolerancia a la glucosa en ninguno de los genotipos (ni LZR, ni OZR), aunque redujeron los niveles de insulina circulante 30 minutos después de la administración de glucosa en las OZR (Figuras 34A y 34B). Por otra parte, los adenovirus GRP78 tendieron a aumentar la sensibilidad a la insulina en las LZR (Figura 34C). Notablemente, este efecto fue más pronunciado en las OZR, donde se encontró una mejora significativa en la resistencia a la insulina (Figura 34D). De acuerdo con estos datos, el adenovirus GRP78 aumentó los niveles de pAKT en el músculo (Figura 34F) y los niveles de pPI3K y pAKT en el hígado (Figura 34H) de las OZR. No se observaron cambios significativos en las LZR (Figuras 34E y 34G). En general, estas evidencias demuestran que el tratamiento con GRP78 en el VMH mejora la sensibilidad a insulina en las OZR.

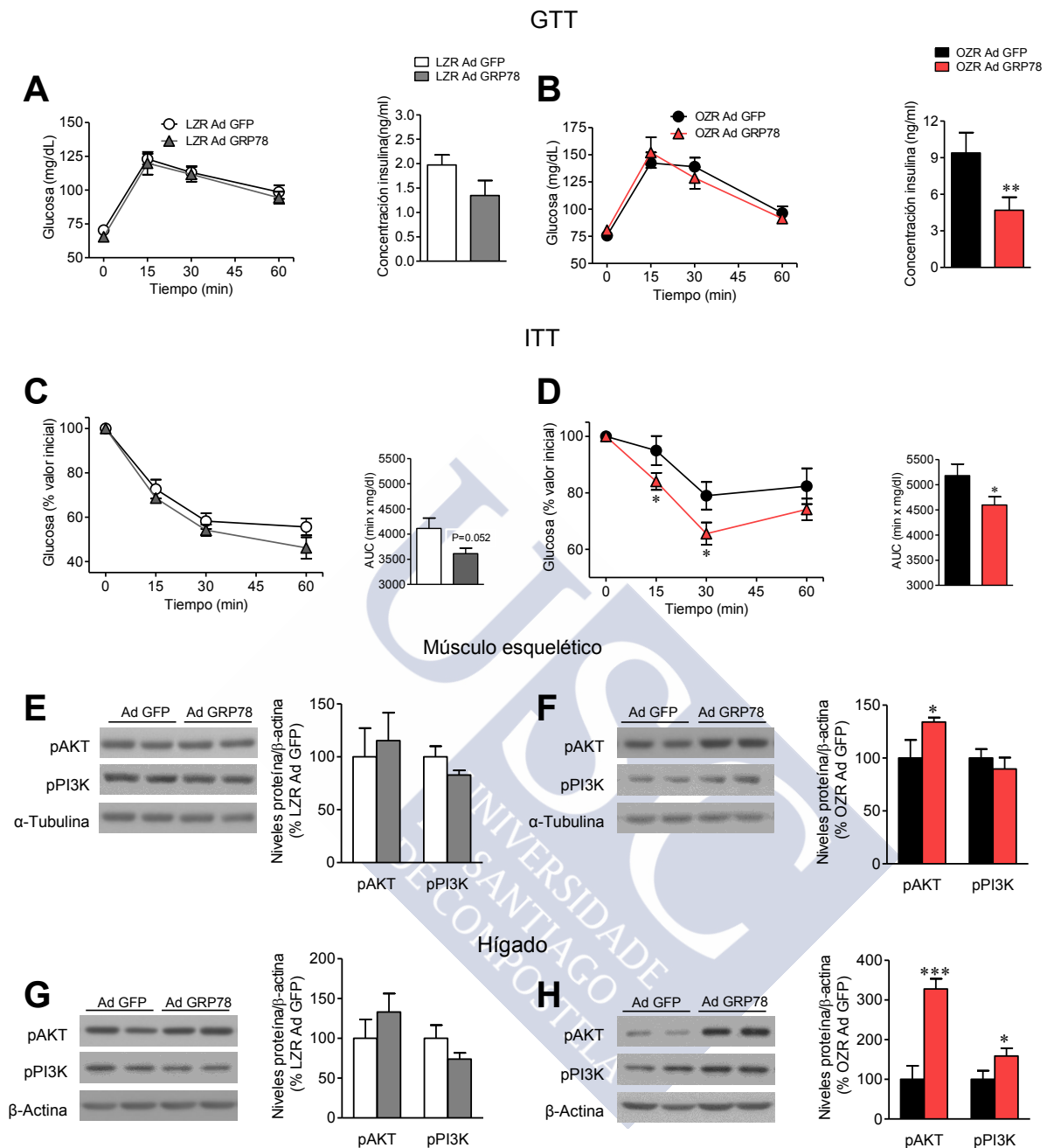


Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas Zucker obesas sobre la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina. (A y B) GTT (paneles izquierdos) y concentración de insulina en suero 30 minutos después de la administración de glucosa (paneles derechos), (C y D) ITT (paneles izquierdos) y área bajo la curva (AUC) de la ITT (paneles derechos), (E y F) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la vía de señalización de la insulina en el músculo esquelético (panel derecho) y (G y H) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la vía de señalización de la insulina en el hígado de LZR y OZR tratados estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=6-10 animales por grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 versus LZR Ad GFP u OZR Ad GFP.

4.1.8. El ER stress hipotalámico está incrementado en las ratas obesas alimentadas con HFD

Las ratas alimentadas con HFD durante 3 meses mostraron un aumento en el peso corporal y la ingesta de energía (Figuras 35A y 35B). Proteínas de la vía de UPR del ER, tales como GRP78, pIRE1, pPERK, p $\text{eIF}2\alpha$, ATF6 α y CHOP se incrementaron en el VMH del grupo HFD, demostrando un aumento del ER stress (Figura 35C).

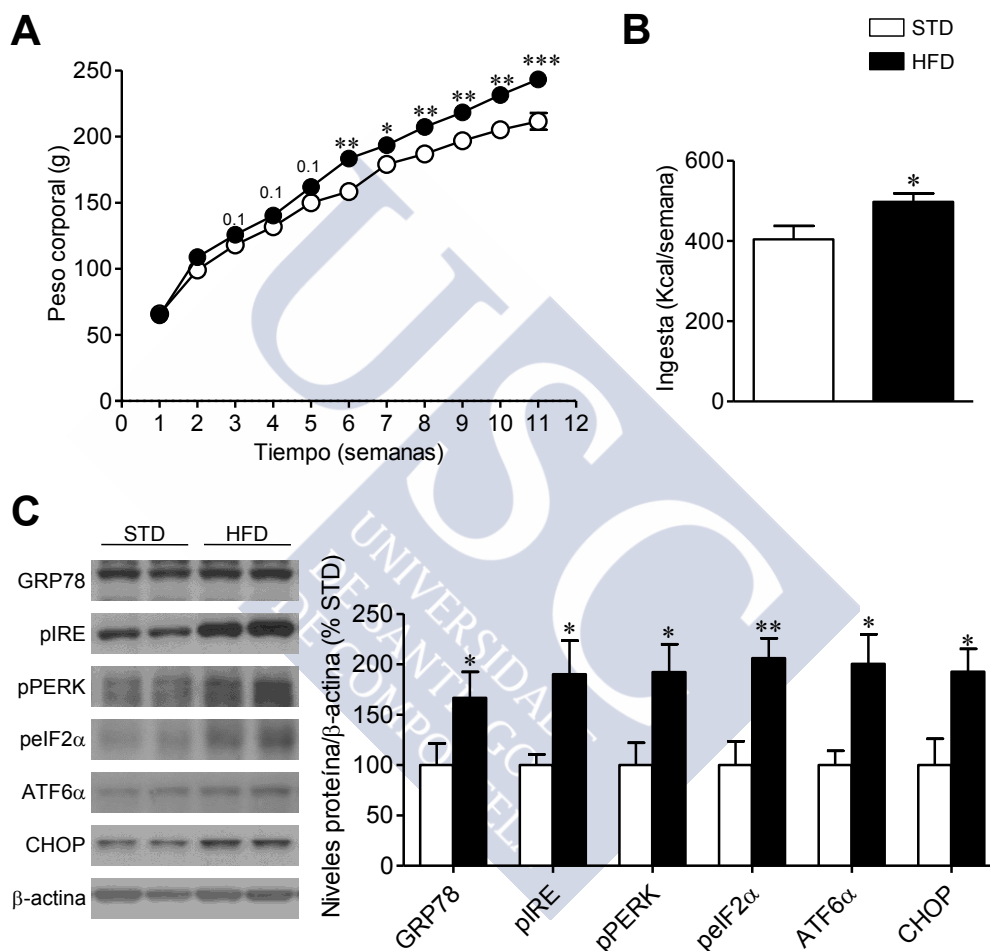


Figura 35. Efecto de la HFD en el balance de energético y en el ER stress hipotalámico. (A) Variación del peso corporal, (B) ingesta de comida y (C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho) de ratas alimentadas con STD o HFD durante 3 meses. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=6-20 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus STD.

4.1.9. El tratamiento central con TUDCA disminuyó el peso corporal y el ER stress de las ratas obesas HFD

Nuestro siguiente objetivo fue investigar si la mejora del ER stress hipotalámico podría revertir o mejorar el fenotipo metabólico de las ratas con obesidad inducida por dieta. Para ello, las ratas alimentadas con HFD fueron tratadas vía ICV con la chaperona química TUDCA. La administración central de este fármaco en las ratas HFD indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta (Figura 36B), una disminución del ER stress hipotalámico (Figura 36E) y un aumento de la temperatura corporal (Figura 36F).

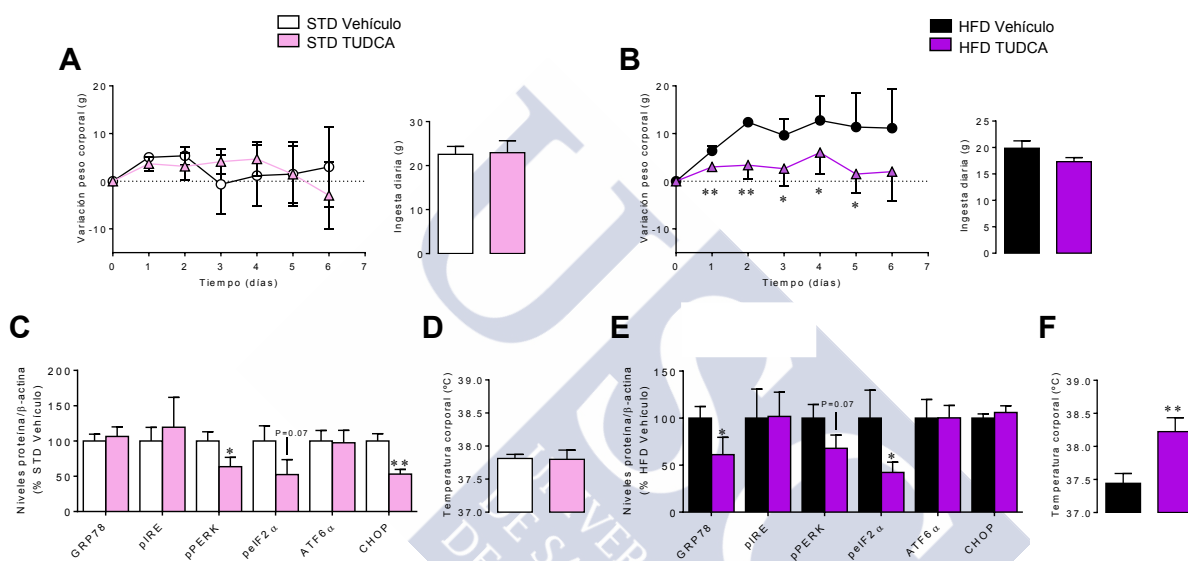


Figura 36. Efecto central de TUDCA sobre el balance energético de ratas HFD. (A y B) Variación de peso corporal (paneles izquierdos) e ingesta de comida (paneles derechos), (C y E) niveles de proteína de la UPR en el VMH y (D y F) temperatura rectal de ratas STD y HFD tratadas centralmente con vehículo o TUDCA. n=7-9 animales por grupo experimental. Todos los datos se expresan como media±SEM. *P<0.05 y **P <0.01 versus vehículo (STD o HFD).

Tras observar estos cambios en la homeostasis energética de los animales decidimos caracterizar más a fondo el componente termogénico. Lo que vimos es que en las ratas HFD, TUDCA produjo un aumento de la temperatura del BAT (Figura 37A), un oscurecimiento visible del BAT (Figura 37B) y un incremento de UPC1 en BAT (Figura 37C), gWAT (Figura 37D) y sWAT (Figura 37E), siendo este último indicativo de *browning* (Kajimura et al., 2015; Wang and Seale, 2016). Es de destacar que ninguno de estos cambios metabólicos se encontró en las ratas alimentadas con STD (Figuras 36A, 36C, 36D, 37A, 37B, 37C, 37D y 37E).

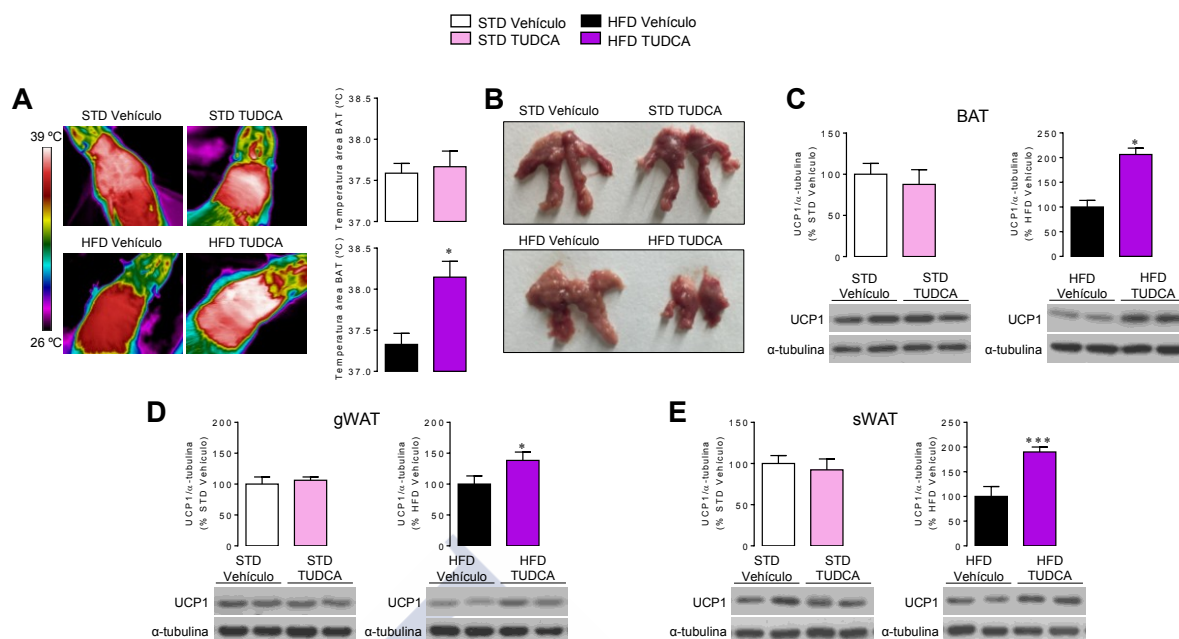


Figura 37. Efecto central de TUDCA en la termogénesis de las ratas HFD. (A) Imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos), (B) imágenes macroscópicas representativas del BAT interescapular, (C, D y E) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles inferiores, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en BAT, gWAT y sWAT respectivamente (paneles superiores) de ratas STD y HFD tratadas centralmente con vehículo o TUDCA. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=6-7 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus vehículo (STD o HFD).

4.1.10. GRP78 en el VMH disminuyó el peso corporal y el ER stress de las ratas obesas HFD

A continuación, de manera análoga al modelo animal tratado con ceramidas y a las ratas Zucker, se inyectó en el VMH un adenovirus que codifica la chaperona GRP78 o bien un adenovirus control que expresa GFP, por ser este núcleo hipotalámico un sitio clave que modula la actividad del BAT (Contreras et al., 2014a; Lopez et al., 2016). La eficacia de la infección en el VMH se evaluó mediante la expresión de GFP (Figura 38A), y también mediante *western blot*, observando unos mayores niveles de GRP78 en las muestras de VMH (Figuras 38B y 38C). El adenovirus GRP78 provocó una disminución en los niveles de proteína de pIRE, peIF2 α y CHOP en el VMH de las ratas STD (Figura 38B), mientras que en las ratas HFD se detectó una reducción de peIF2 α y CHOP (Figura 38C). Además, la administración de adenovirus GRP78 en el VMH indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta en las ratas HFD pero no en las ratas STD (Figuras 38D y 38E). De acuerdo con estos datos, la inyección de adenovirus GRP78 condujo a una reducción en la adiposidad medida por el peso de la grasa subcutánea en las ratas HFD, pero no en las ratas STD (Figuras 38F y 38G). Estos efectos se asociaron con una mejora en el fenotipo metabólico de las ratas HFD, como lo demuestra la disminución de la esteatosis hepática (Figura 38H).

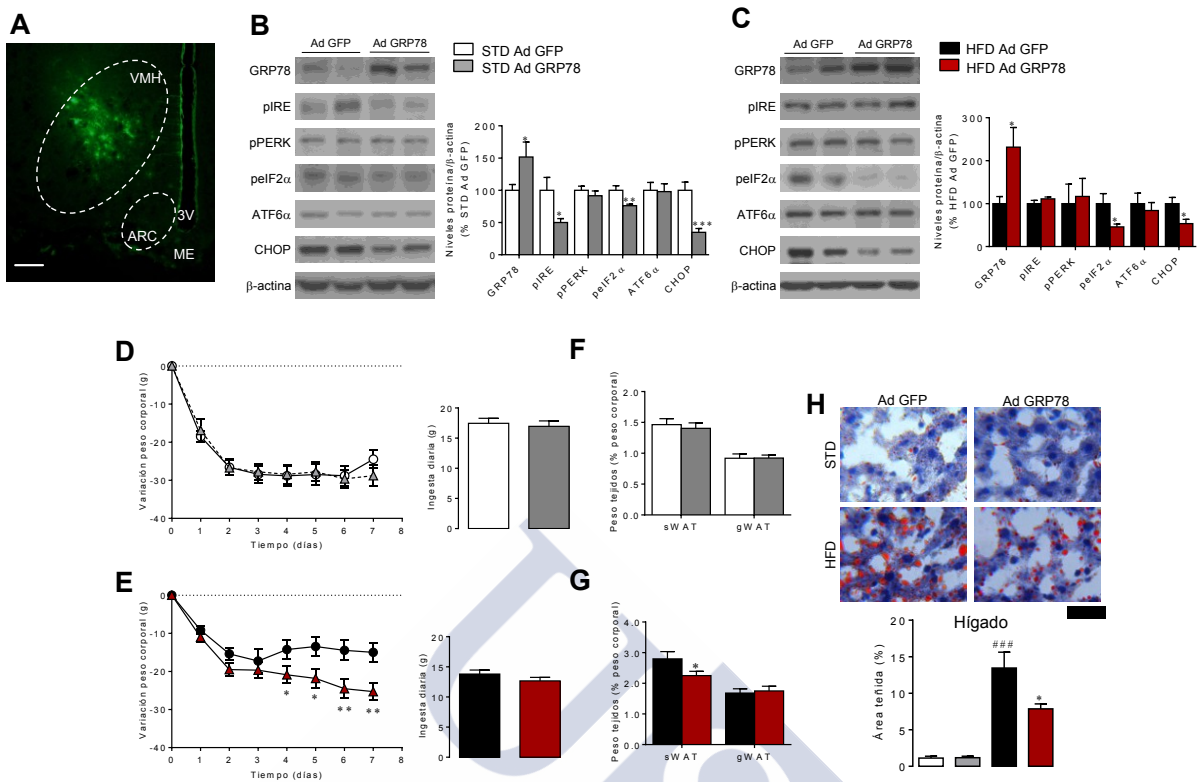


Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas HFD sobre el balance de energía. (A) Fluorescencia directa representativa de la expresión de GFP en el VMH (20X, barra de escala: 100 μ m), (B y C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (paneles derechos), (D y E) variación de peso corporal (paneles izquierdos) e ingesta de comida (paneles derechos), (F y G) peso del sWAT y del gWAT y (H) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel superior, barra de escala: 50 μ m) y su cuantificación (panel inferior) de ratas con STD o HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-46 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus (STD o HFD) Ad GFP; ###P<0.001 versus STD Ad GFP.

Además, en relación con esto, los niveles séricos de colesterol se redujeron y los niveles séricos de leptina mostraron una tendencia, aunque estadísticamente no significativa, a estar disminuidos por el efecto del adenovirus GRP78 en las ratas HFD. No se detectaron cambios, independientes de la dieta, en triglicéridos (TAG), NEFAs o insulina circulantes (Tabla 16).

	STD Ad GFP	STD Ad GRP78	HFD Ad GFP	HFD Ad GRP78
Leptina (ng/mL)	2.89 \pm 0.46	2.03 \pm 0.51	8.82 \pm 1.37 ***	6.45 \pm 0.91 (P=0.1 vs. HFD Ad GFP)
Insulina (ng/mL)	0.47 \pm 0.14	0.50 \pm 0.14	0.94 \pm 0.18 *	0.81 \pm 0.19
Colesterol (mg/dL)	107.10 \pm 6.58	106.64 \pm 6.14	152.68 \pm 2.39 ***	142.05 \pm 3.73 #
NEFAs (mg/dL)	11.49 \pm 0.53	15.18 \pm 0.93	20.22 \pm 1.92 **	20.29 \pm 1.79 ***
TAG (mg/dL)	63.96 \pm 5.79	55.11 \pm 6.25	64.49 \pm 9.91	52.79 \pm 11.00

Tabla 16. Parámetros metabólicos séricos de ratas STD o HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=8-9 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus STD Ad GFP; #p<0.05 versus HFD Ad GFP.

Para cerciorarnos acerca de la especificidad de la administración en el VMH, realizamos inyecciones de adenovirus codificantes para GRP78 en áreas hipotalámicas próximas al VMH, evitando infectar las poblaciones neuronales que componen el VMH (Figura 39A). Nuestros datos anatómicos mostraron que el VMH no se infectó, como lo indica la ausencia de GFP en este núcleo. Notablemente, bajo estas condiciones no se encontraron cambios en el peso corporal (Figura 39B) ni en la ingesta (Figura 39C). Estas evidencias indican que el efecto de GRP78 en el peso corporal es específico del VMH y no está relacionado con poblaciones neuronales fuera de este núcleo.

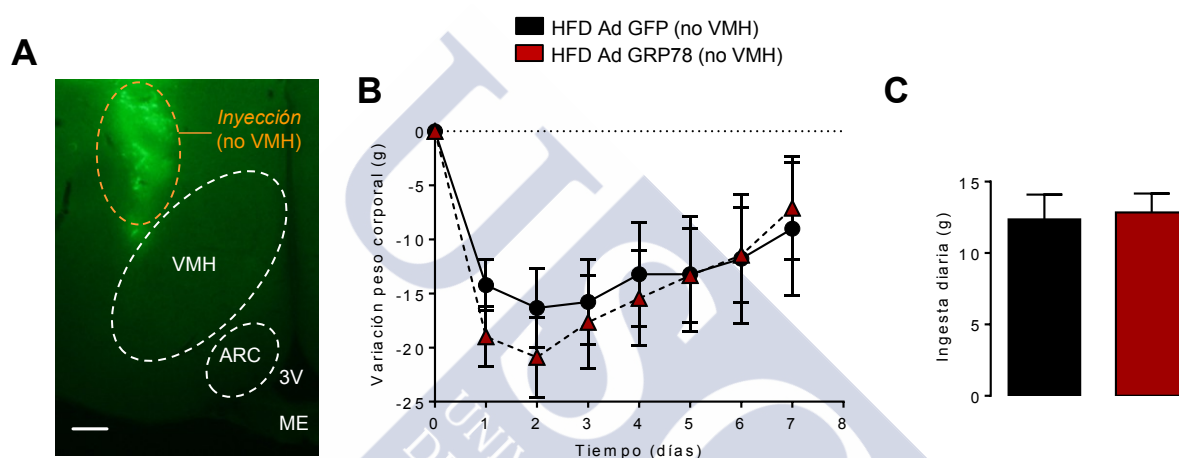


Figura 39. Efecto de la sobreexpresión central “errante” de GRP78 en el balance energético en ratas HFD (A) Fluorescencia directa representativa de la expresión de GFP en el exterior del VMH (20X, barra de escala: 100 μ m), (B) variación de peso corporal y (C) ingesta de comida de ratas HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en la vecindad del VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=9 animales por grupo experimental.

Con el fin de investigar si la magnitud de la DIO podría afectar el efecto de la manipulación hipotalámica de GRP78, generamos un modelo de HFD de 6 meses. El tratamiento con adenovirus codificantes para GRP78 en el VMH recapituló los efectos observados en el modelo HFD de 3 meses: una disminución (masiva) del peso corporal independiente de la ingesta (Figuras 40A y 40B), asociada a una adiposidad reducida en sWAT y una tendencia en gWAT (Figura 40C).

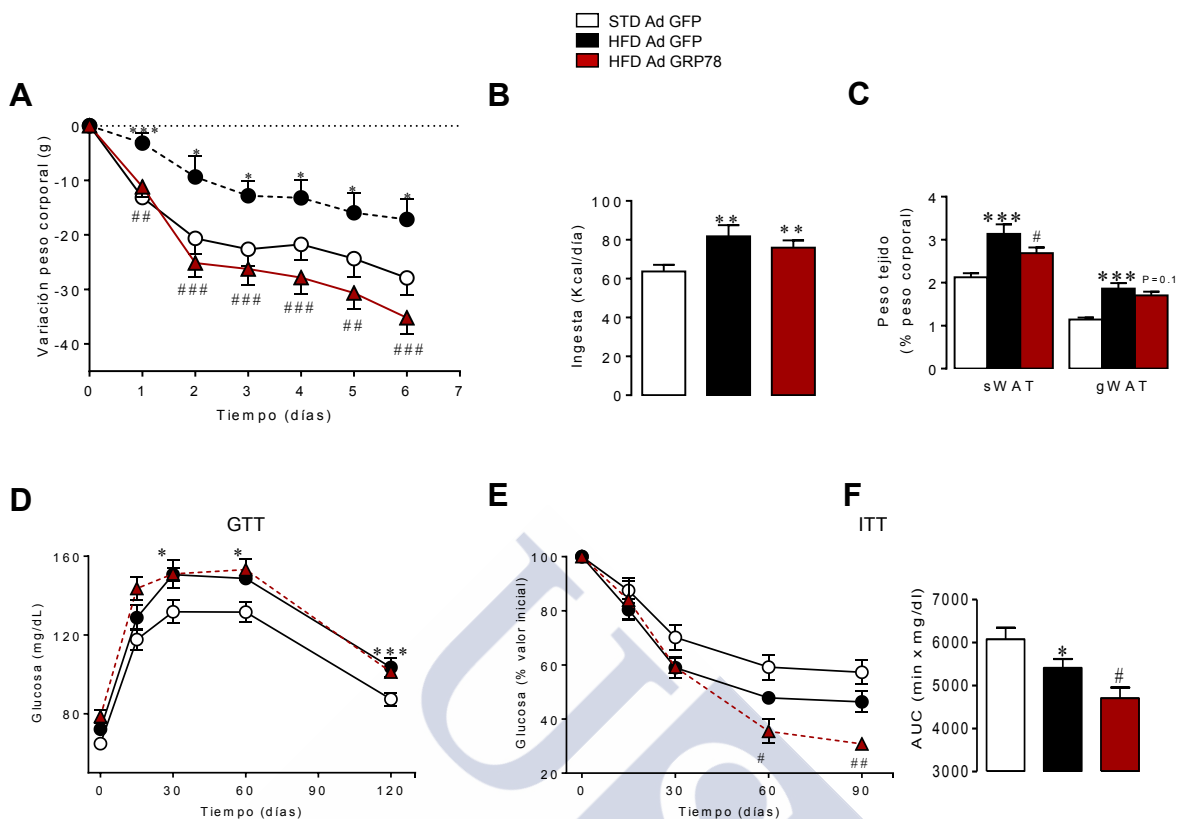


Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas alimentadas con HFD durante 6 meses sobre balance energético y la homeostasis de la glucosa. (A) Variación del peso corporal, (B) consumo de energía, (C) peso del sWAT y del gWAT, (D) GTT, (E) ITT (panel izquierdo) y área bajo la curva (AUC) de la ITT (panel derecho) de ratas alimentadas durante 6 meses con STD o HFD y tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=10-20 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus STD Ad GFP; #P<0.05, ##P<0.01, y ###P<0.001 versus HFD Ad GFP.

4.1.11. GRP78 en el VMH mejoró la sensibilidad a insulina y la señalización de leptina de las ratas obesas HFD

Evaluamos a continuación el impacto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH sobre la homeostasis de la glucosa en los tejidos periféricos y la sensibilidad a la insulina en las ratas alimentadas con HFD o STD durante 3 meses. Nuestros datos mostraron que la administración de GRP78 en el VMH no tuvo impacto en la tolerancia a la glucosa de las ratas STD (Figura 41A) ni tampoco en las ratas HFD (Figura 41B). Sin embargo, la resistencia a la insulina característica de las ratas HFD mejoró con el adenovirus codificante para GRP78 en el VMH (Figuras 41D y 41F), mientras que no afectó a las ratas STD (Figuras 41C y 41E). El cálculo de HOMA-IR confirmó que la resistencia a la insulina inducida por HFD fue mejorada por la sobreexpresión de GRP78 en VMH (STD Ad GFP: 1.42 ± 0.02 ; STD Ad GRP78: 1.48 ± 0.03 ; HFD Ad GFP: 2.90 ± 0.05 , $P < 0.001$ vs. STD Ad GFP; HFD Ad GRP78: 2.11 ± 0.02 , $P < 0.001$ vs. HFD Ad GFP). Se obtuvieron datos

similares cuando se administró GRP78 a las ratas alimentadas con HFD durante 6 meses (Figuras 40D, 40E y 40F).

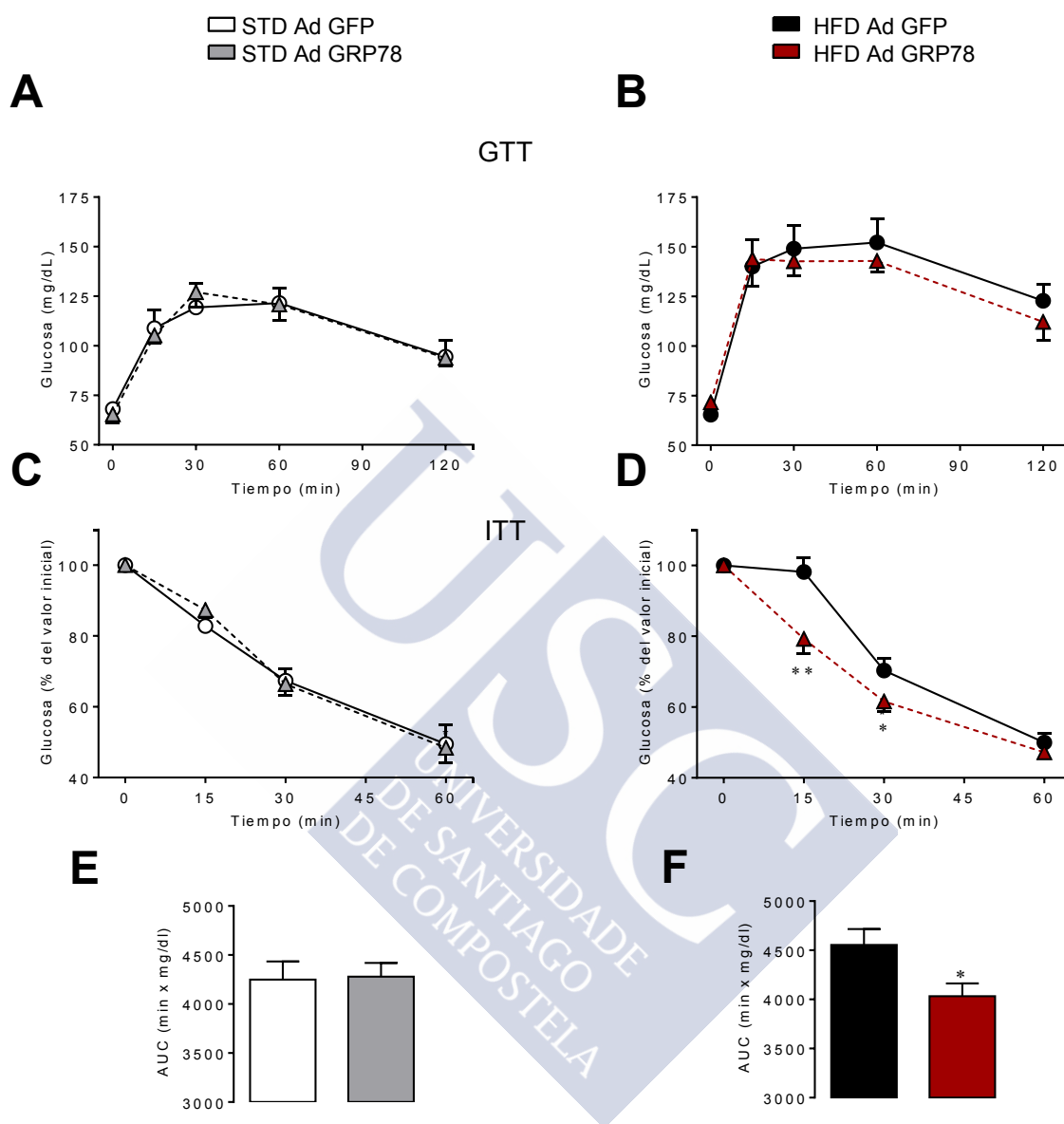


Figura 41. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas HFD sobre la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina. (A y B) GTT, (C y D) ITT y (E y F) área bajo la curva (AUC) de la ITT de ratas con STD y HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=14-15 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus HFD Ad GFP.

Como se ha explicado en la introducción, el ER stress induce resistencia a leptina e insulina (Zhang et al., 2008; Schneeberger et al., 2013). Nuestros datos mostraron que en el VMH de las ratas HFD durante 3 meses, pero no en las ratas STD, los niveles de proteína pSTAT3, pAKT y pPI3K aumentaron después de la administración de GRP78 (Figura 42A y 42B; experimento en condiciones basales, sin estimulación previa con leptina/insulina). Para agregar una visión funcional a los datos, se realizó un test de resistencia a leptina administrando leptina vía ICV en ratas HFD tratadas con adenovirus GFP o adenovirus

GRP78 en el VMH, y la se midió la ingesta a las 12 horas. Mientras que en las ratas STD, la leptina ICV tuvo una potente acción anorexigénica, este efecto desapareció en las ratas con HFD. De manera relevante, y en concordancia con los datos moleculares, la inyección de adenovirus GRP78 en el VMH recuperó la sensibilidad a la leptina en las ratas HFD (Figura 42C).

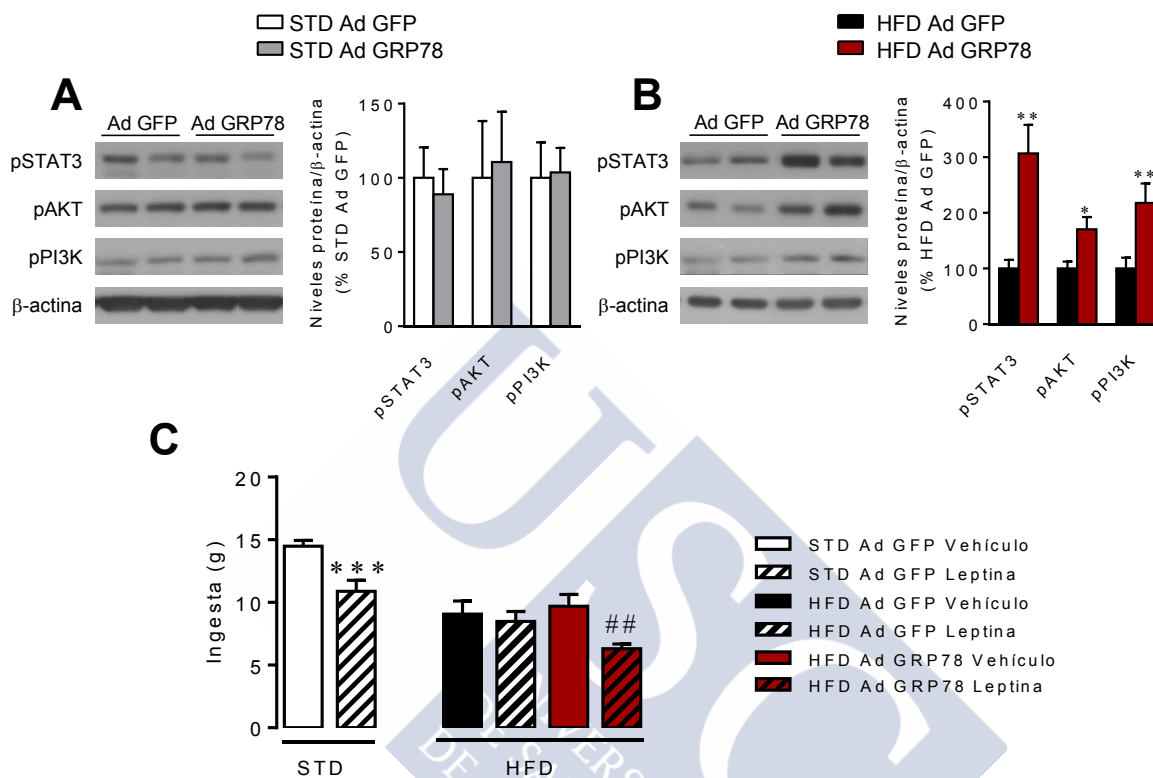


Figura 42. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas HFD sobre la señalización de la leptina. (A y B) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la vía de leptina en el VMH (paneles derechos) y (C) prueba de resistencia a la leptina de ratas STD y HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-10 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus HFD Ad GFP; ***P<0.001 versus vehículo STD Ad GFP; ##P<0.01 versus vehículo HFD Ad GRP78.

4.1.12. GRP78 en el VMH estimuló la termogénesis en el BAT y el *browning* del WAT de las ratas obesas HFD

A continuación, investigamos el efecto de los adenovirus GRP78 en el VMH sobre la termogénesis. Nuestros datos mostraron que mientras GRP78 en el VMH no modificó ni la temperatura del BAT ni la temperatura corporal en ratas STD (Figuras 43A y 43D), sí aumentó la temperatura de BAT y tendió a aumentar la temperatura corporal en ratas alimentadas con HFD durante 3 meses (Figuras 43B y 43F). De acuerdo con esto, observamos que el BAT de animales HFD tratados con adenovirus GRP78 presentaban un BAT macroscópicamente más oscuro (Figuras 43C y 43E), que se correspondía con unos niveles de

UCP1 más altos (Figuras 43G y 43H); sin embargo, en las ratas STD no observamos cambios. Notablemente, se observaron efectos similares cuando GRP78 se administró a ratas alimentadas con HFD durante 6 meses (Figuras 45A, 45B, 45C y 45D).

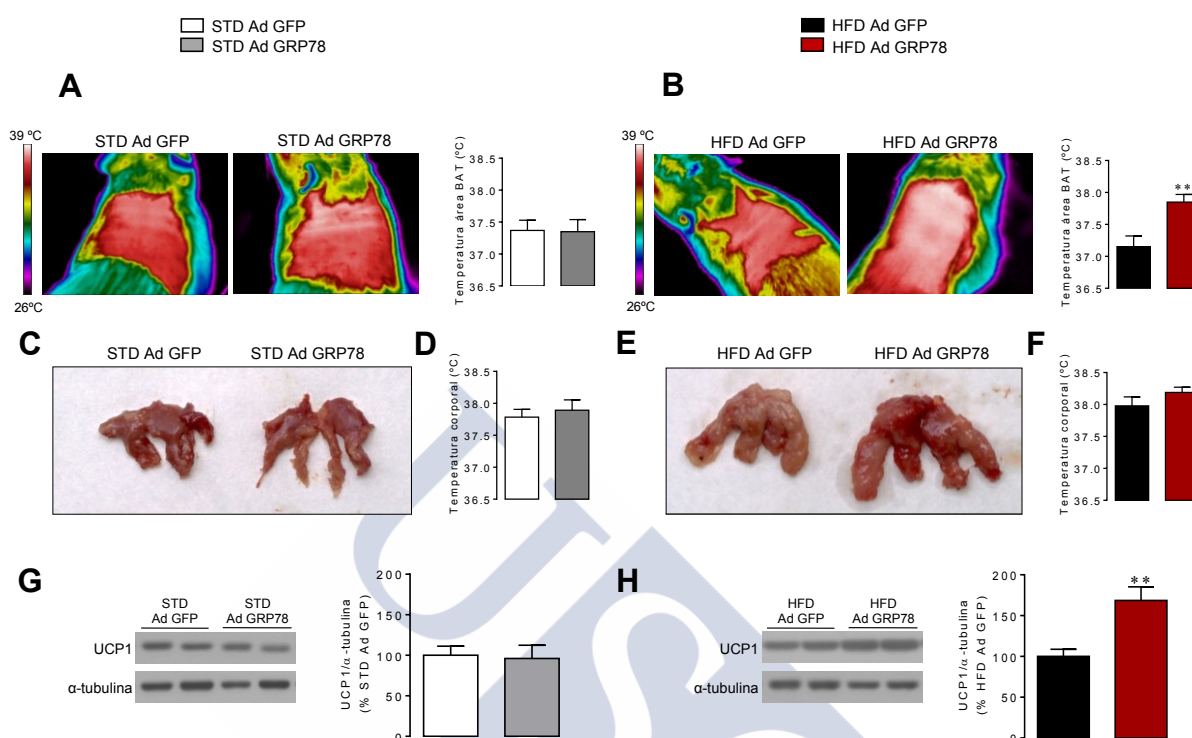


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas HFD sobre la termogénesis de BAT. (A y B) Imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos), (C y E) imágenes macroscópicas representativas del BAT interescapular, (D y F) temperatura rectal (G y H) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en BAT (paneles derechos) de ratas STD y HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-15 animales por grupo experimental. **P<0.01 versus HFD Ad GFP.

Después de demostrar que la administración de adenovirus GRP78 en el VMH activa la termogénesis BAT en ratas HFD, exploramos la posibilidad de que también pudiese regular el *browning* del WAT, como observamos con el tratamiento central con TUDCA (Figuras 37D y 37E). El tamaño de los adipocitos fue mayor en ambos gWAT y sWAT de ratas alimentadas con HFD durante 3 meses en comparación con ratas con STD. El tratamiento con GRP78 en el VMH redujo significativamente el tamaño de adipocitos en ambos regímenes de dieta (STD y HFD) (Figuras 44A y 44B). La administración de GRP78 en el VMH de las ratas HFD aumentó la inmunotinción de UCP1 en el gWAT en comparación con las GFP (Figura 44A), aunque en el sWAT la tendencia no fue significativa (P = 0.1) (Figura 44B). Se encontraron datos coherentes con los anteriores resultados cuando las mismas muestras se analizaron mediante *western blot*, confirmándose la elevación en la expresión de UCP1 en el sWAT y gWAT de ratas HFD, pero no en ratas STD, tratadas con adenovirus GRP78 en el VMH (Figuras 44C y 44D).

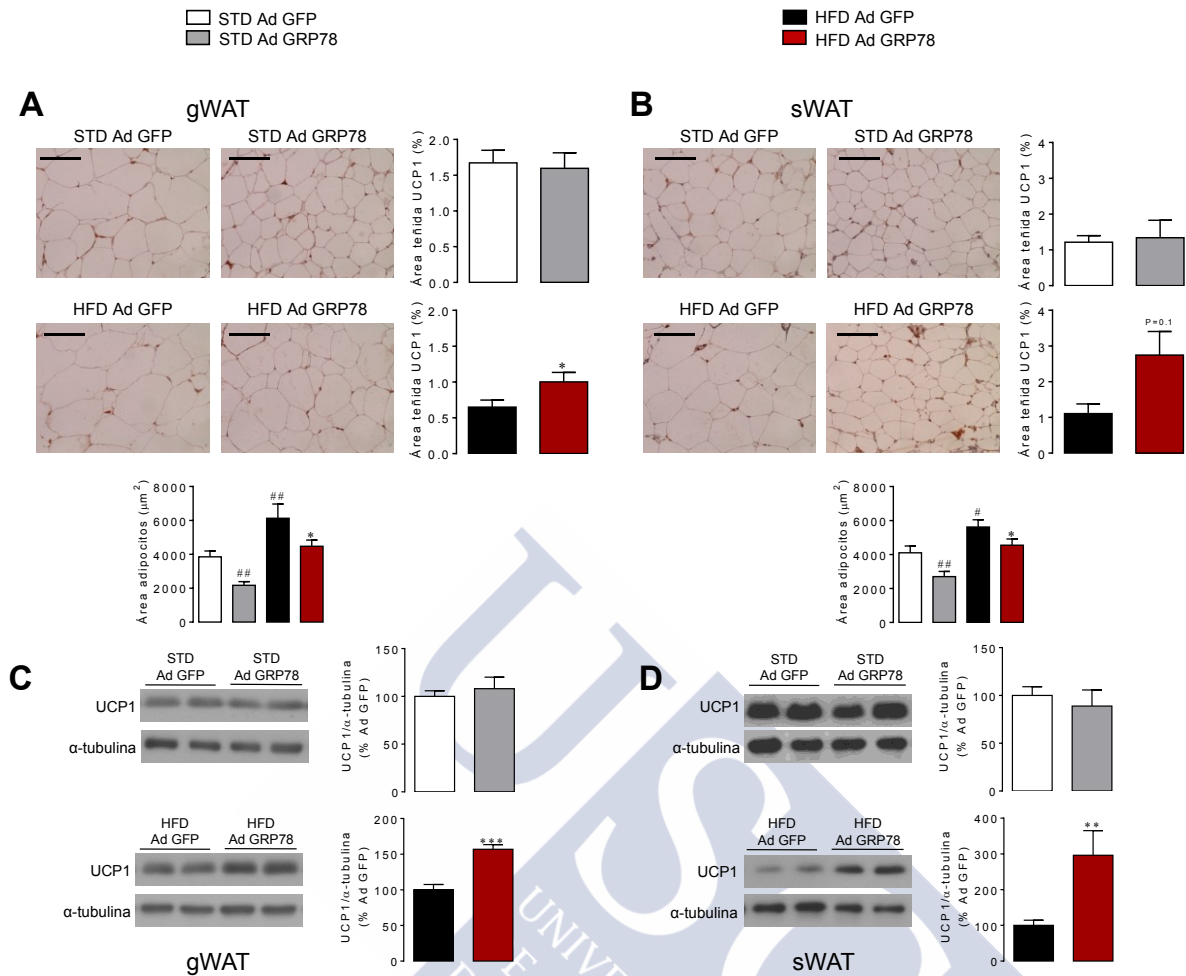


Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas HFD sobre el *browning* del WAT. (A y B) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-UCP1 representativa que muestra la tinción de UCP1 (paneles izquierdos; 20X, barra de escala: 100 µm), área teñida con UCP1 (paneles derechos), área de adipocitos (paneles inferiores), (C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en gWAT (paneles derechos) y (D) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en sWAT (paneles derechos) de ratas STD o HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-10 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus HFD Ad GFP; #P<0.05 y ##P<0.01 versus STD Ad GFP.

Los efectos de los adenovirus GRP78 en los animales con 6 meses de HFD, tamaño de los adipocitos gonadales e inguinales y la inmunotinción de UCP1 (Figuras 45E y 45F), fueron los mismos que en los de 3 meses de HFD. También mostraron una mayor expresión de otros marcadores de *browning* en la grasa blanca, tales como PGC1α (en ratas HFD), PRDM16 (en ratas STD y HFD), pero no de CIDEA (Figuras 45G y 45H).

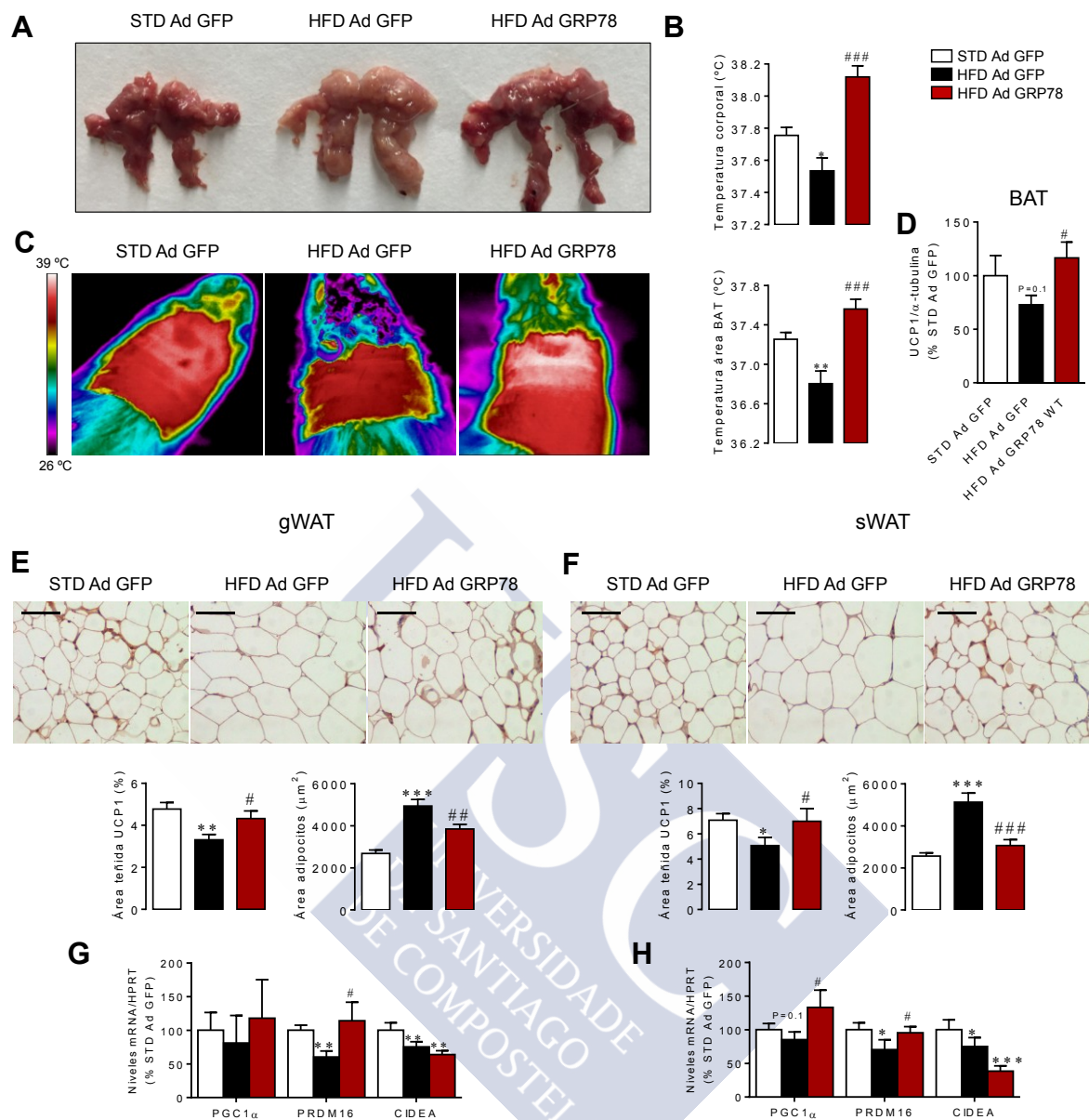


Figura 45. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas alimentadas con HFD durante 6 meses sobre la termogénesis del BAT y el browning del WAT. (A) Imágenes macroscópicas representativas del BAT interescapular BAT, (B) temperatura rectal, (C) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho), (D) niveles de UCP1 en el BAT, (E y F) inmunohistoquímica con anticuerpo anti-UCP1 representativa que muestra la tinción de UCP1 (paneles superiores; 20X, barra de escala: 100 μm), área teñida con UCP1 (paneles inferior izquierdos), área de adipocitos (paneles inferior derechos) del gWAT y del sWAT respectivamente y (G y H) niveles de mRNA de PGC1α, PRDM16 y CIDEA en gWAT y sWAT respectivamente de ratas alimentadas con STD o HFD durante 6 meses tratados con adenovirus GFP o GRP78. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=8-20 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus vehículo STD Ad GFP. #P<0.05, ##P<0.05 y ###P<0.05, 0.01 y 0.001 versus HFD Ad GFP.

4.1.13. GRP78 en el VMH indujo la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT a través de la activación del SNS

La termogénesis de BAT está controlada principalmente por el SNS a través de los β 3-AR (Cannon and Nedergaard, 2004; Morrison and Nakamura, 2011; Contreras et al., 2014a). Por este motivo, investigamos si la regulación del BAT después de la administración de los adenovirus GRP78 en el VMH estaba mediada por el SNS. La inactivación farmacológica del β 3-AR por administración SC del antagonista específico SR59230A (Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014) revirtió el efecto sobre el peso corporal asociado con la administración central de GRP78 (Figura 46A) sin afectar la ingesta de los animales (Figura 46B). Acorde con el aumento de peso después del bloqueo β 3-AR, también aumentó la cantidad de grasa inguinal y gonadal (Figura 46C). El tratamiento con SR59230A se asoció con una disminución en la coloración de BAT (observada macroscópicamente) y promovió la acumulación de WAT a nivel interescapular (Figura 46D). Además, SR59230A disminuyó los niveles de UCP1 medidos por *western blot* (Figura 46E), así como la temperatura corporal y de BAT (Figuras 46F y 46G).

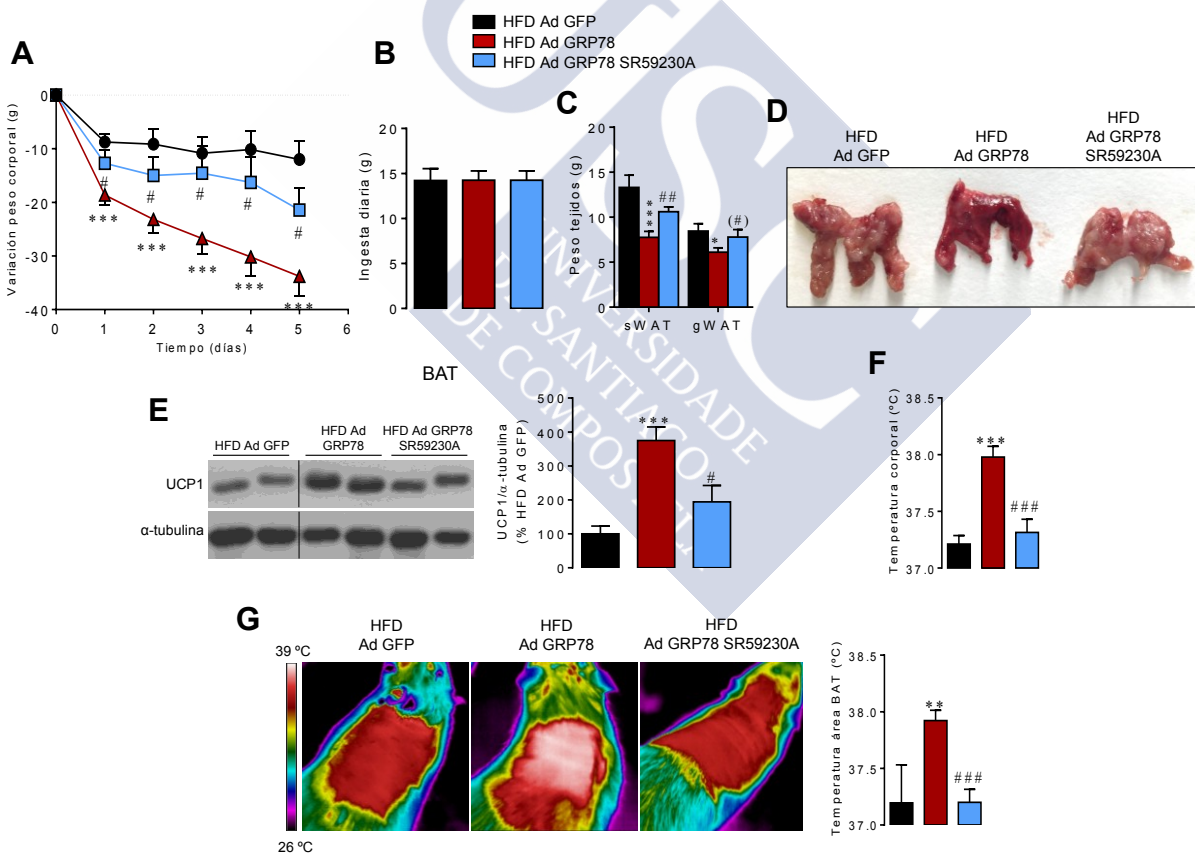


Figura 46. Efecto del antagonismo del β 3-AR sobre la termogénesis de BAT inducida por GRP78 en ratas HFD. (A) Variación de peso corporal, (B) ingesta de comida, (C), peso del sWAT y gWAT, (D) imágenes macroscópicas representativas del BAT, (E) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho) y (G) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho) de ratas HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH y tratadas subcutáneamente con vehículo o el antagonista del β 3-AR (SR59230A). n=7-19 animales por grupo experimental. Todos los datos se expresan como

media \pm SEM. * P <0.05, ** P <0.01, y *** P <0.001 versus HFD Ad GFP; (# P <0.05), # P <0.5, ### P <0.01 y #### P <0.001 versus HFD Ad GRP78.

Evidencias recientes han demostrado que el fenómeno de *browning* está modulado por el SNS a través de β 3-AR en los adipocitos blancos (Nedergaard and Cannon, 2014; Contreras et al., 2016). Por este motivo, investigamos el efecto de SR59230A en el *browning* del WAT. SR59230A revirtió el fenotipo *beige/brite* del WAT inducido por los adenovirus codificantes para GRP78, como lo demuestra el aumento de área de los adipocitos, la disminución de la inmunotinción de UCP1 (Figuras 47A y 47C) y los niveles proteicos de UCP1 (Figuras 47B y 47D), tanto en gWAT como en sWAT.

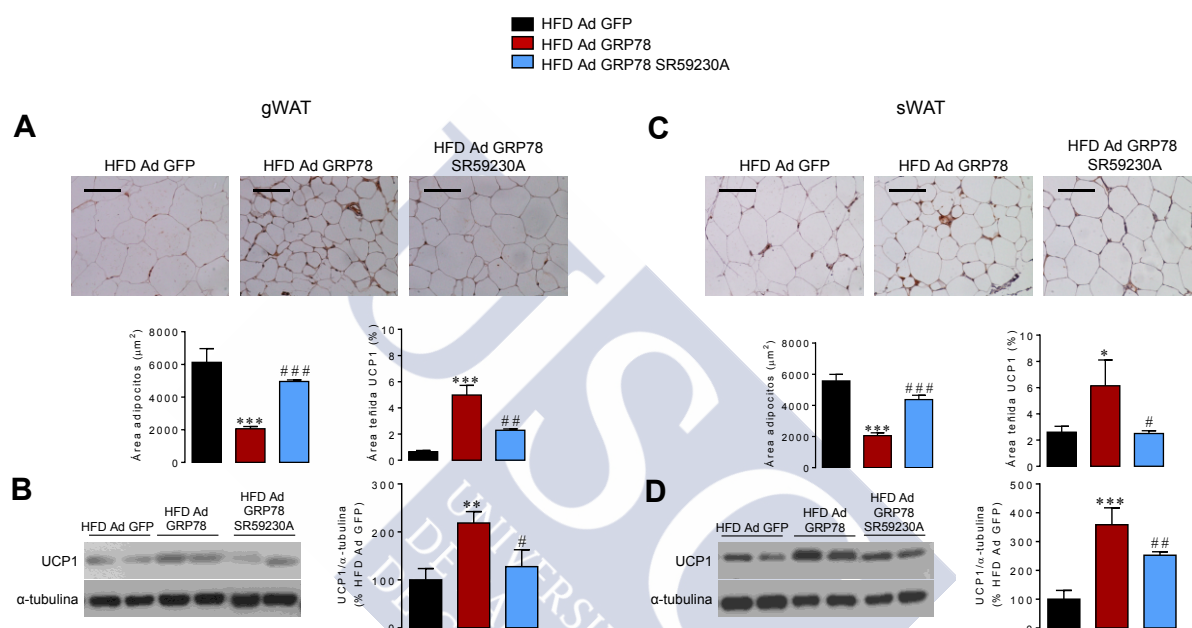


Figura 47. Efecto del antagonismo del β 3-AR sobre el *browning* del WAT inducido por GRP78 en ratas HFD. (A y C) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-UCP1 representativa que muestra la tinción de UCP1 (paneles superiores; 20X, barra de escala: 100 μm), área teñida con UCP1 (paneles inferior izquierdos), área de adipocitos (paneles inferior derechos) del gWAT y del sWAT respectivamente y (B y D) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en gWAT y sWAT respectivamente (paneles derechos) de ratas HFD tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH y tratadas subcutáneamente con vehículo o el antagonista del β 3-AR (SR59230A). Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n =6-8 animales por grupo experimental. * P <0.05, ** P <0.01, y *** P <0.001 versus HFD Ad GFP; (# P <0.05), # P <0.5, ### P <0.01 y #### P <0.001 versus HFD Ad GRP78.

4.1.14. El *browning* del WAT inducido por GRP78 en el VMH es independiente de la señalización de leptina

También investigamos si el efecto central de GRP78 en el VMH sobre el *browning* era directo o secundario a la acción de la leptina; en tanto que sabíamos que GRP78 inducía una pérdida de peso, una disminución de la adiposidad y una tendencia a reducir los niveles de leptina (Figuras 38E, 38G, 40C y Tabla 16). Para abordar esto, se analizó el efecto de los

adenovirus GRP78 en las OZR y en las LZR. Nuestros datos mostraron que el tratamiento con GRP78 en el VMH promovió el *browning* en las OZR pero no en las LZR, como lo demuestra la disminución del área de los adipocitos y el aumento de la inmunotinción de UCP1 (Figuras 48A y 48B), así como los niveles de proteína UCP1 (Figuras 48C y 48D).

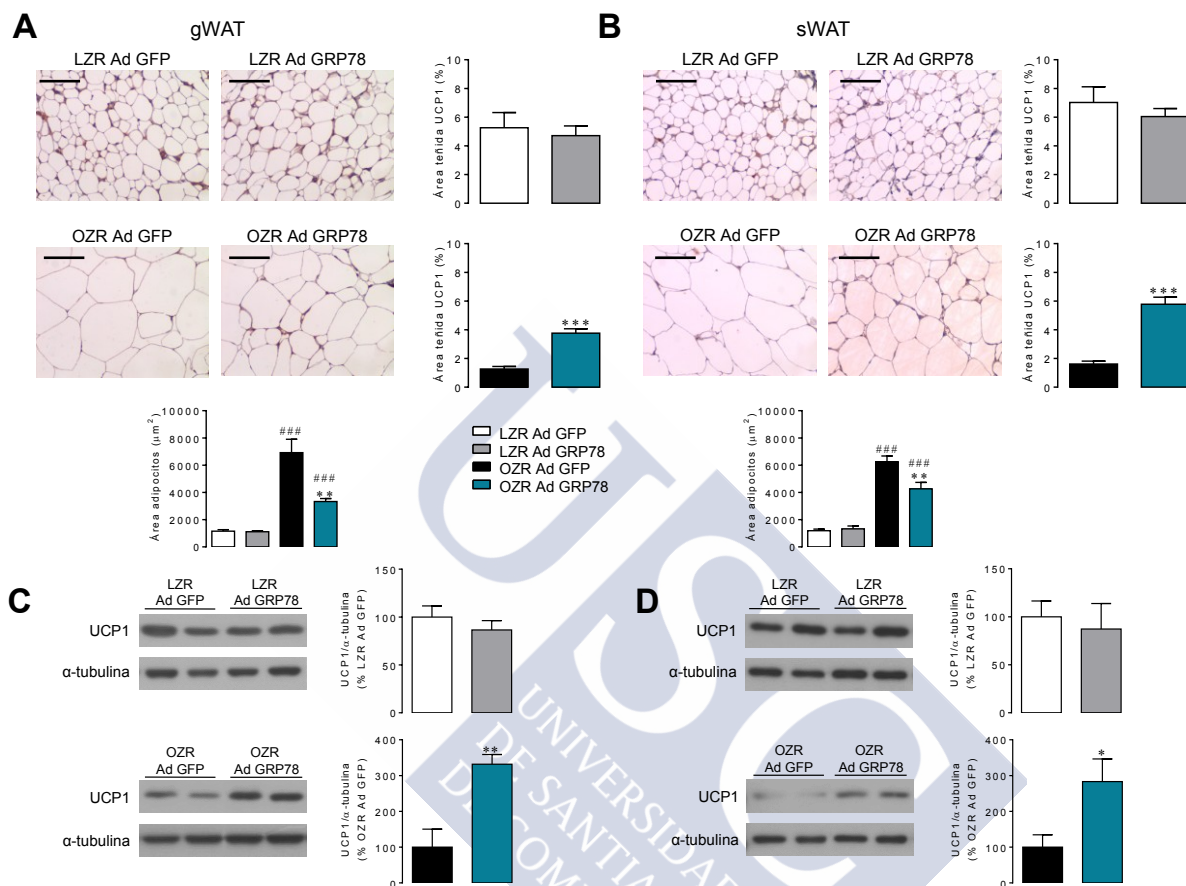


Figura 48. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de las OZR sobre el *browning* del WAT. (A y B) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-UCP1 representativa que muestra la tinción de UCP1 (paneles superior izquierdos; 20X, barra de escala: 100 μm), área teñida con UCP1 (paneles superior derechos), área de adipocitos (paneles inferior izquierdos) del gWAT y del sWAT respectivamente y (C y D) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en gWAT y sWAT respectivamente (paneles derechos) de LZR u OZR tratadas estereotáxicamente con adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=6-10 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus OZR Ad GFP; ###P<0.001 versus LZR Ad GFP.

4.1.15. GRP78 en el VMH revirtió los efectos centrales de la tapsigargina en el balance energético

Finalmente, quisimos investigar si los efectos de la manipulación de GRP78 en el VMH eran consistentes y reproducibles en otro modelo de ER stress; a saber, el inducido farmacológicamente por la administración central de tapsigargina. El tratamiento central con este fármaco indujo un aumento de peso independiente de la ingesta (Figuras 49A y 49B).

También encontramos un aumento del ER stress hipotalámico (Figura 49C), un BAT menos oscuro a simple vista con acumulación de grasa a nivel macroscópico (Figura 49D), una tendencia a disminuir la temperatura corporal (Figura 49E), una disminución significativa en la temperatura del BAT (Figura 49F), así como niveles disminuidos de UCP1 en el BAT (Figura 49G), gWAT (Figura 49H) y sWAT (Figura 49I). Es de destacar que todas esas respuestas se revirtieron o mejoraron mediante la administración de adenovirus GRP78 en el VMH. Las anteriores evidencias demuestran que, a través de la atenuación del ER stress, GRP78 en el VMH es un importante modulador del balance energético al controlar tanto la termogénesis del BAT como el *browning* del WAT.

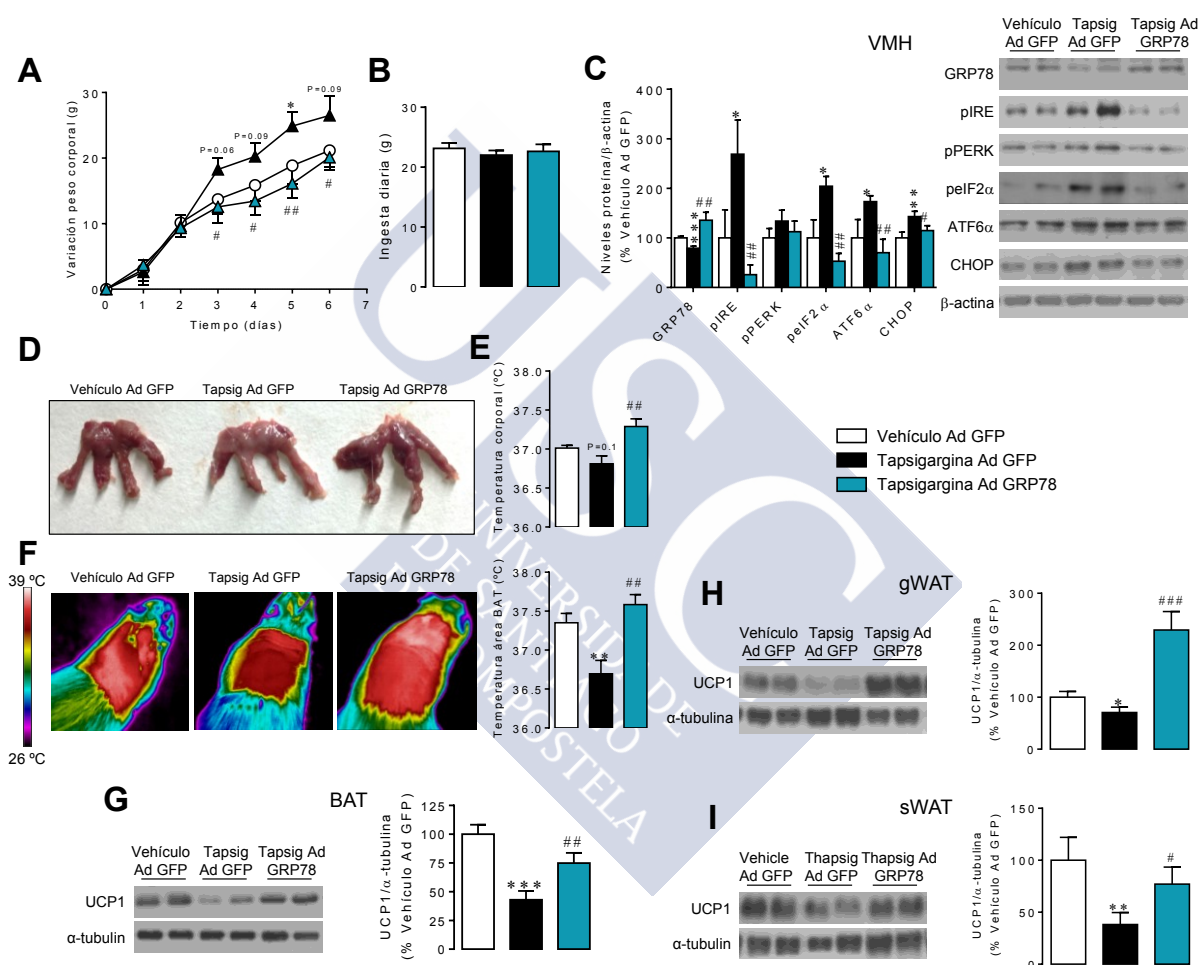


Figura 49. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH en ratas tratadas centralmente con taspargargin. (A) Variación de peso corporal, (B) ingesta de comida, (C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel derecho, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel izquierdo), (D) imágenes macroscópicas representativas del BAT, (E) temperatura rectal, (F) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho) de ratas y (G, H e I) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT, gWAT y sWAT respectivamente (panel derecho) de ratas tratadas centralmente con vehículo o taspargargin y administración estereotáxica de adenovirus GFP o GRP78 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=5-10 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01, y ***P<0.001 versus vehículo Ad GFP; #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus taspargargin Ad GFP.

4.2. EL ESTRADIOL REGULA EL BALANCE ENERGÉTICO REDUCIENDO EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDO POR LAS CERAMIDAS

4.2.1. El estradiol central inhibe la lipotoxicidad y el ER stress hipotalámico inducido por ceramidas

El modelo usado para generar una deficiencia estrogénica fueron las ratas OVX, como se explica en la sección de métodos son ratas hembra a las que se les extirpan quirúrgicamente los ovarios y que por tanto pierden la capacidad de generar estrógenos endógenos. En nuestros experimentos las ratas OVX tuvieron una significativa ganancia de peso durante los 15 días posteriores al procedimiento (Sham: 12.7 ± 2.54 g; OVX: 48.63 ± 2.38 g; $P < 0.001$) y desarrollaron una marcada hiperfagia (Sham: 16.1 ± 0.42 g; OVX: 18.25 ± 0.40 g 15 días después de la OVX; $P < 0.001$). Como se esperaba, el tratamiento con E2 central (ICV) provocó una marcada disminución en el peso corporal y en la ingesta (Figuras 50A y 50B), así como una reducción en la adiposidad y en la masa magra (Figura 50C).

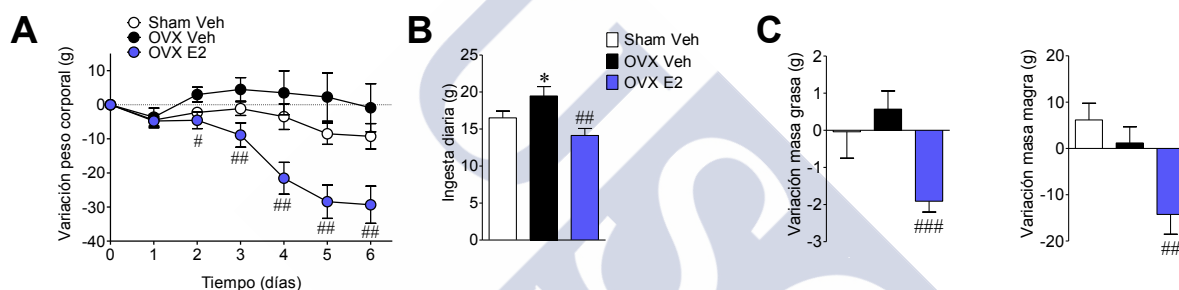


Figura 50. Efecto central del E2 sobre el balance energético. (A) Variación del peso corporal, (B) ingesta de comida y (C) variación de la masa grasa (panel izquierdo) y variación de la masa magra (panel derecho) de ratas Sham o OVX tratadas ICV con vehículo o E2. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. $n = 7-9$ animales por grupo experimental. * $P < 0.05$ versus Sham vehículo; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ versus OVX vehículo.

La administración central de E2 no afectó el consumo de oxígeno (vO_2 72 horas Sham Vehículo: 121.16 ± 2.76 mL/g masa magra; vO_2 72 horas OVX Vehículo: 114.66 ± 3.13 mL/g masa magra; vO_2 72 horas OVX E2: 118.17 ± 3.1 mL/g masa magra). Sin embargo, el E2 central aumentó significativamente el gasto de energía (EE) de las ratas OVX (Figura 51A). De acuerdo con esta evidencia, las ratas OVX que recibieron E2 ICV mostraron un cociente respiratorio reducido (RQ; Figura 51B), indicativo de una mayor oxidación de lípidos.

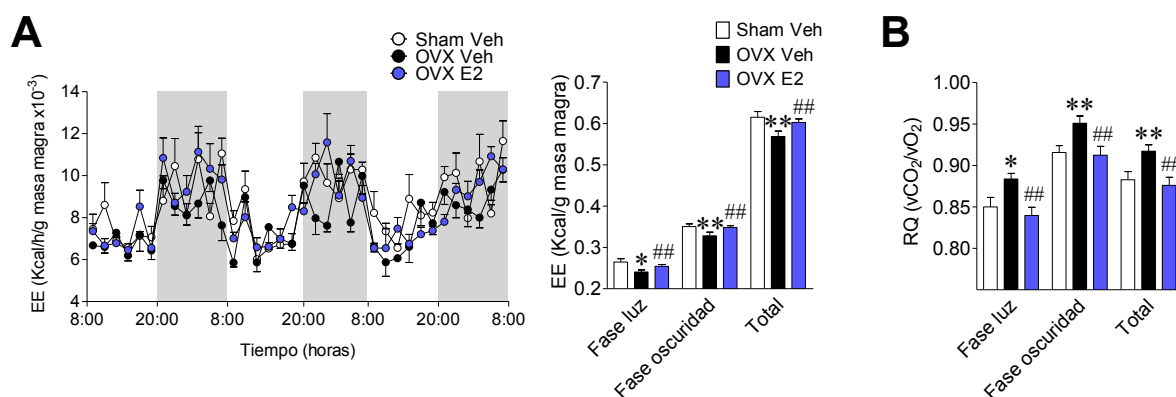


Figura 51. Efecto central del E2 sobre la homeostasis energética. (A) Variación del gasto energético a lo largo de 72h (panel izquierdo) y gasto energético acumulado en 72h y (B) cociente respiratorio de ratas Sham o OVX tratadas ICV con vehículo o E2. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus Sham vehículo; ###P<0.01 versus OVX vehículo.

También mostraron un aumento en la termogénesis del BAT y en la temperatura corporal (Figuras 52A y 52B), con expresión de UCP1 en el BAT (Figura 52C) y una reducción en el contenido de lípidos hepáticos (Figura 52D).

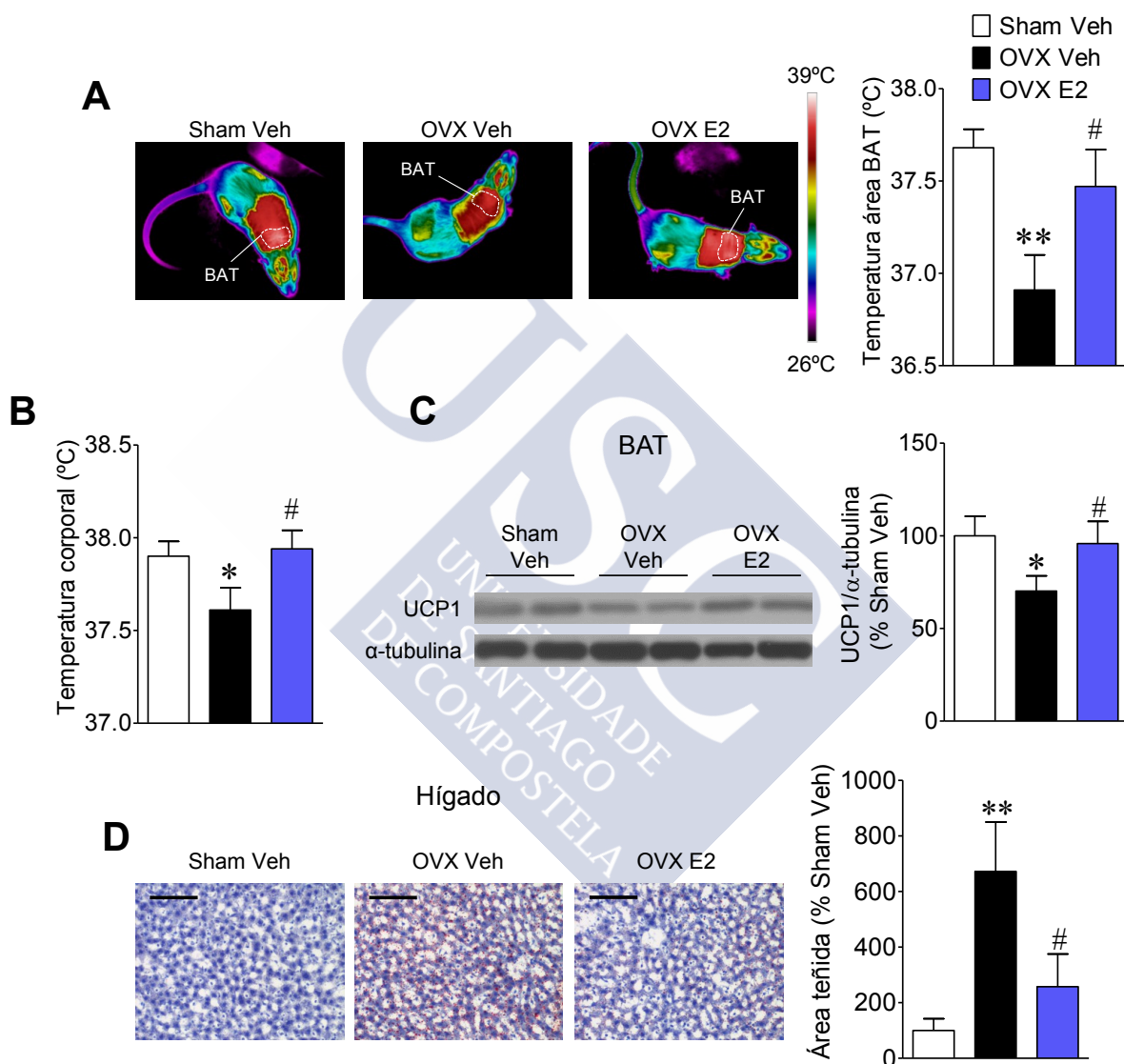


Figura 52. Efecto central del E2 sobre la termogénesis del BAT y los lípidos hepáticos. (A) Imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho), (B) temperatura rectal, (C) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho) y (D) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μm) y su cuantificación (panel derecho) de ratas Sham o OVX tratadas ICV con vehículo o E2. Todos los datos se expresan como media±SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus Sham vehículo; #P<0.05 versus OVX vehículo.

A continuación, investigamos el efecto de la OVX y el reemplazo central con E2 sobre los niveles de ceramidas en el MBH. Encontramos que la OVX indujo una marcada elevación de los niveles de ceramidas hipotalámicas y que el E2 ICV los restauró a los niveles observados en las ratas Sham (Figura 53A). Cabe destacar que, en asociación con el aumento de la concentración de ceramidas, las ratas OVX mostraron un aumento del ER stress en el MBH. Así, detectamos niveles aumentados de marcadores de la UPR, como pIRE, pPERK, p $\text{eIF2}\alpha$ y CHOP (Figura 53B). La administración central de E2 revirtió el aumento del ER stress al reducir los niveles de los marcadores de la UPR a los niveles de los detectados en los controles Sham. Debemos subrayar el hecho de que la expresión hipotalámica de la chaperona GRP78 se incrementó después del tratamiento central con E2, efecto que podemos interpretar como un mecanismo celular para reducir el ER stress (Figura 53B).

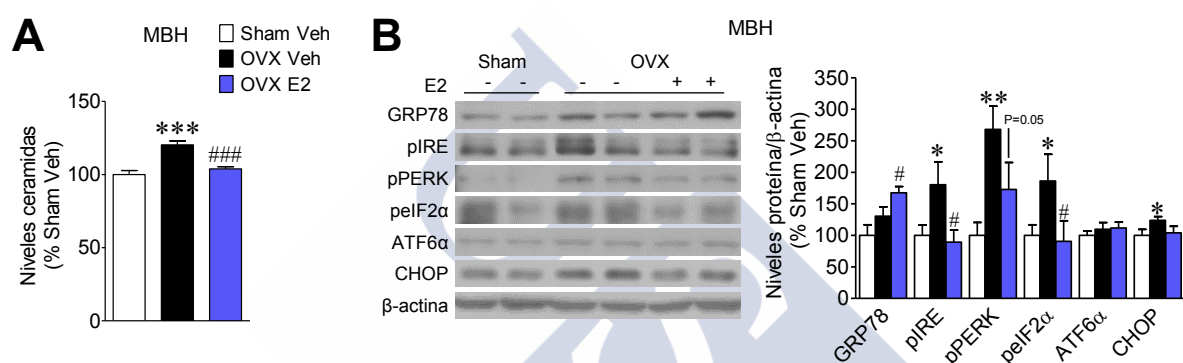


Figura 53. Efecto central del E2 sobre los niveles de ceramidas y el ER stress hipotalámico. (A) Niveles de ceramidas en el MBH y (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el MBH (panel derecho) de ratas Sham o OVX tratadas ICV con vehículo o E2. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-9 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.05 y ***P<0.05 versus Sham vehículo; #P<0.05 y ###P<0.001 versus OVX vehículo.

4.2.2. La inhibición farmacológica de la síntesis de ceramidas hipotalámicas mimetiza el efecto central del estradiol sobre el balance energético a través del SNS

Como hemos visto en los bloques de resultados 4.1 y 4.2, la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas promueve un balance energético positivo debido a una disminución en la termogénesis. Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar si la inhibición de la síntesis de ceramidas en el hipotálamo de ratas OVX podría mejorar su fenotipo metabólico. La administración crónica ICV de miriocina (un inhibidor de la síntesis de ceramidas) a ratas OVX disminuyó el peso corporal y la adiposidad de manera independiente a la ingesta (Figuras 54A, 54B y 54C). Este efecto se asoció con la normalización de los niveles de ceramidas y del ER stress en el MBH (Figuras 54C y 54D).

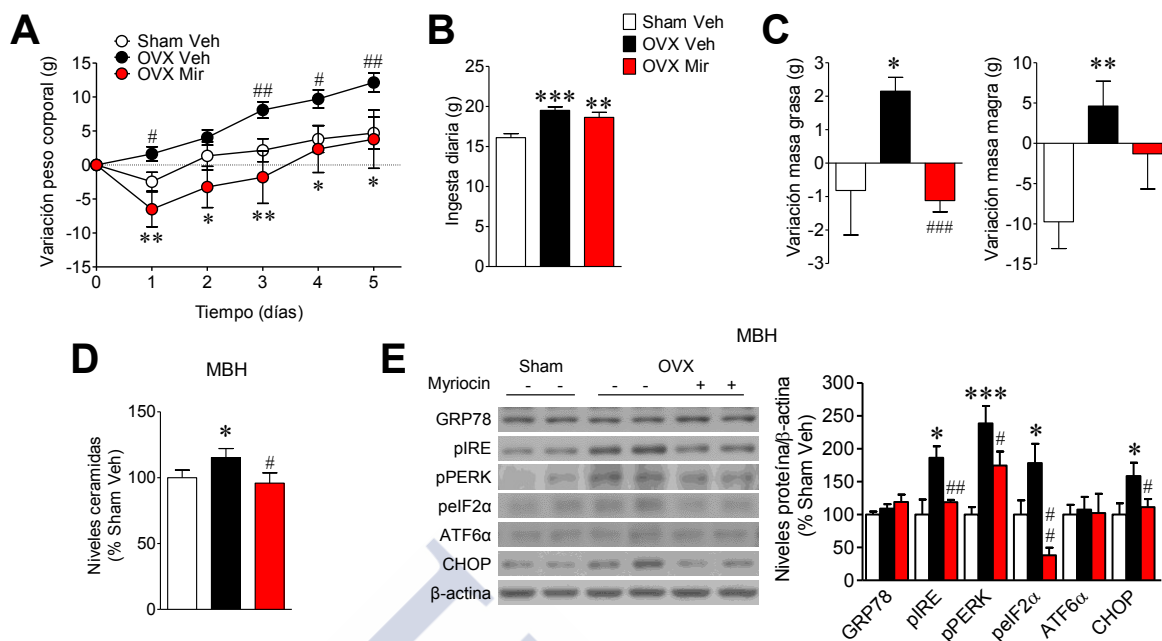


Figura 54. Efecto central de la miriocina sobre el balance energético en ratas OVX. (A) Variación peso corporal, (B) ingesta de comida, (C) variación de la masa grasa (panel izquierdo) y variación de la masa magra (panel derecho), (D) niveles de ceramidas en el MBH y (E) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el MBH (panel derecho) de ratas Sham o ratas OVX tratadas ICV con vehículo o miriocina. Todos los datos se expresan como mean \pm SEM. n=7-38 animales por grupo experimental *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus Sham vehículo; #P<0.05, ##P<0.01 y ###P<0.001 versus OVX vehículo.

Los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 55A), la temperatura del BAT (Figura 55B) y la temperatura corporal (Figura 55C) aumentaron, mientras que los niveles de lípidos hepáticos disminuyeron (Figura 55D) en esas mismas ratas OVX tratadas con miriocina.

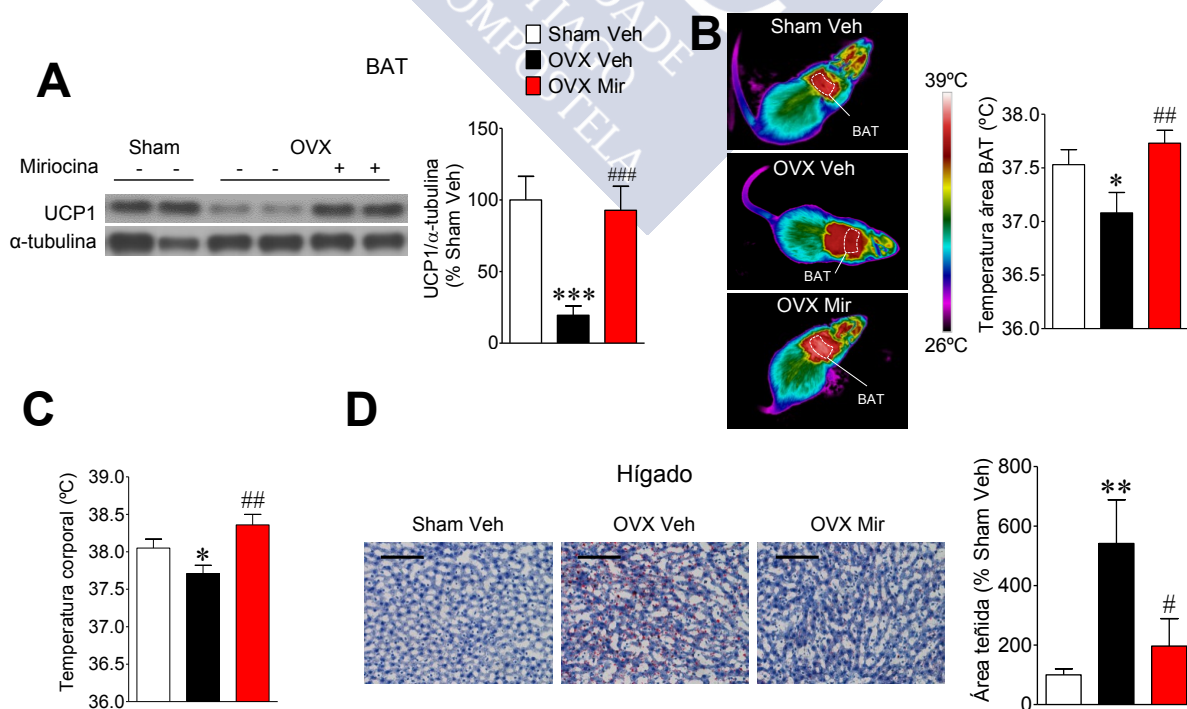


Figura 55. Efecto central de la miriocina sobre la termogénesis del BAT y los lípidos hepáticos en ratas OVX. (A) Imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho), (B) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho), (C) temperatura rectal y (D) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μ m) y su cuantificación (panel derecho) de ratas Sham o ratas OVX tratadas ICV con vehículo o miriocina. Todos los datos se expresan como $\text{mean} \pm \text{SEM}$. $n=7-16$ animales por grupo experimental * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ versus Sham vehículo; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ versus OVX vehículo.

En el conocimiento por nuestros anteriores datos, de que las ceramidas centrales inducen una marcada disminución en la actividad del SNS que inerva el BAT (Figuras 20D, 20E y 46), se investigó si el bloqueo de los receptores adrenérgicos afectaba al efecto central de la miriocina ICV en la termogénesis del BAT de ratas OVX. El efecto de su administración central se revirtió (de forma independiente a la ingesta) mediante el bloqueo farmacológico del β_3 -AR con el antagonista específico, SR59230A (Figuras 56A y 56B). El aumento en el peso corporal inducido por SR59230A se asoció con una reversión equivalente en la activación de la temperatura corporal (Figura 56C), la temperatura del BAT (Figura 56D) y la expresión de UCP1 en el BAT (Figura 56E) inducida por el tratamiento ICV con miriocina.

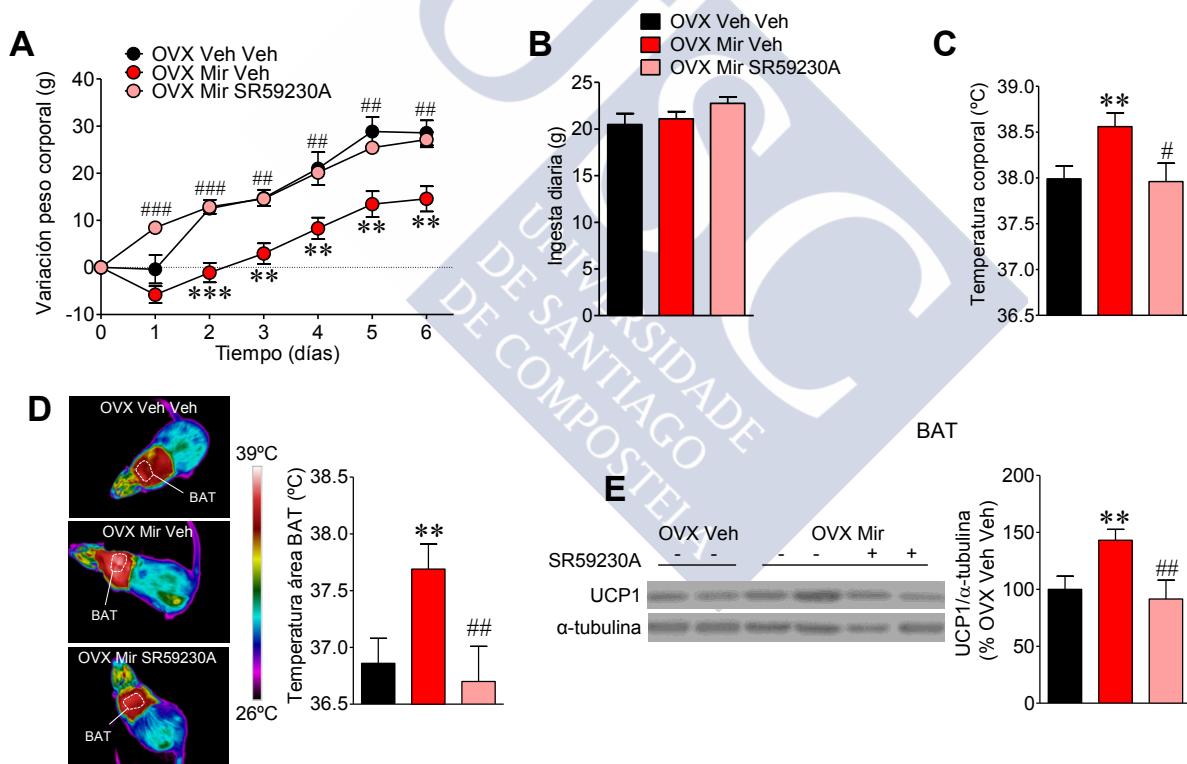


Figura 56. Efecto de la miriocina y el antagonismo del β_3 -AR sobre la termogénesis del BAT en ratas OVX. (A) Variación del peso corporal, (B) ingesta de comida, (C) temperatura rectal, (D) imágenes térmicas representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho) y (E) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho) de ratas OVX tratadas ICV con miriocina y tratadas subcutáneamente con vehículo o con el antagonista del β_3 -AR (SR59230A). Todos los datos se expresan como $\text{media} \pm \text{SEM}$. $n=7-18$ animales por grupo experimental ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ versus OVX vehículo vehículo; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ versus OVX miriocina vehículo.

4.2.3. El silenciamiento de SPTLC específicamente en el VMH disminuye el ER stress y el fenotipo metabólico de las ratas OVX

Para investigar más a fondo el papel de la ruta de síntesis *de novo* de ceramidas y diseccionar el núcleo hipotalámico responsable de las anteriores acciones, decidimos actuar sobre la SPTLC1. Esta enzima cataliza el primer paso limitante en la síntesis *de novo* de ceramidas. En consecuencia, silenciamos la expresión de SPTLC1 usando adenovirus que codificaban un shRNA contra esta enzima y lo hicimos específicamente en el VMH, un núcleo hipotalámico clave en la modulación de la termogénesis y en la función estrogénica general (Morrison and Nakamura, 2011; Contreras et al., 2014a; Lopez and Tena-Sempere, 2015). La infección en el VMH se evaluó mediante la visualización de la expresión de GFP (Figura 57A) y mediante la disminución de los niveles de proteína de SPTLC1 (Figura 57B). Dado que la estabilidad de la subunidad SPTLC2 depende de la expresión de SPTLC1 y que ambas subunidades se asocian con una estequiometría 1:1 (Hanada, 2003; Watson et al., 2009), el silenciamiento de SPTLC1 también acarrió una reducción asociada en la expresión de SPTLC2 (Figura 57B).

La administración de adenovirus shSPTLC1 en el VMH indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta en las ratas OVX pero no en las ratas Sham (Figuras 57C y 57F). Este efecto se asoció a una marcada reducción del ER stress en el VMH de las ratas OVX. Este efecto también se observó en ratas Sham pero en menor medida (Figuras 57G y 57H).

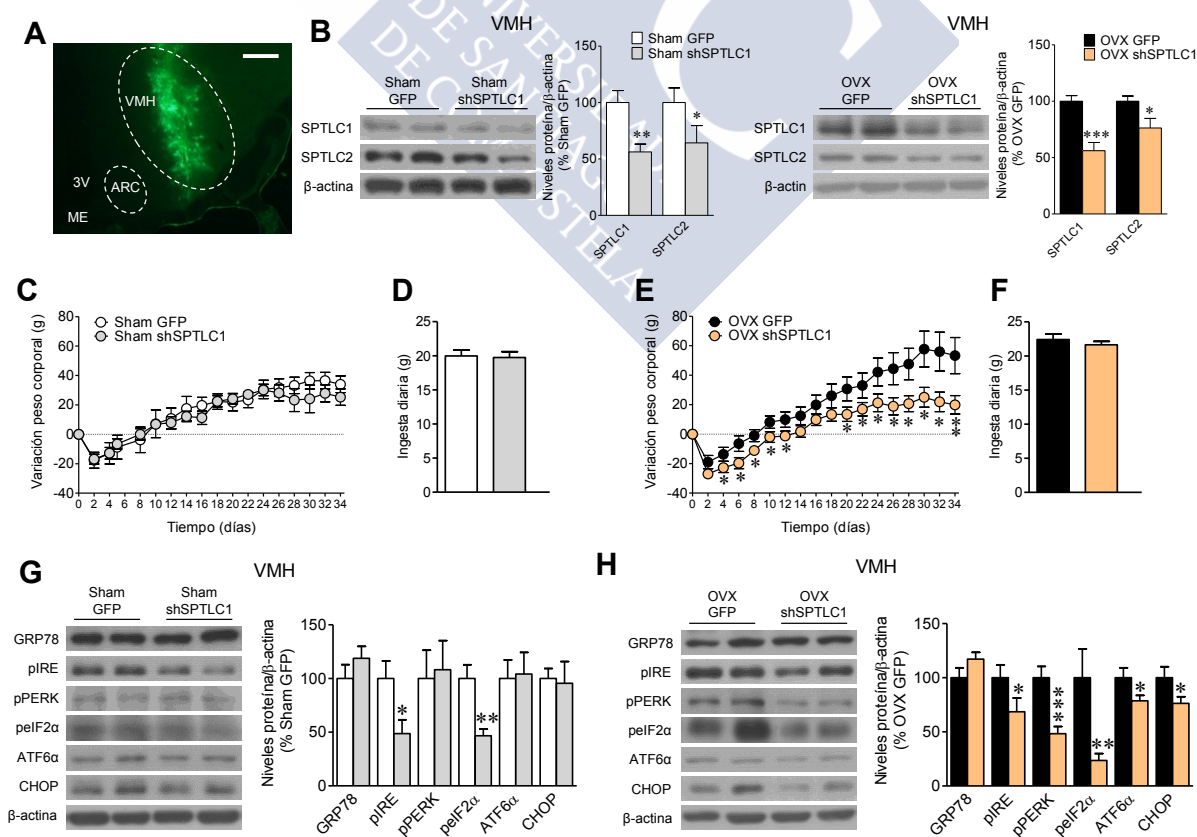


Figura 57. Efecto del *knock down* de SPTLC1 en el VMH de ratas OVX sobre el balance energético. (A) Fluorescencia directa representativa de la expresión de GFP en el VMH (20X, barra de escala: 100 μ m), (B) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de SPTLC1 y SPTLC2 en el VMH (panel derecho), (C y E) variación del peso corporal, (D y F) ingesta de comida y (G y H) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho) de ratas Sham u OVX tratados estereotáxicamente con adenovirus GFP o shSPTLC1 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-20 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus Sham GFP u OVX GFP.

De acuerdo con estos datos, la inyección de adenovirus shSPTLC1 condujo a un aumento de la temperatura corporal (Figuras 58A y 58B), la temperatura del BAT (Figuras 58C y 58D) y de los niveles de proteína UCP1 en el BAT (Figuras 58E y 58Z) de OVX pero no de ratas Sham.

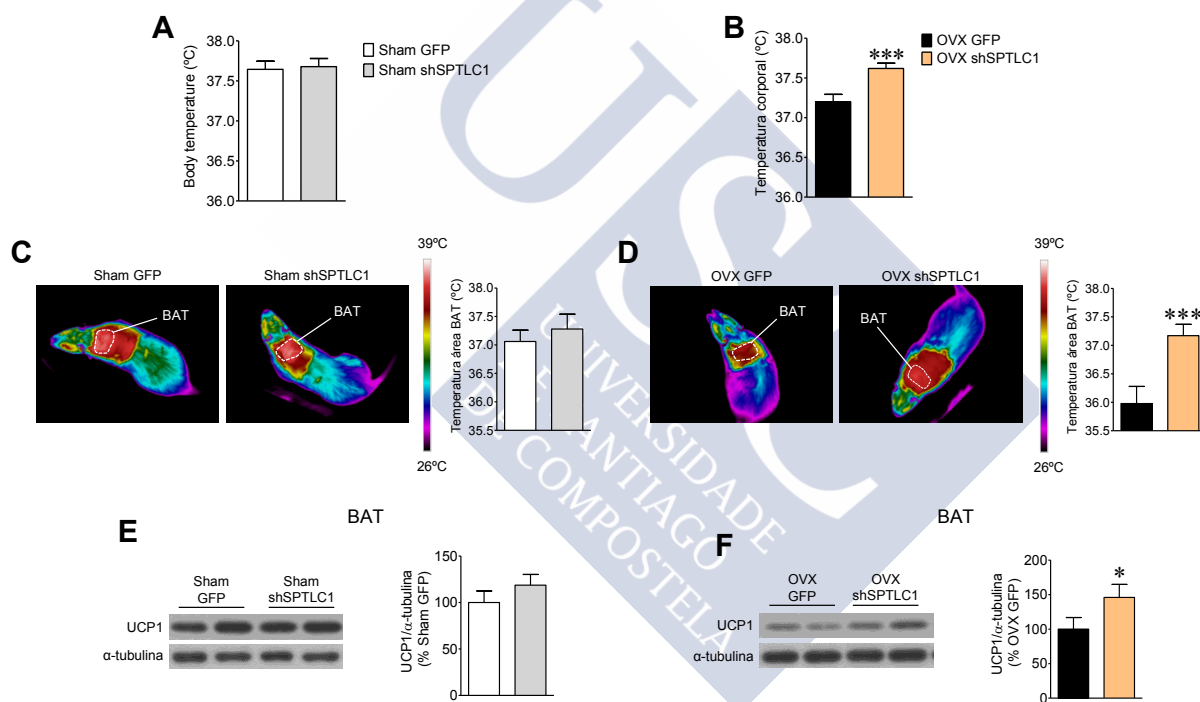


Figura 58. Efecto del *knock down* de SPTLC1 en el VMH de ratas OVX sobre la termogénesis del BAT. (A y B) Temperatura rectal, (C y D) imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos) y (E y F) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (paneles derechos) de ratas Sham u OVX tratados estereotáxicamente con adenovirus GFP o shSPTLC1 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-20 animales por grupo experimental. *P<0.05 y ***P<0.001 versus OVX GFP.

Estos efectos se asociaron con una mejora en el fenotipo metabólico de las ratas OVX, como lo demuestra la disminución de la esteatosis hepática (Figura 59A). En general, estos resultados, junto con los datos de miriocina, indican que los niveles de ceramidas hipotalámicas, y más precisamente, los niveles de ceramidas en el VMH median las acciones centrales de E2 en la termogénesis de BAT y el balance energético.

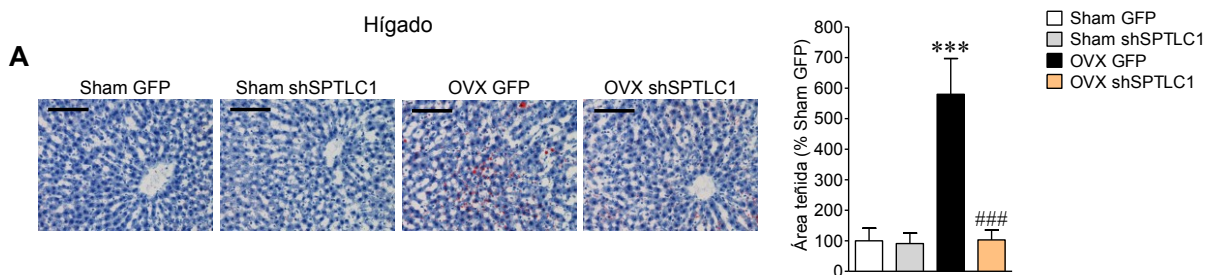


Figura 59. Efecto del *knock down* de SPTLC1 en el VMH de ratas OVX sobre la esteatosis hepática. (A) Secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μ m) y su cuantificación (panel derecho) de ratas Sham u OVX tratados estereotáxicamente con adenovirus GFP o shSPTLC1 en el VMH. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-8 animales por grupo experimental. ***P<0.001 versus Sham GFP, ###P<0.001 versus OVX GFP.

4.2.4. La inhibición farmacológica del ER stress hipotalámico recapitula el efecto central del estradiol sobre el balance energético

Tanto por resultados obtenidos en los bloques 4.1 y 4.2 como por la literatura publicada (Zhang et al., 2008; Ozcan et al., 2009; Schneeberger et al., 2013), se sabe que el aumento del ER stress hipotalámico está asociado con el desarrollo de resistencia a insulina y leptina, lo que lleva a la obesidad. Teniendo en cuenta que las ceramidas hipotalámicas provocan ER stress, se estudió si el ER stress inducido por ceramidas puede ser un mecanismo que media las acciones centrales de la deficiencia de E2 en la termogénesis del BAT y la homeostasis energética.

Para ello, las ratas OVX fueron tratadas vía ICV con la chaperona química TUDCA. La administración central de TUDCA en ratas OVX (pero no en las ratas Sham) indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta (Figuras 60A, 60B, 60C y 60D), una disminución del ER stress hipotalámico (Figuras 60E y 60F), una tendencia a aumentar la temperatura corporal (Figura 60G), una elevación en la temperatura del BAT (Figura 60H) y un incremento en el UPC1 del BAT (Figura 60I). Es de destacar que ninguno de estos cambios metabólicos se encontró en las ratas Sham (Figuras 60G, 60H y 60I). Además, la inyección central de TUDCA redujo el contenido de lípidos hepáticos de las ratas OVX, pero no tuvo efectos en las ratas Sham (Figura 60J).

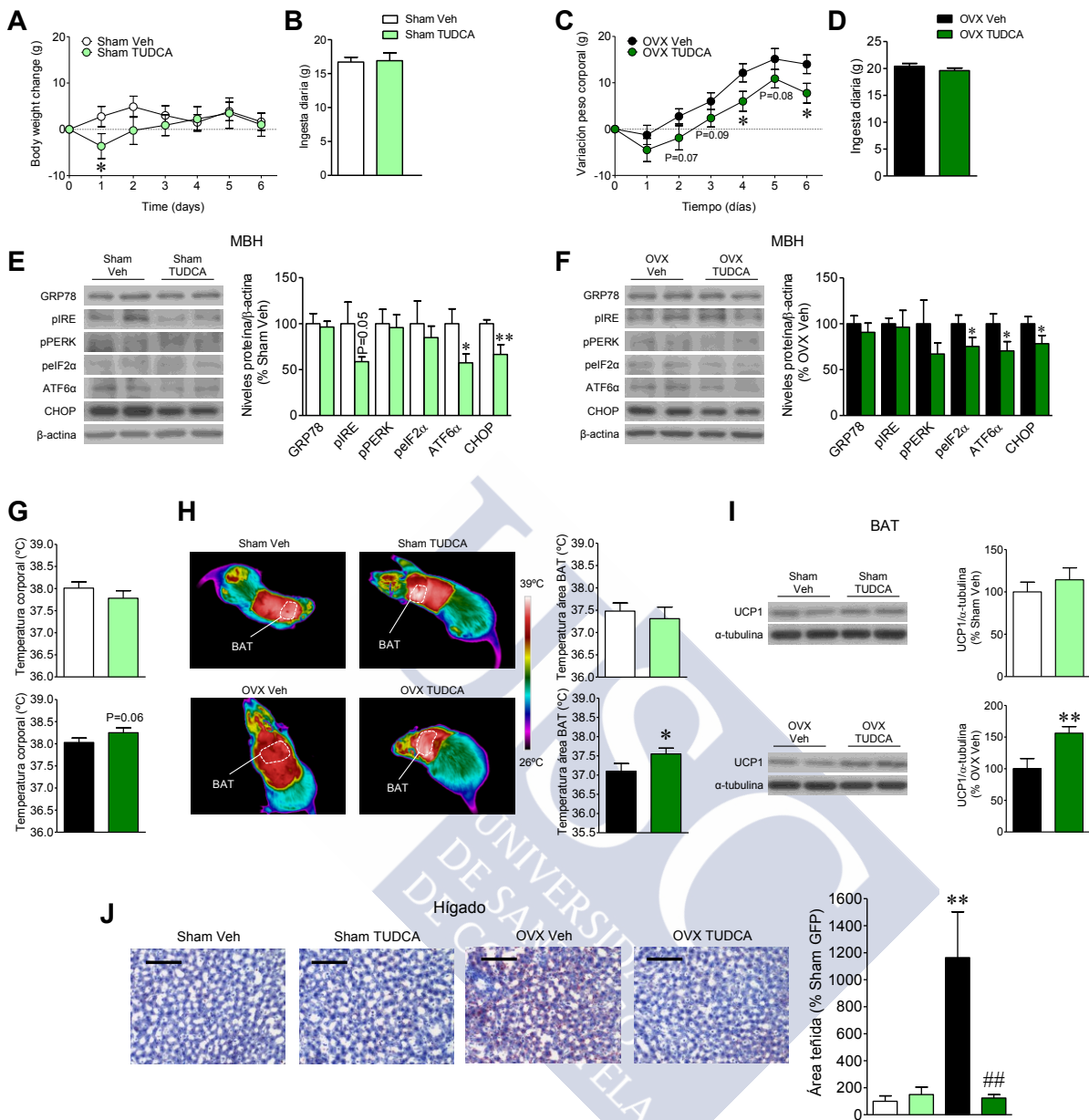


Figura 60. Efecto central del TUDCA en ratas OVX sobre el balance energético. (A y C) Variación del peso corporal, (B y D) ingesta de comida, (E y F) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el MBH (panel derecho), (G) temperatura rectal, (H) imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos), (I) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (paneles derechos) y (J) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μ m) y su cuantificación (panel derecho) de ratas Sham o OVX tratadas ICV con vehículo o TUDCA. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-8 animales por grupo experimental. *P<0.05 y **P<0.01 versus Sham vehículo o OVX vehículo. ###P<0.01 versus OVX vehículo.

4.2.5. GRP78 en el VMH disminuye el peso corporal y mejora el fenotipo metabólico de las ratas OVX a través del SNS

Tras la observación de nuestros primeros datos, donde el tratamiento central con E2 disminuyó el ER stress y aumentó los niveles hipotalámicos de GRP78 (Figura 53B), entendimos que esto tenía una relevancia funcional ya que debido a su actividad chaperona, podría actuar disminuyendo los niveles de ER stress. Por lo tanto, se realizó un experimento de ganancia de función inyectando el adenovirus codificante para GRP78 en el VMH de ratas OVX y en sus controles Sham. La eficacia de la infección en el VMH se evaluó mediante la detección de unos mayores niveles de GRP78 en el VMH (Figuras 61E y 61F). Los adenovirus GRP78 en el VMH indujeron una pérdida de peso independiente de la ingesta en las ratas OVX pero no en las ratas Sham (Figuras 61A y 61D). Ese efecto se asoció con una disminución del ER stress en el VMH de las OVX pero no en las ratas Sham (Figuras 61E y 61F), un aumento de la temperatura corporal (Figura 61G), un incremento de la temperatura del BAT (Figura 61H) y unos mayores niveles de UPC1 en el BAT (Figura 61I). La sobreexpresión de GRP78 en el VMH redujo el contenido de lípidos hepáticos de las ratas OVX (Figura 61J).

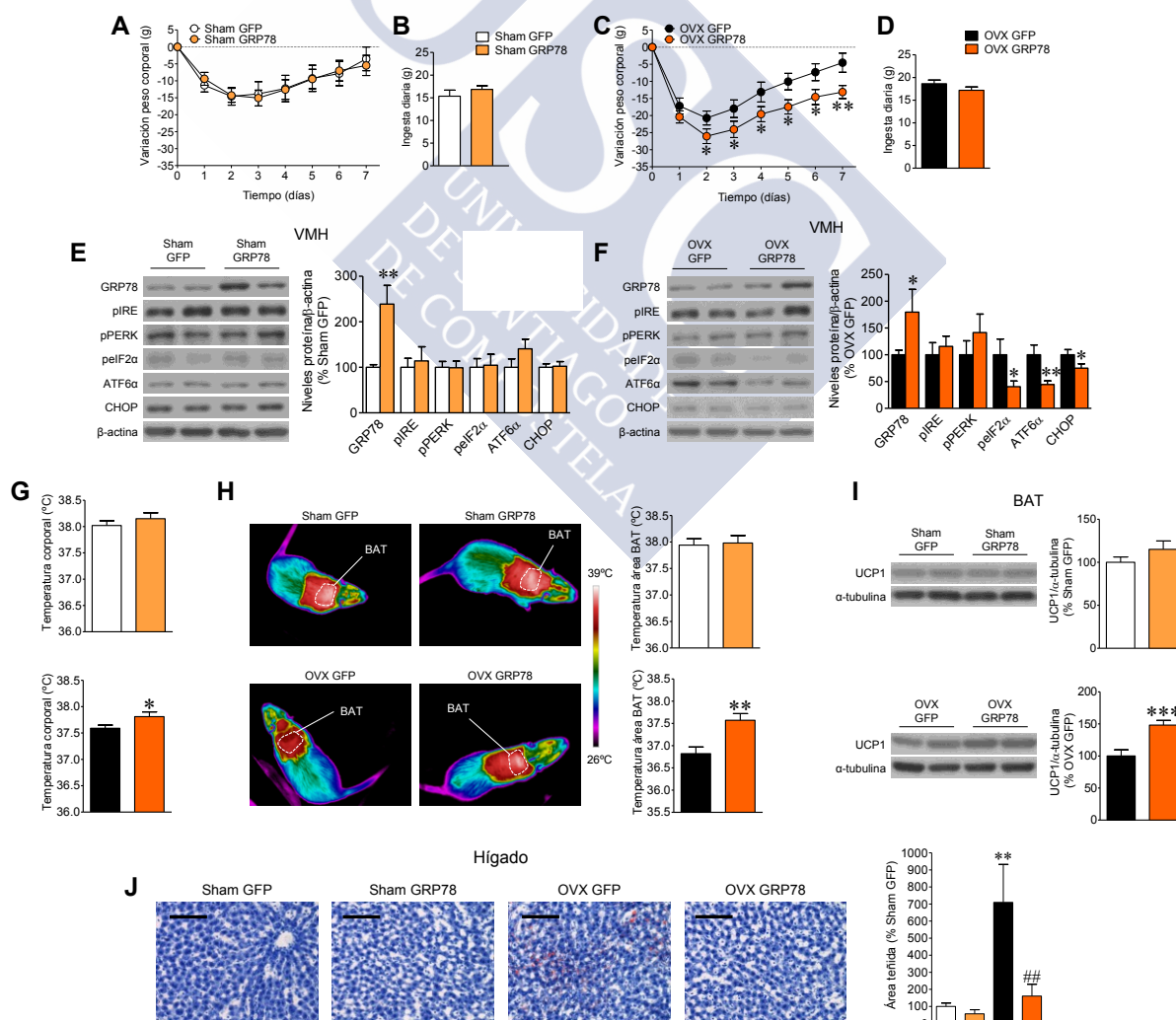


Figura 61. Efecto de la sobreexpresión de GRP78 en el VMH de ratas OVX sobre el balance energético y la termogénesis del BAT. (A y C) Variación del peso corporal, (B y D) ingesta de comida, (E y F) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (panel izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de proteína de la UPR en el VMH (panel derecho), (G) temperatura rectal, (H) imágenes térmicas representativas (paneles izquierdos) y temperatura del área BAT (paneles derechos), (I) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdos, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (paneles derechos) y (J) secciones de hígado teñidas con Oil-Red O representativas (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μ m) y su cuantificación (panel derecho) de ratas Sham u OVX tratadas estereotáxicamente en el VMH con adenovirus GFP o GRP78. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. n=7-18 animales por grupo experimental. *P<0.05, **P<0.01 y ***P<0.001 versus Sham GFP u OVX GFP.

Finalmente, investigamos si la regulación de BAT después de la administración de adenovirus GRP78 en el VMH de las ratas OVX estaba mediada por el SNS. La inactivación farmacológica de β 3-AR por la administración SC del antagonista SR59230A bloqueó la disminución del peso corporal asociado con la acción de GRP78 en el VMH (Figura 62A) de manera independiente a la ingesta (Figura 62B). Consistentemente, el tratamiento con SR59230A atenuó el aumento inducido por GRP78 en la temperatura corporal (Figura 62C), en la temperatura de BAT (Figura 62D) y en los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 62E). En general, estas evidencias demuestran que la disminución del ER stress en el VMH inducida por el E2 es un modulador importante del balance energético mediante el control de la termogénesis del BAT.

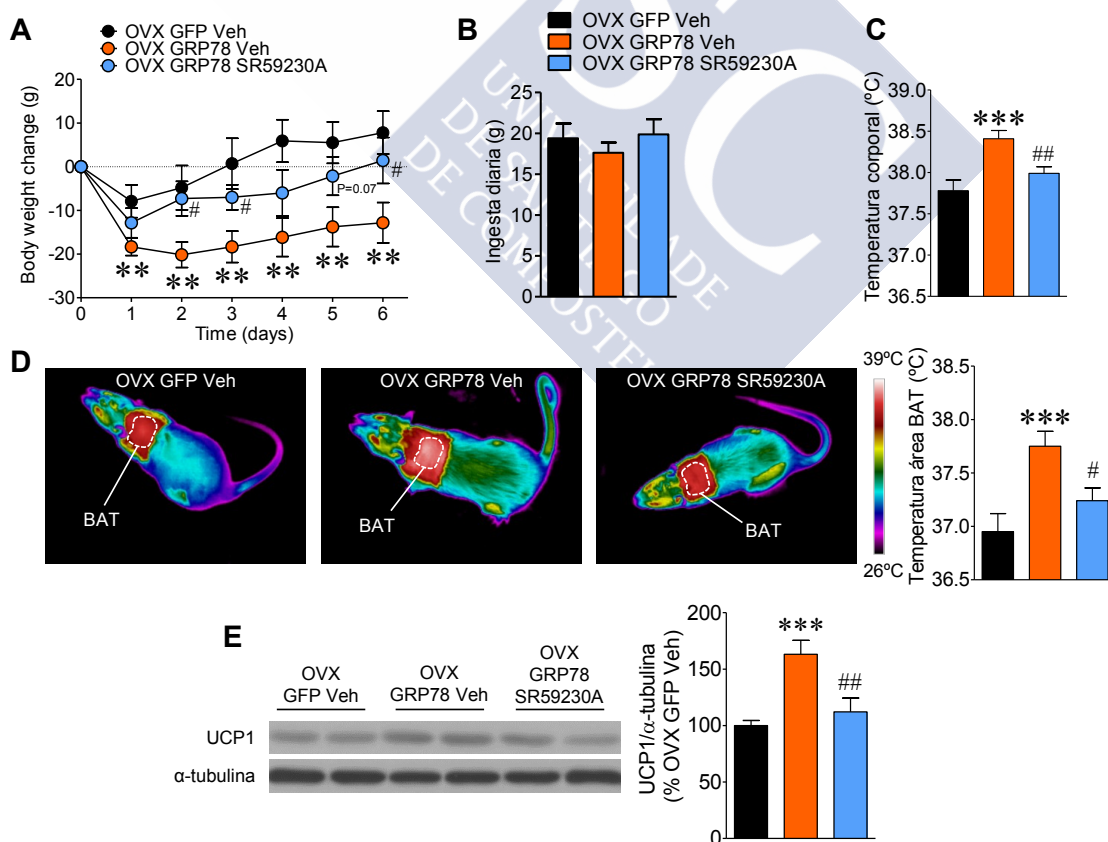


Figura 62. Efecto del antagonismo del β 3-AR sobre la termogénesis del BAT inducida por GRP78 en ratas OVX. (A) Variación del peso corporal, (B) ingesta de comida, (C) temperatura rectal, (D) imágenes térmicas

representativas (panel izquierdo) y temperatura del área BAT (panel derecho), (E) imágenes autorradiográficas de *western blot* representativas (paneles izquierdo, bandas cargadas en el mismo gel) y niveles de UCP1 en el BAT (panel derecho) de ratas OVX tratadas estereotáxicamente en el VMH con adenovirus GFP o GRP78 y tratadas subcutáneamente con vehículo o con el antagonista del β 3-AR (SR59230A). n=7-19 animales por grupo experimental. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. **P<0.01 y ***P<0.001 versus OVX GFP vehículo; #P<0.05 y ##P<0.01 versus OVX GRP78 vehículo.





5. DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral hemos abordado el estudio de la relación fisiológica existente entre las ceramidas, el ER stress hipotalámico y la modulación del balance energético. Adicionalmente investigamos el papel del ER stress hipotalámico en el *browning* del WAT y su posible contribución en la mejora de la obesidad inducida por dieta. Rematando con el estudio del mecanismo de acción de los estrógenos en la homeostasis energética en asociación con los niveles de ceramidas y ER stress hipotalámico.

5.1. LA LIPOTOXICIDAD Y EL ER STRESS HIPOTALÁMICO INDUCIDOS POR CERAMIDAS REGULAN EL BALANCE ENERGÉTICO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN SIMPÁTICA DEL BAT

En primer lugar, demostramos que la lipotoxicidad hipotalámica inducida por las ceramidas y el ER stress provocan una disminución del tono simpático del BAT, lo que conduce a una disminución de la termogénesis y a un aumento de peso independiente de la ingesta. Además, demostramos que la modulación genética de la vía de ER stress inducida por las ceramidas en el VMH modula el balance energético al influir en la termogénesis del BAT a través del SNS.

5.1.1. Las ceramidas regulan el balance energético

Las ceramidas comprenden una familia de esfingolípidos simples generados a partir de un ácido graso y una molécula de esfingosina (Bikman and Summers, 2011; Chavez and Summers, 2012). Aunque las ceramidas están presentes a bajos niveles dentro de las membranas biológicas, realizan importantes contribuciones a la estructura de la membrana celular. Además, las ceramidas ejercen diversos efectos reguladores sobre las vías de señalización que median el crecimiento, la proliferación, la motilidad, la adhesión, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis celular (Holland and Summers, 2008; Hannun and Obeid, 2008; Cowart, 2009). El aumento de la producción de ceramidas puede conducir a ER stress, un mecanismo vinculado a la resistencia a la insulina y a las enfermedades metabólicas hepáticas (Kahn et al., 2006; Holland and Summers, 2008; Bikman and Summers, 2011; Chavez and Summers, 2012). En consonancia con esto, la inhibición farmacológica sistémica o la ablación genética global de la síntesis *de novo* de ceramidas mejora la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa (Summers et al., 1998; Yang et al., 2009a) en la resistencia a la insulina inducida por glucocorticoides, grasas

saturadas y obesidad (Holland et al., 2007). Las evidencias actuales indican que los niveles de ceramidas cerebrales aumentan durante la obesidad inducida por HFD (Borg et al., 2012) y en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Car et al., 2012). Además, los niveles de ceramidas hipotalámicas regulados por la carnitina palmitoiltransferasa 1c (CPT1c, una isoforma específica localizada en el ER), median el efecto orexigénico de la grelina (Ramirez et al., 2013). Finalmente, estudios recientes han relacionado las ceramidas del hipocampo con alteraciones en el balance energético (Picard et al., 2014). Sin embargo, a pesar de estas evidencias, no había datos que relacionasen la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas con el ER stress y la homeostasis energética. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el equilibrio energético positivo asociado a la obesidad podría estar mediado por alteraciones específicas en los niveles de ceramidas y ER stress hipotalámico.

5.1.2. Las ceramidas regulan el ER stress hipotalámico

Nuestros datos demuestran que la administración central de ceramida C6 (que actúa como un precursor de ceramidas de cadena larga) aumenta la concentración de ceramida C16 en el hipotálamo ventromedial. Este efecto se asoció con una ganancia de peso independiente de la ingesta de comida, con inflamación hipotalámica (que conduce a lipotoxicidad) y con un aumento de los niveles de proteínas UPR (indicador funcional de ER stress). Asimismo, también se asoció con una disminución de la activación del SNS y con la capacidad termogénica de BAT.

Para determinar la relevancia fisiológica de estas observaciones, investigamos si la modulación selectiva de la UPR en el hipotálamo (y en consecuencia del ER stress) era suficiente para anular los efectos centrales de las ceramidas *in vivo*. Con este propósito, decidimos centrarnos en la chaperona GRP78. GRP78 es la chaperona más abundante del ER cuya función es evitar la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del ER (Lee, 2005; Marciniak and Ron, 2006; Ron and Walter, 2007). Nuestros datos mostraron que la administración crónica ICV de ceramidas aumenta los niveles de GRP78 en el MBH, como respuesta adaptativa para mejorar el ER stress. En base a esta idea de que GRP78 es la respuesta fisiológica normal ante los aumentos de ER stress evaluamos la posibilidad de sobreexpresarla, tratando a las ratas con partículas adenovirales codificantes para GRP78 específicamente dentro del VMH. Un núcleo hipotalámico conocido por controlar la termogénesis del BAT a través del SNS (Cannon and Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2014a; Lopez et al., 2016).

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de GRP78 en el VMH reduce el ER stress y revierte los efectos anabólicos de la administración central de ceramidas, al promover una pérdida de peso (independientemente de la ingesta), el aumento del contenido de UCP1 en BAT y la termogénesis. Por el contrario, la inactivación de GRP78 (mediante la infección con adenovirus codificantes para una isoforma DN de GRP78) dentro de VMH promueve el ER stress y aumenta el peso corporal de una manera independiente a la ingesta, en asociación

con una disminución de la expresión de UCP1 en BAT. Sorprendentemente, no se detectó ningún efecto sobre el peso corporal o la termogénesis del BAT cuando se moduló GRP78 en el ARC. Un núcleo hipotalámico involucrado principalmente en la regulación de la ingesta, en lugar del gasto de energía (Yeo and Heisler, 2012; Williams and Elmquist, 2012; Lopez et al., 2013). En general, estos datos sugieren que tanto las ceramidas como el GRP78 regulan el balance de energía de manera específica anatómicamente. De acuerdo con esta hipótesis, la resistencia a insulina inducida por las ceramidas también mejoró cuando GRP78 se sobreexpresó en el VMH, núcleo también clave en la modulación de la homeostasis de la glucosa (McCrimmon et al., 2006; McCrimmon et al., 2008).

Aunque clásicamente, se consideró al VMH como un regulador de la ingesta (concretamente "un centro de saciedad" debido a que los primeros estudios de lesión desencadenaban en los animales estados de hiperfagia y obesidad), nuestros datos refuerzan las pruebas recientes que revelan un papel fisiológico más complejo. En concreto, respaldan la idea de que el VMH es un área cerebral fundamental en la regulación de la termogénesis y el balance energético, integrando las señales periféricas (hormonas tiroideas, BMP8b, estradiol y GLP-1) y la detección de metabolitos (ácidos grasos y ceramidas) con los sensores de energía celular (AMPK) (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2014; Beiroa et al., 2014) y ahora con el ER stress y la UPR.

Un evento típicamente asociado con las alteraciones del control central del balance energético es el desarrollo de resistencia a las señales periféricas, como la insulina y la leptina (Caro et al., 1996; Howard et al., 2004). Trabajos recientes han demostrado que uno de los mecanismos patológicos subyacentes a la resistencia a leptina es el ER stress hipotalámico (Zhang et al., 2008; Hosoi et al., 2008; Ozcan et al., 2009; Won et al., 2009; Ropelle et al., 2010; Schneeberger et al., 2013). Asimismo, estos estudios demostraron también que las intervenciones farmacológicas que mejoran el plegamiento de proteínas (por ejemplo el uso de chaperonas químicas) recuperan la señalización de leptina e insulina, normalizando el peso corporal. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en la función del ARC y las alteraciones de la ingesta. En esta tesis, nos centramos en la relevancia fisiopatológica del ER stress en el VMH utilizando un modelo bien establecido de resistencia a la leptina, la rata Zucker obesa (OZR) que presenta una señalización defectuosa del receptor de leptina (Phillips et al., 1996). En este modelo animal observamos unos niveles aumentados de ceramidas hipotalámicas, asociadas con un aumento de la UPR y del ER stress en el VMH. A continuación, sobreexpresamos GRP78 en el VMH de las OZR. Los resultados obtenidos en este experimento mostraron como GRP78 promovió una mejora del ER stress hipotalámico asociado a un aumento de la termogénesis en el BAT que conduce a un marcado balance energético negativo y a una mejora del perfil metabólico como indica el aumento de la señalización de leptina y la sensibilidad a insulina, así como la reducción de la esteatosis hepática y los niveles de lípidos circulantes. Es necesario remarcar que estos efectos fueron totalmente independientes de la ingesta de los animales, ya que esta se mantuvo sin cambios después del tratamiento adenoviral. En general, estos datos indican que la modulación del ER stress en el VMH mejora la obesidad en un modelo de resistencia a la leptina.

En resumen, aunque tradicionalmente, los efectos tóxicos de la acumulación de lípidos como las ceramidas, se han identificado en tejidos periféricos como células β pancreáticas, hígado, corazón y músculo esquelético, donde se han relacionado con la inflamación y con la fisiopatología de la resistencia a insulina, diabetes tipo 2, enfermedad hepática, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Unger, 2002; Virtue and Vidal-Puig, 2008; Symons and Abel, 2013) la posible acumulación de especies lipídicas en el hipotálamo, con un consecuente desarrollo lipotoxicidad, y su potencial efecto nocivo sobre la homeostasis energética no había sido abordado hasta este momento. En los resultados de esta tesis, demostramos que las ceramidas juegan un papel clave dentro del hipotálamo modulando el balance energético a través de la inducción de lipotoxicidad/ER stress y la regulación de la función BAT.

Tras estos resultados iniciales que nos permitieron establecer el modelo fisiológico anteriormente descrito nos propusimos ir más allá evaluando el posible papel de GRP78 en la obesidad inducida por HFD y en la ganancia de peso inducida por taspigargina. Del mismo modo que también estudiamos si los efectos de GRP78 se articulan en estos modelos a través de la activación de la termogénesis del BAT y del *browning* de la grasa blanca.

5.1.3. La reversión del ER stress hipotalámico inducido por HFD revierte el fenotipo obeso

Los hallazgos encontrados y que discutiremos en profundidad a continuación fueron que las ratas HFD muestran un aumento en el ER stress hipotalámico. El tratamiento central con TUDCA o la administración estereoespecífica de adenovirus codificantes para GRP78 en el VMH promovió una mejora general del fenotipo metabólico de las ratas HFD. Estos efectos estuvieron asociados a un aumento de la termogénesis en el BAT y también al *browning* de la grasa blanca.

El *browning* del WAT es responsable de un aumento significativo en el gasto total de energía (Shabalina et al., 2013) y su estimulación se ha propuesto como una estrategia potencial terapéutica para promover la reducción de la grasa corporal (Yoneshiro et al., 2013; Nedergaard and Cannon, 2014). Los adipocitos *beige/brite* inducidos en el WAT (Harms and Seale, 2013; Nedergaard and Cannon, 2014; Wang and Seale, 2016), derivan de una población precursora distinta de los adipocitos blancos y marrones (Wang et al., 2013; Wang and Seale, 2016) y se han propuesto varios mecanismos para el *browning* del WAT (Villarroya and Vidal-Puig, 2013; Nedergaard and Cannon, 2014), incluida la exposición prolongada al frío (Loncar et al., 1986) y la activación adrenérgica (Cousin et al., 1992; Ghorbani et al., 1997; Cao et al., 2011). Sin embargo, a pesar de que se han identificado múltiples factores que modulan el desarrollo y la función de las células *beige/brite*, y que el *browning* es un proceso impulsado por el SNS (y por lo tanto, modulado por el hipotálamo), el papel del CNS en el control del *browning* del WAT sigue siendo casi desconocido. Trabajos recientes han demostrado que la activación de AgRP en el ARC suprime el proceso de *browning* y que este efecto está mediado por la β -N-acetilglucosamina ligada a O (O-

GlcNAc) (Ruan et al., 2014). Además, la leptina y la insulina parecen actuar a través de las neuronas POMC para promover el *browning* de la grasa blanca (Dodd et al., 2015). Por último, también se ha propuesto que el agonismo de GLP1 en el VMH media el fenómeno de *browning* a través de un mecanismo que implica la inhibición de AMPK en el hipotálamo (Beiroa et al., 2014).

En base a los resultados expuestos en la sección 4.1, demostramos que la mejora del ER stress en el VMH, mediante la sobreexpresión genética de GRP78, conduce a un aumento del *browning* del WAT a través de la activación de la señalización simpática por el β 3-AR; una acción que está asociada con la pérdida de peso independientemente de la ingesta. Esta acción fue confirmada en varios modelos: ratas DIO (alimentadas durante 3 y 6 meses con HFD), ratas tratadas centralmente con taspigargina y OZR. Cabe destacar que este efecto parece ser también independiente de la señalización de leptina, ya que la reducción del ER stress en el VMH provoca la pérdida de peso y el *browning* del WAT en las OZR (que expresan un receptor de leptina mutado o no funcional).

Nuestros resultados revelan que, de manera similar a lo que ocurre con la activación del BAT, el *browning* de la grasa blanca está regulado por el ER stress dentro del VMH y esto encaja con la idea de que la inhibición de este proceso protege de la obesidad inducida por dieta. La relevancia de estos datos reside en que, además de disminuir el peso corporal, el tratamiento con adenovirus GRP78 provocó una mejora general marcada del fenotipo metabólico de las ratas obesas HFD, con disminución de la adiposidad, esteatosis hepática reducida, mejora en la señalización de leptina, aumento de la sensibilidad a insulina y aumento de la termogénesis en el BAT. La contribución específica de la termogénesis generada en las células *beige/brite* a la mejora del fenotipo metabólico aún no se ha establecido. Sin embargo, evidencias recientes han demostrado que el UCP1 de las mitocondrias de los adipocitos *beige/brite* tienen capacidad termogénica y representan aproximadamente un tercio de la capacidad termogénica del BAT interescapular (Shabalina et al., 2013).

En síntesis, nuestros resultados proponen un mecanismo fisiopatológico en el que la lipotoxicidad y el ER stress hipotalámico inducidos por las ceramidas disminuyen la termogénesis del BAT y promueven el desarrollo de obesidad. En consecuencia, la mejora del ER stress en el VMH por la expresión de la chaperona GRP78 revierte el anterior mecanismo produciendo una mejora del fenotipo metabólico por incremento tanto de la actividad del BAT como por el *browning* del WAT.

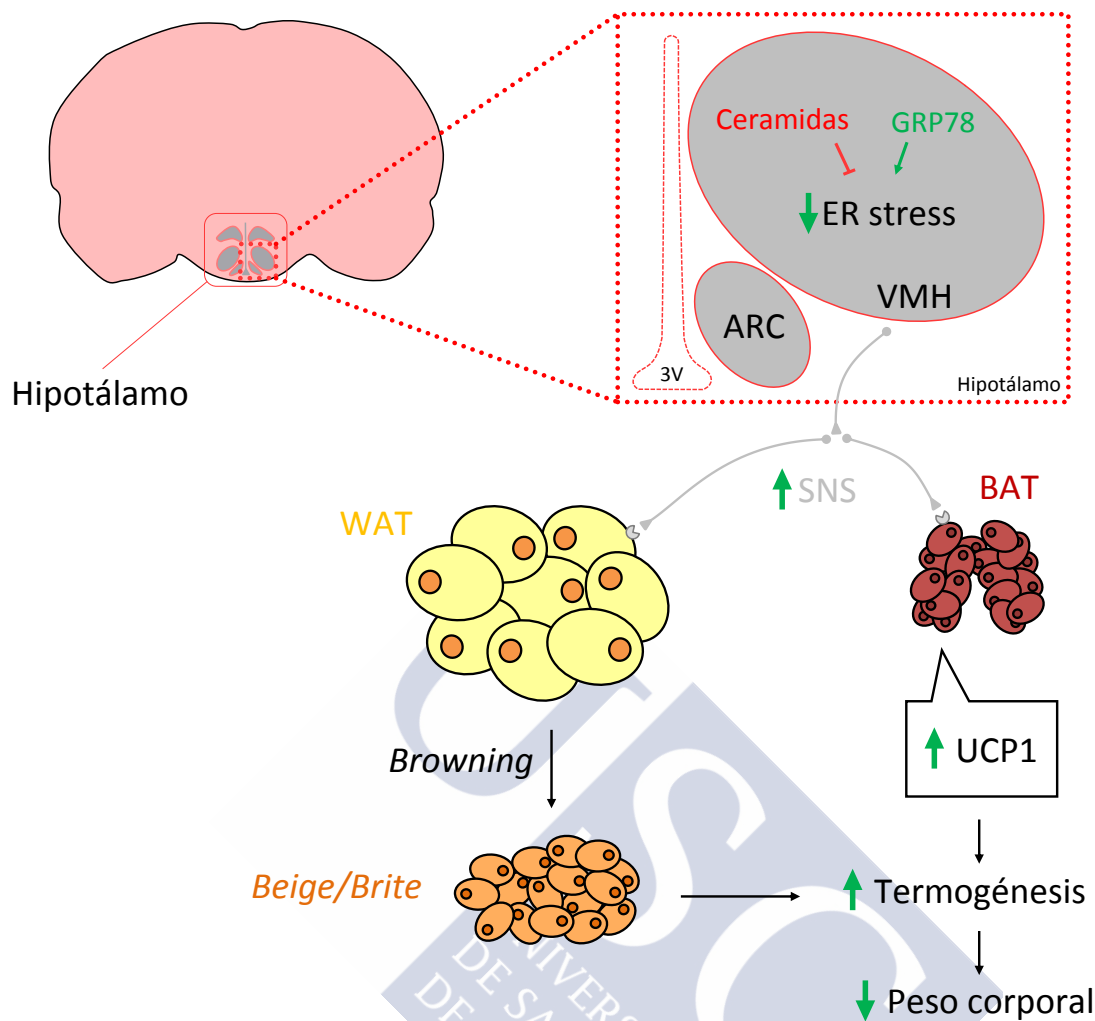


Figura 63. Resumen gráfico de la sección 5.1.

5.2. EL ESTRADIOL MODULA EL ER STRESS HIPOTALÁMICO A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN DE LAS CERAMIDAS PARA AUMENTAR LA TERMOGÉNESIS DEL BAT Y DISMINUIR EL PESO CORPORAL

Por último, se dedicará esta última parte de la discusión a los resultados contenidos en el bloque 4.3 donde identificamos por primera vez un vínculo entre los efectos de E2 sobre la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas y el ER stress con la termogénesis del BAT. Demostramos aquí que el reemplazo central de E2 restaura los niveles de ceramidas y el estrés ER en el hipotálamo de ratas hembra OVX. Por otra parte, el bloqueo farmacológico o genético de la síntesis de ceramida y la reducción del ER stress recapitulan los efectos fisiológicos producidos por el E2 (aumento de la termogénesis del BAT, pérdida de peso y reducción de los lípidos hepáticos).

Como se explicó en la introducción los estrógenos tienen una acción anorexigénica y además incrementan el gasto energético. En situaciones deficitarias de estrógenos como la

ovariectomía o la menopausia, se produce una ganancia de peso corporal como resultado de la hiperfagia y del gasto energético reducido. Esto se asocia además con un incremento de la adiposidad del organismo, una acumulación de lípidos hepáticos y de esteatosis (Paquette et al., 2007; Volzke et al., 2007; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Palmer and Clegg, 2015; Mauvais-Jarvis, 2015; Morselli et al., 2016). Se sabe que la terapia de reemplazo con estrógenos tanto a nivel periférico como central revierte estos efectos metabólicos (Mauvais-Jarvis et al., 2013; Martínez de Morentin et al., 2014; Palmer and Clegg, 2015; Mauvais-Jarvis, 2015; Martínez de Morentin et al., 2015; Morselli et al., 2016). Estudios recientes de nuestro grupo han propuesto un mecanismo por el cual AMPK en el VMH media el efecto central del E2 en la termogénesis del BAT (Martínez de Morentin et al., 2014). AMPK es una enzima reguladora del metabolismo de los ácidos grasos (Kahn et al., 2005; Lage et al., 2008; Lopez et al., 2016), y por tanto el mecanismo antes descrito vincula directamente los efectos centrales de los estrógenos con los lípidos hipotalámicos. Sin embargo, a pesar de que trabajos recientes han demostrado que existe un dimorfismo sexual en el contenido de ácidos grasos en el cerebro (Rodríguez-Navas et al., 2016), y que el tratamiento periférico con E2 reduce los niveles séricos de ceramidas en ratas OVX (Vinayavekhin et al., 2016), no ha sido demostrado hasta la fecha si el metabolismo de los lípidos complejos está involucrado en las acciones centrales de E2.

A estas alturas de la discusión y en base a los resultados presentados en esta tesis doctoral ya se ha establecido como la lipotoxicidad inducida por ceramidas en el hipotálamo es un mecanismo fisiopatológico que conduce al desarrollo de obesidad mediante la supresión de la termogénesis del BAT. Además también se sabe que ciertas señales hormonales como THs, leptina, BMP8b, GLP1 y E2 actúan en el hipotálamo sobre el metabolismo de ácidos grasos para ejercer su acción en el balance energético (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Tanida et al., 2013; Beiroa et al., 2014; Martínez de Morentin et al., 2014; Martínez-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, no se conocía si los niveles de ceramidas y ER stress podrían estar implicados en la integración y respuesta por parte del CNS a las señales nutricionales y hormonales periféricas.

Como consecuencia, planteamos una hipótesis en la cual las acciones inducidas por el E2 en el balance energético podrían estar mediadas por la modulación de las ceramidas y el ER stress en el hipotálamo. Nuestros datos mostraron que el tratamiento central con E2 indujo un balance energético negativo en ratas OVX, asociado con una reducción de la lipotoxicidad y el ER stress hipotalámico inducido por ceramidas. Por otra parte, la inhibición farmacológica de la síntesis de ceramidas a nivel central, mediante el uso de miriocina, suprimió el ER stress hipotalámico y recapituló los efectos del E2 en el balance energético. Más concretamente los animales disminuyeron el peso corporal de manera independiente a la ingesta y asociado a un incremento en la termogénesis del BAT. A continuación, investigamos si el VMH pudiese ser el mediador de esas acciones ya que conocíamos por nuestros resultados previos que la lipotoxicidad y ER stress en el VMH juegan un papel importante en la modulación de la termogénesis del BAT y que además el ER α en el VMH es el sitio de donde el E2 modula la función termogénica del BAT (Musatov et al., 2007; Xu et al., 2011; Martínez de Morentin et

al., 2014). Sobre esa base, silenciamos la expresión de SPTLC1 en el VMH de ratas OVX. La disminución de la expresión de SPTLC exclusivamente en el VMH mejoró el ER stress y la obesidad de esos animales, a través de un incremento en la capacidad termogénica del BAT y en consecuencia de la temperatura corporal de los animales. Estos datos sugieren que el E2 central induce un balance energético negativo a través de la disminución de la lipotoxicidad y el ER stress inducidos por ceramidas. Este mecanismo, se verificó mediante dos estrategias: tratando a las ratas OVX vía ICV con la chaperona química TUDCA y mediante la sobreexpresión genética de GRP78 en el VMH. Cabe destacar, que los efectos observados con miriocina y con GRP78 fueron revertidos por el bloqueo farmacológico del β 3-AR, lo que sugiere que los cambios en la señalización de ceramidas y en el ER stress hipotalámico inducida por E2 en el VMH se transmiten al BAT a través del SNS.

En resumen, en este estudio demostramos que el E2 promueve una mejora de la lipotoxicidad y el ER stress inducidos por ceramidas, específicamente en el VMH. Esta acción conduce a un aumento de la termogénesis del BAT mediante la activación de la señalización simpática. Esta acción que se asocia además con una pérdida de peso corporal independiente de la ingesta y con una reducción en la esteatosis hepática.

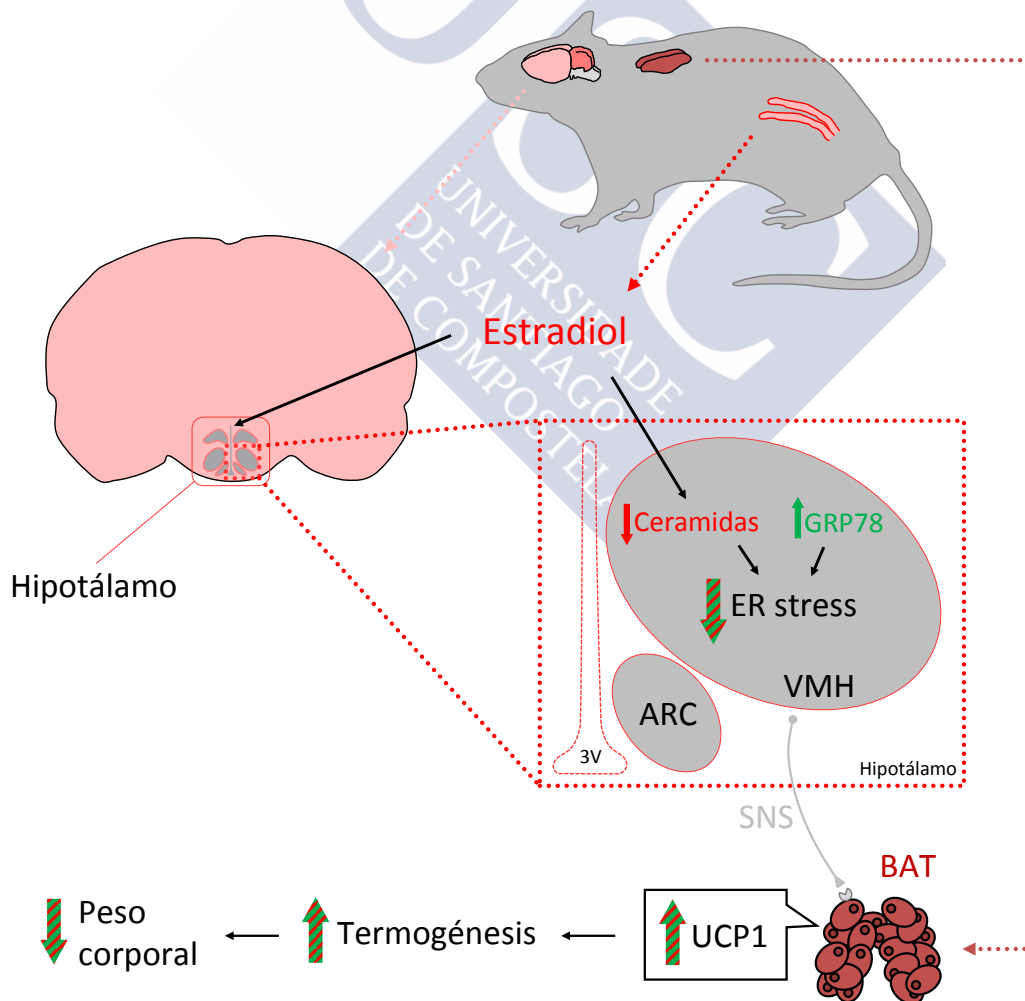


Figura 64. Resumen gráfico de la sección 5.2.





6. CONCLUSIONES

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

1. La lipotoxicidad inducida por ceramidas y el ER stress hipotalámico provocan una disminución del tono simpático del tejido adiposo pardo, que conduce a una disminución de la termogénesis y a un aumento de peso independiente de la ingesta.

2. La lipotoxicidad inducida por ceramidas y el ER stress hipotalámico son mecanismos fisiopatológicos relevantes en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta. La reversión de este mecanismo en el núcleo ventromedial del hipotálamo promueve una mejora general del fenotipo metabólico en ratas alimentadas con dieta alta en grasa. Estos efectos se asocian a un aumento de la termogénesis en el tejido adiposo pardo y también al *browning* de la grasa blanca.

3. El estradiol promueve una mejora de la lipotoxicidad y el ER stress inducidos por ceramidas, específicamente en el núcleo ventromedial del hipotálamo. Esta acción conduce a un aumento de la termogénesis del tejido adiposo pardo mediante la activación de la señalización simpática. Este mecanismo se asocia además con una pérdida de peso corporal independiente de la ingesta y con una reducción en la esteatosis hepática.





7. BIBLIOGRAFÍA

Abbott,C.R., Small,C.J., Kennedy,A.R., Neary,N.M., Sajedi,A., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (2005). Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake. *Brain Res.* 1043, 139-144.

Abizaid,A., Liu,Z.W., Andrews,Z.B., Shanabrough,M., Borok,E., Elsworth,J.D., Roth,R.H., Sleeman,M.W., Picciotto,M.R., Tschop,M.H., Gao,X.B., and Horvath,T.L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest* 116, 3229-3239.

Adachi,Y., Yamamoto,K., Okada,T., Yoshida,H., Harada,A., and Mori,K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 75-89.

Ainslie,D.A., Morris,M.J., Wittert,G., Turnbull,H., Proietto,J., and Thorburn,A.W. (2001). Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 25, 1680-1688.

Air,E.L., Benoit,S.C., Blake Smith,K.A., Clegg,D.J., and Woods,S.C. (2002). Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 423-429.

Al-Massadi,O., Crujeiras,A.B., Gonzalez,R.C., Pardo,M., Dieguez,C., Casanueva,F.F., and Seoane,L.M. (2010). Age, sex, and lactating status regulate ghrelin secretion and GOAT mRNA levels from isolated rat stomach. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 299, E341-E350.

Alvarez-Crespo,M., Martinez-Sanchez,N., Ruiz-Pino,F., Garcia-Lavandeira,M., Alvarez,C.V., Tena-Sempere,M., Nogueiras,R., Dieguez,C., and Lopez,M. (2013). The orexigenic effect of orexin-A revisited: dependence of an intact growth hormone axis. *Endocrinology* 154, 3589-3598.

ANAND,B.K. and BROBECK,J.R. (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77, 323-324.

Aponte,Y., Atasoy,D., and Sternson,S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351-355.

Aravich,P.F. and Scalfani,A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav. Neurosci.* 97, 970-983.

Asarian,L. and Geary,N. (2006). Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 361, 1251-1263.

Asarian,L. and Geary,N. (2007). Estradiol enhances cholecystokinin-dependent lipid-induced satiation and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology* 148, 5656-5666.

Asnicar,M.A., Smith,D.P., Yang,D.D., Heiman,M.L., Fox,N., Chen,Y.F., Hsiung,H.M., and Koster,A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142, 4394-4400.

Bai,F.L., Yamano,M., Shiotani,Y., Emson,P.C., Smith,A.D., Powell,J.F., and Tohyama,M. (1985). An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res.* 331, 172-175.

Bamshad,M., Aoki,V.T., Adkison,M.G., Warren,W.S., and Bartness,T.J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol* 275, R291-R299.

Bamshad,M., Song,C.K., and Bartness,T.J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* 276, R1569-R1578.

Barros,R.P. and Gustafsson,J.A. (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* 14, 289-299.

Bartelt,A., Bruns,O.T., Reimer,R., Hohenberg,H., Ittrich,H., Peldschus,K., Kaul,M.G., Tromsdorf,U.I., Weller,H., Waurisch,C., Eychmuller,A., Gordts,P.L., Rinninger,F., Bruegelmann,K., Freund,B., Nielsen,P., Merkel,M., and Heeren,J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 17, 200-205.

Bartness,T.J., Vaughan,C.H., and Song,C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int. J. Obes. (Lond)* 34 *Suppl 1*, S36-S42.

Bartness,T.J. and Wade,G.N. (1984). Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav. Neurosci.* 98, 674-685.

Baskin,D.G., Breininger,J.F., and Schwartz,M.W. (1999a). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828-833.

Baskin,D.G., Figlewicz,L.D., Seeley,R.J., Woods,S.C., Porte,D., Jr., and Schwartz,M.W. (1999b). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848, 114-123.

Baskin,D.G., Norwood,B.J., Schwartz,M.W., and Koerker,D.J. (1995). Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology* 136, 5547-5554.

Beatty,W.W., O'Briant,D.A., and Vilberg,T.R. (1975). Effects of ovariectomy and estradiol injections on food intake and body weight in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3, 539-544.

Beck,B., Jhanwar-Uniyal,M., Bulet,A., Chapleur-Chateau,M., Leibowitz,S.F., and Bulet,C. (1990). Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Res.* 528, 245-249.

Beiroa,D., Imbernon,M., Gallego,R., Senra,A., Herranz,D., Villarroya,F., Serrano,M., Ferno,J., Salvador,J., Escalada,J., Dieguez,C., Lopez,M., Fruhbeck,G., and Nogueiras,R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 63, 3346-3358.

- Bellinger,L.L. and Bernardis,L.L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav.* 76, 431-442.
- Bennett,P.A., Lindell,K., Wilson,C., Carlsson,L.M., Carlsson,B., and Robinson,I.C. (1999). Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology* 69, 417-423.
- Benoit,S.C., Air,E.L., Coolen,L.M., Strauss,R., Jackman,A., Clegg,D.J., Seeley,R.J., and Woods,S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 22, 9048-9052.
- Benoit,S.C., Kemp,C.J., Elias,C.F., Abplanalp,W., Herman,J.P., Migrenne,S., Lefevre,A.L., Cruciani-Guglielmacci,C., Magnan,C., Yu,F., Niswender,K., Irani,B.G., Holland,W.L., and Clegg,D.J. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest* 119, 2577-2589.
- Bernardis,L.L. (1970). Participation of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the "feeding center" and water intake circuitry of the weanling rat. *J. Neurovisc. Relat* 31, 387-398.
- Bernardis,L.L. and Bellinger,L.L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 434, 321-381.
- Bernd,N. and Flockerzi,V. (2014). *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Berthoud,H.R. (2012). The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 478-487.
- Bertolotti,A., Zhang,Y., Hendershot,L.M., Harding,H.P., and Ron,D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326-332.
- Bewick,G.A., Gardiner,J.V., Dhillon,W.S., Kent,A.S., White,N.E., Webster,Z., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* 19, 1680-1682.
- Bi,S. (2013). Dorsomedial hypothalamic NPY modulation of adiposity and thermogenesis. *Physiol Behav.* 121, 56-60.
- Bi,S., Kim,Y.J., and Zheng,F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46, 309-314.
- Bi,S., Ladenheim,E.E., Schwartz,G.J., and Moran,T.H. (2001). A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 281, R254-R260.
- Bikman,B.T. and Summers,S.A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest* 121, 4222-4230.
- Bittencourt,J.C., Presse,F., Arias,C., Peto,C., Vaughan,J., Nahon,J.L., Vale,W., and Sawchenko,P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J. Comp Neurol.* 319, 218-245.

Blevins, J.E. and Ho, J.M. (2013). Role of oxytocin signaling in the regulation of body weight. *Rev. Endocr. Metab Disord.* *14*, 311-329.

Blond-Elguindi, S., Fourie, A.M., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1993). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J. Biol. Chem.* *268*, 12730-12735.

Blouet, C. and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* *209*, 1-12.

Boden, G., Cheung, P., Salehi, S., Homko, C., Loveland-Jones, C., Jayarajan, S., Stein, T.P., Williams, K.J., Liu, M.L., Barrero, C.A., and Merali, S. (2014). Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue. *Diabetes* *63*, 912-922.

Boden, G., Duan, X., Homko, C., Molina, E.J., Song, W., Perez, O., Cheung, P., and Merali, S. (2008). Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* *57*, 2438-2444.

Borg, M.L., Omran, S.F., Weir, J., Meikle, P.J., and Watt, M.J. (2012). Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. *J. Physiol* *590*, 4377-4389.

Boulant, J.A. (1974). The effect of firing rate on preoptic neuronal thermosensitivity. *J. Physiol* *240*, 661-669.

Boulant, J.A. and Dean, J.B. (1986). Temperature receptors in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol* *48*, 639-654.

Boulant, J.A. and Hardy, J.D. (1974). The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J. Physiol* *240*, 639-660.

Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 717-749.

Broadwell, R.D. and Brightman, M.W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp Neurol.* *166*, 257-283.

Bronnikov, G., Bengtsson, T., Kramarova, L., Golozubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1999). beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* *140*, 4185-4197.

Brown, L.M. and Clegg, D.J. (2010). Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *122*, 65-73.

Brown, L.M., Gent, L., Davis, K., and Clegg, D.J. (2010). Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Res.* *1350*, 77-85.

Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D., and Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* *289*, 2122-2125.

- Cakir,I., Cyr,N.E., Perello,M., Litvinov,B.P., Romero,A., Stuart,R.C., and Nillni,E.A. (2013). Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J. Biol. Chem.* *288*, 17675-17688.
- Campfield,L.A., Smith,F.J., Guisez,Y., Devos,R., and Burn,P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* *269*, 546-549.
- Cannon,B. and Nedergaard,J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* *84*, 277-359.
- Cao,L., Choi,E.Y., Liu,X., Martin,A., Wang,C., Xu,X., and During,M.J. (2011). White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab* *14*, 324-338.
- Cao,W., Medvedev,A.V., Daniel,K.W., and Collins,S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* *276*, 27077-27082.
- Cao,W.H., Fan,W., and Morrison,S.F. (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* *126*, 229-240.
- Cao,W.H. and Morrison,S.F. (2006). Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology* *51*, 426-437.
- Car,H., Zendzian-Piotrowska,M., Prokopiuk,S., Fiedorowicz,A., Sadowska,A., Kurek,K., and Sawicka,D. (2012). Ceramide profiles in the brain of rats with diabetes induced by streptozotocin. *FEBS J.* *279*, 1943-1952.
- Caro,J.F., Kolaczynski,J.W., Nyce,M.R., Ohannesian,J.P., Opentanova,I., Goldman,W.H., Lynn,R.B., Zhang,P.L., Sinha,M.K., and Considine,R.V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* *348*, 159-161.
- Casabiell,X., Pineiro,V., Peino,R., Lage,M., Camina,J., Gallego,R., Vallejo,L.G., Dieguez,C., and Casanueva,F.F. (1998). Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *83*, 2149-2155.
- Castro,G., MF,C.A., Weissmann,L., Quaresma,P.G., Katashima,C.K., Saad,M.J., and Prada,P.O. (2013). Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. *FEBS Open. Bio* *3*, 443-449.
- Challis,B.G., Coll,A.P., Yeo,G.S., Pinnock,S.B., Dickson,S.L., Thresher,R.R., Dixon,J., Zahn,D., Rochford,J.J., White,A., Oliver,R.L., Millington,G., Aparicio,S.A., Colledge,W.H., Russ,A.P., Carlton,M.B., and O'Rahilly,S. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 4695-4700.
- Chao,P.T., Yang,L., Aja,S., Moran,T.H., and Bi,S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab* *13*, 573-583.

Chaurasia,B. and Summers,S.A. (2015). Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab* 26, 538-550.

Chavez,J.A. and Summers,S.A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab* 15, 585-594.

Chen,H.Y., Trumbauer,M.E., Chen,A.S., Weingarth,D.T., Adams,J.R., Frazier,E.G., Shen,Z., Marsh,D.J., Feighner,S.D., Guan,X.M., Ye,Z., Nargund,R.P., Smith,R.G., van der Ploeg,L.H., Howard,A.D., MacNeil,D.J., and Qian,S. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607-2612.

Cheung,C.C., Clifton,D.K., and Steiner,R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489-4492.

Chiu,H.C., Kovacs,A., Ford,D.A., Hsu,F.F., Garcia,R., Herrero,P., Saffitz,J.E., and Schaffer,J.E. (2001). A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* 107, 813-822.

Choi,Y.H., Fujikawa,T., Lee,J., Reuter,A., and Kim,K.W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front Neurosci.* 7, 71.

Chou,T.C., Scammell,T.E., Gooley,J.J., Gaus,S.E., Saper,C.B., and Lu,J. (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J. Neurosci.* 23, 10691-10702.

Clegg,D.J., Brown,L.M., Woods,S.C., and Benoit,S.C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55, 978-987.

Clegg,D.J., Brown,L.M., Zigman,J.M., Kemp,C.J., Strader,A.D., Benoit,S.C., Woods,S.C., Mangiaracina,M., and Geary,N. (2007). Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56, 1051-1058.

Cnop,M., Hannaert,J.C., Hoorens,A., Eizirik,D.L., and Pipeleers,D.G. (2001). Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50, 1771-1777.

Coll,A.P., Farooqi,I.S., and O'Rahilly,S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* 129, 251-262.

Coll,A.P. and Yeo,G.S. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 970-976.

Considine,R.V., Sinha,M.K., Heiman,M.L., Kriauciunas,A., Stephens,T.W., Nyce,M.R., Ohannesian,J.P., Marco,C.C., McKee,L.J., Bauer,T.L., and . (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292-295.

Contreras,C., Gonzalez,F., Ferno,J., Dieguez,C., Rahmouni,K., Nogueiras,R., and Lopez,M. (2014a). The brain and brown fat. *Ann. Med.* 1-19.

Contreras,C., Gonzalez-Garcia,I., Martinez-Sanchez,N., Seoane-Collazo,P., Jacas,J., Morgan,D.A., Serra,D., Gallego,R., Gonzalez,F., Casals,N., Nogueiras,R., Rahmouni,K., Dieguez,C., and Lopez,M. (2014b). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep.* 9, 366-377.

- Contreras,C., Nogueiras,R., Dieguez,C., Medina-Gomez,G., and Lopez,M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol. Cell Endocrinol.* *438*, 107-115.
- Cooke,P.S., Heine,P.A., Taylor,J.A., and Lubahn,D.B. (2001). The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. *Mol. Cell Endocrinol.* *178*, 147-154.
- Corander,M.P., Rimmington,D., Challis,B.G., O'Rahilly,S., and Coll,A.P. (2011). Loss of agouti-related peptide does not significantly impact the phenotype of murine POMC deficiency. *Endocrinology* *152*, 1819-1828.
- Correa,S.M., Newstrom,D.W., Warne,J.P., Flandin,P., Cheung,C.C., Lin-Moore,A.T., Pierce,A.A., Xu,A.W., Rubenstein,J.L., and Ingraham,H.A. (2015). An estrogen-responsive module in the ventromedial hypothalamus selectively drives sex-specific activity in females. *Cell Rep.* *10*, 62-74.
- Correnti,J.M., Juskeviciute,E., Swarup,A., and Hoek,J.B. (2014). Pharmacological ceramide reduction alleviates alcohol-induced steatosis and hepatomegaly in adiponectin knockout mice. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* *306*, G959-G973.
- Cousin,B., Cinti,S., Morroni,M., Raimbault,S., Ricquier,D., Penicaud,L., and Casteilla,L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J. Cell Sci.* *103 (Pt 4)*, 931-942.
- Cowart,L.A. (2009). Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol. Metab* *20*, 34-42.
- Cowley,M.A., Pronchuk,N., Fan,W., Dinulescu,D.M., Colmers,W.F., and Cone,R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* *24*, 155-163.
- Cowley,M.A., Smith,R.G., Diano,S., Tschop,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., Cone,R.D., and 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*, 649-661.
- CROCKER,A.C. and FARBER,S. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)* *37*, 1-95.
- Crowe,J.P. and Moore,R.E. (1974). Proceedings: Physiological and behavioural responses of aged men to passive heating. *J. Physiol* *236*, 43P-45P.
- Culhane,E.S. and Carstens,E. (1988). Medial hypothalamic stimulation suppresses nociceptive spinal dorsal horn neurons but not the tail-flick reflex in the rat. *Brain Res.* *438*, 137-144.
- Cummings,D.E. and Overduin,J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest* *117*, 13-23.
- Cummings,D.E., Purnell,J.Q., Frayo,R.S., Schmidova,K., Wisse,B.E., and Weigle,D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* *50*, 1714-1719.

- Cvoro,A., Tzagarakis-Foster,C., Tatomer,D., Paruthiyil,S., Fox,M.S., and Leitman,D.C. (2006). Distinct roles of unliganded and liganded estrogen receptors in transcriptional repression. *Mol. Cell* 21, 555-564.
- Cypess,A.M., Lehman,S., Williams,G., Tal,I., Rodman,D., Goldfine,A.B., Kuo,F.C., Palmer,E.L., Tseng,Y.H., Doria,A., Kolodny,G.M., and Kahn,C.R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509-1517.
- da,L.G., Frederico,M.J., da,S.S., Vitto,M.F., Cesconetto,P.A., de Pinho,R.A., Pauli,J.R., Silva,A.S., Cintra,D.E., Ropelle,E.R., and De Souza,C.T. (2011). Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur. J. Appl. Physiol* 111, 2015-2023.
- Dafopoulos,K., Chalvatzas,N., Kosmas,G., Kallitsaris,A., Pournaras,S., and Messinis,I.E. (2010). The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women. *J. Endocrinol. Invest* 33, 109-112.
- Davis,A.M., Seney,M.L., Stallings,N.R., Zhao,L., Parker,K.L., and Tobet,S.A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurobiol.* 60, 424-436.
- Davis,K.E., Carstens,E.J., Irani,B.G., Gent,L.M., Hahner,L.M., and Clegg,D.J. (2014). Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis. *Horm. Behav.* 66, 196-207.
- Davis,K.E., Neinast,D., Sun,K., Skiles,M., Bills,D., Zehr,A., Zeve,D., Hahner,D., Cox,W., Gent,M., Xu,Y., Wang,V., Khan,A., and Clegg,D.J. (2013). The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Mol. Metab* 2, 227-242.
- Deldicque,L., Bertrand,L., Patton,A., Francaux,M., and Baar,K. (2011). ER stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1. *PLoS. One.* 6, e20993.
- Dhillon,S.S. and Belsham,D.D. (2011). Estrogen inhibits NPY secretion through membrane-associated estrogen receptor (ER)-alpha in clonal, immortalized hypothalamic neurons. *Int. J. Obes. (Lond)* 35, 198-207.
- Diano,S., Kalra,S.P., Sakamoto,H., and Horvath,T.L. (1998). Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res.* 812, 256-259.
- Dill,K.A. and Chan,H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* 4, 10-19.
- Dimicco,J.A. and Zaretsky,D.V. (2007). The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 292, R47-R63.
- Dodd,G.T., Decherf,S., Loh,K., Simonds,S.E., Wiede,F., Balland,E., Merry,T.L., Munzberg,H., Zhang,Z.Y., Kahn,B.B., Neel,B.G., Bence,K.K., Andrews,Z.B., Cowley,M.A., and Tiganis,T. (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160, 88-104.
- Dodd,G.T., Worth,A.A., Nunn,N., Korpai,A.K., Bechtold,D.A., Allison,M.B., Myers,M.G., Jr., Statnick,M.A., and Luckman,S.M. (2014). The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab* 20, 639-649.

- Dong,M., Yang,X., Lim,S., Cao,Z., Honek,J., Lu,H., Zhang,C., Seki,T., Hosaka,K., Wahlberg,E., Yang,J., Zhang,L., Lanne,T., Sun,B., Li,X., Liu,Y., Zhang,Y., and Cao,Y. (2013). Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. *Cell Metab* 18, 118-129.
- Duysens,J., Dom,R., and Gybels,J. (1989). Suppression of the hindlimb flexor reflex by stimulation of the medial hypothalamus and thalamus in the rat. *Brain Res.* 499, 131-140.
- Eckel,L.A. and Geary,N. (1999). Endogenous cholecystokinin's satiating action increases during estrus in female rats. *Peptides* 20, 451-456.
- Edens,N.K. and Wade,G.N. (1983). Effects of estradiol on tissue distribution of newly-synthesized fatty acids in rats and hamsters. *Physiol Behav.* 31, 703-709.
- Egawa,M., Yoshimatsu,H., and Bray,G.A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am. J. Physiol* 260, R328-R334.
- Elbers,J.M., Asscheman,H., Seidell,J.C., and Gooren,L.J. (1999). Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals. *Am. J. Physiol* 276, E317-E325.
- Elias,C.F., Aschkenasi,C., Lee,C., Kelly,J., Ahima,R.S., Bjorbaek,C., Flier,J.S., Saper,C.B., and Elmquist,J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.
- Elias,C.F., Lee,C., Kelly,J., Aschkenasi,C., Ahima,R.S., Couceyro,P.R., Kuhar,M.J., Saper,C.B., and Elmquist,J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385.
- Ellgaard,L. and Helenius,A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181-191.
- Elmquist,J.K., Ahima,R.S., Elias,C.F., Flier,J.S., and Saper,C.B. (1998a). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 741-746.
- Elmquist,J.K., Bjorbaek,C., Ahima,R.S., Flier,J.S., and Saper,C.B. (1998b). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 395, 535-547.
- Emery,D.E. and Moss,R.L. (1984). Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. *Horm. Behav.* 18, 313-329.
- Enerback,S., Jacobsson,A., Simpson,E.M., Guerra,C., Yamashita,H., Harper,M.E., and Kozak,L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.
- Enriori,P.J., Sinnayah,P., Simonds,S.E., Garcia,R.C., and Cowley,M.A. (2011). Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J. Neurosci.* 31, 12189-12197.
- Epstein,L.H., Leddy,J.J., Temple,J.L., and Faith,M.S. (2007). Food reinforcement and eating: a multilevel analysis. *Psychol. Bull.* 133, 884-906.

- Fedorenko,A., Lishko,P.V., and Kirichok,Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400-413.
- Fekete,C., Legradi,G., Mihaly,E., Huang,Q.H., Tatro,J.B., Rand,W.M., Emerson,C.H., and Lechan,R.M. (2000). alpha-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. *J. Neurosci.* 20, 1550-1558.
- Fekete,C., Sarkar,S., Rand,W.M., Harney,J.W., Emerson,C.H., Bianco,A.C., and Lechan,R.M. (2002). Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143, 3846-3853.
- Feldmann,H.M., Golozoubova,V., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9, 203-209.
- Ferno,J., Senaris,R., Dieguez,C., Tena-Sempere,M., and Lopez,M. (2015). Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding. *Mol. Cell Endocrinol.* 418 Pt 1, 17-26.
- Ferrer-Lorente,R., Cabot,C., Fernandez-Lopez,J.A., and Alemany,M. (2007). Effects of combined oleoyl-estrone and rimonabant on overweight rats. *J. Pharmacol. Sci.* 104, 176-182.
- Fiocchetti,M., Ascenzi,P., and Marino,M. (2012). Neuroprotective effects of 17beta-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Front Physiol* 3, 73.
- Flint,A.P., Sheldrick,E.L., and Fisher,P.A. (2002). Ligand-independent activation of steroid receptors. *Domest. Anim Endocrinol.* 23, 13-24.
- Flynn,G.C., Pohl,J., Flocco,M.T., and Rothman,J.E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726-730.
- Foryst-Ludwig,A., Clemenz,M., Hohmann,S., Hartge,M., Sprang,C., Frost,N., Krikov,M., Bhanot,S., Barros,R., Morani,A., Gustafsson,J.A., Unger,T., and Kintscher,U. (2008). Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS. Genet.* 4, e1000108.
- Frayn, K. N. *Metabolic Regulation: A Human Perspective.* 3. 22-2-2010. Wiley-Blackwell.
Ref Type: Edited Book
- Futai,M., Noumi,T., and Maeda,M. (1989). ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 111-136.
- Gao,D., Pararasa,C., Dunston,C.R., Bailey,C.J., and Griffiths,H.R. (2012). Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 796-806.
- Gao,Q., Mezei,G., Nie,Y., Rao,Y., Choi,C.S., Bechmann,I., Leranth,C., Toran-Allerand,D., Priest,C.A., Roberts,J.L., Gao,X.B., Mobbs,C., Shulman,G.I., Diano,S., and Horvath,T.L. (2007). Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat. Med.* 13, 89-94.

- Gao,S., Zhu,G., Gao,X., Wu,D., Carrasco,P., Casals,N., Hegardt,F.G., Moran,T.H., and Lopaschuk,G.D. (2011). Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 9691-9696.
- Gao,X.B. and Horvath,T. (2014). Function and dysfunction of hypocretin/orexin: an energetics point of view. *Annu. Rev. Neurosci.* *37*, 101-116.
- Gardner,B.M. and Walter,P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* *333*, 1891-1894.
- Garlid,K.D., Jaburek,M., and Jezek,P. (1998). The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* *438*, 10-14.
- Garver,W.S., Jelinek,D., Oyarzo,J.N., Flynn,J., Zuckerman,M., Krishnan,K., Chung,B.H., and Heidenreich,R.A. (2007). Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse. *J. Cell Biochem.* *101*, 498-516.
- Ge,X., Yang,H., Bednarek,M.A., Galon-Tilleman,H., Chen,P., Chen,M., Lichtman,J.S., Wang,Y., Dalmas,O., Yin,Y., Tian,H., Jermutus,L., Grimsby,J., Rondinone,C.M., Konkar,A., and Kaplan,D.D. (2017). LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metab.*
- Geary,N. and Asarian,L. (2001). Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *281*, R1290-R1294.
- Geary,N., Asarian,L., Korach,K.S., Pfaff,D.W., and Ogawa,S. (2001). Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology* *142*, 4751-4757.
- Geerling,J.C., Shin,J.W., Chimenti,P.C., and Loewy,A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J. Comp Neurol.* *518*, 1460-1499.
- Gehlert,D.R., Chronwall,B.M., Schafer,M.P., and O'Donohue,T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* *1*, 25-31.
- Gething,M.J. and Sambrook,J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* *355*, 33-45.
- Ghorbani,M., Claus,T.H., and Himms-Hagen,J. (1997). Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem. Pharmacol.* *54*, 121-131.
- Golozoubova,V., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *291*, E350-E357.
- Golozoubova,V., Hohtola,E., Matthias,A., Jacobsson,A., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J.* *15*, 2048-2050.
- Gonzales,K.L., Tetel,M.J., and Wagner,C.K. (2008). Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* *149*, 4615-4621.
- Gonzalez-Garcia,I., Ferno,J., Dieguez,C., Nogueiras,R., and Lopez,M. (2017a). Hypothalamic Lipids: Key Regulators of Whole Body Energy Balance. *Neuroendocrinology* *104*, 398-411.

Gonzalez-Garcia,I., Tena-Sempere,M., and Lopez,M. (2017b). Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1043, 315-335.

Graham,M., Shutter,J.R., Sarmiento,U., Sarosi,I., and Stark,K.L. (1997). Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* 17, 273-274.

Gray,J.M. and Greenwood,M.R. (1982). Time course of effects of ovarian hormones on food intake and metabolism. *Am. J. Physiol* 243, E407-E412.

Gregor,M.F., Yang,L., Fabbrini,E., Mohammed,B.S., Eagon,J.C., Hotamisligil,G.S., and Klein,S. (2009). Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58, 693-700.

Grill,H.J. and Hayes,M.R. (2012). Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. *Cell Metab* 16, 296-309.

Gropp,E., Shanabrough,M., Borok,E., Xu,A.W., Janoschek,R., Buch,T., Plum,L., Balthasar,N., Hampel,B., Waisman,A., Barsh,G.S., Horvath,T.L., and Bruning,J.C. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci.* 8, 1289-1291.

Grumbach,M.M. and Auchus,R.J. (1999). Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 4677-4694.

Guan,X.M., Yu,H., Palyha,O.C., McKee,K.K., Feighner,S.D., Sirinathsinghji,D.J., Smith,R.G., van der Ploeg,L.H., and Howard,A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48, 23-29.

Guan,X.M., Yu,H., Trumbauer,M., Frazier,E., van der Ploeg,L.H., and Chen,H. (1998). Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport* 9, 3415-3419.

Guieu,J.D. and Hardy,J.D. (1970). Effects of heating and cooling of the spinal cord on preoptic unit activity. *J. Appl. Physiol* 29, 675-683.

Haarbo,J., Marslew,U., Gotfredsen,A., and Christiansen,C. (1991). Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 40, 1323-1326.

Hagimoto,S., Arima,H., Adachi,K., Ito,Y., Suga,H., Sugimura,Y., Goto,M., Banno,R., and Oiso,Y. (2013). Expression of neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA stimulated by glucocorticoids is attenuated via NF-kappaB p65 under ER stress in mouse hypothalamic cultures. *Neurosci. Lett.* 553, 165-169.

Hajdуч,E., Turban,S., Le,L., X, Le,L.S., Lipina,C., Dimopoulos,N., Dugail,I., and Hundal,H.S. (2008). Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem. J.* 410, 369-379.

Hall, J. E. GUYTON Y HALL. TRATADO DE FISIOLÓGIA MÉDICA. 13. 25-4-2016. Elsevier.
Ref Type: Edited Book

Hammel,H.T., Hardy,J.D., and FUSCO,M.M. (1960). Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs. *Am. J. Physiol* 198, 481-486.

- Hanada,K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1632, 16-30.
- Hannun,Y.A. and Luberto,C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 10, 73-80.
- Hannun,Y.A. and Obeid,L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277, 25847-25850.
- Hannun,Y.A. and Obeid,L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139-150.
- Harding,H.P., Zhang,Y., Bertolotti,A., Zeng,H., and Ron,D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* 5, 897-904.
- Harlan,S.M., Morgan,D.A., Agassandian,K., Guo,D.F., Cassell,M.D., Sigmund,C.D., Mark,A.L., and Rahmouni,K. (2011). Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ. Res.* 108, 808-812.
- Harms,M. and Seale,P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19, 1252-1263.
- Hayden,M.S. and Ghosh,S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Haze,K., Yoshida,H., Yanagi,H., Yura,T., and Mori,K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787-3799.
- Heine,P.A., Taylor,J.A., Iwamoto,G.A., Lubahn,D.B., and Cooke,P.S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12729-12734.
- Hendershot,L.M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med.* 71, 289-297.
- Hetherington,A.W. and Ranson,S.W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.* 78, 149-172.
- Hetherington,A.W. and Ranson,S.W. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J. Comp. Neurol.* 76, 475-499.
- Hetz,C. and Mollereau,B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 233-249.
- Hewitt,K.N., Pratis,K., Jones,M.E., and Simpson,E.R. (2004). Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 145, 1842-1848.
- Hirasawa,M., Nishihara,M., and Takahashi,M. (1996). Neural activity in the VMH associated with suppression of the circulatory system in rats. *Physiol Behav.* 59, 1017-1023.
- Hirosawa,M., Minata,M., Harada,K.H., Hitomi,T., Krust,A., and Koizumi,A. (2008). Ablation of estrogen receptor alpha (ERalpha) prevents upregulation of POMC by leptin and insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 320-323.

Holland,W.L., Brozinick,J.T., Wang,L.P., Hawkins,E.D., Sargent,K.M., Liu,Y., Narra,K., Hoehn,K.L., Knotts,T.A., Siesky,A., Nelson,D.H., Karathanasis,S.K., Fontenot,G.K., Birnbaum,M.J., and Summers,S.A. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5, 167-179.

Holland,W.L. and Summers,S.A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381-402.

Holt,S.J., Wheal,H.V., and York,D.A. (1988). Response of brown adipose tissue to electrical stimulation of hypothalamic centres in intact and adrenalectomized Zucker rats. *Neurosci. Lett.* 84, 63-67.

Horn,T., Wilkinson,M.F., Landgraf,R., and Pittman,Q.J. (1994). Reduced febrile responses to pyrogens after lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Am. J. Physiol* 267, R323-R328.

Hosoi,T., Sasaki,M., Miyahara,T., Hashimoto,C., Matsuo,S., Yoshii,M., and Ozawa,K. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.* 74, 1610-1619.

Hotamisligil,G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900-917.

Howard,J.K., Cave,B.J., Oksanen,L.J., Tzamelis,I., Bjorbaek,C., and Flier,J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* 10, 734-738.

Huang,C.J., Lin,C.Y., Haataja,L., Gurlo,T., Butler,A.E., Rizza,R.A., and Butler,P.C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes* 56, 2016-2027.

Huang,Y.S., Doi,R., Chowdhury,P., Pasley,J.N., Nishikawa,M., Huang,T.J., and Rayford,P.L. (1993). Effect of cholecystokinin on food intake at different stages of the estrous cycle in female rats. *J. Assoc. Acad. Minor. Phys.* 4, 56-58.

Hugie,T., Halvorson,I., and Thornhill,J. (1992). Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 575, 57-62.

Hurtley,S.M. and Helenius,A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 277-307.

Imai-Matsumura,K., Matsumura,K., and Nakayama,T. (1984). Involvement of ventromedial hypothalamus in brown adipose tissue thermogenesis induced by preoptic cooling in rats. *Jpn. J. Physiol* 34, 939-943.

Imbernon,M., Beiroa,D., Vazquez,M.J., Morgan,D.A., Veyrat-Durebex,C., Porteiro,B., Diaz-Arteaga,A., Senra,A., Busquets,S., Velasquez,D.A., Al-Massadi,O., Varela,L., Gandara,M., Lopez-Soriano,F.J., Gallego,R., Seoane,L.M., Argiles,J.M., Lopez,M., Davis,R.J., Sabio,G., Rohner-Jeanrenaud,F., Rahmouni,K., Dieguez,C., and Nogueiras,R. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636-649.

- Jo, Y.H. (2012). Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurophysiol.* *107*, 42-49.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Misso, M.L., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S., and Simpson, E.R. (2001). Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *79*, 3-9.
- Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S., and Simpson, E.R. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 12735-12740.
- Julier, C. and Nicolino, M. (2010). Wolcott-Rallison syndrome. *Orphanet. J. Rare. Dis.* *5*, 29.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* *1*, 15-25.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* *444*, 840-846.
- Kajimura, S., Spiegelman, B.M., and Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab* *22*, 546-559.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P., and Kalra, P.S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 10931-10935.
- Kalsbeek, A., Bruinstroop, E., Yi, C.X., Klieverik, L.P., La Fleur, S.E., and Fliers, E. (2010). Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1212*, 114-129.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* *50*, 2438-2443.
- Kamei, Y., Suzuki, M., Miyazaki, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Wu, J., Ishimi, Y., and Ezaki, O. (2005). Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* *51*, 110-117.
- Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferre, P., and Foufelle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest* *119*, 1201-1215.
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M.F., Mohammed, B.S., Pietka, T.A., Finck, B.N., Patterson, B.W., Horton, J.D., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G.S., and Klein, S. (2010). Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* *59*, 1899-1905.
- Kasumov, T., Li, L., Li, M., Gulshan, K., Kirwan, J.P., Liu, X., Previs, S., Willard, B., Smith, J.D., and McCullough, A. (2015). Ceramide as a mediator of non-alcoholic Fatty liver disease and associated atherosclerosis. *PLoS. One.* *10*, e0126910.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373-384.

- Kellokoski,E., Poykko,S.M., Karjalainen,A.H., Ukkola,O., Heikkinen,J., Kesaniemi,Y.A., and Horkko,S. (2005). Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 2954-2963.
- Kenney,W.L. and Munce,T.A. (2003). Invited review: aging and human temperature regulation. *J. Appl. Physiol* (1985.) 95, 2598-2603.
- Kim,K.W., Zhao,L., Donato,J., Jr., Kohno,D., Xu,Y., Elias,C.F., Lee,C., Parker,K.L., and Elmquist,J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 10673-10678.
- Kim,M.S., Rossi,M., Abusnana,S., Sunter,D., Morgan,D.G., Small,C.J., Edwards,C.M., Heath,M.M., Stanley,S.A., Seal,L.J., Bhatti,J.R., Smith,D.M., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49, 177-182.
- Kim,S.H. and Plutzky,J. (2016). Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J.* 40, 12-21.
- Kim,Y., Park,M., Boghossian,S., and York,D.A. (2010). Three weeks voluntary running wheel exercise increases endoplasmic reticulum stress in the brain of mice. *Brain Res.* 1317, 13-23.
- King,B.M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 87, 221-244.
- Kingma,B.R., Frijns,A.J., Schellen,L., and an Marken Lichtenbelt,W.D. (2014). Beyond the classic thermoneutral zone: Including thermal comfort. *Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal*, 1(2), 142–149. <http://doi.org/10.4161/temp.29702>. *Temperature.* (Austin.) 1, 142-149.
- Kojima,M., Hosoda,H., Date,Y., Nakazato,M., Matsuo,H., and Kangawa,K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Komori,T., Morikawa,Y., Nanjo,K., and Senba,E. (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* 139, 1107-1115.
- Kong,D., Tong,Q., Ye,C., Koda,S., Fuller,P.M., Krashes,M.J., Vong,L., Ray,R.S., Olson,D.P., and Lowell,B.B. (2012). GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell* 151, 645-657.
- Kong,W., Stanley,S., Gardiner,J., Abbott,C., Murphy,K., Seth,A., Connoley,I., Ghatei,M., Stephens,D., and Bloom,S. (2003). A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J.* 17, 1688-1690.
- Kontani,Y., Wang,Y., Kimura,K., Inokuma,K.I., Saito,M., Suzuki-Miura,T., Wang,Z., Sato,Y., Mori,N., and Yamashita,H. (2005). UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4, 147-155.
- Kotz,C.M., Wang,C.F., Briggs,J.E., Levine,A.S., and Billington,C.J. (2000). Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 278, R494-R498.

- Krahn,D.D., Gosnell,B.A., Levine,A.S., and Morley,J.E. (1988). Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res.* 443, 63-69.
- Krashes,M.J., Koda,S., Ye,C., Rogan,S.C., Adams,A.C., Cusher,D.S., Maratos-Flier,E., Roth,B.L., and Lowell,B.B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest* 121, 1424-1428.
- Kristensen,P., Judge,M.E., Thim,L., Ribel,U., Christjansen,K.N., Wulff,B.S., Clausen,J.T., Jensen,P.B., Madsen,O.D., Vrang,N., Larsen,P.J., and Hastrup,S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.
- Krude,H., Biebermann,H., Luck,W., Horn,R., Brabant,G., and Gruters,A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 19, 155-157.
- Kurek,K., Piotrowska,D.M., Wiesiolek-Kurek,P., Lukaszuk,B., Chabowski,A., Gorski,J., and Zendzian-Piotrowska,M. (2014). Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 34, 1074-1083.
- Kurtz,D.M., Rinaldo,P., Rhead,W.J., Tian,L., Millington,D.S., Vockley,J., Hamm,D.A., Brix,A.E., Lindsey,J.R., Pinkert,C.A., O'Brien,W.E., and Wood,P.A. (1998). Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15592-15597.
- Lafontan,M. and Berlan,M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34, 1057-1091.
- Lage,R., Dieguez,C., Vidal-Puig,A., and Lopez,M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol. Med.* 14, 539-549.
- Lage,R., Vázquez,M.J., Varela,L., Saha,A.K., Vidal-Puig,A., Nogueiras,R., Diéguez,C., and López,M. (2010). Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *FASEB J.* 24, 2670-2679.
- Lam,B.Y.H., Cimino,I., Poley-Wolf,J., Nicole,K.S., Rimmington,D., Iyemere,V., Heeley,N., Cossetti,C., Schulte,R., Saraiva,L.R., Logan,D.W., Blouet,C., O'Rahilly,S., Coll,A.P., and Yeo,G.S.H. (2017). Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Mol. Metab* 6, 383-392.
- Lam,T.K., Schwartz,G.J., and Rossetti,L. (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat. Neurosci.* 8, 579-584.
- Lau,J., Farzi,A., Qi,Y., Heilbronn,R., Mietsch,M., Shi,Y.C., and Herzog,H. (2017). CART neurons in the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area exert differential controls on energy homeostasis. *Mol. Metab.*
- Lee,A.S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* 26, 504-510.
- Lee,A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35, 373-381.

- Lee, J. and Ozcan, U. (2014). Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* *289*, 1203-1211.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* *16*, 452-466.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., and Unger, R.H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 10878-10882.
- Lee, Y.S., Challis, B.G., Thompson, D.A., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Madonna, M.E., Wraight, V., Sims, M., Vatin, V., Meyre, D., Shield, J., Burren, C., Ibrahim, Z., Cheetham, T., Swift, P., Blackwood, A., Hung, C.C., Wareham, N.J., Froguel, P., Millhauser, G.L., O'Rahilly, S., and Farooqi, I.S. (2006). A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* *3*, 135-140.
- Leedy, M.G. and Hart, B.L. (1985). Female and male sexual responses in female cats with ventromedial hypothalamic lesions. *Behav. Neurosci.* *99*, 936-941.
- Levin, E.R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab* *20*, 477-482.
- Li, W., Yang, X., Xing, S., Bian, F., Yao, W., Bai, X., Zheng, T., Wu, G., and Jin, S. (2014). Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall. *Oxid. Med. Cell Longev.* *2014*, 823071.
- Liang, Y.Q., Akishita, M., Kim, S., Ako, J., Hashimoto, M., Iijima, K., Ohike, Y., Watanabe, T., Sudoh, N., Toba, K., Yoshizumi, M., and Ouchi, Y. (2002). Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *26*, 1103-1109.
- Lin, K.C., Sagawa, N., Yura, S., Itoh, H., and Fujii, S. (2005). Simultaneous increases of leptin and gonadotropin-releasing hormone following exogenous estrogen administration in women with normally menstrual cycle. *Endocr. J.* *52*, 449-454.
- Lindberg, D., Chen, P., and 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. *J. Comp Neurol.* *521*, 3167-3190.
- Loncar, D., Bedrica, L., Mayer, J., Cannon, B., Nedergaard, J., Afzelius, B.A., and Svajger, A. (1986). The effect of intermittent cold treatment on the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* *97*, 119-129.
- Lopez, M. (2017). BAT Expansion: A Panacea against Obesity? Lessons from LKB1. *EBioMedicine.* *24*, 11-13.
- Lopez, M., Alvarez, C.V., Nogueiras, R., and Dieguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol. Med.* *19*, 418-427.
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A.K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S., Deoliveira, R.M., Castaneda, T., Datta, R., Dong, J.Z., Culler, M., Sleeman, M.W., Alvarez, C.V., Gallego, R., Lelliott, C.J., Carling, D., Tschop, M.H., Dieguez, C., and Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* *7*, 389-399.

- Lopez,M., Lelliott,C.J., Tovar,S., Kimber,W., Gallego,R., Virtue,S., Blount,M., Vazquez,M.J., Finan,N., Powles,T.J., O'Rahilly,S., Saha,A.K., Dieguez,C., and Vidal-Puig,A.J. (2006). Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55, 1327-1336.
- Lopez,M., Nogueiras,R., Tena-Sempere,M., and Dieguez,C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 421-432.
- López,M. and Tena-Sempere,M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol. Metab* 26, 411-421.
- Lopez,M. and Tena-Sempere,M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol. Metab* 26, 411-421.
- Lopez,M., Tena-Sempere,M., and Dieguez,C. (2010a). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol.* 31, 113-127.
- Lopez,M., Varela,L., Vazquez,M.J., Rodriguez-Cuenca,S., Gonzalez,C.R., Velagapudi,V.R., Morgan,D.A., Schoenmakers,E., Agassandian,K., Lage,R., Martinez de Morentin,P.B., Tovar,S., Nogueiras,R., Carling,D., Lelliott,C., Gallego,R., Oresic,M., Chatterjee,K., Saha,A.K., Rahmouni,K., Dieguez,C., and Vidal-Puig,A. (2010b). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* 16, 1001-1008.
- Lovejoy,J.C., Champagne,C.M., de,J.L., Xie,H., and Smith,S.R. (2008). Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int. J. Obes. (Lond)* 32, 949-958.
- Lowell,B.B. and Spiegelman,B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Ludwig,D.S., Tritos,N.A., Mastaitis,J.W., Kulkarni,R., Kokkotou,E., Elmquist,J., Lowell,B., Flier,J.S., and Maratos-Flier,E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* 107, 379-386.
- Luo,X., Ikeda,Y., Lala,D., Rice,D., Wong,M., and Parker,K.L. (1999). Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for endocrine development and function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 13-18.
- Luquet,S. and Magnan,C. (2009). The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. *Front Biosci. (Schol. Ed)* 1, 448-465.
- Luquet,S., Perez,F.A., Hnasko,T.S., and Palmiter,R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310, 683-685.
- Lutter,M. and Nestler,E.J. (2009). Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J. Nutr.* 139, 629-632.
- Lutz,T.A. (2012). Effects of amylin on eating and adiposity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231-250.
- Lyons,W.E., Mamounas,L.A., Ricaurte,G.A., Coppola,V., Reid,S.W., Bora,S.H., Wihler,C., Koliatsos,V.E., and Tessarollo,L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 15239-15244.

- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* *318*, 1351-1365.
- Madden, C.J. and Morrison, S.F. (2009). Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *296*, R831-R843.
- Madden, C.J., Tupone, D., Cano, G., and Morrison, S.F. (2013). α 2 Adrenergic receptor-mediated inhibition of thermogenesis. *J. Neurosci.* *33*, 2017-2028.
- Maedler, K., Spinass, G.A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., and Donath, M.Y. (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* *50*, 69-76.
- Marciniak, S.J. and Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.* *86*, 1133-1149.
- Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* *7*, 497-508.
- Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1500-1508.
- Marks, J.L., Porte, D., Jr., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234-3236.
- Marsh, D.J., Weingarth, D.T., Novi, D.E., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Guan, X.M., Jiang, M.M., Feng, Y., Camacho, R.E., Shen, Z., Frazier, E.G., Yu, H., Metzger, J.M., Kuca, S.J., Shearman, L.P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D.J., Strack, A.M., MacIntyre, D.E., van der Ploeg, L.H., and Qian, S. (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 3240-3245.
- Martinez de Morentin, P.B., Gonzalez-Garcia, I., Martins, L., Lage, R., Fernandez-Mallo, D., Martinez-Sanchez, N., Ruiz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D.A., Pinilla, L., Gallego, R., Saha, A.K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P.H., Dieguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Tena-Sempere, M., and Lopez, M. (2014). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* *20*, 41-53.
- Martinez de Morentin, P.B., Lage, R., Gonzalez-Garcia, I., Ruiz-Pino, F., Martins, L., Fernandez-Mallo, D., Gallego, R., Ferno, J., Senaris, R., Saha, A.K., Tovar, S., Dieguez, C., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Lopez, M. (2015). Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology* *156*, 947-960.
- Martinez de Morentin, P.B. and Lopez, M. (2010). "Mens sana in corpore sano": exercise and hypothalamic ER stress. *PLoS. Biol.* *8*.
- Martinez de Morentin, P.B., Whittle, A.J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., and Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* *61*, 807-817.

- Martinez-Sanchez,N., Seoane-Collazo,P., Contreras,C., Varela,L., Villarroya,J., Rial-Pensado,E., Buque,X., Aurrekoetxea,I., Delgado,T.C., Vazquez-Martinez,R., Gonzalez-Garcia,I., Roa,J., Whittle,A.J., Gomez-Santos,B., Velagapudi,V., Tung,Y.C.L., Morgan,D.A., Voshol,P.J., Martinez de Morentin,P.B., Lopez-Gonzalez,T., Linares-Pose,L., Gonzalez,F., Chatterjee,K., Sobrino,T., Medina-Gomez,G., Davis,R.J., Casals,N., Oresic,M., Coll,A.P., Vidal-Puig,A., Mittag,J., Tena-Sempere,M., Malagon,M.M., Dieguez,C., Martinez-Chantar,M.L., Aspichueta,P., Rahmouni,K., Nogueiras,R., Sabio,G., Villarroya,F., and Lopez,M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* 26, 212-229.
- Martins,L., Fernandez-Mallo,D., Novelle,M.G., Vazquez,M.J., Tena-Sempere,M., Nogueiras,R., Lopez,M., and Dieguez,C. (2012). Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS. One.* 7, e46923.
- Martins,L., Seoane-Collazo,P., Contreras,C., Gonzalez-Garcia,I., Martinez-Sanchez,N., Gonzalez,F., Zalvide,J., Gallego,R., Dieguez,C., Nogueiras,R., Tena-Sempere,M., and Lopez,M. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep.* 16, 2231-2242.
- Mastorakos,G. and Zapanti,E. (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Nutr. Neurosci.* 7, 271-280.
- Matthews,J. and Gustafsson,J.A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 3, 281-292.
- Mauvais-Jarvis,F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab* 22, 24-33.
- Mauvais-Jarvis,F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol. Sex Differ.* 6, 14.
- Mauvais-Jarvis,F., Clegg,D.J., and Hevener,A.L. (2013). The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr. Rev.* 34, 309-38.
- McClellan,K.M., Parker,K.L., and Tobet,S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 27, 193-209.
- McCrimmon,R.J., Fan,X., Cheng,H., McNay,E., Chan,O., Shaw,M., Ding,Y., Zhu,W., and Sherwin,R.S. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 55, 1755-1760.
- McCrimmon,R.J., Shaw,M., Fan,X., Cheng,H., Ding,Y., Vella,M.C., Zhou,L., McNay,E.C., and Sherwin,R.S. (2008). Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444-450.
- McFadden,J.W., Aja,S., Li,Q., Bandaru,V.V., Kim,E.K., Haughey,N.J., Kuhajda,F.P., and Ronnett,G.V. (2014). Increasing Fatty Acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS. One.* 9, e115642.
- McGlone,F. and Reilly,D. (2010). The cutaneous sensory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34, 148-159.

McGowan,M.K., Andrews,K.M., Fenner,D., and Grossman,S.P. (1993). Chronic intrahypothalamic insulin infusion in the rat: behavioral specificity. *Physiol Behav.* *54*, 1031-1034.

Meli,R., Pacilio,M., Raso,G.M., Esposito,E., Coppola,A., Nasti,A., Di,C.C., Nappi,C., and Di,C.R. (2004). Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* *145*, 3115-3121.

Melmed,S., Polonsky,K., Larsen,P.R., and Kronenberg,H. (2015). *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier).

Mercer,A.J., Hentges,S.T., Meshul,C.K., and Low,M.J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci.* *7*, 19.

Mercer,J.G., Hoggard,N., Williams,L.M., Lawrence,C.B., Hannah,L.T., and Trayhurn,P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* *387*, 113-116.

Meyers,M.J., Sun,J., Carlson,K.E., Marriner,G.A., Katzenellenbogen,B.S., and Katzenellenbogen,J.A. (2001). Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J. Med. Chem.* *44*, 4230-4251.

Milanski,M., Degasperi,G., Coope,A., Morari,J., Denis,R., Cintra,D.E., Tsukumo,D.M., Anhe,G., Amaral,M.E., Takahashi,H.K., Curi,R., Oliveira,H.C., Carnevali,J.B., Bordin,S., Saad,M.J., and Velloso,L.A. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* *29*, 359-370.

Minami,T., Oomura,Y., Nabekura,J., and Fukuda,A. (1990). 17 beta-estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res.* *519*, 301-307.

Mitoma,J., Ito,M., Furuya,S., and Hirabayashi,Y. (1998). Bipotential roles of ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage-dependent manners. *J. Neurosci. Res.* *51*, 712-722.

Monjo,M., Rodriguez,A.M., Palou,A., and Roca,P. (2003). Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology* *144*, 4923-4930.

Monnikes,H., Heymann-Monnikes,I., and Tache,Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. *Brain Res.* *574*, 70-76.

Morrison,S.F. (1999). RVLN and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* *276*, R962-R973.

Morrison,S.F. (2004). Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci.* *19*, 67-74.

Morrison,S.F. and Nakamura,K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci. (Landmark. Ed)* *16*, 74-104.

Morselli,E., Frank,A.P., Santos,R.S., Fatima,L.A., Palmer,B.F., and Clegg,D.J. (2016). Sex and Gender: Critical Variables in Pre-Clinical and Clinical Medical Research. *Cell Metab* *24*, 203-209.

- Morton,G.J., Cummings,D.E., Baskin,D.G., Barsh,G.S., and Schwartz,M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* *443*, 289-295.
- Morton,G.J., Meek,T.H., and Schwartz,M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 367-378.
- Morton,G.J., Mystkowski,P., Matsumoto,A.M., and Schwartz,M.W. (2004). Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides* *25*, 667-674.
- Muller,T.D., Nogueiras,R., Andermann,M.L., Andrews,Z.B., Anker,S.D., Argente,J., Batterham,R.L., Benoit,S.C., Bowers,C.Y., Broglio,F., Casanueva,F.F., D'Alessio,D., Depoortere,I., Geliebter,A., Ghigo,E., Cole,P.A., Cowley,M., Cummings,D.E., Dagher,A., Diano,S., Dickson,S.L., Dieguez,C., Granata,R., Grill,H.J., Grove,K., Habegger,K.M., Heppner,K., Heiman,M.L., Holsen,L., Holst,B., Inui,A., Jansson,J.O., Kirchner,H., Korbonits,M., Laferrere,B., LeRoux,C.W., Lopez,M., Morin,S., Nakazato,M., Nass,R., Perez-Tilve,D., Pfluger,P.T., Schwartz,T.W., Seeley,R.J., Sleeman,M., Sun,Y., Sussel,L., Tong,J., Thorner,M.O., van der Lely,A.J., van der Ploeg,L.H., Zigman,J.M., Kojima,M., Kangawa,K., Smith,R.G., Horvath,T., and Tschop,M.H. (2015). Ghrelin. *Mol. Metab* *4*, 437-460.
- Musatov,S., Chen,W., Pfaff,D.W., Mobbs,C.V., Yang,X.J., Clegg,D.J., Kaplitt,M.G., and Ogawa,S. (2007). Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 2501-2506.
- Nakamura,K. and Morrison,S.F. (2008). A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat. Neurosci.* *11*, 62-71.
- Nakamura,K. and Morrison,S.F. (2011). Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J. Physiol* *589*, 3641-3658.
- Nakazato,M., Murakami,N., Date,Y., Kojima,M., Matsuo,H., Kangawa,K., and Matsukura,S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* *409*, 194-198.
- Nedergaard,J., Bengtsson,T., and Cannon,B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *293*, E444-E452.
- Nedergaard,J. and Cannon,B. (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* *20*, 396-407.
- Nedergaard,J., Golozoubova,V., Matthias,A., Shabalina,I., Ohba,K., Ohlson,K., Jacobsson,A., and Cannon,B. (2001). Life without UCP1: mitochondrial, cellular and organismal characteristics of the UCP1-ablated mice. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 756-763.
- Nguyen,A.D., Mitchell,N.F., Lin,S., Macia,L., Yulyaningsih,E., Baldock,P.A., Enriquez,R.F., Zhang,L., Shi,Y.C., Zolotukhin,S., Herzog,H., and Sainsbury,A. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS. One.* *7*, e40191.
- Ni,M. and Lee,A.S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* *581*, 3641-3651.
- Nicholls,D.G. and Locke,R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* *64*, 1-64.
- Nilsson,S., Makela,S., Treuter,E., Tujague,M., Thomsen,J., Andersson,G., Enmark,E., Pettersson,K., Warner,M., and Gustafsson,J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* *81*, 1535-1565.

Obici,S., Zhang,B.B., Karknias,G., and Rossetti,L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* 8, 1376-1382.

Ogawa,S., Chan,J., Chester,A.E., Gustafsson,J.A., Korach,K.S., and Pfaff,D.W. (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12887-12892.

Ohlsson,C., Hellberg,N., Parini,P., Vidal,O., Bohlooly,M., Rudling,M., Lindberg,M.K., Warner,M., Angelin,B., and Gustafsson,J.A. (2000). Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 640-645.

Okura,T., Koda,M., Ando,F., Niino,N., and Shimokata,H. (2003a). Relationships of resting energy expenditure with body fat distribution and abdominal fatness in Japanese population. *J. Physiol Anthropol. Appl. Human Sci.* 22, 47-52.

Okura,T., Koda,M., Ando,F., Niino,N., Tanaka,M., and Shimokata,H. (2003b). Association of the mitochondrial DNA 15497G/A polymorphism with obesity in a middle-aged and elderly Japanese population. *Hum. Genet.* 113, 432-436.

Oldfield,B.J., Giles,M.E., Watson,A., Anderson,C., Colvill,L.M., and McKinley,M.J. (2002). The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience* 110, 515-526.

Ollmann,M.M., Wilson,B.D., Yang,Y.K., Kerns,J.A., Chen,Y., Gantz,I., and Barsh,G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

Olney,J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.

Olofsson,L.E., Pierce,A.A., and Xu,A.W. (2009). Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 15932-15937.

Oyadomari,S., Harding,H.P., Zhang,Y., Oyadomari,M., and Ron,D. (2008). Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 7, 520-532.

Oyadomari,S., Koizumi,A., Takeda,K., Gotoh,T., Akira,S., Araki,E., and Mori,M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest* 109, 525-532.

Ozcan,L., Ergin,A.S., Lu,A., Chung,J., Sarkar,S., Nie,D., Myers,M.G., Jr., and Ozcan,U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9, 35-51.

Ozcan,U., Cao,Q., Yilmaz,E., Lee,A.H., Iwakoshi,N.N., Ozdelen,E., Tuncman,G., Gorgun,C., Glimcher,L.H., and Hotamisligil,G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.

Ozcan,U., Yilmaz,E., Ozcan,L., Furuhashi,M., Vaillancourt,E., Smith,R.O., Gorgun,C.Z., and Hotamisligil,G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137-1140.

- Palmer,B.F. and Clegg,D.J. (2015). The sexual dimorphism of obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* *402*, 113-119.
- Palmiter,R.D., Erickson,J.C., Hollopeter,G., Baraban,S.C., and Schwartz,M.W. (1998). Life without neuropeptide Y. *Recent Prog. Horm. Res.* *53*, 163-199.
- Pandit,R., Beerens,S., and Adan,R.A.H. (2017). Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *312*, R938-R947.
- Paquette,A., Shinoda,M., Rabasa,L.R., Prud'homme,D., and Lavoie,J.M. (2007). Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas* *58*, 182-190.
- Park,C.J., Zhao,Z., Glidewell-Kenney,C., Lazic,M., Chambon,P., Krust,A., Weiss,J., Clegg,D.J., Dunaif,A., Jameson,J.L., and Levine,J.E. (2011). Genetic rescue of nonclassical ERalpha signaling normalizes energy balance in obese Eralpha-null mutant mice. *J. Clin. Invest* *121*, 604-612.
- Park,T.S., Hu,Y., Noh,H.L., Drosatos,K., Okajima,K., Buchanan,J., Tuinei,J., Homma,S., Jiang,X.C., Abel,E.D., and Goldberg,I.J. (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J. Lipid Res.* *49*, 2101-2112.
- Park,T.S., Panek,R.L., Mueller,S.B., Hanselman,J.C., Rosebury,W.S., Robertson,A.W., Kindt,E.K., Homan,R., Karathanasis,S.K., and Rekhter,M.D. (2004). Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* *110*, 3465-3471.
- Parker,K.L., Rice,D.A., Lala,D.S., Ikeda,Y., Luo,X., Wong,M., Bakke,M., Zhao,L., Frigeri,C., Hanley,N.A., Stallings,N., and Schimmer,B.P. (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog. Horm. Res.* *57*, 19-36.
- Paxinos,G. and Watson,C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier).
- Pelleymounter,M.A., Cullen,M.J., and Wellman,C.L. (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol.* *131*, 229-238.
- Perez,S.E., Chen,E.Y., and Mufson,E.J. (2003). Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *145*, 117-139.
- Perkins,M.N., Rothwell,N.J., Stock,M.J., and Stone,T.W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* *289*, 401-402.
- Petrovic,N., Walden,T.B., Shabalina,I.G., Timmons,J.A., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* *285*, 7153-7164.
- Peyron,C., Tighe,D.K., van den Pol,A.N., de,L.L., Heller,H.C., Sutcliffe,J.G., and Kilduff,T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* *18*, 9996-10015.
- Phillips,M.S., Liu,Q., Hammond,H.A., Dugan,V., Hey,P.J., Caskey,C.J., and Hess,J.F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat. Genet.* *13*, 18-19.
- Picard,A., Rouch,C., Kassis,N., Moulle,V.S., Croizier,S., Denis,R.G., Castel,J., Coant,N., Davis,K., Clegg,D.J., Benoit,S.C., Prevot,V., Bouret,S., Luquet,S., Le,S.H., Cruciani-Guglielmacci,C., and

- Magnan,C. (2014). Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents. *Mol. Metab* 3, 167-176.
- Porte,D., Jr., Baskin,D.G., and Schwartz,M.W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264-1276.
- Porteiro,B., Fondevila,M.F., Delgado,T.C., Iglesias,C., Imbernon,M., Iruzubieta,P., Crespo,J., Zabala-Letona,A., Ferno,J., Gonzalez-Teran,B., Matesanz,N., Hernandez-Cosido,L., Marcos,M., Tovar,S., Vidal,A., Sanchez-Ceinos,J., Malagon,M.M., Pombo,C., Zalvide,J., Carracedo,A., Buque,X., Dieguez,C., Sabio,G., Lopez,M., Aspichueta,P., Martinez-Chantar,M.L., and Nogueiras,R. (2017). Hepatic p63 regulates steatosis via IKKbeta/ER stress. *Nat. Commun.* 8, 15111.
- Porter,C., Chondronikola,M., and Sidossis,L.S. (2015). The Therapeutic Potential of Brown Adipocytes in Humans. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 6, 156.
- Posey,K.A., Clegg,D.J., Printz,R.L., Byun,J., Morton,G.J., Vivekanandan-Giri,A., Pennathur,S., Baskin,D.G., Heinecke,J.W., Woods,S.C., Schwartz,M.W., and Niswender,K.D. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 296, E1003-E1012.
- Purkayastha,S., Zhang,H., Zhang,G., Ahmed,Z., Wang,Y., and Cai,D. (2011). Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 2939-2944.
- Qian,S., Chen,H., Weingarh,D., Trumbauer,M.E., Novi,D.E., Guan,X., Yu,H., Shen,Z., Feng,Y., Frazier,E., Chen,A., Camacho,R.E., Shearman,L.P., Gopal-Truter,S., MacNeil,D.J., van der Ploeg,L.H., and Marsh,D.J. (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 5027-5035.
- Qiu,J., Bosch,M.A., Tobias,S.C., Krust,A., Graham,S.M., Murphy,S.J., Korach,K.S., Chambon,P., Scanlan,T.S., Ronnekleiv,O.K., and Kelly,M.J. (2006). A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J. Neurosci.* 26, 5649-5655.
- Qu,D., Ludwig,D.S., Gammeltoft,S., Piper,M., Pellemounter,M.A., Cullen,M.J., Mathes,W.F., Przypek,R., Kanarek,R., and Maratos-Flier,E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.
- Raichur,S., Wang,S.T., Chan,P.W., Li,Y., Ching,J., Chaurasia,B., Dogra,S., Ohman,M.K., Takeda,K., Sugii,S., Pewzner-Jung,Y., Futerma,A.H., and Summers,S.A. (2014). CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* 20, 687-695.
- Ramirez,S. and Claret,M. (2015). Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett.* 589, 1678-1687.
- Ramirez,S., Martins,L., Jacas,J., Carrasco,P., Pozo,M., Clotet,J., Serra,D., Hegardt,F.G., Dieguez,C., Lopez,M., and Casals,N. (2013). Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* 62, 2329-2337.
- Rhodes,D.L. and Liebeskind,J.C. (1978). Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Res.* 143, 521-532.

- Richard,D. (1986). Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am. J. Physiol* 250, R245-R249.
- Rios,M., Fan,G., Fekete,C., Kelly,J., Bates,B., Kuehn,R., Lechan,R.M., and Jaenisch,R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* 15, 1748-1757.
- Robidoux,J., Martin,T.L., and Collins,S. (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 297-323.
- Rocha,M., Grueso,E., and Puerta,M. (2001). The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *J. Endocrinol.* 171, 349-354.
- Rodriguez,A.M., Monjo,M., Roca,P., and Palou,A. (2002). Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1714-1723.
- Rodriguez-Cuenca,S., Monjo,M., Gianotti,M., Proenza,A.M., and Roca,P. (2007). Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 292, E340-E346.
- Rodriguez-Navas,C., Morselli,E., and Clegg,D.J. (2016). Sexually dimorphic brain fatty acid composition in low and high fat diet-fed mice. *Mol. Metab* 5, 680-689.
- Romero,A., Kirchner,H., Heppner,K., Pfluger,P.T., Tschop,M.H., and Nogueiras,R. (2010). GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur. J. Endocrinol.* 163, 1-8.
- Ron,D. and Walter,P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519-529.
- Ropelle,E.R., Flores,M.B., Cintra,D.E., Rocha,G.Z., Pauli,J.R., Morari,J., De Souza,C.T., Moraes,J.C., Prada,P.O., Guadagnini,D., Marin,R.M., Oliveira,A.G., Augusto,T.M., Carvalho,H.F., Velloso,L.A., Saad,M.J., and Carvalheira,J.B. (2010). IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS. Biol.* 8.
- Ruan,H.B., Dietrich,M.O., Liu,Z.W., Zimmer,M.R., Li,M.D., Singh,J.P., Zhang,K., Yin,R., Wu,J., Horvath,T.L., and Yang,X. (2014). O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat. *Cell* 159, 306-317.
- Rubin,B.S. and Barfield,R.J. (1983). Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37, 218-224.
- Rui,L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 14, 387-407.
- Rutkowski,D.T., Wu,J., Back,S.H., Callaghan,M.U., Ferris,S.P., Iqbal,J., Clark,R., Miao,H., Hassler,J.R., Fornek,J., Katze,M.G., Hussain,M.M., Song,B., Swathirajan,J., Wang,J., Yau,G.D., and Kaufman,R.J. (2008). UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev. Cell* 15, 829-840.
- Saito,M., Minokoshi,Y., and Shimazu,T. (1987). Ventromedial hypothalamic stimulation accelerates norepinephrine turnover in brown adipose tissue of rats. *Life Sci.* 41, 193-197.

Sakaguchi,T., Arase,K., and Bray,G.A. (1988). Effect of intrahypothalamic hydroxybutyrate on sympathetic firing rate. *Metabolism* 37, 732-735.

Sakaguchi,T. and Bray,G.A. (1989). Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. *Brain Res.* 492, 271-280.

Sakurai,T. (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 171-181.

Sakurai,T. (2014). The role of orexin in motivated behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 719-731.

Sakurai,T., Amemiya,A., Ishii,M., Matsuzaki,I., Chemelli,R.M., Tanaka,H., Williams,S.C., Richardson,J.A., Kozlowski,G.P., Wilson,S., Arch,J.R., Buckingham,R.E., Haynes,A.C., Carr,S.A., Annan,R.S., McNulty,D.E., Liu,W.S., Terrett,J.A., Elshourbagy,N.A., Bergsma,D.J., and Yanagisawa,M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.

Saltiel,A.R. and Kahn,C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.

Samad,F., Hester,K.D., Yang,G., Hannun,Y.A., and Bielawski,J. (2006). Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 55, 2579-2587.

Santollo,J. and Eckel,L.A. (2009). Effect of a putative ERalpha antagonist, MPP, on food intake in cycling and ovariectomized rats. *Physiol Behav.* 97, 193-198.

Sawai,H. and Hannun,Y.A. (1999). Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem. Phys. Lipids* 102, 141-147.

Schaffer,J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 281-287.

Schneeberger,M., Dietrich,M.O., Sebastian,D., Imbernon,M., Castano,C., Garcia,A., Esteban,Y., Gonzalez-Franquesa,A., Rodriguez,I.C., Bortolozzi,A., Garcia-Roves,P.M., Gomis,R., Nogueiras,R., Horvath,T.L., Zorzano,A., and Claret,M. (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172-187.

Schneeberger,M., Gomis,R., and Claret,M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* 220, T25-T46.

Schneider,J.E., Palmer,L.A., and Wade,G.N. (1986). Effects of estrous cycles and ovarian steroids on body weight and energy expenditure in Syrian hamsters. *Physiol Behav.* 38, 119-126.

Schreiber,R., Diwoky,C., Schoiswohl,G., Feiler,U., Wongsiriroj,N., Abdellatif,M., Kolb,D., Hoeks,J., Kershaw,E.E., Sedej,S., Schrauwen,P., Haemmerle,G., and Zechner,R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* 26, 753-763.

Schroder,M. and Kaufman,R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739-789.

Schulz,M. and Engelhardt,B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal. Fluid Res.* 2, 8.

- Schwartz,M.W., Peskind,E., Raskind,M., Boyko,E.J., and Porte,D., Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2, 589-593.
- Schwartz,M.W., Seeley,R.J., Woods,S.C., Weigle,D.S., Campfield,L.A., Burn,P., and Baskin,D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119-2123.
- Schwartz,M.W., Sipols,A.J., Marks,J.L., Sanacora,G., White,J.D., Scheurink,A., Kahn,S.E., Baskin,D.G., Woods,S.C., Figlewicz,D.P., and . (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608-3616.
- Schwartz,M.W., Woods,S.C., Porte,D., Jr., Seeley,R.J., and Baskin,D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Seale,P., Bjork,B., Yang,W., Kajimura,S., Chin,S., Kuang,S., Scime,A., Devarakonda,S., Conroe,H.M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Rudnicki,M.A., Beier,D.R., and Spiegelman,B.M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.
- Segal,J.P., Stallings,N.R., Lee,C.E., Zhao,L., Socci,N., Viale,A., Harris,T.M., Soares,M.B., Childs,G., Elmquist,J.K., Parker,K.L., and Friedman,J.M. (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurosci.* 25, 4181-4188.
- Shabalina,I.G., Petrovic,N., de Jong,J.M., Kalinovich,A.V., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 5, 1196-1203.
- Sharma,N.K., Das,S.K., Mondal,A.K., Hackney,O.G., Chu,W.S., Kern,P.A., Rasouli,N., Spencer,H.J., Yao-Borengasser,A., and Elbein,S.C. (2008). Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93, 4532-4541.
- Shen,J., Chen,X., Hendershot,L., and Prywes,R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99-111.
- Shimabukuro,M., Zhou,Y.T., Levi,M., and Unger,R.H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2498-2502.
- Shin,A.C., Zheng,H., and Berthoud,H.R. (2009). An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat. *Physiol Behav.* 97, 572-580.
- Shin,H., Ma,Y., Chanturiya,T., Cao,Q., Wang,Y., Kadegowda,A.K.G., Jackson,R., Rumore,D., Xue,B., Shi,H., Gavrilova,O., and Yu,L. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab* 26, 764-777.
- Shinoda,K., Lei,H., Yoshii,H., Nomura,M., Nagano,M., Shiba,H., Sasaki,H., Osawa,Y., Ninomiya,Y., Niwa,O., and . (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dyn.* 204, 22-29.
- Shughrue,P., Scrimo,P., Lane,M., Askew,R., and Merchenthaler,I. (1997a). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology* 138, 5649-5652.
- Shughrue,P.J., Komm,B., and Merchenthaler,I. (1996). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61, 678-681.

Shughrue,P.J., Lane,M.V., and Merchenthaler,I. (1997b). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp Neurol.* *388*, 507-525.

Shughrue,P.J., Scrimo,P.J., and Merchenthaler,I. (1998). Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* *139*, 5267-5270.

Silva,J.E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.* *86*, 435-464.

Simpson,K.A., Martin,N.M., and Bloom,S.R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras. Endocrinol. Metabol.* *53*, 120-128.

Skibicka,K.P., Hansson,C., Alvarez-Crespo,M., Friberg,P.A., and Dickson,S.L. (2011). Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience* *180*, 129-137.

Small,C.J., Liu,Y.L., Stanley,S.A., Connoley,I.P., Kennedy,A., Stock,M.J., and Bloom,S.R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* *27*, 530-533.

Sohn,J.W., Elmquist,J.K., and Williams,K.W. (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci.* *36*, 504-512.

Song,B., Scheuner,D., Ron,D., Pennathur,S., and Kaufman,R.J. (2008). Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest* *118*, 3378-3389.

Speakman,J.R. and O'Rahilly,S. (2012). Fat: an evolving issue. *Dis. Model. Mech.* *5*, 569-573.

Stanley,B.G., Kyrkouli,S.E., Lampert,S., and Leibowitz,S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* *7*, 1189-1192.

Stauffer,S.R., Coletta,C.J., Tedesco,R., Nishiguchi,G., Carlson,K., Sun,J., Katzenellenbogen,B.S., and Katzenellenbogen,J.A. (2000). Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J. Med. Chem.* *43*, 4934-4947.

Summers,S.A., Garza,L.A., Zhou,H., and Birnbaum,M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* *18*, 5457-5464.

Swanson,L.W. and Sawchenko,P.E. (1980). Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* *31*, 410-417.

Symons,J.D. and Abel,E.D. (2013). Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev. Endocr. Metab Disord.* *14*, 59-68.

Tan,C.P., Sano,H., Iwaasa,H., Pan,J., Sailer,A.W., Hreniuk,D.L., Feighner,S.D., Palyha,O.C., Pong,S.S., Figueroa,D.J., Austin,C.P., Jiang,M.M., Yu,H., Ito,J., Ito,M., Ito,M., Guan,X.M., MacNeil,D.J., Kanatani,A., van der Ploeg,L.H., and Howard,A.D. (2002). Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* *79*, 785-792.

Tanida,M., Yamamoto,N., Shibamoto,T., and Rahmouni,K. (2013). Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS. One.* *8*, e56660.

- Tattersall,G.J., Sinclair,B.J., Withers,P.C., Fields,P.A., Seebacher,F., Cooper,C.E., and Maloney,S.K. (2012). Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Compr. Physiol* 2, 2151-2202.
- Thammacharoen,S., Lutz,T.A., Geary,N., and Asarian,L. (2008). Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor-alpha-expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology* 149, 1609-1617.
- Thompson,R.H., Canteras,N.S., and Swanson,L.W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp Neurol.* 376, 143-173.
- Titolo,D., Cai,F., and Belsham,D.D. (2006). Coordinate regulation of neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression by estrogen depends on the ratio of estrogen receptor (ER) alpha to ERbeta in clonal hypothalamic neurons. *Mol. Endocrinol.* 20, 2080-2092.
- Tokunaga,K., Fukushima,M., Kemnitz,J.W., and Bray,G.A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am. J. Physiol* 251, R1221-R1227.
- Tran,P.V., Lee,M.B., Marin,O., Xu,B., Jones,K.R., Reichardt,L.F., Rubenstein,J.R., and Ingraham,H.A. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 441-453.
- Travers,J.B., Travers,S.P., and Norgren,R. (1987). Gustatory neural processing in the hindbrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 595-632.
- Tritos,N.A., Segal-Lieberman,G., Vezeridis,P.S., and Maratos-Flier,E. (2004). Estradiol-induced anorexia is independent of leptin and melanin-concentrating hormone. *Obes. Res.* 12, 716-724.
- Tschop,M., Smiley,D.L., and Heiman,M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.
- Tsubone,T., Masaki,T., Katsuragi,I., Tanaka,K., Kakuma,T., and Yoshimatsu,H. (2005). Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul. Pept.* 130, 97-103.
- Turinsky,J., O'Sullivan,D.M., and Bayly,B.P. (1990). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J. Biol. Chem.* 265, 16880-16885.
- Unger,R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* 53, 319-336.
- Unger,R.H. and Orci,L. (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 24 *Suppl* 4, S28-S32.
- Uno,T. and Shibata,M. (2001). Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 280, R536-R546.
- Varela,L. and Horvath,T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079-1086.
- Velickovic,K., Cvorovic,A., Srdic,B., Stokic,E., Markelic,M., Golic,I., Otasevic,V., Stancic,A., Jankovic,A., Vucetic,M., Buzadzic,B., Korac,B., and Korac,A. (2014). Expression and subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in human fetal brown adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 99, 151-159.

Vetter,M.L., Faulconbridge,L.F., Webb,V.L., and Wadden,T.A. (2010). Behavioral and pharmacologic therapies for obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 578-588.

Vidal-Puig,A. and Unger,R.H. (2010). Special issue on lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 207-208.

Villarroya,F. and Vidal-Puig,A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 17, 638-643.

Vinayavekhin,N., Sueajai,J., Chaihad,N., Panrak,R., Chokchaisiri,R., Sangvanich,P., Suksamrarn,A., and Piyachaturawat,P. (2016). Serum lipidomics analysis of ovariectomized rats under Curcuma comosa treatment. *J. Ethnopharmacol.* 192, 273-282.

Virtanen,K.A., Lidell,M.E., Orava,J., Heglind,M., Westergren,R., Niemi,T., Taittonen,M., Laine,J., Savisto,N.J., Enerback,S., and Nuutila,P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518-1525.

Virtue,S. and Vidal-Puig,A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol.* 6, e237.

Volzke,H., Schwarz,S., Baumeister,S.E., Wallaschofski,H., Schwahn,C., Grabe,H.J., Kohlmann,T., John,U., and Doren,M. (2007). Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* 56, 594-595.

von,B.C., Wiedenmann,A., and Dimroth,P. (2009). Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 649-672.

Wade,G.N. (1972). Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav.* 8, 523-534.

Wade,G.N. and Gray,J.M. (1978). Cytoplasmic 17 beta-[3H]estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology* 103, 1695-1701.

Wade,G.N. and Gray,J.M. (1979). Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav.* 22, 583-593.

Walter,P. and Ron,D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.

Wang,C.N., O'Brien,L., and Brindley,D.N. (1998). Effects of cell-permeable ceramides and tumor necrosis factor-alpha on insulin signaling and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47, 24-31.

Wang,J. and Leibowitz,K.L. (1997). Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res.* 777, 231-236.

Wang,Q.A., Tao,C., Gupta,R.K., and Scherer,P.E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 19, 1338-1344.

Wang,W. and Seale,P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 691-702.

- Waterson,M.J. and Horvath,T.L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab* 22, 962-970.
- Watson,M.L., Coghlan,M., and Hundal,H.S. (2009). Modulating serine palmitoyl transferase (SPT) expression and activity unveils a crucial role in lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle cells. *Biochem. J.* 417, 791-801.
- Weigle,D.S., Bukowski,T.R., Foster,D.C., Holderman,S., Kramer,J.M., Lasser,G., Lofton-Day,C.E., Prunkard,D.E., Raymond,C., and Kuijper,J.L. (1995). Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J. Clin. Invest* 96, 2065-2070.
- Weigt,C., Hertrampf,T., Zoth,N., Fritzeimer,K.H., and Diel,P. (2012). Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* 351, 227-238.
- Weiser,M.J., Foradori,C.D., and Handa,R.J. (2008). Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res. Rev.* 57, 309-320.
- Whittle,A.J., Carobbio,S., Martins,L., Slawik,M., Hondares,E., Vazquez,M.J., Morgan,D., Csikasz,R.I., Gallego,R., Rodriguez-Cuenca,S., Dale,M., Virtue,S., Villarroya,F., Cannon,B., Rahmouni,K., Lopez,M., and Vidal-Puig,A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149, 871-885.
- Whittle,A.J., Lopez,M., and Vidal-Puig,A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol. Med.* 17, 405-411.
- Williams,K.W. and Elmquist,J.K. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat. Neurosci.* 15, 1350-1355.
- Winkler,E. and Klingenberg,M. (1994). Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* 269, 2508-2515.
- Won,J.C., Jang,P.G., Namkoong,C., Koh,E.H., Kim,S.K., Park,J.Y., Lee,K.U., and Kim,M.S. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity. (Silver. Spring)* 17, 1861-1865.
- Woods,S.C., Lotter,E.C., McKay,L.D., and Porte,D., Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503-505.
- Wren,A.M., Seal,L.J., Cohen,M.A., Brynes,A.E., Frost,G.S., Murphy,K.G., Dhillon,W.S., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 5992.
- Wu,J., Bostrom,P., Sparks,L.M., Ye,L., Choi,J.H., Giang,A.H., Khandekar,M., Virtanen,K.A., Nuutila,P., Schaart,G., Huang,K., Tu,H., van Marken Lichtenbelt,W.D., Hoeks,J., Enerback,S., Schrauwen,P., and Spiegelman,B.M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.
- Xia,J.Y., Holland,W.L., Kusminski,C.M., Sun,K., Sharma,A.X., Pearson,M.J., Sifuentes,A.J., McDonald,J.G., Gordillo,R., and Scherer,P.E. (2015). Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* 22, 266-278.

- Xiong, Y., Page, J.C., Narayanan, N., Wang, C., Jia, Z., Yue, F., Shi, X., Jin, W., Hu, K., Deng, M., Shi, R., Shan, T., Yang, G., and Kuang, S. (2017). Peripheral Neuropathy and Hindlimb Paralysis in a Mouse Model of Adipocyte-Specific Knockout of *Lkb1*. *EBioMedicine*. *24*, 127-136.
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* *6*, 736-742.
- 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., and Clegg, D.J. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* *14*, 453-465.
- Yagyu, H., Chen, G., Yokoyama, M., Hirata, K., Augustus, A., Kako, Y., Seo, T., Hu, Y., Lutz, E.P., Merkel, M., Bensadoun, A., Homma, S., and Goldberg, I.J. (2003). Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* *111*, 419-426.
- Yamada, Y., Ando, F., Niino, N., Ohta, S., and Shimokata, H. (2002). Association of polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density of the femoral neck in elderly Japanese women. *J. Mol. Med. (Berl)* *80*, 452-460.
- Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A.J., Hannun, Y.A., and Samad, F. (2009a). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *297*, E211-E224.
- Yang, L. and Hotamisligil, G.S. (2008). Stressing the brain, fattening the body. *Cell* *135*, 20-22.
- Yang, L., Scott, K.A., Hyun, J., Tamashiro, K.L., Tray, N., Moran, T.H., and Bi, S. (2009b). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J. Neurosci.* *29*, 179-190.
- Yard, B.A., Carter, L.G., Johnson, K.A., Overton, I.M., Dorward, M., Liu, H., McMahon, S.A., Oke, M., Puech, D., Barton, G.J., Naismith, J.H., and Campopiano, D.J. (2007). The structure of serine palmitoyltransferase; gateway to sphingolipid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* *370*, 870-886.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* *5*, 1066-1070.
- Ye, R., Jung, D.Y., Jun, J.Y., Li, J., Luo, S., Ko, H.J., Kim, J.K., and Lee, A.S. (2010). Grp78 heterozygosity promotes adaptive unfolded protein response and attenuates diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* *59*, 6-16.
- Yeo, G.S. and Heisler, L.K. (2012). Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat. Neurosci.* *15*, 1343-1349.
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest* *123*, 3404-3408.
- Yonezawa, R., Wada, T., Matsumoto, N., Morita, M., Sawakawa, K., Ishii, Y., Sasahara, M., Tsuneki, H., Saito, S., and Sasaoka, T. (2012). Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *303*, E445-E456.

- Yoshida,T., Nishioka,H., Yoshioka,K., and Kondo,M. (1987). Reduced norepinephrine turnover in interscapular brown adipose tissue of obese rats after ovariectomy. *Metabolism* 36, 1-6.
- Yoshimatsu,H., Egawa,M., and Bray,G.A. (1993). Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res.* 601, 121-128.
- Zaretskaia,M.V., Zaretsky,D.V., Shekhar,A., and Dimicco,J.A. (2002). Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res.* 928, 113-125.
- Zhan,C., Zhou,J., Feng,Q., Zhang,J.E., Lin,S., Bao,J., Wu,P., and Luo,M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 33, 3624-3632.
- Zhang,Q., Yu,J., Liu,B., Lv,Z., Xia,T., Xiao,F., Chen,S., and Guo,F. (2013). Central activating transcription factor 4 (ATF4) regulates hepatic insulin resistance in mice via S6K1 signaling and the vagus nerve. *Diabetes* 62, 2230-2239.
- Zhang,X. and van den Pol,A.N. (2012). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) inhibits melanin-concentrating hormone neurons: implications for TRH-mediated anorexic and arousal actions. *J. Neurosci.* 32, 3032-3043.
- Zhang,X., Zhang,G., Zhang,H., Karin,M., Bai,H., and Cai,D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61-73.
- Zhang,Y., Kerman,I.A., Laque,A., Nguyen,P., Faouzi,M., Louis,G.W., Jones,J.C., Rhodes,C., and Munzberg,H. (2011). Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J. Neurosci.* 31, 1873-1884.
- Zhang,Y., Kilroy,G.E., Henagan,T.M., Prpic-Uhing,V., Richards,W.G., Bannon,A.W., Mynatt,R.L., and Gettys,T.W. (2005). Targeted deletion of melanocortin receptor subtypes 3 and 4, but not CART, alters nutrient partitioning and compromises behavioral and metabolic responses to leptin. *FASEB J.* 19, 1482-1491.
- Zhang,Y., Proenca,R., Maffei,M., Barone,M., Leopold,L., and Friedman,J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhang,Y.H., Lu,J., Elmquist,J.K., and Saper,C.B. (2000). Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project to the spinal cord. *J. Neurosci.* 20, 6578-6586.
- Zheng,H., Patterson,L.M., Phifer,C.B., and Berthoud,H.R. (2005). Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 289, R247-R258.
- Zhou,Y.P. and Grill,V. (1995). Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80, 1584-1590.
- Zhou,Y.P. and Grill,V.E. (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J. Clin. Invest* 93, 870-876.

Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1784-1789.

Ziauddeen, H., Alonso-Alonso, M., Hill, J.O., Kelley, M., and Khan, N.A. (2015). Obesity and the neurocognitive basis of food reward and the control of intake. *Adv. Nutr.* 6, 474-486.

Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J.* 23, 3113-3120.

