ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Óscar
Freire Agulleiro

Tese de doutoramento

Regulación hipotalámica del balance energético. Papel de AMPKalfa2 y AMPKgamma2

Santiago de Compostela, 2024

Programa de Doutoramento en Endocrinoloxía

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESE DE DOUTORAMENTO

REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL BALANCE ENERGÉTICO. PAPEL DE AMPKALFA2 Y AMPKGAMMA2.

Autor
Óscar Freire Agulleiro

Director: D. Miguel Antonio López Pérez y D. Carlos Diéguez González
Titor/a: D. Miguel Antonio López Pérez

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOXÍA
SANTIAGO DE COMPOSTEL

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

DECLARACIÓN DE CONFLITO DE INTERESE

REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DEL BALANCE ENERGÉTICO. PAPEL DE AMPKALFA2 Y AMPKGAMMA2

D./Dña. Óscar Freire Agulleiro

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

A 17 de Febrero de 2024 en Santiago de Compostela,

Resumo:

AMPK trátase do principal sensor enerxético das células eucariotas, encargándose da monitorización do estado enerxético celular e gobernándoo. A nivel central, tamén demostrou ser un sensor enerxético global, tendo un papel clave a nivel hipotalámico na regulación do balance enerxético. Durante situacións fisiolóxicas como unha exposición a frío, a activación da maquinaria termoxénica é clave para a supervivencia. Nesta Tese, demostrouse como a subunidade AMPKα1 no VMH é clave durante a aclimatación dos ratos a 4ºC. Evidencias recentes, tamén apuntan a AMPKα1 nas neuronas SF1 do VMH como un importante regulador da termoxénese no BAT, sendo a súa inhibición ou eliminación capaz de reverter a obesidade inducida por dieta ou xenética. Porén, o papel doutras subunidades de AMPK nas neuronas SF1 aínda non se descubriu. Nesta Tese estudamos de forma paralela o resultado metabólico da eliminación de AMPKα2 y AMPKγ2 en neuronas SF1. O modelo SF1-Cre AMPKα2 non presenta alteracións metabólicas en condicións de dieta estándar, pero si un aumento da masa corporal e adiposidade en condiciones de HFD, mostrando un fenotipo oposto ao resultado da eliminación de AMPKα1 nas mesmas neuronas. A eliminación de AMPKγ2 nas neuronas SF1 provoca un aumento da masa corporal e adiposidade en ambos sexos en condicións estándar, pero só en machos en condicións de HFD. Estes datos amosan un papel clave de AMPK e as súas diferentes subunidades nas neuronas SF1 no control do balance enerxético. Palabras chave: AMPK, VMH, SF1, BAT, balance enerxético.

Resumen:

AMPK constituye el principal sensor energético de las células eucariotas, encargándose de la monitorización del estado energético celular y gobernándolo. A nivel central, también ha demostrado ser un sensor energético global, teniendo un papel clave a nivel hipotalámico en la regulación del balance energético. Durante situaciones fisiológicas como una exposición a frío, la activación de la maquinaria termogénica es clave para la supervivencia. En esta Tesis se demuestra como la subunidad AMPKα1 en el VMH es clave durante la aclimatación de los ratones a 4ºC. Evidencias recientes, también apuntan a AMPKα1 en las neuronas SF1 del VMH como un importante regulador de la termogénesis en el BAT, siendo su inhibición o deleción capaz de revertir la obesidad inducida por dieta o genética. Sin embargo, el papel de otras subunidades de AMPK en las neuronas SF1 todavía no se ha descrito. En esta Tesis hemos estudiado paralelamente el resultado metabólico de la eliminación de AMPKα2 y AMPKγ2 en neuronas SF1. El modelo SF1-Cre AMPKα2 no presenta alteraciones metabólicas en condiciones de dieta estándar, pero si un aumento de la masa corporal y adiposidad en condiciones de HFD, mostrando un fenotipo opuesto al resultado de la eliminación de AMPKα1 en las mismas neuronas. La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1 provoca un aumento de la masa corporal y adiposidad en ambos sexos en condiciones estándar, pero solo en machos en condiciones de HFD. Estos datos demuestran el papel clave de AMPK y sus diferentes subunidades en las neuronas SF1 en el control del balance energético. Palabras clave: AMPK, VMH, SF1, BAT, balance energético.

Abstract:

AMPK it’s the main cellular energy sensor, sensing the cellular energy state and ruling it. It has been also shown, how central AMPK acts as a global energy sensor, having a major role in the regulation of energy balance at the hypothalamic level. During physiological challenges, such as cold exposure, the activation of the thermogenic machinery it’s key to survive. In this Thesis we showed a relevant role for AMPKα1 in the VMH of rodents during cold exposure. Recent evidence also highlights AMPKα1 in SF1 neurons as an important regulator of BAT

USC DE COMPOSTELA

thermogenesis, as either its elimination or inhibition it's able to revert diet induced or genetic obesity. However, the role of other AMPK subunits in SF1 neurons, has not been studied yet. In this Thesis we studied the metabolic relevance from the elimination of AMPKα2 and AMPKγ2 in SF1 neurons. SF1-Cre AMPKα2 mice didn't show any metabolic disturbances under standard conditions but showed increased body weight gain and adiposity under HFD conditions, displaying the opposite phenotype from the elimination of AMPKα1 in the same neurons. Deletion of AMPKγ2 in SF1 neurons, displayed higher body weight gain as well as adiposity in both sexes, under standard conditions, but only in male in HFD conditions. These data show, a key role of AMPK and its different subunits in SF1 neurons ruling energy balance.
Key words: AMPK, VMH, SF1, BAT, energy balance.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3V: tercer ventrículo (*third ventricle*)

AC: adenilato ciclasa (*adenylate cyclase*)

ADP: adenosín difosfato

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

AMP: adenosín monofosfato

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

AP: área postrema (*area postrema*)

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

ASP: adipsina/proteína estimulante de la acilación (*acylation-stimulating protein*)

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

ATP: adenosín trifosfato

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

BBB: barrera hematoencefálica (*blood brain barrier*)

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

BNST: núcleo del lecho de la estría terminal (*bed nucleus of the stria terminalis)*

CaMKK2: proteína quinasa quinasa dependiente de calcio/calmodulina (*calcium/calmodulin* dependent protein kinase kinase 2)

cAMP: adenosín monofosfato cíclico (*cyclic adenosin monophosphate*)

CART: transcrito relacionado con la cocaína y anfetamina (*cocaine and anphetamine- regulated trasncript*)

CBM: dominio de unión a carbohidratos (*carbohydrate binding domain*)

CBS: dominio de sintasa-β de cistationina (*cystathionine*-β-*synthase*)

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

CKK: colecistoquinina (*cholecystokinin*)

CNO: N-óxido de clozapina (*clozapine N-oxide*)

CNS: sistema nervioso central (*central nervous system*)

CPT1a: carnitina palmitoiltransferasa 1a (*carnitine palmytoiltransferase 1a)*

CPT1c: carnitina palmitoiltransferasa 1c (*carnitine palmytoiltransferase 1c*)

DREADD: receptores de diseño exclusivamente activados por fármacos de diseño (*designer receptors exclusively activated by designer drugs*)

DMH: núcleo dorsomedial (*dorsomedial nucleus of the hypothalamus*)

DMV: núcleo motor dorsal del nervio vago (*dorsal motor nucleus of the vagus*)

ER: retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

ERα: receptor de estrógenos alfa (*estrogen receptor alpha*).

FADH2: flavín adenín dinucleótido

FBP: fructosa 1,6-bisfosfato (*fructose 1,6-bisphosphate*)

FFAs: ácidos grasos libres (*free fatty acids*)

FOXO1: forkhead box protein O1

GFAP: proteína gliofibrilar acídica (*glial fibrillary acidic protein*)

GDB: dominio de unión a glucógeno (*glycogen biding domain*)

GIP: péptido inhibidor gástrico o polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa *(gastric inhibitory polypeptide/glucose-dependent insulinotropic polipeptyde*)

GLP-1: péptido 1 análogo al glucagón (*glucagon-like peptide-1*)

GLP-1R: receptor del péptido análogo al glucagón (*glucagon-like peptide receptor*)

GHS-R: receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (*growth hormone secretagoge-recptor*)

GLUT: transportador de glucosa (*glucose transporter*)

GOAT: ghrelina O-acil-transferasa (*ghrelin O-acyl-transferase*)

GRP78/BiP: chaperona 78 regulada por glucosa/proteína de unión a inmunoglobulina (*glucose-regulated protein 78/binding inmunoglobulin protein*)

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

gWAT: tejido adiposo gonadal (*gonadal white adipose tissue*)

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

HMGR: HMG-CoA reductasa (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase/HMG-CoA reductase*).

HSL: lipasa sensible a hormonas (*hormone sensitive lipase*)

IL-6: interleuquina 6 (*interleukin 6*)

IML: núcleo internomediolateral (*internomediolateral nucleus*)

IO: oliva inferior (*inferior olive*)

IR: receptor de insulina (*insulin receptor*)

ITT: test de sensibilidad a la insulina (*insuline tolerance test*).

LKB1: quinasa hepática B1 (*liver kinase B1*)

LC: locus cerúleo

LHA: área hipotalámica lateral (*lateral hypothalamic area*)

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

LepR: receptor de leptina (*leptin receptor*)

MBH: hipotálamo mediobasal (*mediobasal hypothalamus*)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

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

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

ME: eminencia media (*median eminence*)

MFF: factor de fisión mitocondrial (*mitochondrial fision factor*)

MGL: monoacilglicerol lipasa (*monoacylglycerol lipase*)

MO25: proteína de ratón 25 (*mouse protein 25*)

MSH: hormona estimuladora de los melanocitos (*melanocyte-stimulating hormone*)

mTOR: quinasa diana de rapamicina en células de mamíferos (*mechanistic target of rapamicyn*)

NAc: núcleo accumbens (*accumbens nucleus*)

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NE: norepinefrina (*norepinephrine*)

NEFA: ácidos grasos libres no-esterificados (*nonesterified free fatty acids*)

NOS1: óxido nítrico sintasa 1 (*nitric oxide synthase*)

NPY: neuropéptido Y (*neuropeptide Y*)

NST: termogénesis no inducida por temblor (*non-shivering thermogenesis*)

NTS: núcleo del tracto solitario (*nucleus tractus solitarii*)

OXM: oxintomodulina (*oxintomodulin*)

P38 MAPK: quinasa activada por mitógeno p38 (*p38 mitogen-activated protein kinase*)

PAI-I: inhibidor del activador del plasminógeno I (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*)

PBN: núcleo parabraquial (*parabrachial nucleus*)

PGC1α: coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PFA: área perifornical (*perifornical area*)

PGA: sustancia gris central (*periaqueductal grey*)

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa (*phosphoinositide 3-kinase*)

PKA: proteína quinasa A (*protein kinase A*)

PP2Cα: proteína fosfatasa 2Cα (*protein phosphatase 2Cα*)

POA: área preóptica (*preoptic area*)

POMC: proopiomelanocortina (*pro-opiomelacortin*)

PPARγ: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)

PRDM16: dominio PR que contiene 16 (*PR domain containing 16*)

PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1 B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*)

PTT: test de tolerancia al piruvato (*piruvate tolerance test*).

PVH: núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus of the hypothalamus*)

PYY3-36: péptido YY (*peptide YY*)

RPa: rafe pálido (*raphe pallidus*)

RTN: núcleo retrotrapezoide (*retrotrapezoid nucleus*)

RVLM: parte rostral de la médula ventrolateral (*rostral ventrolateral medulla*)

SCN: núcleo supraquiasmático (*suprachiasmatic nucleus*)

scWAT: grasa subcutánea (*subcutaneous white adipose tissue*)

SF1: factor esteroidogénico 1 (*steroidogenic factor 1*)

SNS: sistema nervioso simpático (*simpathetic nervous system*)

ST: termogénesis inducida por temblor (*shivering thermogenesis*)

STD: dieta estándar (*standart diet*)

STRAD: proteína alfa relacionada con el adaptador quinasa STE20 (*STE20-related kinase adapter protein alpha*)

TAK1: quinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor-β-kinase*)

TGA: triacilglicéridos (*triacylglicerides*)

TFG-β: factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor β*)

TNFα: factor de necrósis tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

UCP1: proteína desacoplante 1 (*uncoupling protein 1*)

VGLUT2: transportador vesicular de glutamato 2 (*vesicular glutamate transporter 2*)

VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo (*ventromedial nucleus of the hypothalamus*)

VTA: área tegmental ventral (*ventral tegmental area*)

vWAT: tejido adiposo blanco visceral (*visceral white adipose tissue*)

ANGLICISMOS

Browning: pardeamiento.

Knock-out: modificación genética en la que se produce el silenciamiento o eliminación de un gen.

Wildtype: animales control con modificaciones genéticas que no afectan al fenotipo.

Downstream: más abajo, en términos de vías de señalización molecular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 16
1.1 OBESIDAD 16
1.2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 16
1.2.1 Señales gastrointestinales 18
1.2.1.1 Péptidos gastrointestinales: un mundo de agonistas 20
1.2.1.2 Ghrelina 22
1.2.2 Señales pancreáticas 23
1.2.2 Señales del tejido adiposo 24
1.3 GASTO ENERGÉTICO, TERMOGÉNESIS Y TEJIDO ADIPOSO PARDO 25
1.4 HIPOTÁLAMO Y HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 30
1.4.1 Núcleo arcuato 32
1.4.1.1 Neuronas AgRP/NPY 33
1.4.1.2 Neuronas POMC/CART 34
1.4.2 Núcleo ventromedial 36
1.4.2.1 VMH y regulación de la termogénesis en el BAT 38
1.4.3 Núcleo Dorsomedial 40
1.4.4 Núcleo Paraventricular 40
1.4.5 Área hipotalámica lateral 42
1.5 NEURONAS SF1 Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA 43
1.5.1 Naturaleza de las neuronas SF1 ante estímulos farmacogenéticos y optogenéticos. 45
1.5.1.1 Implicaciones en el metabolismo de la glucosa 46
1.5.2 Animales genéticamente modificados en neuronas SF1 46
1.5.2.1 Receptores de hormonas y otras moléculas señalizadoras 46
1.5.2.2 Neurotransmisores y receptores 48
1.5.2.3 SIRT1 y AMPK 48
1.6 AMPK SENSOR ENERGÉTICO GLOBAL 49
1.6.1 Estructura y regulación de AMPK 50
1.6.2 Metabolismo celular 51
1.6.2.1 Regulación de rutas catabólicas 52
1.6.2.2 Regulación de rutas anabólicas 52
1.6.3 AMPK en el hipotálamo 53
1.6.3.1 AMPK y homeostasis de la glucosa 54

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.3.2 AMPK hipotalámica, gasto energético y termogénesis *55*
2. HIPÓTESIS **58**
3. OBJETIVOS **60**
4. MATERIALES Y MÉTODOS **62**
4.1 MODELOS ANIMALES **62**
4.1.1 Consideraciones éticas y aspecto legislativo **62**
4.1.2 Modelos animales empleados **62**
4.2 ANESTESIA Y ANALGESIA **63**
4.3 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS **64**
4.3.1 Vía subcutánea (SC) **64**
4.3.2 Vía intraperitoneal (IP) **64**
4.3.3 Vía núcleo-específica **64**
4.4 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS **65**
4.4.1 Generación de ratones knock-out condiciones SF1 para AMPKα2 y AMPKγ2. ..... **65**
4.4.2 Monitorización de la ingesta y la masa corporal **65**
4.4.3 Medición de la temperatura corporal **66**
4.4.4 Medición de la temperatura del BAT y base de la cola **66**
4.4.5 Modificaciones de la temperatura ambiental de los animales **66**
4.4.5.1 Exposición a frío *66*
4.4.5.2 Termoneutralidad *66*
4.4.5.3 Test de disipación de temperatura *66*
4.4.6 Determinación de la composición corporal **67**
4.4.7 Ensayos relacionados con el metabolismo de la glucosa **67**
4.4.7.1 GTT, ITT y PTT *67*
4.4.7.2 Test de tolerancia a la glucosa postprandial *67*
4.4.7.3 Restricción calórica *68*
4.4.7.4 Test de hormonas hiperglucemiantes *68*
4.4.8 Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora. **68**
4.5 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS **68**
4.5.1 Estereotaxia núcleo específica **68**
4.5.2 Implantación de registradores de temperatura subcutáneos **69**
4.5.3 Perfusión intracardiaca **70**
4.5.4 Disección y extracción de tejidos **70**
4.6 DISEÑOS EXPERIMENTALES **70**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.6.1 Exposición a 4ºC con diferentes tiempos y termoneutralidad 70
4.6.2 Inoculación de adenovirus AMPKα1-CA en ratas y exposición a 4ºC 71
4.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS 72
4.7.1 Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real (RT-qPCR) 72
4.7.1.1 Extracción de ARN 72
4.7.1.2 Cuantificación de ARNm 73
4.7.1.3 Retrotranscripción (RT) 73
4.7.1.4 PCR en tiempo real 73
4.7.2 Análisis de proteína por western blot 75
4.7.2.1 Extracción de proteína 75
4.7.2.2 Cuantificación de proteína 76
4.7.2.3 Preparación de los geles 77
4.7.2.4 Preparación de las muestras para la electroforesis 78
4.7.2.5 Electroforesis 78
4.7.2.6 Transferencia 79
4.7.2.7 Inmunodetección 79
4.7.2.8 Revelado 81
4.7.2.9 Cuantificación de las proteínas 81
4.7.3 Inmunohistoquímica 81
4.7.4 Histología tinción hematoxilina-eosina 82
4.7.5 Inmunofluorescencia 82
4.7.5.1 Inmunofluorescencia directa 83
4.7.5.2 Adquisición de imágenes por microscopía confocal 83
4.7.5.3 Adquisición de imágenes con microscopia de fluorescencia 84
4.7.6 Hibridación in situ (Tecnología BaseScope v2 RED Assay) 84
4.7.7 PCR genotipado 84
4.7.7.1 Extracción de ADN 85
4.7.7.2 Amplificación por PCR 85
4.7.7.3 Electroforesis en geles de agarosa 89
4.7.8 Estadística 89
4.7.8.1 T-test 90
4.7.8.2 ANOVA de una vía 90
4.7.8.3 ANOVA de medidas repetidas 90
5. RESULTADOS 92
5.1 AMPK se inhibe en el hipotálamo tras una exposición a frío y la consecuente activación de la termogénesis y *browning* del WAT 92

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 La sobreexpresión de una isoforma constitutivamente activa de AMPKα1 en el VMH dificulta la aclimatación a frío de los animales 96

5.3 Caracterización de la eliminación de AMPKα2 en las neuronas SF1 del VMH. 98

5.4 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta a la masa corporal ni a la termogénesis en ambos sexos. 101

5.5 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora. 104

5.6 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al metabolismo de la glucosa 105

5.7 Los ratones deficientes en AMPKα2 en las neuronas SF1 no muestran cambios en la termorregulación ante diferentes estímulos térmicos 109

5.8 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 da lugar a un aumento de la masa corporal en condiciones de HFD en machos 112

5.9 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1, no afecta al gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora en condiciones de HFD. 115

5.10 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al metabolismo de la glucosa en condiciones de HFD 116

5.11 Validación de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 116

5.12 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1 activa la ruta de AMPK en el VMH 119

5.13 La eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 provoca un aumento de masa sin cambios en la termogénesis. 119

5.14 Los ratones macho deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 presentan una disminución del gasto energético 122

5.15 La eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 no afecta al manejo de la glucemia. 124

5.16 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1 no afecta a la termorregulación ante la exposición a diferentes estímulos térmicos. 125

5.17 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1, provoca un aumento de masa corporal en los machos en condiciones de HFD. 129

5.18 Los animales deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 no muestra cambios en el control glucémico en condiciones de HFD. 132

5.19 Los animales deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 no muestran cambios en el gasto energético y la actividad locomotora en condiciones de HFD 133

6. DISCUSIÓN 135

7. CONCLUSIONS 142

8. BIBLIOGRAFÍA 144

9. ANEXOS 189

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

La obesidad y el sobrepeso se definen por la Organización Mundial para la Salud (OMS) como un acúmulo anormal o excesivo de grasa que presenta un riesgo para la salud. El parámetro más utilizado para definir la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC) (WHO, 2023). Un IMC de 25 o superior se considera sobrepeso, mientras que un IMC de 30 o superior se considera obesidad. El IMC es un índice sencillo que relaciona la masa corporal y la altura de los individuos, calculándose mediante la división entre el peso de la persona en kilogramos y el cuadrado de su talla en metros ($IMC=kg/m^2$). El IMC resulta muy útil al ser un parámetro utilizado universalmente para los individuos independientemente de su edad y/o sexo. Sin embargo, debería sólo utilizarse como guía ya que podría no corresponder al mismo nivel de acúmulo graso en distintos individuos. El sobrepeso y la obesidad suponen un problema al ser un factor de riesgo para numerosas enfermedades crónicas como pueden ser: diabetes, enfermedades cardiovasculares e infarto, osteoartritis y varios tipos de cáncer (endometrio, mama, ovario, próstata, hígado, etc.) (Abdullah et al., 2011; Delpino et al., 2023; Guh et al., 2009; Pi-Sunyer, 2009; Seidell & Halberstadt, 2015; World Health Organization, 2020).

A nivel global la prevalencia de la obesidad se ha visto triplicada entre los años 1975 y 2016 (Bentham et al., 2017). En 2016, más de 1,9 billones de adultos (con 18 años o más), tenían sobrepeso, de los cuáles más de 650 millones eran obesos. Lo que supone que un 39% de los hombres y un 40% de las mujeres con 18 años o más tenían sobrepeso y entre ellos aproximadamente un 13% de la población global padecían obesidad (11% de hombres y 15% de mujeres). Actualmente la obesidad y el sobrepeso suponen más muertes anualmente que la malnutrición. En los niños la situación es todavía más alarmante, ya que su prevalencia se ha multiplicado más de 4 veces de 1975 a 2016, pasando de un 4% a un 16%. En 2020, un total de 39 millones de niños por debajo de 5 años padecían obesidad o sobrepeso.

En España los datos no son mejores, ya que en 2020 un 16% de la población con 18 años o más (15,5% de mujeres y un 16,5% de hombres), padecían también obesidad (Ministerio de Sanidad, 2020). En niños entre 2 y 17 años, el porcentaje de obesidad asciende a un 10,3% en ambos sexos (Ministerio de Sanidad, 2017). Y en concreto en nuestra comunidad autónoma, Galicia, el porcentaje también se encuentra algo elevado respecto a la media nacional, con un 16,5% de población adulta con obesidad.

La causa fundamental de la obesidad es un desequilibrio energético donde las calorías consumidas son superiores a las gastadas. Globalmente se ha producido un incremento en la ingesta de alimentos hipercalóricos (ricos en grasa y azúcares) y a un aumento de la inactividad física, debido a que socialmente somos cada vez más sedentarios por los cambios en las formas de trabajo, medios de transporte y el aumento de la urbanización. Aunque sabemos que la obesidad y el sobrepeso se pueden prevenir y revertir, ningún país ha logrado revertir el crecimiento de esta pandemia.

Las intervenciones recomendadas y más relevantes van a ser tanto en el ámbito nutricional como en el de la actividad física. Sin embargo, la búsqueda de tratamientos para frenar la obesidad o sus patologías asociadas es fundamental y para ello, conocer los mecanismos que regulan la ingesta, el balance energético y el metabolismo, pueden proporcionarnos nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la obesidad.

1.2 Homeostasis energética

Atendiendo a la primera ley de la termodinámica, la energía ni se crea ni se destruye. Este principio de conservación de la energía hace que en los organismos vivos deba existir un

equilibrio o un balance energético para asegurar la homeostasis de los individuos. En el balance energético vamos a distinguir por un lado el aporte de energía (ingesta) y el consumo de energía (gasto energético). El aporte energético está constituido por las calorías ingeridas provenientes de alimentos y bebidas en forma de carbohidratos, lípidos y proteínas; mientras que, el gasto energético podríamos dividirlo de forma simplificada en: metabolismo basal, actividad física y termogénesis adaptativa (López et al., 2016; O. Hill et al., 2012).

Siempre que el balance energético se mantenga y el aporte energético sea igual al gasto energético, un individuo mantendrá su masa corporal. Sin embargo, el balance energético de un individuo puede verse afectado por diversos factores genéticos, hormonales y nutricionales, así como variables ambientales y factores psicosociales (Friedman, 2009; Kopelman, 2000). Cuando el gasto energético es superior a la ingesta entramos en un estado de balance energético negativo que puede dar lugar a delgadez o en casos extremos caquexia. En el caso opuesto, la obesidad, por ejemplo, consiste en un desequilibrio positivo en el balance energético en el que el aporte energético es superior al gasto energético, y el exceso de energía es acumulado en forma de grasa en el organismo (Figura 1).

El mantenimiento de este equilibrio energético es fundamental para los seres vivos y por tanto existen diferentes mecanismos neuroendocrinos que permiten un control delicado de ambos componentes de esta balanza. El principal encargado de esta regulación es el sistema nervioso central (CNS, *central nervous system*), que va a recibir diferentes señales periféricas como hormonas, nutrientes y aferencias nerviosas, integrar esta información y proporcionar una respuesta acorde para mantener la homeostasis energética del individuo. Dentro del CNS podemos destacar distintas partes implicadas en esta regulación, como pueden ser: áreas olfativas, la corteza cerebral, el tronco del encéfalo y el rombencéfalo (Garrison & Knight, 2017; Julliard et al., 2017; Nectow et al., 2017; Rossi & Stuber, 2018; Schneeberger et al., 2014, 2019; Waterson & Horvath, 2015). Sin embargo, dentro del CNS el hipotálamo destaca como uno de los centros reguladores más importantes del balance energético. El hipotálamo integra todas estas señales periféricas (de las que hablaremos a continuación) generando una respuesta capaz de regular la ingesta, el gasto energético, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico (Coll et al., 2007; Morton et al., 2006; Myers & Olson, 2012; Rossi & Stuber, 2018; Schwartz et al., 2000; Seoane-Collazo et al., 2015; Yeo & Heisler, 2012).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

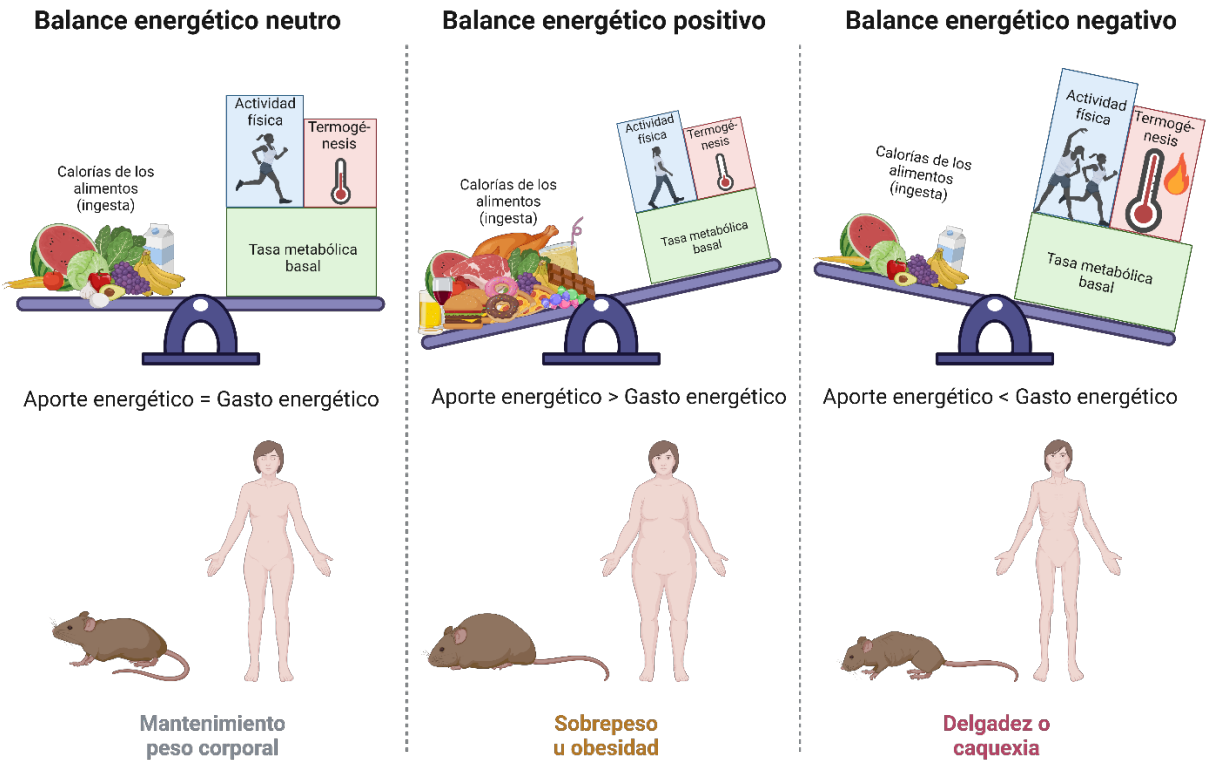


Figura 1. Representación de los diferentes componentes del balance energético y sus posibles variaciones. Figura creada con biorrender.com

1.2.1 Señales gastrointestinales

Para una correcta regulación de la ingesta y por tanto del balance energético, el número de comidas, así como su frecuencia y duración deben estar estrechamente reguladas. El inicio de las comidas depende tanto de factores externos e internos, como: factores emocionales, la disponibilidad y palatabilidad de la comida, el momento del día, etc., sin embargo, la terminación de la comida es un proceso con un mayor control biológico. El principal determinante del tamaño de las comidas es el comienzo de la saciedad, un estado biológico inducido por estímulos neuro-humorales generados durante la ingesta y que conllevan a su finalización (Schwartz et al., 2000).

La saciedad se consigue mediante diferentes señales producidas en diferentes partes del tracto gastrointestinal, incluyendo: estómago, intestino delgado proximal, intestino delgado distal, colón y páncreas. Esta puede ocurrir mediante estímulos mecánicos (distensión y contracción del tubo digestivo), estímulos químicos (nutrientes liberados durante la digestión) y estímulos neuro-humorales (como las hormonas gastrointestinales y otros neurotransmisores) (Ahima & Antwi, 2008; Cummings & Overduin, 2007; Strader & Woods, 2005). Esta información se transmite al CNS a través de las aferencias nerviosas que recibe el sistema digestivo provenientes del sistema nervioso autónomo: aferencias parasimpáticas, a través de los nervios vago y pélvicos y aferencias simpáticas a través de los nervios esplácnicos. La mayoría de las aferencias vagales se transmiten al núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus tractus solitarii*), mientras que las señales hormonales llegan al cerebro a través del área postrema (AP, *Area Postrema*), un órgano circunventricular con capilares que carecen de barrera hematoencefálica (BBB, *Blood Brain Barrier*), siendo por tanto permeable a señales periféricas y que está situado en el techo del cuarto ventrículo, justo encima del NTS. La

información del NTS se transfiere posteriormente a otros centros neurales superiores situados en el hipotálamo como: el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus of the hypothalamus*) o el núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*). La integración de toda esta información aferente en relación con la presencia de comida en el aparato digestivo va a determinar el tamaño de las comidas y la aparición de la saciedad (López et al., 2007).

El tracto gastrointestinal podría considerarse como uno de los órganos endocrinos más grandes del organismo, al liberar una gran cantidad de hormonas peptídicas que a su vez actúan sobre otras glándulas exocrinas, músculo y el sistema nervioso. La mayor parte de señales hormonales producidas en el tracto gastrointestinal son señales anorexigénicas, que van a reducir el apetito o la ingesta. Entre ellas destacan la colecistoquinina (CKK, *cholecystokinin*) liberada por las células I en el yeyuno y duodeno; el primer péptido entérico definido como una señal de saciedad, con receptores tanto en el intestino como en el cerebro, que participa además en la digestión al actuar sobre el páncreas exógeno, provocando la liberación de enzimas al intestino. Ratas que carecen del receptor de colecistoquinina 1 (CKK1), son obesas e hiperfágicas (Bi & Moran, 2002). El péptido polipancreático (PP, *pancreatic polypeptide*) es liberado por el páncreas endocrino después de las comidas y reduce el apetito, probablemente al retrasar el vaciado gástrico. De forma similar, el péptido YY_{3-36} (PYY_{3-36}, *peptide YY*), relacionado con la familia del PP, es un péptido de 36 aminoácidos secretado por las células L de la parte distal del intestino que parece reducir la ingesta en roedores, primates y humanos también al retrasar el vaciado gástrico (Murphy & Bloom, 2006). Por último, otros péptidos gastrointestinales que parecen reducir la ingesta son la amilina, bombesina, oxintomodulina y la apolipoproteína A-IV (AP-IV, *apolipoprotein A-IV*) (Figura 2) (López et al., 2007; Murphy & Bloom, 2006; Strader & Woods, 2005).

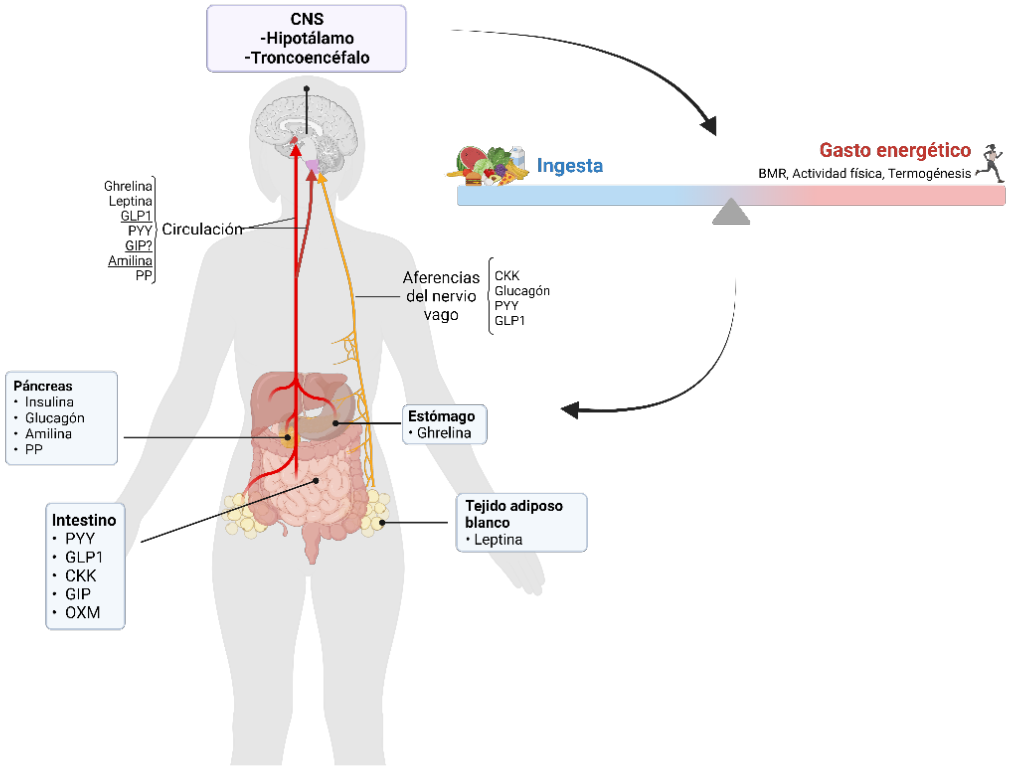


Figura 2. Principales señales gastrointestinales, pancreáticas y del tejido adiposo y su señalización a nivel central para la regulación del balance energético. Figura creada con biorrender.com

1.2.1.1 Péptidos gastrointestinales: un mundo de agonistas

Existen otros péptidos entéricos igualmente anorexigénicos que merecen una mención especial debido a su implicación actual en el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo II. El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) (Figura 2) es sintetizado y secretado por las células L del intestino a partir del proglucagón, cuya expresión también ocurre en las células α del páncreas y en neuronas del tronco encéfalo e hipotálamo. GLP-1 actúa sobre su receptor GLP-1R (GLP-1R, *glucagon-like peptide 1 receptor*) a nivel pancreático, favoreciendo la expresión y liberación de insulina (efecto incretina) e inhibiendo la secreción del glucagón, así como favoreciendo la proliferación de las células β (Drucker et al., 1987). A nivel central, GLP-1 o su agonismo, también es capaz de disminuir la masa corporal a través de la reducción de la ingesta (Sisley et al., 2014) y el aumento del gasto energético (Beiroa et al., 2014). Debido a su fuerte efecto insulinotrópico, diferentes agonistas del receptor de GLP-1, con una vida media más elevada que el péptido endógeno, se han ido desarrollando y aprobando en clínica para el tratamiento de la diabetes tipo II, entre ellos se encuentran: exenatida, lisixenatida, liraglutida, dulaglutida, albiglutida y semaglutide (Brandt et al., 2018).

Otro péptido entérico interesante es el péptido inhibidor gástrico o el polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa GIP (GIP, *gastric inhibitory polypetide/glucosa-dependent insulinotropic polipeptyde*) (Figura 2). Un péptido de 42 aminoácidos secretado por las células enteroendocrinas K del intestino delgado proximal en respuesta a la presencia de lípidos en la dieta (Takeda et al., 1987). Igual que GLP-1, GIP favorece la secreción de insulina en situaciones de hiperglucemia y a mayores posee también un efecto protector sobre las células β-pancreáticas, favoreciendo su proliferación, diferenciación y supervivencia en modelos murinos de diabetes. Su receptor, nuevamente también se expresa en el hipotálamo y en el tejido adiposo (Usdin et al., 1993). Al igual que para GLP-1 análogos de GIP con mayor vida media se están actualmente desarrollando y testando en varios modelos animales (Müller et al., 2018).

Es en 2009 cuando DiMarchi, Tschöp y colaboradores desarrollan el primer agonista dual, un único péptido con las propiedades anoréticas del GLP-1 y las capacidades lipolíticas y termogénicas del glucagón (Day et al., 2009). En primera instancia, parece un planteamiento paradójico debido a las propiedades opuestas de disminución y aumento de la glucemia en sangre del GLP-1 y el glucagón, respectivamente. La principal función del glucagón es aumentar los niveles de glucosa en sangre, a través de la estimulación de la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis (Jiang & Zhang, 2003). Sin embargo, a pesar de esta visión glucocéntrica de esta hormona, el glucagón posee otros efectos fisiológicos interesantes para el manejo de la homeostasis energética y el control de la masa corporal. A nivel central, el glucagón es capaz de disminuir la ingesta (Quiñones et al., 2015), aumentar el gasto energético al incrementar la termogénesis en el tejido adiposo pardo (Billington et al., 1991; Kuroshima & Yahata), inhibir la motilidad gástrica (Mochiki et al., 1998), disminuir la acumulación de grasa al inhibir la lipogénesis y favorecer la lipólisis (Amatuzio et al., 1962), así como, mejorar la función cardíaca (Glick et al., 1968). A mayores, al combinarse con GLP-1 las propiedades insulinotrópicas de este contrarrestarían la capacidad hiperglucemiante del glucagón. Tras una serie de modificaciones estructurales, la molécula resultante presentaba un agonismo equilibrado sobre ambos receptores y con una buena solubilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas. La administración semanal de este co-agonista en ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa, tras 4 semanas de tratamiento, logró normalizar su masa corporal, mejorar su tolerancia a la glucosa, metabolismo lipídico y la esteatosis hepática (Figura 3). Los animales perdieron masa debido a un aumento del gasto energético y una reducción de la ingesta, que se acompañó de menores niveles grasos. Este agonista dual también funcionó en animales *knock-out* para el GLP-1R, indicando que parte de los efectos beneficiosos se debían también al

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

glucagón (Day et al., 2009). De forma paralela, otro grupo de investigadores desarrolló un agonista dual de GLP-1 y oxintomodulina, ya que esta última, que también se libera a través de las células K, presenta afinidad por los receptores del glucagón y GLP-1 solo que con una afinidad inferior. Este agonista también consiguió disminuir la masa de ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa, mejor control glucémico y mejor perfil lipídico de estos animales (Pocai et al., 2009). Actualmente, estos y otros agonistas duales de GLP-1 y glucagón, al igual que los agonistas del receptor de GLP-1, están siendo evaluados en ensayos clínicos (Brandt et al., 2018).

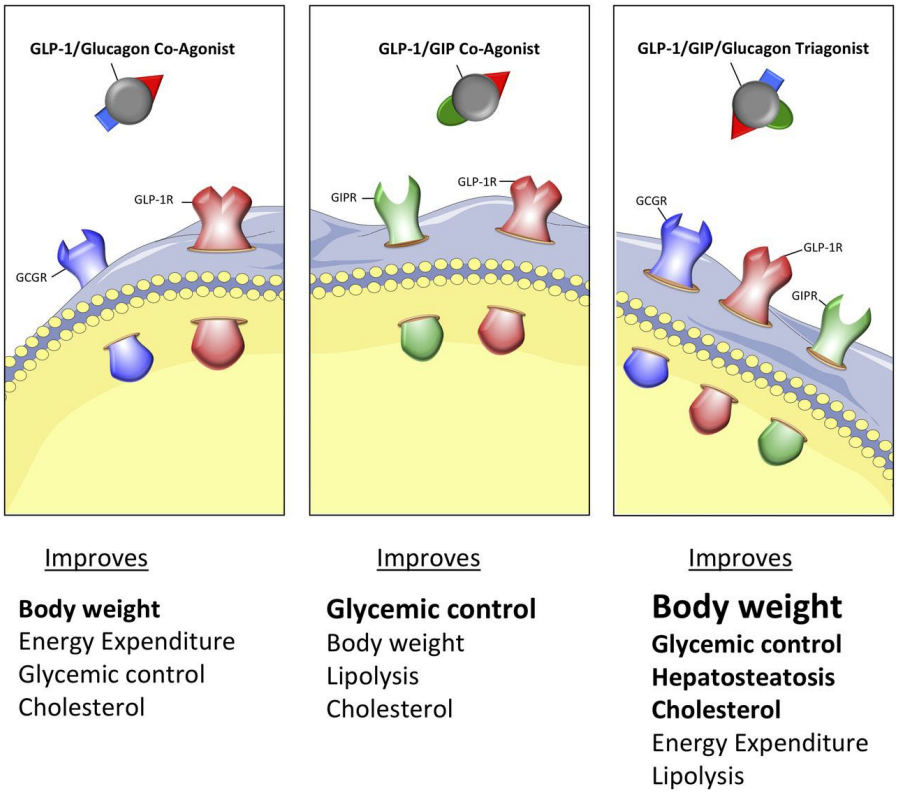


Figura 3. Esquema de los principales agonistas duales (GLP-1/glucagón y GLP-1/GIP) y el agonista triple (GLP-1/glucagón/GIP) y sus principales efectos metabólicos. Reproducida con permiso de American Society for Pharmacology and Experimental Terapeutics (License: 1402697-1) (Müller et al., 2018)

Posteriormente en 2013, la misma colaboración entre DiMarchi y Tschöp dio lugar al desarrollo de un agonista dual de GLP-1 y GIP. De igual manera, tras una serie de modificaciones estructurales y sustituciones de aminoácidos sobre el esqueleto del glucagón, logran un péptido capaz de revertir varias comorbilidades del síndrome metabólico, como la obesidad, dislipemia e hiperglucemia, en ratones deficientes en leptina o con obesidad inducida por dieta (Figura 3). Estos resultados presentaron además un gran potencial traslacional, al obtener beneficios metabólicos también en primates no humanos y pacientes humanos (Finan et al., 2013). De hecho, es destacable que el pasado año 2022 la FDA aprobó el fármaco conocido como Tirzepatide (Mounjaro), para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (FDA, 2022), y este fármaco consiste en realidad en un agonista dual de GLP-1 y GIP capaz de lograr una disminución de la hemoglobina glicosilada, superior a la insulina sola o a los agonistas selectivos del receptor de GLP-1, además de una reducción del 22,5% de la masa corporal en pacientes obesos sin diabetes (Dahl et al., 2022; Del Prato et al., 2021; Frias et al., 2017; Frías et al., 2021; Jastreboff et al., 2022; Rosenstock et al., 2021).

Finalmente, tras la observación de que el tratamiento con agonistas duales GLP-1/GIP a mayores con glucagón poseía todavía un mayor efecto positivo sobre la pérdida masa corporal y la glucemia, se llevó a cabo el desarrollo de una única molécula que actuase sobre los tres receptores a la vez. Un triagonista GLP-1/GIP/glucagón (Figura 3), que en ratones con obesidad inducida por dieta poseía una mejora superior en la pérdida de masa corporal, disminución de la ingesta, disminución plasmática de insulina y otros parámetros metabólicos que la misma dosis de liraglutida (agonista de GLP-1R) (Finan et al., 2015).

Durante estos años, se han desarrollado varias moléculas con acción sobre diferentes receptores, agonistas duales o triples agonistas, demostrando una gran eficacia sobre el manejo de la glucemia y la masa corporal en varios modelos murinos de obesidad, bien genéticamente o inducidos por dieta, así como en primates no humanos y humanos. Queda camino por ver la trascendencia clínica de muchos de ellos al igual que su seguridad a largo plazo, pero actualmente su eficacia metabólica los ha puesto en el punto de mira para el tratamiento de la actual pandemia obesogénica a la que nos enfrentamos (Müller et al., 2018; Nogueiras et al., 2023; Rodgers et al., 2012).

1.2.1.2 Ghrelina

La ghrelina constituye la única de las hormonas gastrointestinales que promueve el hambre, es decir que es orexigénica (Figura 2). Se libera por las células oxínticas del estómago de forma pre-pandrial (antes de las comidas) que es cuando sus niveles en sangre aumentan. Está constituida por 28 aminoácidos y su tercer residuo de serina posee una esterificación de ácido n-octanoico, que le permite atravesar la BBB. Esta acilación se consigue por el enzima ghrelina O-acil-transferasa (GOAT, *ghrelin O-acyl-transferase*). Fue inicialmente descubierta como un secretagogo de la hormona de crecimiento, al ser el principal ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R, *growth hormone secretagogue-receptor*) (Kojima et al., 1999). Tanto la ghrelina como su receptor se expresan en varias regiones del cerebro, intestino, hipófisis, riñón, corazón, pulmón, ovarios, islotes pancreáticos y en la placenta (Müller et al., 2015).

Tras su descubrimiento inicial, se observó que su administración periférica causaba un aumento de masa corporal en ratas y ratones, y su administración central provocaba un incremento en la ingesta, dosis-dependiente, que cursaba a su vez con un aumento de la masa corporal y la adiposidad (Tschöp et al., 2000). En humanos sus niveles también aumentan de forma aguda preprandialmente y decaen tras la ingesta (Cummings et al., 2001, 2004; Wren et al., 2001), indicando su posible rol como factor iniciador de las comidas. En pacientes obesos sus niveles decaen, pero aumentan tras una intervención dietética con una consecuente reducción de la masa corporal o tras un bypass gástrico, indicando también su importancia en la regulación del balance energético a largo plazo (Cummings et al., 2002; Tschöp et al., 2001). El principal lugar de acción de la ghrelina para el control de la ingesta es el ARC, donde activa las neuronas orexigénicas AgRP/NPY que inducen la expresión del neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) y la proteína relacionada con agutí (AgRP, *agouti-related protein*), ambos péptidos orexigénicos, cuya liberación va a cursar además con la inhibición de neuronas anorexigénicas como las neuronas proopiomelanocortina (POMC, *proopiomelanocortin*) (Chen et al., 2004; Cowley et al., 2003; Kamegai et al., 2001; Shintani et al., 2001). Se cree que en el hipotálamo la ghrelina induce una liberación de endocannabinoides (Kola et al., 2005, 2008), que conllevan la activación de la proteína quinasa quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK2, *calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase 2*) y en consecuencia un aumento en la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) (Anderson et al., 2008). Se ha descrito como la acción orexigénica de la ghrelina depende de la regulación del metabolismo de ácidos grasos, mediado por AMPK y la carnitina

palmitoiltransferasa 1 c (CPT1c, *carnitoil-palmitoil transferase 1c*), con especial relevancia en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH, *ventromedial hypothalamic nucleus*) (Lage et al., 2010; López et al., 2008; Ramírez et al., 2013); y a su vez también de la activación de la quinasa diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR, *mechanistic target of rapamicyn*) en el ARC (Martins et al., 2012). Por último, la ghrelina también tiene efectos extra-hipotalámicos, su administración intracerebroventricular (ICV) también causa un aumento de la expresión del marcador de actividad neuronal cFOS, en el NTS y AP (Bailey et al., 2001); y también actúa sobre los centros de recompensa como el núcleo accumbens (NAc, *accubens nucleus*) y el área tegmental ventral (VTA, *ventral tegmental área*) (Abizaid et al., 2006; Skibicka et al., 2012), destacando la importancia de la ghrelina en los comportamientos relacionados con la búsqueda de comida, anticipación y aumento de la actividad locomotora previa asociada a la ingesta. Recientemente, se ha descubierto un antagonista del receptor de ghrelina, el péptido antimicrobiano 2 expresado en hígado (LEAP2, *liver-expressed antimicrobial peptide* 2), que antagoniza las acciones metabólicas la ghrelina *in vivo* e *in vitro*, situándolo como una nueva posible diana terapéutica para la obesidad (Al-Massadi et al., 2018; Ge et al., 2018; Lugilde et al., 2022).

1.2.2 Señales pancreáticas

El páncreas juega un rol fundamental en la digestión de los macronutrientes y por tanto en la homeostasis energética. La gran mayoría del páncreas se encarga de liberar enzimas digestivas al tracto gastrointestinal, como amilasa, lipasa pancreática y tripsinógeno, esta parte es la que se conoce como páncreas exocrino. El páncreas endocrino, que constituye en torno al 1-2% del órgano, está formado por células que se organizan en los conocidos como islotes de Langerhans. En los islotes encontramos diferentes tipos de células: las células α que secretan glucagón; células β que liberan amilina, péptido-C e insulina; células γ que secretan PP; células δ que secretan somatostatina y células ε que secretan ghrelina (Röder et al., 2016). De forma simplificada, el glucagón[1] aumenta los niveles de glucosa en sangre, mientras que la insulina los disminuye. La somatostatina, inhibe la liberación de ambos. El PP (del que mencionamos antes su efecto anorexigénico), pertenece a la misma familia que NPY y PYY_{3-36}. Ejerce sus efectos anorécticos al unirse a su receptor Y_5 señalizando a través de vías del tronco del encéfalo, como el AP, modulando la expresión de neuropéptidos como la orexina o NPY y modulando la expresión de la ghrelina (Asakawa et al., 2003). La amilina se secreta igual que la insulina por las células β del páncreas e inhibe el vaciado gástrico y la secreción de ácido gástrico y glucagón. También disminuye el tamaño de las comidas tras su administración central o periférica, nuevamente señalizando de forma principal en el AP (Rushing et al., 2000). Existe también un análogo sintético denominado pramlintida que se emplea en diabetes y logra la reducción de la masa corporal (Hollander et al., 2004).

La insulina (Figura 2) favorece la captación de glucosa por el músculo y la grasa e inhibe la producción hepática de glucosa, regulando así la concentración de glucosa en sangre. También favorece el crecimiento y la diferenciación celular, promueve el almacenamiento de sustratos en el tejido adiposo, músculo e hígado al promover la lipogénesis, la síntesis de glucógeno y de proteínas. En contrapartida, inhibe la lipólisis, la glucogenólisis y la degradación de proteínas. Constituyendo, por tanto, una de las principales señales anabólicas del organismo (Röder et al., 2016; Saltiel & Kahn, 2001). A nivel central, cruza la BBB a través de un mecanismo saturable por transportador y reduce la ingesta (Baura et al., 1993; G. L. King & Johnson, 1985; S. C. Woods et al., 1979). La deleción específica del IR en el cerebro provoca

[1] Ver *1.2.1.1 Péptidos gastrointestinales: un mundo de agonistas* – página 11

obesidad a través de la dieta, debido a una mayor ingesta en ratones hembra y a unos mayores niveles de leptina (Brüning et al., 2000). El receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) presenta una amplia distribución en el cerebro, con una importante representación en el hipotálamo (Baskin et al., 1988; Havrankova et al., 1978; Houten et al., 1979). Dentro del hipotálamo hay dos poblaciones neuronales que son dianas clave para la señalización de la insulina: las neuronas AgRP/NPY y POMC (Varela & Horvath, 2012). La insulina consigue su efecto anoréxico estimulando las neuronas POMC, que través la activación de la vía de las melanocortinas van a inhibir la ingesta, mientras que a su vez inhibe directamente las neuronas AgRP/NPY, impidiendo su efecto orexigénico (Benoit et al., 2002; Obici et al., 2001; Obici, Feng, et al., 2002; Schwartz et al., 1992; Sipols et al., 1995). Adicionalmente, actuando en el hipotálamo, la insulina modula el metabolismo glucémico periférico, inhibiendo la producción hepática de glucosa, un efecto preferentemente mediado por las neuronas AgRP (Könner et al., 2007a; Obici, Zhang, et al., 2002).

1.2.2 Señales del tejido adiposo

El tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) es considerado un importante órgano endocrino, debido a la cantidad de hormonas y citoquinas que libera, con un importante efecto sobre: apetito, homeostasis de la glucosa, metabolismo lipídico, fisiología cardiovascular, reproducción, desarrollo y función del sistema inmune, entre otras acciones. Siendo, por tanto, un tejido clave en la regulación del balance energético. El WAT libera: esteroides sexuales y glucocorticoides; precursores de hormonas peptídicas como el angiotensinógeno; factores del complemento como la adipsina o proteína estimulante de la acilación (ASP *acylation-stimulating-protein*), que inhibe a la lipasa sensible a hormonas (HSL, *hormone-sensitive lipase*) y favorece la acumulación de triacilglicéridos en el adipocito; citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF, *tumor necrosis factor* α) y la interleuquina 6 (IL-6, *interleuking-6*) que juegan un papel fundamental en el metabolismo lipídico y de la glucosa; el factor de crecimiento transformante β (TFG-β, *transforming growth factor β*); la adiponectina; resistina y finalmente el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*) (Funcke & Scherer, 2019; López et al., 2007; Scheja & Heeren, 2019). Pero, sin duda la hormona secretada por el WAT que nos resulta más interesante desde el punto de vista del balance energético es la leptina.

La leptina es una hormona peptídica secretada mayoritariamente por los adipocitos (Figura 2), capaz de actuar sobre los dos lados de la ecuación del balance energético: ingesta y gasto energético. Fue descubierta como el producto del gen *ob* (*obese*) (Y. Zhang et al., 1994) y consiste en un péptido de 167 aminoácidos que circula de forma proporcional a la cantidad de grasa que hay en el organismo (Considine et al., 1996; Hamilton et al., 1995; Maffei et al., 1995), constituyendo junto con la insulina, las dos principales señales de adiposidad del organismo (Schwartz et al., 2000). Su ausencia en ratones da lugar a hiperfagia, obesidad y una importante desregulación endocrina (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995). En humanos, igual que en ratones, su deficiencia causa obesidad mórbida e hipogonadismo, aunque en ambos casos se revierte con el tratamiento de la proteína obtenida de forma recombinante (Farooqi et al., 1999).

Para cruzar la BBB, la leptina utiliza un transporte saturable, una de las razones por las cuales, en individuos obesos con altos niveles de leptina, esta no logra entrar de forma eficiente en el cerebro, generándose una resistencia a la misma (Banks et al., 1996; Schwartz, Peskind, et al., 1996). En el cerebro sus receptores abundan en diferentes zonas, con especial representación en el hipotálamo y nuevamente como la insulina en núcleos como el ARC o VMH (Couce et al., 1997; Fei et al., 1997; Schwartz, Seeley, et al., 1996). De forma similar a

la insulina, la leptina inhibe la actividad de las neuronas orexigénicas AgRP/NPY reduciendo la expresión de ambos neuropéptidos (Schwartz, Baskin, et al., 1996; Stephens et al., 1995; Swart et al., 2002; van den Top et al., 2004) y activando las neuronas anorexigénicas POMC y aquellas que expresan el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART, *cocaine- and anfetamine-regulated transcript*) (Cowley et al., 2001; Kristensen et al., 1998; Schwartz et al., 1997). Siendo especialmente importante la señalización en las neuronas POMC (Balthasar et al., 2004) y las proyecciones de ambas neuronas orexigénicas y anorexigénicas a el área hipotalámica lateral (LHA, *lateral hypothalamic area*), para controlar la masa corporal (Elias et al., 1999). Adicionalmente, fuera del ARC, la leptina también parece activar las neuronas que expresan el factor esteroidogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*) del VMH, acción que es necesaria para una homeostasis energética normal (Dhillon et al., 2006). Finalmente, la leptina también es capaz de actuar sobre el otro lado de la balanza, afectando al gasto energético actuando en distintos núcleos hipotalámicos y aumentando el tono del sistema nervioso simpático (SNS, *sympathetic nervous system*), sobre el tejido adiposo marrón (BAT, *brown adipose tissue*), para aumentar la termogénesis de este o el *browning* del WAT (Dodd et al., 2015; Pandit et al., 2017; P. Wang et al., 2020) (de los cuales hablaremos en el siguiente apartado). Sin embargo, el efecto termogénico de la leptina sobre el BAT es controvertido, concluyendo algunos autores que es una molécula pirética (es decir, que altera los mecanismos centrales de regulación de la temperatura y la fiebre) y no termogénica (Fischer et al., 2016; Seoane-Collazo et al., 2020).

1.3 Gasto energético, termogénesis y Tejido adiposo pardo

Previamente se habló de que el gasto energético está compuesto por varios componentes: la tasa metabólica basal (BMR, *basal metabolic rate*), la actividad física y la termogénesis adaptativa. La BMR, constituye un 80% del gasto energético de un individuo, en donde dos tercios de esta se emplearían en mantener la temperatura corporal, al ser los humanos animales homeotermos, mientras que el otro tercio se emplearía en metabolismo celular (integridad celular, mantenimiento de gradientes iónicos, etc.). La actividad física a su vez podríamos dividirla en derivada del ejercicio o no derivada del ejercicio (incluyendo el mantenimiento de una postura erguida en bipedestación), y en individuos sedentarios constituiría un 10% del gasto energético total. El restante 10% haría referencia a la termogénesis adaptativa (o facultativa), que podríamos definirla como la producción de calor por parte del organismo de forma independiente al ejercicio en respuesta al ambiente o la dieta. Sin embargo, estos valores pueden cambiar en personas muy activas, en donde la actividad física y la termogénesis adaptativa podrían suponer hasta un 44% del gasto energético total y la BMR suponer solo el 56% restante (Landsberg et al., 2009). A su vez, cambios en la masa corporal de los individuos durante períodos de obesidad o adelgazamiento producen cambios en el gasto energético, un factor importante para tener en cuenta en pacientes con obesidad que estén perdiendo la masa corporal (Doucet et al., 2001, 2003; Leibel et al., 1995).

La termogénesis es un proceso esencial en los animales homeotermos para mantener su temperatura corporal estable. La termoneutralidad se define como el rango de temperaturas ambientales donde la producción de calor no está estimulada y el BMR es suficiente para mantener la temperatura corporal (Lowell & Spiegelman, 2000). En los ratones y humanos, este rango se sitúa en torno a 28º-30ºC, por debajo de este rango se activan procesos que evitan la pérdida de calor y que generan calor (Cannon & Nedergaard, 2011; Gordon, 2012; Tran et al., 2022). Por una parte, se producirá la vasoconstricción de los vasos sanguíneos, la piloerección y la adopción de posturas esféricas y reducción de la movilidad. Por otro lado, se activará la termogénesis adaptativa, que podemos diferenciarla en termogénesis mediada por temblor y no

mediada por temblor (ST y NST, *shivering and non-shivering thermogenesis*). La tiritona o la termogénesis mediada por temblor es el último mecanismo en activarse en respuesta a frío en comparación a otras respuestas conductuales o fisiológicas, debido a su alto coste energético y la incapacidad para el animal a huir en caso de amenaza. Esta termogénesis tiene lugar principalmente a través de contracciones repetidas del músculo esquelético, como resultado de descargas rítmicas de las motoneuronas. También constituye un mecanismo fisiológico esencial en humanos durante situaciones como la fiebre (Morrison, 2011; Tattersall et al., 2012).

La termogénesis no inducida por temblor (NST) es aquella que ocurre principalmente en músculo (aves y mamíferos) el BAT (mamíferos). El BAT constituye un órgano especializado en la producción de calor. Este mecanismo es especialmente relevante en mamíferos pequeños debido a su gran pérdida de calor (relación área/volumen elevada). En roedores el BAT se encuentra anatómicamente de forma mayoritaria en la región interescapular, aunque también se encuentran depósitos intercostales, perirrenal y periaórticos (Cannon & Nedergaard, 2004). En el pasado se creía que este tejido solo era relevante en roedores, mamíferos hibernantes y en humanos neonatales para el mantenimiento de la temperatura (Aherne & Hull, 1966; Lean, 1989). Fue en el año 2007, cuando la administración de 18-fluorodeoxiglucosa y el uso de la tomografía por emisión de positrones con tomografía computerizada (PET-CT, *positron emission tomography-computed tomography*) en pacientes con cáncer, se descubre la presencia de BAT activo en humanos, en zonas definidas y dispersas, como: la zona supraclavicular, cervical, intercostal, perirrenal y periaórtica. (Cypess et al., 2009; Nedergaard et al., 2007; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009) (Figura 4).

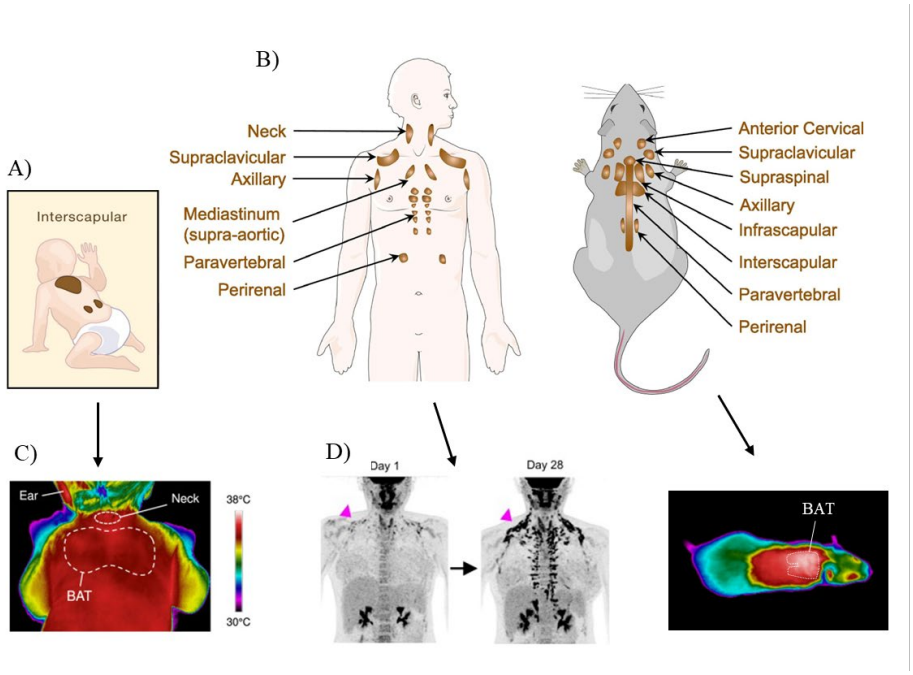


Figura 4. Distribución de los principales depósitos de BAT en neonatos, humanos y ratón y algunos métodos indirectos para cuantificar su actividad. A) Imagen adaptada con permiso de Elsevier (License: 5642950596518) (Gesta et al., 2007); B) Reproducida con permiso de Elsevier (License: 5642960358904) (Herrero et al., 2023); C) Imagen adaptada con permiso de Creative Commons (Urisarri and González-García et al., 2021); D) Imagen adaptada con permiso de American Society for Clinical Investigation (License: 1403915-1)

En humanos se cree que la NST del BAT completamente activo puede suponer un 2,7%-5% de la BMR (van Marken Lichtenbelt & Schrauwen, 2011), siendo por tanto un tejido diana

interesante para la obesidad (González-García et al., 2020; Whittle et al., 2011). Un trabajo reciente ha descrito como el BAT en neonatos se correlaciona con la temperatura corporal y como este es capaz de activarse ante un estímulo de frío suave. Un único estímulo es suficiente para mejorar la adaptación térmica de los neonatos a un segundo estímulo y como la proteína morfogenética de hueso 8b (BMP8b, *bone morphogenetic protein 8b*) parece estar asociada a la respuesta térmica en neonatos (Urisarri et al., 2021).

El BAT presenta características anatómicas y fisiológicas que lo diferencian del WAT. Principalmente presenta unos adipocitos poligonales con un color marrón característico debido a la elevada cantidad de mitocondrias que a su vez contienen citocromos pigmentados que proporcionan dicho color. A mayores, presentan una gran cantidad de gotas lipídicas multiloculares que sirven de sustrato para la elevada densidad de mitocondrias que posee. En contraposición, los adipocitos blancos carecen de esa elevada densidad mitocondrial y la mayor parte de su citoplasma está ocupado por una única gota lipídica (función de almacenaje y endocrina) y el núcleo celular, dando lugar a ese color más blanco (Cinti, 2005; Contreras et al., 2015). El BAT está ampliamente inervado por el SNS, de forma que a su vez está estrechamente regulado por el CNS y presenta una fuerte irrigación sanguínea, de manera que se facilita la disipación del calor generado (Bamshad et al., 1999; Bartness et al., 2010; Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2017; Zeng et al., 2015). La producción de calor en el BAT ocurre gracias a la proteína desacoplante UCP1 (*Uncoupling protein 1*), también conocida como termogenina. En una mitocondria la energía se produce a través de la cadena de transporte electrónico, que crea un gradiente de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, de forma que la ATP sintasa es capaz de producir adenosín trifosfato (ATP) a través de adenosín difosfato (ADP) al dejar que los protones vuelvan de nuevo a la matriz mitocondrial. En el BAT, UCP1 permite el paso de los protones a favor de gradiente de vuelta a la matriz mitocondrial, de forma que se desacopla la cadena de transporte de electrones de la producción de ATP. Como este proceso es un proceso exergónico, la energía resultante se libera en forma de calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Garlid et al., 2000; Nicholls & Locke, 1984; J. E. Silva, 2006). La deficiencia de esta proteína en ratones los vuelve intolerantes al frío. Sin embargo, estos animales necesitan someterse a termoneutralidad para desarrollar obesidad, efecto que se ve incrementado ante una dieta alta en grasa. Esto ocurre ya que, por debajo de la termoneutralidad, los animales presentan cierto estrés térmico que incrementa su BMR (Enerbäck et al., 1997; Feldmann et al., 2009; Nedergaard et al., 2001).

Como se mencionó previamente, la activación de la termogénesis ocurre tras un aumento del tono simpático de los nervios que lo inervan, dando lugar a un aumento de la liberación de norepinefrina (NE, *norepinephrine*), que se unirá al receptor β3-adrenergético (β3-AR, β3-*adrenergic-receptor*) (Cypess et al., 2015). Estos receptores están acoplados a proteínas G, del tipo $G_s\alpha$, de manera que al unirse la norepinefrina se activa la adenilato ciclasa (AC, *adenylyl cyclase*), aumentando los niveles celulares de adenosín monofosfato-cíclico (cAMP, *cyclic adenosin monophosphate*). El cAMP activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), que es la principal responsable de activar la termogénesis y a su vez activar la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK, *p38 mitogen-activated protein kinase*) (Cannon & Nedergaard, 2004; W. Cao et al., 2001; Contreras et al., 2015). PKA produce efectos agudos y efectos crónicos sobre el BAT. De forma aguda estimula la lipólisis a través de la activación de HSL (su forma activa sería fosfoilada), la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) y la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*), que hidrolizarían los triacilglicéridos (TAG, *triacylglicerides*) para liberar ácidos grasos libres (FFAs, *free fatty acids*) (Clifford et al., 2000; Shih & Taberner, 1995). Proceso que también favorece la PKA, al fosforilar e inhibir la perilipina que envuelve las gotas lipídicas del

USC DE COMPOSTELA

citoplasma de los adipocitos (Souza et al., 2007). Los FFA van a ser importados al interior de la mitocondria gracias a la carnitina palmitoil transferasa 1a (CPT1a, *carnitine palmitoyltransferase 1a*), donde se oxidarán dando lugar a dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y flavín dinucleótido ($FADH_2$), que nuevamente serán oxidados en la cadena de transporte electrónico y contribuirán al bombeo de protones al espacio intermembrana, generando el gradiente electroquímico necesario para sintetizar ATP (Boyer, 1997; Futai et al., 1989). Es aquí cuando UCP1 actúa, dejando a los protones pasar de vuelta a la matriz mitocondrial y liberándose el exceso de energía en forma de calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Nicholls & Locke, 1984). La activación prolongada del BAT da lugar a los efectos crónicos de PKA, que al activar a p38 MAPK, induce un aumento en la expresión de UCP1 y el coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1α, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), induciendo un mayor estado de diferenciación del BAT, con una mayor biogénesis mitocondrial y una hipertrofia e hiperplasia del tejido (Figura 5) (Blondin et al., 2014; Cannon & Nedergaard, 2004; W. Cao et al., 2001; Contreras et al., 2015).

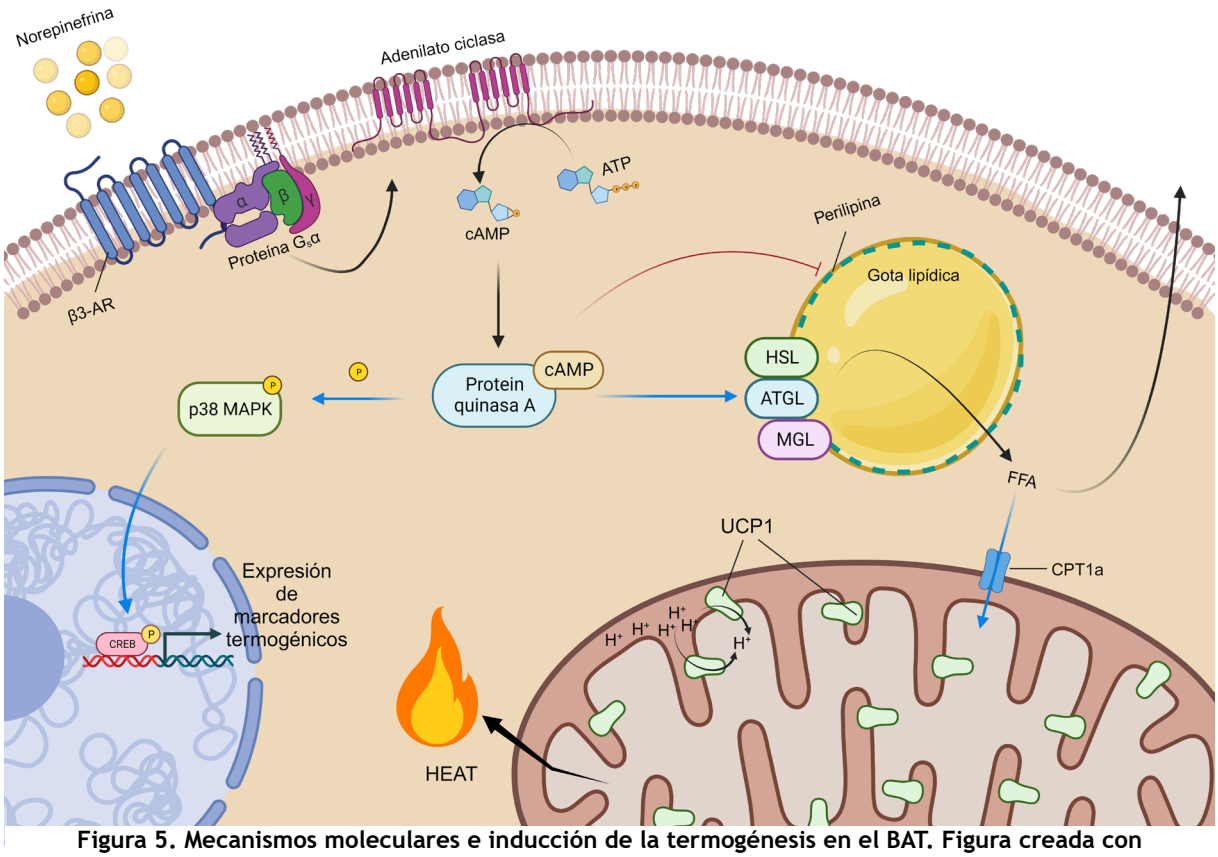
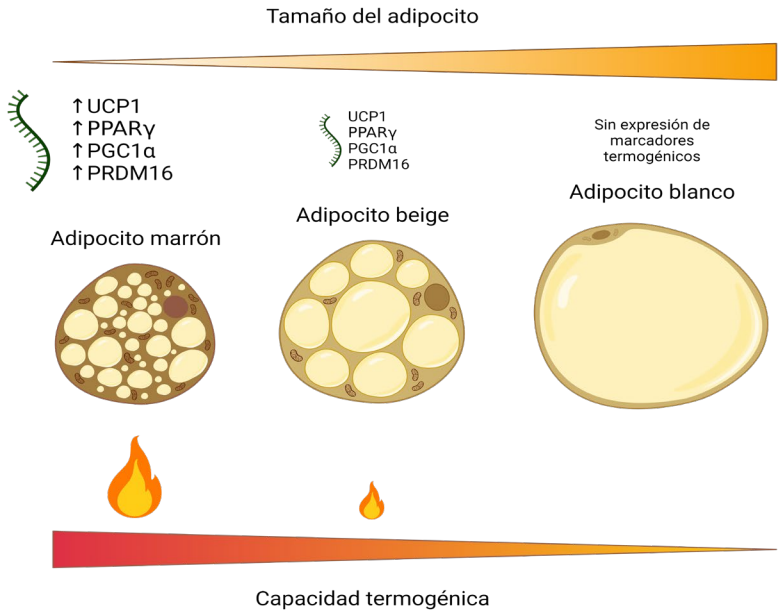


Figura 5. Mecanismos moleculares e inducción de la termogénesis en el BAT. Figura creada con biorrender.com

El modelo anterior de activación de UCP1 presenta cierta controversia. Al principio se creía que UCP1 en condiciones basales estaría inhibido por su unión a ATP y ADP (o GDP). Esta inhibición sería contrarrestada por los FFAs liberados durante la lipólisis producida en el adipocito marrón, tras su previa estimulación por norepinefrina y la actividad de ATGL (Cannon & Nedergaard, 2004). Sin embargo, dos estudios posteriores mostraron, que en animales que carecían de función de ATGL en el BAT, la termogénesis inducida por norepinefrina seguía ocurriendo con normalidad, al utilizar como combustible FFA provenientes del WAT (Schreiber

et al., 2017; Shin et al., 2017). Por tanto, la propia lipólisis del BAT no era necesaria para la termogénesis inducida por β3-AR. Sin embargo, este modelo también implicaría que el SNS carecería de importancia a corto plazo, sobre la inducción de la termogénesis. Por ello, hoy en día se cree que aparte de los FFA debería haber otro activador endógeno de UCP1, que se activase también a través de la liberación de norepinefrina y el β3-AR (Cannon & Nedergaard, 2017) .

Existe un "tercer" tipo de adipocito conocido como los adipocitos beige o *brite* (del inglés (b*rown-in-white*), que son adipocitos blancos que presentan características de los adipocitos marrones al trans-diferenciarse durante un proceso conocido como pardeamiento o *browning* (Contreras et al., 2015, 2017; Peirce et al., 2014) (Figura 6). Este proceso puede ser inducido por frío o por estimulación β3-adrenérgica. Embriológicamente los adipocitos marrones expresan el factor miogénico 5 (Myf5, *myogenic factor 5*), igual que los miocitos, mientras que los adipocitos beige y blancos no comparten este linaje (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014; Seale et al., 2008; Timmons et al., 2007; W. Wang & Seale, 2016) . Los adipocitos beige tienen capacidad termogénica al expresar UCP1 igual que los adipocitos marrones, pero con una magnitud *in vivo* menor (Nedergaard & Cannon, 2013; Petrovic et al., 2010; Shabalina et al., 2013). Algunos de los marcadores moleculares responsables en el proceso de *browning* son: el receptor gamma activado por el profilerador de peroxisomas (PPARγ, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16, *PR domain containing 16*), PGC1α y el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor-a-like efector A*) (Contreras et al., 2015). PPARγ es un factor de transcripción esencial para la diferenciación y supervivencia de los adipocitos (Spiegelman et al., 2000), blancos y marrones, que induce la formación de adipocitos beige, al inducir la expresión de UCP1 y PGC1α en adipocitos blancos, así como otros marcadores de biogénesis mitocondrial, a través de la activación de PRDM16 (Ohno et al., 2012; Petrovic et al., 2010; Seale et al., 2008). PGC1α aumenta sus niveles durante el ejercicio, ayuno o exposición a frío, y es fundamental para la biogénesis mitocondrial y por tanto para la



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 6. Principales tipos de adipocitos y sus aspectos más característicos. Figura creada con biorrender.com

termogénesis en el tejido adiposo pardo (aunque no para su diferenciación) (Lowell & Spiegelman, 2000; Spiegelman et al., 2000). PRDM16, igual que PPARγ, regula la expresión tanto de genes del BAT como del WAT. Si se une a PGC1α, activará genes del BAT reprimiendo genes del WAT. Su sobreexpresión en ratones aumenta el EE y mejor la tolerancia a glucosa en dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) (Frühbeck et al., 2009; Seale et al., 2011). CIDEA, se expresa ampliamente en el BAT, donde si se elimina da lugar a un fenotipo delgado, resistente a obesidad inducida por dieta. Se cree que es un regulador negativo de la actividad de UCP1 (Z. Zhou et al., 2003).

Por último, ciertos estudios sugieren que el BAT encontrado en humanos tiene un perfil molecular más similar a los adipocitos beige o *brite*, que a los marrones (Jespersen et al., 2013; Kajimura et al., 2015; Shinoda et al., 2015; J. Wu et al., 2012), aunque otros muestran una expresión de marcadores termogénicos clásicos (Cypess et al., 2013). En cualquiera de los dos casos, debido a la contribución del BAT al gasto energético, su papel en el aclaramiento de lípidos y carbohidratos en la sangre (Bartelt et al., 2011) y su correlación negativa con el BMI y el estatus diabético de los individuos, supone una estrategia terapéutica para la obesidad y sus patologías asociadas (Betz & Enerbäck, 2015; Chondronikola et al., 2016; Cypess & Kahn, 2010; Frühbeck et al., 2009; González-García et al., 2020; Whittle et al., 2011; Yoneshiro et al., 2013).

1.4 Hipotálamo y homeostasis energética

Previamente, ya se mencionó como diferentes señales periféricas nutricionales y hormonales señalizan en el CNS afectando al balance energético global. Dentro del CNS destacan el hipotálamo y el tronco del encéfalo como dos regiones claves en la regulación del balance energético (Schneeberger et al., 2014). Si bien es cierto que ambas regiones se centran en un control más homeostático, existen otras partes del CNS que se encargan del control hedónico, como los centros corticolímbicos y mesolímbicos que incluirían: hipocampo, córtex prefrontal, amígdala, VTA y NAc; que se encargarían de regular los aspectos más emocionales y cognitivos relacionados con la ingesta de alimentos. Estos mecanismos no serán abarcados en esta introducción y pueden ser ampliados en las siguientes referencias (Berthoud et al., 2017; Campos et al., 2022; DiLeone et al., 2012; Higgs, 2016; Novelle & Diéguez, 2018; Rossi & Stuber, 2018b; Volkow et al., 2017; Woodward et al., 2022).

El hipotálamo va a jugar un rol decisivo en la regulación del balance energético, al integrar una gran cantidad de señales aferentes que alcanzan el CNS, equipararlas a los estándares fisiológicos endógenos (*set points*) ideales, como temperatura, niveles de glucosa o sodio en sangre y niveles hormonales. Y a continuación, produce una respuesta a través de vías autónomas, endocrinas o conductuales para salvaguardar la homeostasis (Saper & Lowell, 2014). Embriológicamente surge de la región más anterior del tubo neural y una vez formado, se sitúa bajo el tálamo y ocupa una posición ventral en el encéfalo. Dentro de su organización encontramos una serie de núcleos hipotalámicos, formados por *clusters* de neuronas diferentes que forman circuitos entre sí y otros núcleos, regulando funciones vitales básicas. De forma rostral-caudal podemos diferenciar el hipotálamo en 3 porciones. La región más anterior o rostral, incluiría principalmente el área preóptica (POA, *preoptic area*) y el núcleo supraquiasmático (SCN, *suprachiasmatic nucleus*), que regularían: la temperatura corporal, la fiebre, el balance electrolítico, los ciclos de sueño-vigilia, los ritmos circadianos y el comportamiento sexual. La parte media o parte tuberal, incluiría: las áreas hipotalámicas anterior y lateral (LHA, *lateral hypothalamic area*) y los núcleos, arcuato, ventromedial, dorsomedial (DMH, *dorsomedial nucleus of the hypothalamus*), supraóptico y paraventricular. Esta región tuberal posee los circuitos neuronales encargados de regular la ingesta y el gasto

energético, así como circuitos de salida para la agresividad, comportamiento sexual y respuestas endocrinas y autónomas. El área más caudal o posterior, incluiría los cuerpos mamilares y el área hipotalámica posterior, que proporciona salidas al hipocampo, que se cree que están involucradas en la vigilia y respuestas al estrés (Figura 7) (Burbridge et al., 2016; Saper & Lowell, 2014).

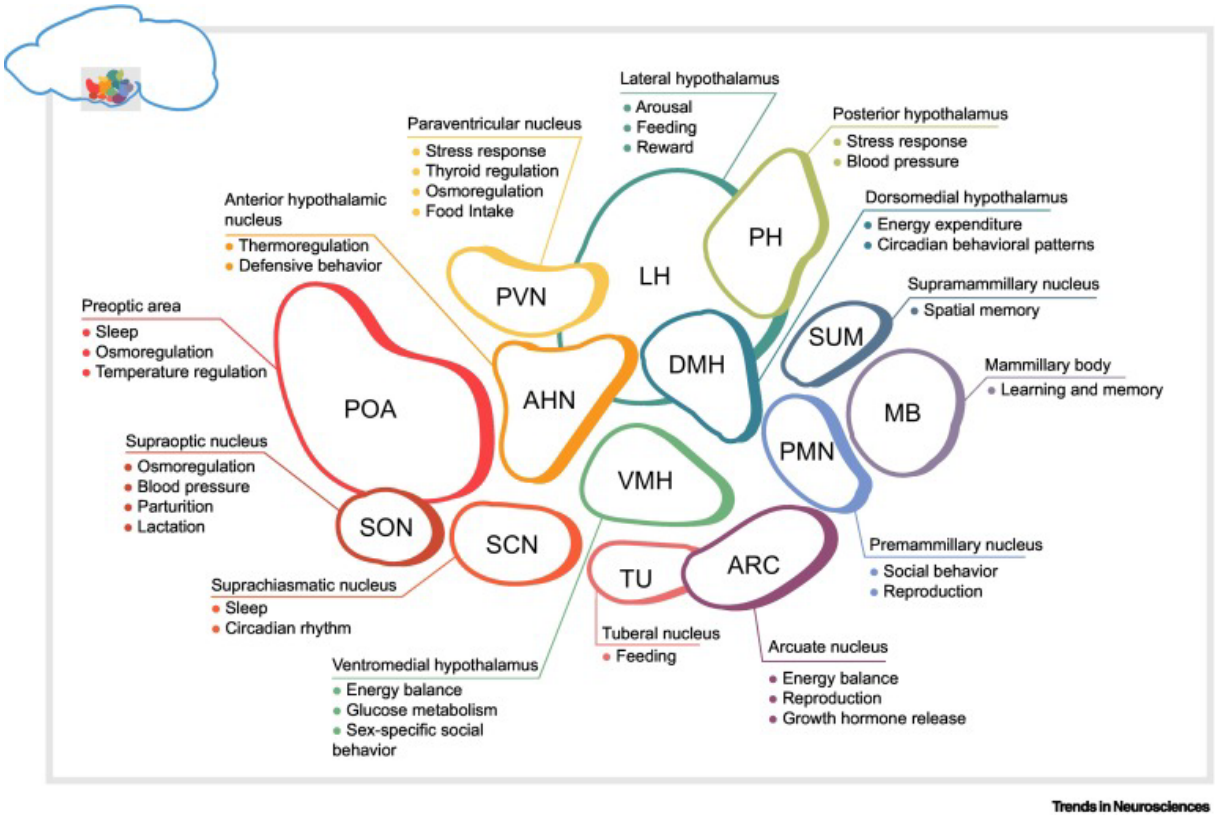


Figura 7. Principales núcleos hipotalámicos y sus funciones. Reproducida con permiso de Creative Commons (Hajdarovic, et al., 2022)

El interés en el hipotálamo como un centro regulador de la homeostasis energética surgió de observaciones tradicionales de que bien tumores (*Frölich's syndrome*) o lesiones que comprendían la hipófisis y tejidos adyacentes de la base del cráneo, probablemente correspondiéndose con la zona medio basal del hipotálamo (MBH, *mediobasal hypothalamus*) daban lugar a un aumento de la adiposidad y obesidad (King, 2006). Estudios posteriores observaron como el desarrollo de obesidad se debía más bien a lesiones en zonas hipotálamicas concretas y no debido a alteraciones hipofisarias (Hetherington, 1943). Lesiones en áreas concretas, como en el MBH o en el PVN, daban lugar a hiperfagia y obesidad (Brobeck, 1946; Hetherington, 1944; Hetherington & Ranson, 1942). A su vez se observó que lesiones en el LHA daban lugar a animales con hipofagia, de manera que el LHA se convirtió en el "*feeding center*" mientras que la zona MBH en el "*satiety center*". Estos estudios reforzaron la idea de las grandes diferencias interregionales que ocurren en el hipotálamo para salvaguardar el balance energético. Posteriormente se observó que estas lesiones no eran en regiones tan discretas como se creía y a menudo dañaban zonas colindantes y otros tractos nerviosos que también discurrían por esas áreas (Ahima & Antwi, 2008; Elmquist et al., 1999). A continuación, nos centraremos en la zona tuberal y los principales núcleos que juegan un rol esencial en la homeostasis energética.

USC DE COMPOSTELA

1.4.1 Núcleo arcuato

El ARC se encuentra en la región hipotalámica mediobasal, donde se sitúa en la posición más ventral del hipotálamo, situándose encima de la eminencia media (ME, *median eminence*) uno de los órganos circunventriculares del cerebro, donde la BBB presenta capilares fenestrados que permite la difusión pasiva de sustancias desde la sangre. Esta posición anatómica, permite a las neuronas del ARC extender sus dendritas a la ME y transformar la información metabólica periférica en señales neuronales, considerándose por tanto neuronas de "primer orden". Los axones de las neuronas del ARC proyectan a otros núcleos hipotalámicos, como el PVH, DMH, VMH, LHA o el área perifornical (PFA, *perifornical area*) comunicando esta información y regulando tanto la ingesta como el gasto energético a través de neuronas "de segundo orden" (García-Cáceres et al., 2019). Concretamente, el ARC es de vital importancia para la detección de las principales señales de adiposidad, como la insulina o la leptina, ya que ambas expresan sus receptores en el ARC (Baskin, Breininger, et al., 1999; Baskin et al., 1988; C. C. Cheung et al., 1997), igual que otras señales hormonales como la ghrelina (Willesen et al., 1999) y también detecta niveles de los nutrientes circulantes como la glucosa. En este transporte de sustancias a través de la ME y sus capilares fenestrados, cabe destacar el rol de los tanicitos, un tipo especial de células ependimarias que está en contacto con el líquido cefalorraquídeo y transporta moléculas de forma activa desde la ME al ARC (Langlet et al., 2013).

En el ARC existen dos poblaciones neuronales bien caracterizadas, que están interrelacionadas y que poseen efectos antagónicos una sobre la otra, con un papel clave en la regulación de la ingesta. Por un lado, las neuronas orexigénicas que coexpresan AgRP/NPY y por el otro las neuronas anorexigénicas que coexpresan POMC/CART. Ambas forman parte del sistema de melanocortinas, ya que sus proyecciones van a afectar a una amplia red de neuronas postsinápticas que expresan el receptor de melanocortina 4 (MC4R, *melanocortin 4 receptor*). En especial, aquellas del PVH, cuya activación farmacogenética (uso de DREADDs) induce saciedad (Garfield et al., 2015). El control de la ingesta por parte de MC4R es clave, ya que sus mutaciones son las causas más comunes de obesidad monogénica en humanos (Chami et al., 2020; Krude et al., 1998; Yeo et al., 1998), desarrollándose agonistas del mismo para el tratamiento de la obesidad (Kievit et al., 2013; Kühnen et al., 2016). Actualmente, uno de ellos, setmelanotide, ha sido aprobado por la FDA para su uso en obesidades monogénicas de distintos tipos (Trapp & Censani, 2023).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.1.1 Neuronas AgRP/NPY

Las neuronas AgRP/NPY se sitúan en la región más medial del ARC, muy próximas a la ME, y constituyen las que se conocen como neuronas del hambre. El neuropéptido AgRP es un neuropéptido que actúa como agonista inverso del receptor de melanocortinas 3 (MC3R, *melanocortin receptor 3*) y MC4R (Haskell-Luevano & Monck, 2001) antagonizando por tanto la saciedad inducida en caso de su activación. El ayuno incrementa los niveles de mRNA de AgRP y NPY entre 5 y 10 veces (Hahn et al., 1998) y el inicio de la ingesta depende de la liberación por estas neuronas de los neuropéptidos AgRP, NPY y del ácido γ-aminobutírico (GABA, *γ-aminobutyric acid*), que inhibe directamente las neuronas POMC/CART (Atasoy et al., 2012). La estimulación optogenética de estas neuronas o mediante el uso de receptores de diseño exclusivamente activados por fármacos de diseño (DREADD, *designer receptors exclusively activated by designer drugs*) induce una ingesta voraz y comportamientos de búsqueda de comida, mientras que su inhibición promueve un efecto inhibitorio sobre la ingesta (Aponte et al., 2011; Krashes et al., 2011). Parece que el efecto agudo sobre la ingesta de las neuronas AgRP/NPY, depende de la liberación temprana de NPY (Engström Ruud et al., 2020).

La importancia de estas neuronas en la regulación de la ingesta se pone de manifiesto cuando su ablación mediada por toxina diftérica en ratones adultos da lugar a una reducción de la ingesta y posterior inanición, que conlleva el sacrificio humanitario de los animales. Sin embargo, su ausencia en ratones desde el nacimiento no presenta un fenotipo tan agudo, probablemente debido a cierta plasticidad de estos circuitos y la aparición de mecanismos compensatorios (Luquet et al., 2005). Estas neuronas también pueden afectar al metabolismo periférico de la glucosa e incluso reducir el dolor percibido por inflamación, mostrando como evolutivamente se favorece la búsqueda de la comida para sobrevivir (Jais & Brüning, 2022).

En ambas neuronas encontramos receptores tanto para la insulina como para la leptina (Baskin, Schwartz, et al., 1999; Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1992), teniendo ambas hormonas un efecto inhibidor sobre estas (van den Top et al., 2004). La inhibición de las neuronas AgRP/NPY por parte de la insulina, produce a mayores una inhibición de la producción hepática de glucosa (Könner et al., 2007). A su vez ambas neuronas presentan receptores para la ghrelina y parecen ser neuronas clave para la acción orexigénica de esta hormona, que, de forma opuesta a leptina e insulina activará estas neuronas (Chen et al., 2004; Cowley et al., 2003; Kamegai et al., 2001; Shintani et al., 2001) (Figura 8).

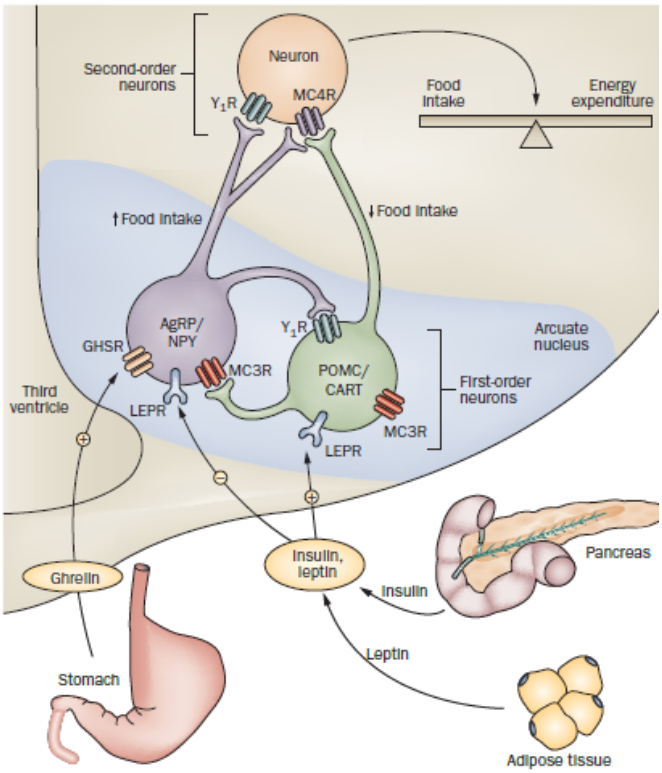


Figura 8. Señalización y efecto de las principales hormonas implicadas en la regulación del balance energético, sobre las distintas poblaciones del ARC. Reproducida con permiso de Springer Nature (License: 5644771120085) (Gregory, et al., 2002)

Mediante estudios *in vivo* que observan la liberación de calcio por parte de las neuronas AgRP, parece que estas

USC DE COMPOSTELA

neuronas están más relacionadas con estímulos relacionados con la búsqueda de comida, que con el estado energético per se del individuo. Ya que su actividad disminuye enormemente aun cuando la comida todavía no se ha ingerido (Chen et al., 2015).

Finalmente, se han descrito múltiples proyecciones de las neuronas AgRP, cuya estimulación induce la ingesta, indicando la existencia de circuitos redundantes relacionados con estas neuronas. Estos circuitos incluyen proyecciones a: PVH, la división anterior del núcleo del lecho de la estría terminal (aBSNT, *anterior division of the bed nucleus of the stria terminalis*), el LHA o tálamo paraventricular (Betley et al., 2013; García-Cáceres et al., 2019). De hecho, las proyecciones al LHA y al al BSNT, son capaces de modular también el programa termogénico en el BAT (Figura 9).

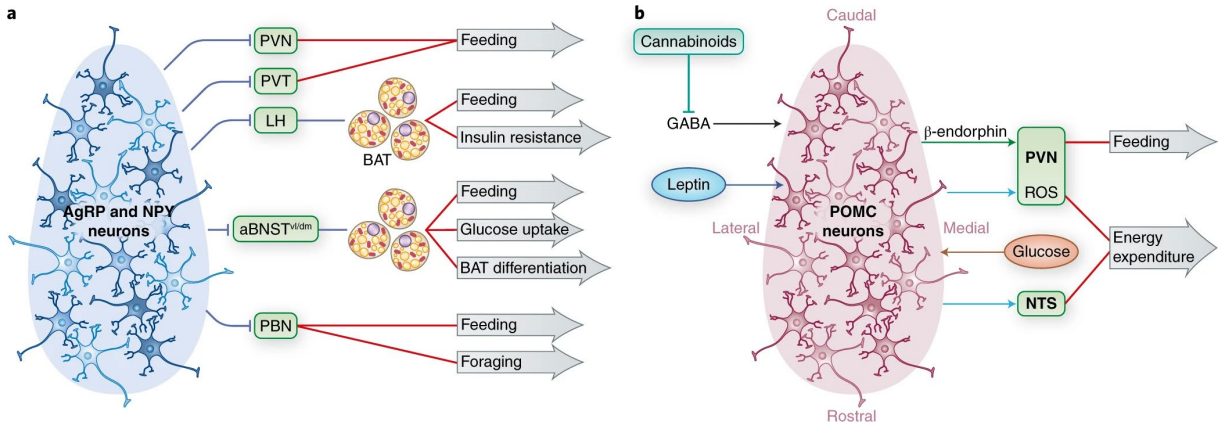


Figura 9. Proyecciones de las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART y sus principales efectos sobre el balance energético. Reproducida con permiso de Springer Nature (License: 5644921085778) (García-Cáceres, et al., 2018)

1.4.1.2 Neuronas POMC/CART

Las neuronas que expresan POMC, se encuentra principalmente en el ARC, y en ratón la mayoría de ellas coexpresan el péptido anorexigénico CART. Existen también neuronas POMC positivas en el tronco del encéfalo (Cone, 2005). Del gen *Pomc,* se generan dos clases de péptidos, melanocortinas y β-endorfinas. Las melanocortinas incluirían: ACTH, α-, β- y γ-hormona estimuladora de los melanocitos (MSH, *melanocyte-stimulating hormone*), y ejercerían su función a través de la familia de receptores MC1R hasta el MC5R.

La activación de las neuronas POMC inhibe la ingesta y la ganancia de la masa corporal (Aponte et al., 2011), y su actividad aumenta ante estados de exceso energético o ingesta prolongada. Sus acciones son mediadas a través de la activación de los receptores MC4R (Cone, 2005; Krashes et al., 2016; Zhan et al., 2013). Aunque recientemente también se ha descrito que la liberación de β-endorfina por parte de las neuronas POMC induciría ingesta (Koch et al., 2015). También se ha descrito, un rol en la regulación de la homeostasis glucémica, ya que su inhibición farmacogenética disminuye los niveles de glucosa en sangre, y esta capacidad para detectar glucosa se altera en condiciones de HFD. En dichas condiciones, la dinámica mitocondrial y el estrés del retículo endoplasmático (ER-stress, *endoplasmatic reticulum stress*) de estas neuronas también se ve afectada (Jais & Brüning, 2022; Schneeberger et al., 2013).

En el caso de la insulina, esta puede activar o inhibir las neuronas POMC. La ghrelina inhibe la actividad de las neuronas POMC, a través de la liberación de GABA por las neuronas AgRP/NPY (Cowley et al., 2003). El péptido entérico PYY_{3-36} inhibe la ingesta a través de la activación de las neuronas POMC (Ghamari-Langroudi et al., 2005). La leptina, como mencionamos previamente, inhibe las neuronas AgRP/NPY, mientras que gradualmente va

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

activando las neuronas POMC a través de la inhibición de neuronas GABAérgicas presinápticas, reduciendo su tono inhibitorio (Vong et al., 2011). Estudios en ratones con relación al receptor de leptina y las neuronas POMC, parecen indicar que las principales acciones anorexigénicas de leptina en ratones adultos no están mediadas por estas neuronas (Jais & Brüning, 2022). Por último, igual que se mencionó para las neuronas AgRP/NPY, la presentación de comida da lugar a la activación inmediata de estas neuronas, de forma que se genera una saciedad anticipada (Chen et al., 2015).

Estudios recientes de estimulación optogénetica y farmacogenética, así como con tecnología de secuenciación de ARN de una única célula, han mostrado la enorme heterogeneidad de las neuronas POMC. Presentando diferencias: espaciales en su distribución ($POMC^{ARC}$ y $POMC^{NTS}$); en la expresión de sus receptores (*clusters* que expresan receptor de leptina, otros de serotonina y *clusters* que expresan el receptor de insulina); en la expresión de neurotransmisores (~27% expresan pocos niveles de POMC y altos de AgRP/NPY); en su respuesta a nutrientes (algunas son sensibles a glucosa y otras no). El sentido fisiológico de esta heterogeneidad reside probablemente en la sinergia de diferentes piezas de un mismo sistema, cuyo objetivo es la homeostasis energética (Quarta et al., 2021) (Figura 10).

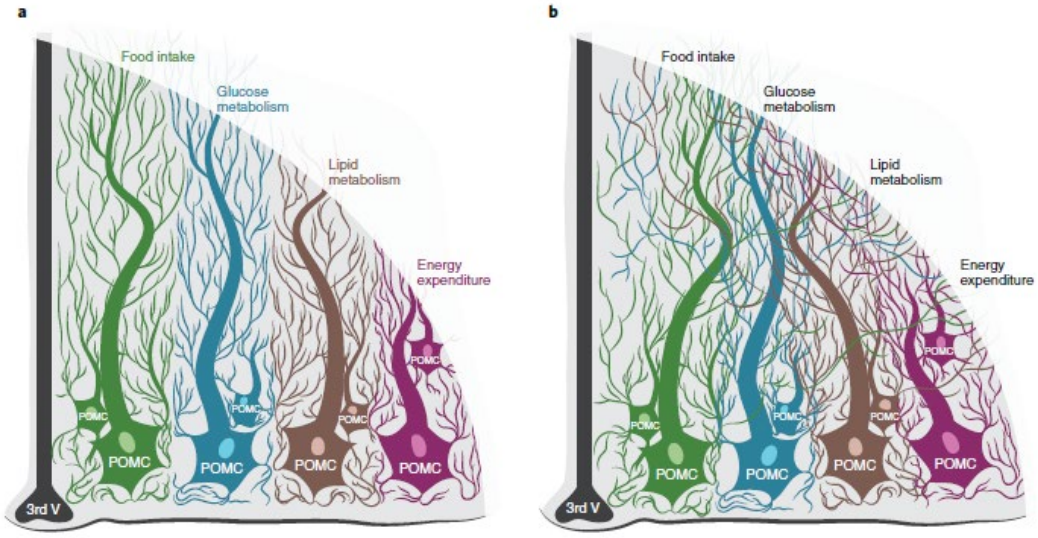


Figura 10. Dos modelos teóricos sobre las neuronas POMC. a) Diferentes neuronas regulando diferentes funciones. B) Diferentes neuronas convergen para modular la misma función y/o las diferentes neuronas actúan en múltiples funciones. Reproducida con permiso de Springer Nature (License: 5645330595525) (Quarta, et al., 2021).

Igual que para AgRP/NPY, una de las proyecciones más importantes de las neuronas POMC es el PVH, donde la expresión de MC4R es elevada y la activación farmacogenética de las neuronas del PVH que expresan MC4R reduce significativamente la ingesta (Garfield et al., 2015). Poniendo de manifiesto la importancia de las conexiones ARC↔PVH en la regulación de la homeostasis energética (Figura 9).

Por último, en el ARC también se encuentran poblaciones neuronales distintas a las explicadas previamente. Por ejemplo, neuronas que expresan oxitocina, liberan glutamato, pero no expresan POMC y promueven saciedad a través de proyecciones al PVH (Fenselau et al., 2017). Otras neuronas orexigénicas y dopaminérgicas, activadas por ghrelina que se cree que regulan la actividad de AgRP/NPY y POMC vecinas (X. Zhang & van den Pol, 2016). Además, los ratones que expresan la Cre recombinasa bajo el promotor de la insulina de rata (RIP-Cre), también presentan un grupo de neuronas en el ARC, diferentes a POMC y AgRP (Kong et al.,

2012). Asimismo, se ha identificado un subtipo de neuronas GABAérgicas que expresan prepronociceptina, cuya activación surgen con comidas "apetecibles" generando hiperfagia.

Finalmente, evidencias actuales también indican el papel clave de los astrocitos del ARC en el balance energético (García-Cáceres et al., 2019).

1.4.2 Núcleo ventromedial

El núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), se encuentra también en la región MBH, adyacente al tercer ventrículo (3V, *third ventricle*) y situado justo encima del ARC y la ME. Su citoestructura se diferencia a simple vista, ya que a su alrededor encontramos pocas células y una región densa en fibras. Está constituido por un grupo de células bilaterales al 3V con forma elíptica, que se estiran lateralmente a medida que se extienden rostro-caudalmente (Kim, Sohn, et al., 2011; McClellan et al., 2006). El VMH fue identificado como uno de los primeros núcleos encargados de la homeostasis energética, denominado por ciertos autores como "centro de saciedad", ya que lesiones en esta área (muchas veces afectando a zonas vecinas), inducían hiperfagia y obesidad (Hetherington, 1944; Hetherington & Ranson, 1942; B. MKing, 2006). De igual manera, otros estudios previos indicaron la posible implicación del VMH en: la homeostasis de la glucosa (Bernardis & Frohman, 1971; W. P. Borg et al., 1994), el comportamiento sexual o reproductivo (Cohen & Pfaff, 1992; Emery, 1984) y el control de la termogénesis en el BAT a través del SNS (Niijima et al., 1984).

Hoy en día, la relevancia del VMH en el control de la homeostasis energética se ha consolidado, confirmándose su importante papel regulador sobre la masa corporal (Dhillon et al., 2006; Kim, Sohn, et al., 2011b), la homeostasis de la glucosa (Tu et al., 2022), la termogénesis en el BAT (Liu et al., 2020; Seoane-Collazo et al., 2015), comportamientos de agresión (D. Lin et al., 2011) y el comportamiento sexual femenino (C. F. Yang et al., 2013).

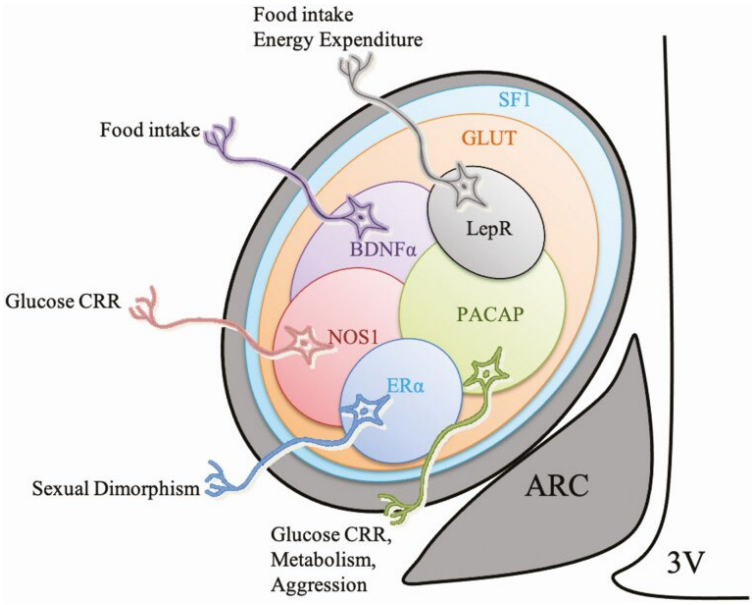


Figura 11. Principales poblaciones descritas en el VMH y su papel en sus diferentes funciones fisiológicas y comportamentales. Reproducida con permiso de Creative Commons (Khodai, et al., 2021)

El VMH está constituido por una serie de neuronas, la mayoría de ella glutamatérgicas (Fu & van den Pol, 2008; Ziegler et al., 2002), pero que a su vez presentan patrones de expresión muy diferentes, lo que permite a agruparlas y distribuirlas anatómicamente en zonas diferenciadas del ventromedial (VMHvl, zona ventrolateral; VMHc, zona central; VMHdm zona dorsomedial). Entre los principales marcadores del VMH encontramos: el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP, *pituitary adenalyte cyclase activating polypeptide*), la óxido nítrico sintasa (NOS1, *nitric oxide synthase*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrofic factor*), el receptor de estrógenos alfa (ERα, *estrogen receptor alpha*) y el receptor de leptina (LepR, *leptin receptor*) (Khodai & Luckman, 2021) (Figura 11). Entre todos

ellos, uno de los más destacados es SF1, proteína codificada por el gen *Nr5a1,* que es el único gen cuya expresión es específica y exclusiva de este núcleo en comparación con los otros marcadores. SF1 es esencial para el desarrollo del VMH y para sus funciones fisiológicas y por tanto será tratado en un epígrafe aparte de este trabajo[2] (Bingham et al., 2008; Choi et al., 2013; Dhillon et al., 2006; K. Kim, Sohn, et al., 2011; Kurrasch et al., 2007; McClellan et al., 2006; Segal et al., 2005). Recientemente, estudios de secuenciación de ARN mensajero de una única célula, han mostrado como el VMHvl parece ser una zona con un perfil transcripcional diferente, presentando ausencia de expresión de SF1 en etapas adultas (Cheung et al., 2013; Kim et al., 2019). En concreto, en esta zona es donde se encuentra la población de células que expresan ERα, y es la zona más relacionada con el comportamiento sexual, presentando un gran dimorfismo entre machos y hembras (Kammel & Correa, 2020; Yang et al., 2013). En el trabajo de van Veen y colaboradores, también mediante secuenciación de ARN mensajero de una única célula, descubren 6 agrupaciones de transcritos bien diferenciados en el VMH constituidas por: *Tac1, Rprm, Pdyn, Sst, Hpcal1* y *Gal.* Su importancia y relación con las poblaciones neuronales clásicas todavía está por definir (Veen et al., 2020).

El VMH, igual que el ARC, presenta receptores para leptina e insulina y juega un papel fundamental en sus funciones, que en el caso de ambas hormonas depende de las neuronas SF1 (Bingham et al., 2008; Dhillon et al., 2006; Klöckener et al., 2011). Aunque en el caso de leptina, también se ha visto que las neuronas que expresan PACAP, tienen un rol importante (Hawke et al., 2009). La ghrelina también ejerce sus efectos en parte, a través del VMH (explicado previamente más en detalle) (Chen et al., 2005; López et al., 2008; Ramírez et al., 2013). En su comunicación con el ARC, parece que durante el ayuno se reduce el tono inhibitorio desde neuronas del VMH a las neuronas POMC del ARC (Sternson et al., 2005), y a su vez en el VMH el ayuno aumenta la expresión de MC4R, que sin embargo presentan una menor sensibilidad a α-MSH, debido a la acción de AgRP sobre las neuronas del VMH (Harrold et al., 1999; Y. Z. Li & Davidowa, 2004).

BDNF también presenta una expresión muy temprana en el VMH (McClellan et al., 2006), expresándose desde el nacimiento. Su deleción temprana en el cerebro da lugar a hiperactividad y obesidad (Rios et al., 2001), mientras que su deleción en adultos específica en el VMH y en DMH también da lugar a un fenotipo obeso debido a hiperfagia. En concreto parece que BDNF disminuye sus niveles durante el ayuno y juega un papel clave la señalización de MC4R en el VHM y sus efectos metabólicos (B. Xu et al., 2003). Aunque estas neuronas no expresan LepR, parece que sí responden a esta aumentando la expresión de BDNF (Liao et al., 2012). De hecho, la administración de BDNF directamente en el VMH reduce la masa corporal y la ingesta, incluso durante una coadministración con NPY (Wang et al., 2007).

El VMH también está implicado en la regulación de la homeostasis de la glucosa como indicaron los primeros estudios de lesiones (Borg et al., 1994; Hetherington & Ranson, 1942). La administración de 2-deoxiglucosa (2-DG), inhibe la glucólisis debido a su acumulación como 2-DG-6-fosfato, impidiendo que continúe con la ruta. Esto da lugar a una hiperglucemia al activar la respuesta contrarreguladora para aumentar los niveles de glucosa (Tu et al., 2022). Borg y colaboradores mostraron que la inducción de glucopenia en el VMH, al administrar 2-DG en este núcleo, daba lugar a un aumento enorme en los niveles de glucosa en sangre, al liberarse grandes cantidades de glucagón, norepinefrina y epinefrina (Borg et al., 1995). Sin embargo, la infusión de glucosa en el VMH daba lugar al efecto contrario, bloqueando la liberación de glucagón incluso durante una hipoglucemia periférica (Borg et al., 1997). Las neuronas SF1 también juegan un importante papel en la regulación de glucosa y se tratarán en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[2] Ver **1.5 Neuronas SF1 y su implicación n la regulación de la homeostasis energética** – página 39

detalle más adelante. Otras poblaciones del VMH, como las neuronas que expresan ERα, también son sensibles a glucosa y previenen la hipoglucemia (He et al., 2020; Tu et al., 2022).

1.4.2.1 VMH y regulación de la termogénesis en el BAT

Por último, el VMH es un importante regulador del gasto energético. Hace años se observó como la estimulación eléctrica de este núcleo daba lugar a un aumento de la termogénesis en el BAT, cuyo efecto se abolía al administrar antagonistas β3-adrenérgicos (Perkins et al., 1981). Además, lesiones en este núcleo daban lugar a una ausencia en el aumento de actividad característico de los nervios que inervaban el BAT durante una exposición a frío (Niijima et al., 1984). La administración de ciertos neuropéptidos en el VMH como: glutamato, norepinefrina, serotonina y triptófano también aumentan el tono simpático sobre el BAT (Halvorson et al., 1990; Sakaguchi & Bray, 1989). A pesar de estos estudios previos, ciertos trabajos muestran discrepancias con la regulación de la termogénesis en el BAT a través del VMH, debido a la falta de controles anatómicos, volúmenes muy elevados y a la falta de evidencia de infección transináptica por medio de virus de la pseudorrabia inyectados en el BAT (Bamshad et al., 1999; Cano et al., 2003; Morrison et al., 2014). Los circuitos neuronales específicos, a través de los cuales el VMH regula la termogénesis en el BAT, todavía no están completamente elucidados (Cannon & Nedergaard, 2004). Sin embargo, se sabe que el VMH, más concretamente las neuronas SF1, proyectan caudalmente a través de la sustancia gris central (PAG, *periaqueductal grey*) a centros autonómicos del tronco del encéfalo como el núcleo parabraquial (PBN, *parabrachial nucleus*), el locus cerúleo (LC, *locus ceruleus*), el NTS, el núcleo retrotrapezoide (RTN, *retrotrapezoid nucleus*) y el grupo de células de catecolaminas C1 de la parte rostral de la médula ventrolateral (RVLM, *rostral ventrolateral medulla*). Regiones que sí se sabe que ejercen un control sobre el SNS-BAT (Bamshad et al., 1998, 1999b; Bartness et al., 2010; Cano et al., 2003; Morrison, 1999; Morrison, 2011; Uno & Shibata, 2001). Así como, a otras regiones implicadas en el control del SNS como el ARC y el PVH (Lindberg et al., 2013). Además, la deleción de SF1 en el VMH, tanto de forma prenatal como post-natal, también impide que se produzca un aumento en la termogénesis inducida por dieta, ya que estos animales no son capaces de aumentar su EE, su consumo de O_2, o sus niveles de UCP1 tras una exposición a HFD (Kim, Zhao, et al., 2011). Recientemente, Hui Ye y colaborades han descrito como las neuronas ERα del VMHvl son capaces de inducir termogénesis tras su activación, debido a sinapsis glutamatérgicas directas sobre neuronas serotoninérgicas de la región dorsal del RPa (Ye et al., 2022). Por otro lado, otro estudio reciente ha mostrado como una población de neuronas del VMHdm, que expresan prodinorfina y se activan tras una exposición a frío, también presentan conexiones bidireccionales con otras regiones muy implicadas en la termogénesis como el DMH, POA y PAG. Además, muestran como estas neuronas son capaces de inducir un gran efecto termogénico tras su activación (Feng et al., 2022).

Evidencia de nuestro grupo ha revelado el posible mecanismo molecular por el cual el VMH regula la termogénesis en el BAT. La proteína quinasa activada por AMP, AMPK, parece ser un regulador negativo de la activación del BAT a través del SNS. Diferentes señales periféricas como las hormonas tiroideas (López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017), el estradiol (E_2 *estradiol*) (Martínez de Morentin et al., 2014), BMP8b (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012) y drogas como la nicotina (Martínez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014) o la liraglutida (Beiroa et al., 2014) y la leptina (Tanida et al., 2013a) todas ellas ejercen un efecto termogénico en el BAT y/o inducen *browning* sobre el WAT, tras inhibir AMPK a nivel hipotalámico y en muchos casos de forma específica en el VMH. Estableciendo el eje

AMPK (VMH)-SNS-BAT como un mecanismo canónico de la regulación del balance energético (Figura 12) (López et al., 2016).

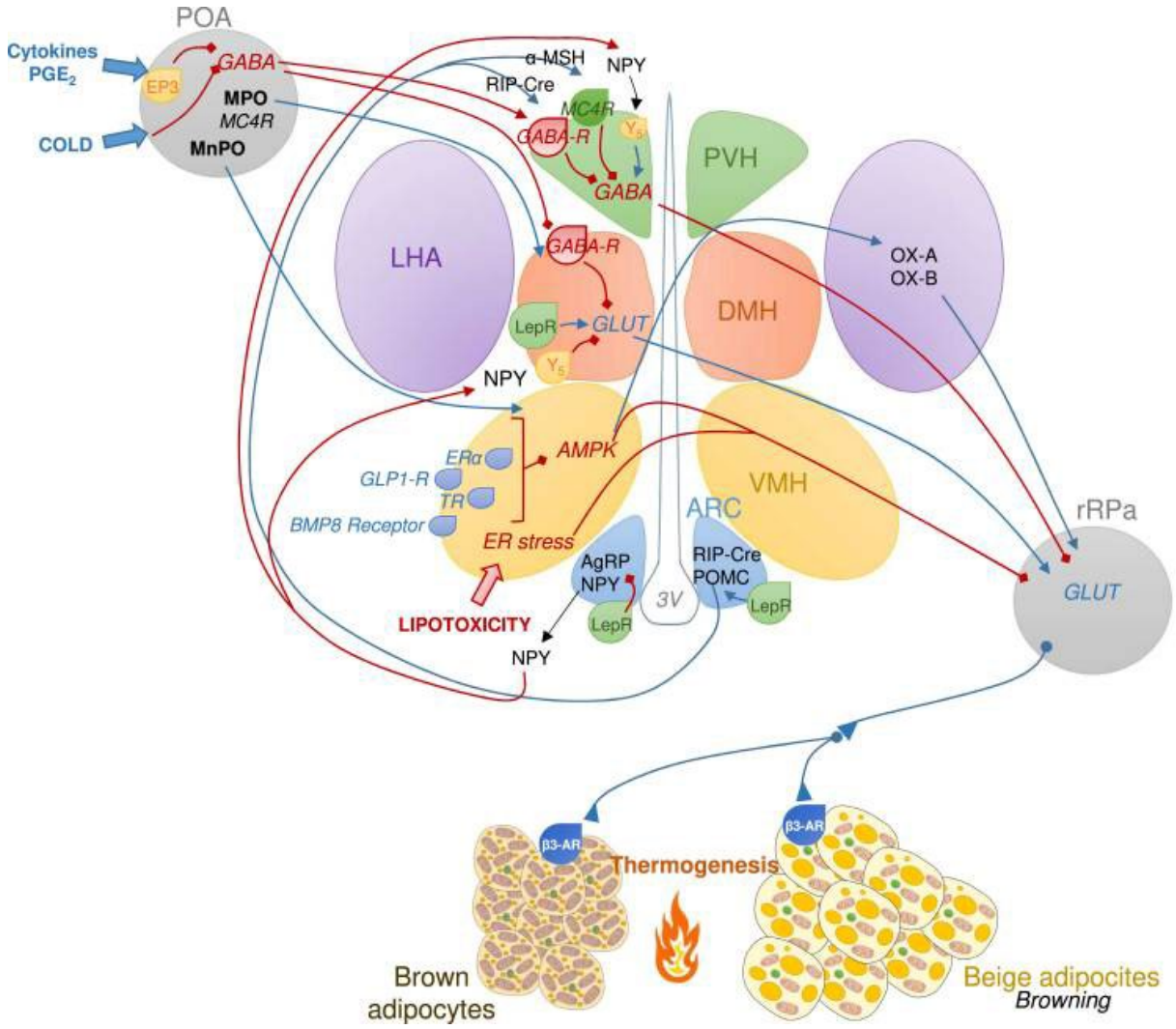


Figura 12. Circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la termogénesis en el BAT y el *browning* del WAT. Reproducida con permiso de Creative Commons (Contreras, et al., 2017).

Por último, también se ha demostrado como ciertas señales lipídicas, como las ceramidas, están relacionadas con la termogénesis. Su acumulación en el hipotálamo durante estados de HFD, o mediante su administración ICV, da lugar a un fenómeno que se conoce como lipotoxicidad, provocando estrés del retículo endoplasmático (ER, *endoplasmatic reticulum*), causando una reducción del tono simpático al BAT. Sin embargo, este efecto puede revertirse al sobreexpresar la proteína chaperona regulada por glucosa 78 (GRP78/BiP, *chaperone glucosa regulated protein 78/binding inmunoglobulin protein*), de forma específica en el VMH (Contreras et al., 2014). Un estudio también apunta que la termogénesis en el VMH puede estar coordinada a su vez por los ciclos circadianos, ya que, la deleción de *Bmal1* (una proteína de los genes reloj que regula los ritmos circadianos) en las neuronas SF1, da lugar a un aumento de la termogénesis de estos animales y del gasto energético durante la noche (Orozco-Solis et al., 2016).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.4.3 Núcleo Dorsomedial

El núcleo dorsomedial se encuentra inmediatamente dorsal al VMH y también se encuentra bilateralmente a ambos lados del 3V. Se encuentra involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos como el apetito, la termorregulación, el estrés o los ritmos circadianos. Esto es debido a la gran cantidad de proyecciones que recibe, como por ejemplo desde el ARC y a su vez a las que emite a otros núcleos como el LHA, el PVH o más caudalmente hacia el tronco del encéfalo (Schneeberger et al., 2014; Williams et al., 2001).

Lesiones eléctricas en este núcleo daban lugar a una menor ingesta, con un efecto menos significativo que en el VMH (Bernardis & Bellinger, 1998). De forma paralela, la administración de distintos neuropéptidos orexigénicos inducía ingesta (Kalra et al., 1999). Diferentes señales orexigénicas como NPY o anorexigénicas como leptina, convergen en este núcleo para regular la ingesta y el gasto energético. La coadministración de leptina y NPY aumentaba los niveles de c-FOS en el DMH, sugiriendo que ambas señales se integraban en dicho núcleo para atenuar o inhibir la ingesta mediada por leptina (Elmquist, Ahima, et al., 1998; Yokosuka et al., 1998). Se cree que el DMH también puede modular la NTS en el BAT a través de receptores de leptina o a través de NPY (Chao et al., 2011; Enriori et al., 2011; Y. Zhang et al., 2011). A diferencia de la expresión de NPY en el ARC, la expresión en el DMH no está bajo el control de la leptina (Bi et al., 2003), sino por los niveles de CKK en el cerebro y otras moléculas todavía por identificar. Estas neuronas proyectan al tronco del encéfalo (al NTS y al núcleo motor dorsal del nervio vago (DMV, *dorsal motor nucleus of the vagus*)), afectando a la ingesta al modular las señales de saciedad como CKK (Bi et al., 2012; L. Yang et al., 2009). Además, parece que NPY en el DMH, también juega un papel sobre el gasto energético, promoviendo la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT inguinal cuando se disminuye su expresión mediante virus (Chao et al., 2011).

El DMH también es núcleo importante en la termorregulación, al tener conexiones directas con el RPa y la IO y regulando también la NST del BAT (Bernardis & Bellinger, 1998; DiMicco & Zaretsky, 2007). Por ejemplo, durante la fiebre (PGE_2) o una exposición a frío (receptores cutáneos), ambos estímulos producen una inhibición de las neuronas del POA, que a su vez mantienen un tono inhibitorio con el DMH, mediado por GABA. De esta manera, las neuronas del DMH se activan y a través de conexiones glutamatérgicas directas con el RPa o la IO, aumentarían la termogénesis en el BAT, para ayudar a defender la temperatura corporal ante ambos estímulos (Cao & Morrison, 2006; Morrison, 2011; Seoane-Collazo et al., 2015). Por último, también se cree que es una región involucrada en la hipertermia asociada al estrés (DiMicco & Zaretsky, 2007).

Finalmente, un trabajo reciente ha encontrado una población de neuronas en el DMH, que co expresan LepR y GLP-1R, que son GABAérgicas, cuya ablación genética da lugar a un fenotipo obeso, por un aumento en la ingesta sin cambios en el gasto energético. El fenotipo parece más severo que en animales que carecen de LepR en neuronas del ARC, como POMC o AgRP, proponiéndose como una población diana muy interesante a la hora de mediar las acciones de la leptina y los agonistas de GLP-1 (Rupp et al., 2023).

1.4.4 Núcleo Paraventricular

El núcleo paraventricular o PVH es el que presenta una posición más dorsal respecto a los anteriores, situándose bilateralmente también a ambos lados del 3V, pero en una posición más anterior que los núcleos mencionados previamente. Representa un centro integrador muy importante en el hipotálamo, con funciones neuroendocrinas, autonómicas y conductuales (Timofeeva et al., 2017). Forma parte de dos ejes importantes para la homeostasis energética como son el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y el eje hipotalámico-hipofisario-

tiroides (HPT) (Nieuwenhuizen & Rutters, 2008). La regulación de estos ejes se logra a través de la división neuroendocrina del PVH, formada por células parvocelulares, que liberan el factor liberador de corticotropina (CRF, *corticotropin-releasing factor*) y la hormona liberadora de tirotropina (THR, *thyrotropin-releasing hormone*). CRF favorecerá la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), y THR de la hormona estimulante de la tiroides o (TSH) en la adenohipófisis. Por un lado, la administración de CRF ICV, reducirá la ingesta y aumentará la termogénesis (Arase et al., 1988; Buwalda et al., 1998) y estas neuronas parecen modular la actividad de las neuronas NPY del ARC (Campbell et al., 2003). Por otro lado, señales anorexigénicas como la leptina, α-MSH o CART, inducen la expresión de THR, activando el eje HPT y en consecuencia aumentando el gasto energético (Ghamari-Langroudi et al., 2010; Vella et al., 2011). La otra parte neuroendocrina del PVH está formada por células magnocelulares, que sintetizan vasopresina y oxitocina que son liberadas directamente en la neurohipófisis (Timofeeva et al., 2017).

El PVH recibe proyecciones directas del ARC, tanto de las poblaciones AgRP/NPY y GABA como de neuronas POMC/CART, y constituye junto con él, un núcleo fundamental en la vía de las melanocortinas (Cone, 2005; Schwartz et al., 2000). La importancia del PVH en la regulación de la ingesta surge de: estudios de lesiones donde se veía que los ratones desarrollaban hiperfagia y obesidad (Sims & Lorden, 1986), amplia expresión de MC4R en este núcleo (Kishi et al., 2003), proyecciones de este núcleo a zonas relacionadas con la saciedad (Blevins et al., 2004; Sawchenko & Swanson, 1982) y al hecho de que la deleción de MC4R en este núcleo afecte notablemente a la ingesta de los animales, dando lugar a fenotipos obesos (Balthasar et al., 2005).

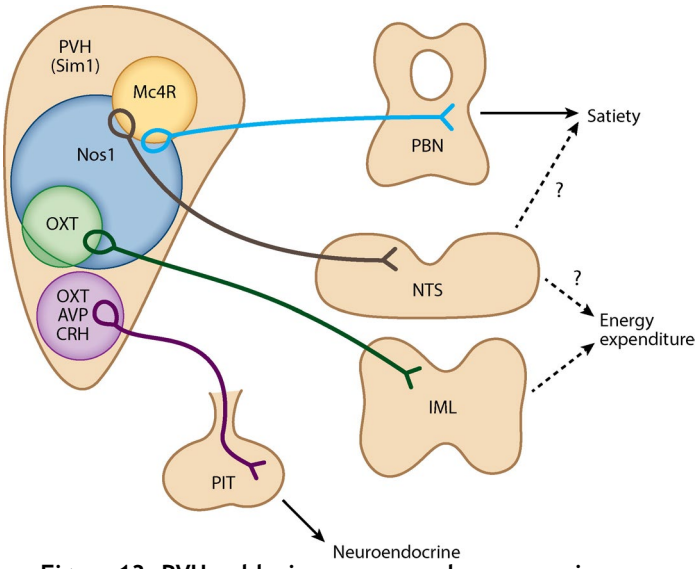


Figura 13. PVH poblaciones neuronales proyecciones y funciones metabólicas. Reproducida con permiso de Annual Reviews, Order License - 1408085-1 (Sutton, et al., 2016)

Este núcleo fue identificado como el principal núcleo encargado de conectar el hipotálamo con regiones del tronco del encéfalo relacionadas y encargadas de inducir saciedad, como el NTS, DMV y PBN (Sawchenko & Swanson, 1982). *Sim1,* un factor de transcripción necesario para el desarrollo del PVH y la amígdala que da lugar a hiperfagia y obesidad en humanos y ratones cuando se encuentra mutado (Figura 13) (Jr et al., 2000; Michaud et al., 1998). El rescate de MC4R de forma exclusiva en neuronas Sim1 del PVH, normaliza la ingesta en un 100% y reduce el fenotipo obeso en un 60% en ratones KO globales para MC4R. Sin embargo, la ausencia de efecto sobre el gasto energético apunta a que otras vías independientes de PVH-MC4R, regulan este componente de la balanza (Balthasar et al., 2005). Cuando el rescate de MC4R se hizo en neuronas Sim1 glutamatérgicas del PVH, los animales normalizaban completamente su masa corporal. Y de igual manera, la deleción de MC4R en estas neuronas, daba lugar al mismo fenotipo que en el trabajo de Balthasar y colaboradores (Shah et al., 2014). Además, se observa la ausencia de producción en estas neuronas de oxitocina, vasopresina, CRH y prodinorfina (Webber et al., 2015). Estudios paralelos identificaron el requerimiento de glutamato en la señalización vía MC4R en neuronas

Sim1, para regular ambos componentes del balance energético (Y. Xu et al., 2013). Finalmente, dentro de las neuronas Sim1, aquellas que expresan también NOS1, proyectan al rombencéfalo y médula espinal, y su activación inhibe la ingesta, aumenta el gasto energético y la actividad. Observándose además que las neuronas que liberan oxitocina pertenecen a este subtipo de neuronas Sim1 que expresan NOS1 (Figura 13) (Sutton et al., 2014).

Por último, el PVH también juega un papel importante en la regulación de la termogénesis. Estudios en ratas, muestran como neuronas en el PVH inhiben el tono simpático hacia el BAT, probablemente a través de proyecciones GABAérgicas directas, desde neuronas premotoras del RPa (Madden & Morrison, 2009). La administración de melatonan II (agonista MC4R) directamente en el PVH, aumenta la termogénesis en hámsteres (Song et al., 2008). Los diferentes rescates de MC4R en el PVH que mencionábamos previamente, tienen un efecto modesto (el caso de NOS1) o nulo sobre el gasto energético, por lo que las neuronas del PVH que regulan este aspecto parecen ser otras (Balthasar et al., 2005; Garfield et al., 2015; Sutton et al., 2014). Estudios previos ya observaron la conexión indirecta entre PVH y BAT, a través de áreas como el núcleo intermediolateral (IML, *intermediolateral nucleus*). A mayores, el PVH también presenta proyecciones a otras zonas implicadas en la termogénesis del BAT, como NTS o RPa (Figura 13) (Bamshad et al., 1999; Morrison et al., 2014; Sutton et al., 2016). La conexión PVH-ARC también tiene potencial de regular la termogénesis, ya que las neuronas RIP podrían hacerlo a través de la liberación de GABA en el PVH y sus proyecciones a través del NTS (Kong et al., 2012).

1.4.5 Área hipotalámica lateral

Como su propio nombre indica, el área hipotalámica lateral agrupa una serie de neuronas y fibras con una menor definición anatómica respecto a los núcleos previamente dichos. Se sitúa de forma lateral y dorsal al VMH, y lateralmente al DMH también. Así, como el VMH fue definido como "centro de saciedad" el LHA se postuló como "centro de ingesta", ya que, lesiones en este último en ratas y gatos daban lugar a afagia y pérdida de masa corporal, mientras que su estimulación aumentaba la ingesta (Anand & Brobeck, 1951; Delgado & Anand, 1952; Hetherington, 1944; Hetherington & Ranson, 1940, 1942; B. M. King, 2006). Con los años se ha demostrado como este núcleo tiene un papel muy relevante en comportamientos homeostáticos como: la homeostasis energética, la ingesta, ciclos de sueño-vigilia y temperatura; así como, comportamientos complejos como: búsqueda de recompensa y motivación, estrés y agresión (Arrigoni et al., 2019; Bernardis & Bellinger, 1993; Gao & Horvath, 2022; Oesch & Adamantidis, 2021; Stuber & Wise, 2016).

Junto con el PVH, las neuronas del LHA se proponen como las neuronas "de segundo orden" en la secreción de neuropéptidos y regulación de la ingesta, con la información proveniente del ARC (Schwartz et al., 2000). Los axones de las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART inervan el LHA, siendo por tanto un área reguladora de las acciones de la leptina (Elias et al., 1999; Elmquist et al., 1999; Elmquist, Maratos-Flier, et al., 1998).

En este núcleo encontramos una plétora de células que ejercen su función a través de una gran cantidad de neuropéptidos y neurotransmisores. Encontramos una gran cantidad de células glutamatérgicas y GABAérgicas, y a su vez, neuronas que expresan neuropéptidos clave en la regulación del balance energético como orexina (OX, *orexin/hypocretin*), la hormona concentradora de la melanina (MCH, *melaning-concentrating hormone*), neurotensina o galanina (Mickelsen et al., 2019; Stuber & Wise, 2016).

Las neuronas que expresan MCH se encuentran de forma predominante en el LHA, constituyendo una población distinguible a las neuronas que expresan OX (Broberger et al., 1998). Existen neuronas de naturaleza GABAérgica y glutamatérgica, implicando naturalezas

inhibitorias o excitadoras. La administración ICV de MCH induce ingesta y ganancia de masa corporal, al igual que su sobreexpresión (Ludwig et al., 2001; Qu et al., 1996). De forma contraria, los ratones *knock-out* para MCH son hipofágicos y delgados (Alon & Friedman, 2006; Shimada et al., 1998). Aparte de su rol en ingesta, parece que la activación de estas neuronas promueva la fase REM durante el sueño (Arrigoni et al., 2019; Shimada et al., 1998).

Las neuronas que expresan hipocretina (1 y 2) o orexina (A y B), también se concentran en el LHA, zona incerta y PFA y fueron descubiertas de forma simultánea por dos grupos (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Su naturaleza parece ser glutamatérgica y en contraposición a las neuronas de MCH, regulan la capacidad de estar despiertos o mantener el estado de alerta, así como la ingesta y comportamientos relacionados con la recompensa (Stuber & Wise, 2016). La inyección icv de orexina induce ingesta, mientras que su bloqueo mediante antagonistas reduce la ingesta (Harris et al., 2005; López et al., 2002; Sakurai, 1999). La ablación genética de estas neuronas da lugar a narcolepsia, mientras que su activación optogenética aumenta los períodos de vigilia (Adamantidis et al., 2007; Hara et al., 2001). Las neuronas de orexina proyectan a zonas como la amigdala, BNST y NAc, centros implicados en el procesamiento de emociones y motivación, así como recompensa. Ciertos estímulos, como comida, sexo o drogas, parecen influenciar la actividad de estas neuronas (Sakurai, 2014). Por último, estas neuronas también proyectan al RPa, siendo capaces de regular la termogénesis (Tupone et al., 2011), donde además los animales que carecen de orexina parecen ser incapaces embriológicamente de desarrollar un BAT funcional (Sellayah et al., 2011).

Estos roles opuestos de ambas poblaciones neuronales del LHA, en su regulación de los ciclos sueño-vigilia e ingesta, hacen hipotetizar a ciertos autores que los efectos observados sobre la ingesta son más bien un efecto asociado a los patrones de comportamiento naturales del animal, que ocurren en función del estado de alerta de este (Arrigoni et al., 2019; Stuber & Wise, 2016).

Por último, se han descrito dos poblaciones de neuronas del LHA, que expresan neurotensina y son capaces de regular el consumo de agua y la ingesta. Ambas presentan proyecciones a diferentes zonas hipotalámicas, y mientras unas co-expresan la forma larga del receptor de leptina, otras son activadas por deshidratación (Brown et al., 2019).

1.5 Neuronas SF1 y su implicación en la regulación de la homeostasis energética

Como se comentó previamente, las neuronas SF1 son una población de neuronas del VMH, con una especial importancia en el balance energético. La expresión del gen *Nr5a1* que codifica para la proteína SF1, se expresa de forma exclusiva en el VMH, dentro del encéfalo, proponiéndose como un candidato muy interesante para abordar las funciones de dicho núcleo. Fuera del SNC su expresión es elevada en glándulas adrenales y gónadas, con funciones relevantes durante el desarrollo (Hoivik et al., 2010). Su expresión incluye las regiones central y dorso-medial del VMH (VMHc, VMHdm) (D.-WKim et al., 2019), ya que el VMHvl parece no presentar expresión de SF1 en etapas adultas y diferenciarse a una agrupación neuronal independiente durante el desarrollo (Cheung et al., 2013; Kim et al., 2019). SF1 es necesario para un desarrollo correcto del VMH, el mantenimiento de su citoarquitectura, así como para su diferenciación y condensación final como núcleo (Figura 14) (Davis et al., 2004; Ikeda et al., 1995; Kurrasch et al., 2007; Shinoda et al., 1995; Tran et al., 2003; Zhao et al., 2008). Su ausencia también afecta a la expresión de varios marcadores tempranos en el VHM, como *Fezf1, Nkx2-2, Nptx2 A2bp1*, que presentan sitios de unión en su promotor para SF1 (Kurrasch et al., 2007).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

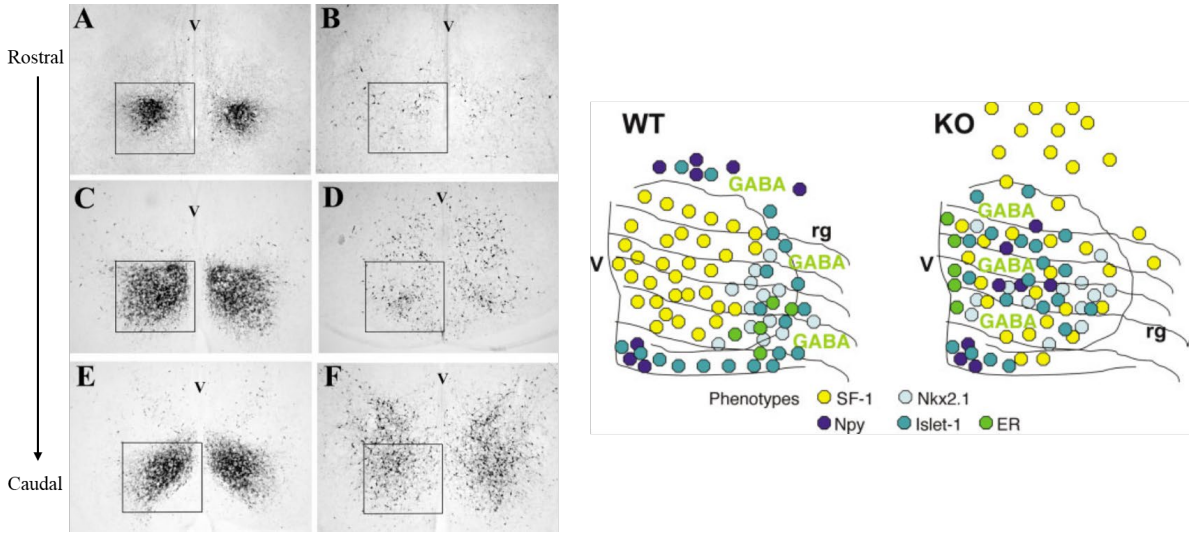


Figura 14. SF1 en el VMH y su papel clave en la citoarquitectura del núcleo. Reproducida y adaptada con permiso de John Wiley and Sons, Order License – 5655330613496 (Stuart, et al., 2014)

La importancia de SF1 en el balance energético comenzó con la observación de que los animales deficientes para esta proteína en la línea germinal presentaban una insuficiencia adrenal que les causaba la muerte (Majdic et al., 2002). Tras el rescate de estos animales con glándulas adrenales de animales *wildtype*, estos animales presentaban una notable obesidad en la etapa adulta, indicando la posible implicación de la expresión de SF1 en el VMH mediando este efecto. Como se mencionó previamente, como SF1 es necesario para un correcto desarrollo del VMH, estudios posteriores silenciaron SF1 de forma postnatal, para elucidar si se debía a la expresión de SF1 o a una formación deteriorada del VMH (Choi et al., 2013). De igual manera, la deleción postnatal de SF1 producía obesidad inducida por HFD y resistencia a leptina, indicando por tanto la necesidad de SF1 para el mantenimiento de la homeostasis energética, sobre todo en casos de exceso calórico (Kim, et al., 2011). Por otra banda, la deficiencia de SF1 también se ha asociado a comportamientos relacionados con la ansiedad (Zhao et al., 2008).

De cara a tener una visión más amplia sobre la función de estas neuronas, en los últimos 15 años se han ido desarrollando diferentes modelos transgénicos, eliminando genes concretos en estas neuronas, con implicaciones conocidas sobre el metabolismo de la glucosa y el gasto energético, de los que hablaremos a continuación. Sin embargo, previamente se tratarán aquellos avances más recientes con tecnologías neuronales más específicas como optogenética y farmacogenética (Claes et al., 2022; Clark et al., 2022; Roth, 2016).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.1 Naturaleza de las neuronas SF1 ante estímulos farmacogenéticos y optogenéticos.

De forma resumida, la optogenética se basa en el empleo de receptores fotoquímicos modificados, basados en los canales de rodopsina 2 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Su estimulación con determinadas longitudes de onda da lugar a la despolarización (activación) o hiperpolarización (inhibición) del potencial de membrana de las neuronas en las que previamente se ha expresado ese receptor, normalmente con el empleo de virus (Deisseroth & Hegemann, 2017; Kim et al., 2017). Por otra banda, la farmacogenética basada en DREADDs, se basa en receptores acoplados a proteínas G, también modificados de forma que se activan o inhiben con la administración de N-óxido de clozapina (CNO, *clozapine n-oxide*). El CNO permite la activación de neuronas durante varias horas con una simple inyección (Figura 15) (Choi et al., 2013; Claes et al., 2022; Clark et al., 2022; Roth, 2016).

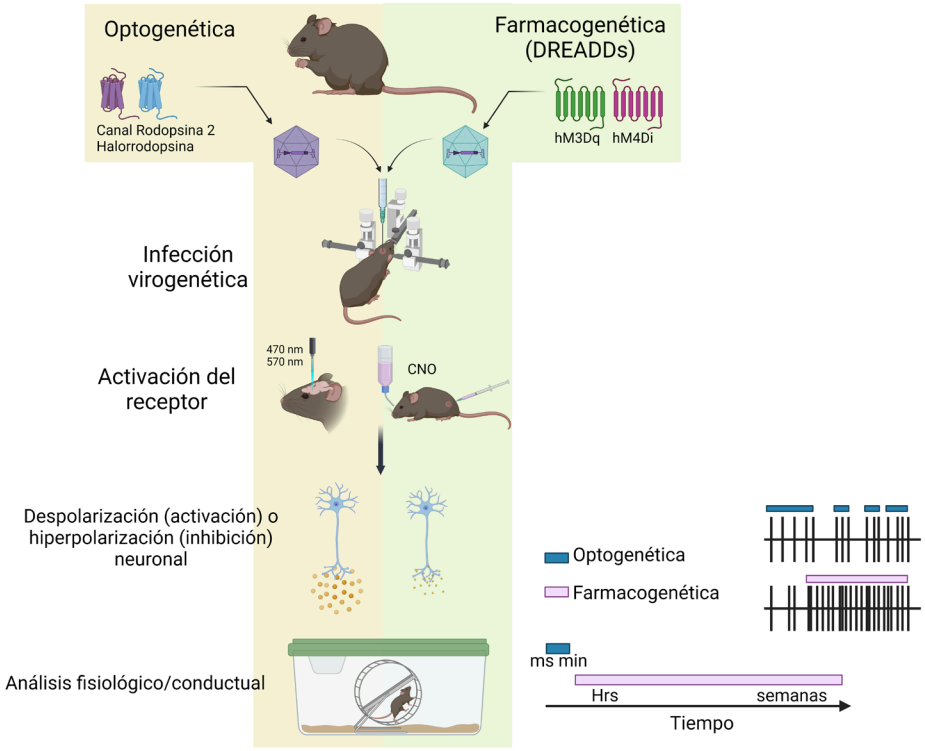


Figura 15. Resumen gráfico del funcionamento de las técnicas optogenéticas y farmacogenéticas.Figura creada con biorrender.

La inhibición farmacogenética de las neuronas SF1 elimina los comportamientos de miedo asociados a la presencia de depredadores (Silva et al., 2013). Mientras que, la activación optogenética de las neuronas SF1 a altas frecuencias (>20 Hz) (Kunwar et al., 2015; Wang et al., 2015), da lugar a una respuesta defensiva, con estados de inmovilización y escape espontáneos, mientras que, a menores frecuencias aparecen efectos sobre la ingesta, mostrando una reducción de esta tras periodos de ayuno (Viskaitis et al., 2017). En el mismo trabajo de Viskaitis vieron como la frecuencia de las neuronas varía para regular la ingesta y los estados asociados a ansiedad, donde una baja actividad permite la ingesta y un incremento en esta la disminuye (Viskaitis et al., 2017). Los mismos autores también activaron las neuronas mediante DREADDs y observaron una disminución en la ingesta, mientras que la inhibición de estas, también mediante DREADDs, aumentaba la ingesta acumulada. El uso prolongado de CNO inhibiendo o activando neuronas SF1 también acababa afectando a la masa grasa de los animales (Viskaitis et al., 2017). Coutinho y colaboradores también observan que la activación

de las neuronas SF1 mediante DREADDs disminuye la ingesta, y aumenta el gasto energético (Coutinho et al., 2017). En trabajos posteriores, se observó que este circuito de SF1 sobre la inhibición de la ingesta, probablemente involucre al PVH, y que también podría afectar al gasto energético (Zhang et al., 2020).

1.5.1.1 Implicaciones en el metabolismo de la glucosa

El VMH juega un papel clave en la homeostasis de la glucosa (Choi et al., 2013; Shimazu & Minokoshi, 2017; Tu et al., 2022). En el VMH las células SF1 pueden responder a la glucosa, siendo bien excitadas por ella (GE, *glucose-excited*) o bien inhibidas (GI, *glucosa-inhibited*), si bien el aumento de glucosa aumenta los potenciales de acción o los disminuye, respectivamente. Un estudio reciente indica que un 47% de las neuronas SF1 de la porción VMHdm y un 49% de la región VMHc, responden a glucosa (Y. He et al., 2020). Aunque más adelante se tratará como diferentes modelos *knock-out* en neuronas SF1 afectan a la homeostasis de la glucosa, reportaremos aquí los efectos que surgen de la activación o inhibición de las neuronas SF1. La estimulación optogenética de las neuronas SF1 produce hiperglucemia en ratones que no presentan otras alteraciones (Meek et al., 2016). Otros autores vieron lo mismo en neuronas NOS1 (un subtipo de neuronas SF1) (Faber et al., 2018). En contraposición, otro estudio observó que su activación mediante DREADDs no daba lugar a hiperglucemia, sino lo contrario, menores niveles de glucosa durante test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucosa tolerance test*) y test tolerancia a insulina (ITT, *insulin tolerance test*), a través de una mejora en la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos (Coutinho et al., 2017). Algo similar encontraron Toda y colaboradores, donde la inactivación de SF1, da lugar un empeoramiento en el metabolismo de la glucosa (Toda et al., 2016). Sin embargo, en otro estudio de Zhang observan que la activación farmacogenética de las neuronas SF1, induce hiperglucemia, resulta en peor tolerancia a la glucosa y reduce la sensibilidad a la insulina (Zhang et al., 2020). Las discrepancias en estos estudios probablemente se deban a la heterogeneidad de las células SF1, y a diferentes agrupaciones de neuronas SF1 sobre las que se incide en estos estudios (Choi et al., 2013; Tu et al., 2022).

1.5.2 Animales genéticamente modificados en neuronas SF1

1.5.2.1 Receptores de hormonas y otras moléculas señalizadoras

Tras el desarrollo de los ratones SF1-Cre, muchos grupos han generado distintos modelos *knock-out* para genes implicados en la obesidad o la diabetes, de forma específica en las neuronas SF1. Uno de los trabajos más clásicos sobre las neuronas SF1, es el de Dhillon y Lowell, donde muestran que las neuronas SF1 son activadas por leptina, y que la deleción de LepR de forma específica en neuronas SF1, daba lugar a un gran aumento en la masa corporal de forma independiente a la ingesta y mostrando además la incapacidad de estos animales a adaptar su gasto energético, ante un consumo de dieta alta en grasa (Dhillon et al., 2006). Posteriormente, en el mismo grupo eliminaron SOCS3 (Figura 16) (un regulador negativo en la señalización de leptina) en neuronas SF1, estos animales presentaban una mayor sensibilidad a la leptina, una menor ingesta y aunque no presentaban cambios en la masa corporal, presentaban una mejor homeostasis de la glucosa en contextos de dieta alta en grasa (Zhang et al., 2008). En otro estudio, la eliminación de *Ptpn1* o la proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP1B, *protein-tyrosine phosphatase 1B*) (Figura 16) otro regulador negativo en la señalización de leptina en neuronas SF1, aumentaba la sensibilidad a leptina, con una menor ingesta. En donde las hembras presentaban un incremento en la masa corporal en HFD, debido a un aumento en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la señalización de la insulina en las neuronas SF1, que con el tiempo supera a las acciones de la leptina resultando en obesidad (Chiappini et al., 2014).

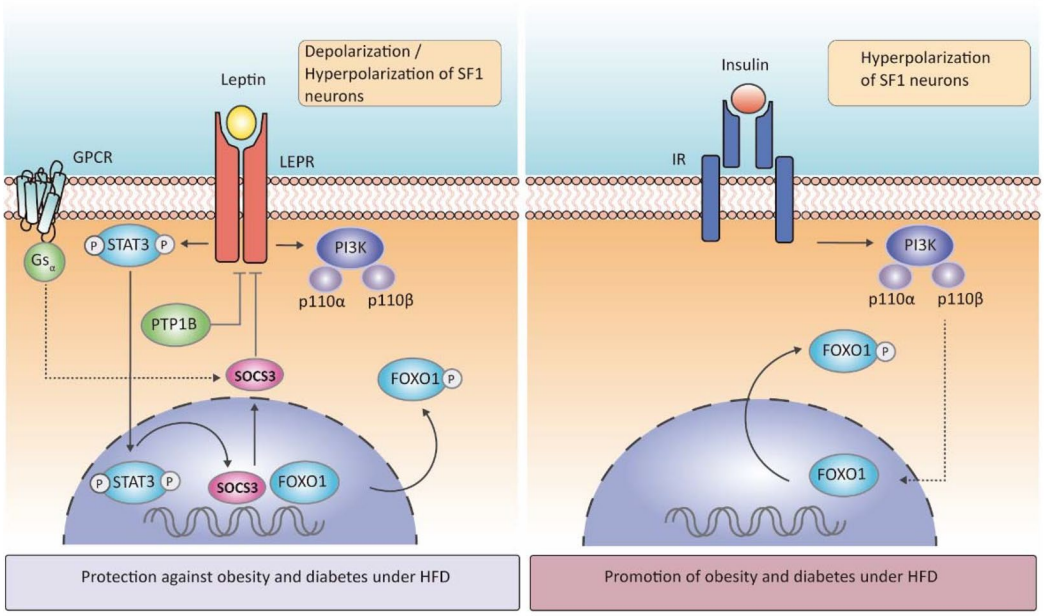


Figura 16. Receptores de leptina e insulina y dianas moleculares relacionadas con la señalización de los mismos. Reproducida con permiso de Creative Commons (Fosch, et. al 2021)

Continuando con otra de las hormonas más relevantes en el balance energético, varios autores han eliminado proteínas relacionadas con la ruta de la insulina en las neuronas SF1. Ratones que carecen del IR en neuronas SF1 no muestran diferencias de masa corporal en condiciones estándar, pero cuando son alimentados con HFD presentan una resistencia a la misma, con un menor masa corporal y adiposidad, una mejor sensibilidad a la leptina y homeostasis de la glucosa. Estos ratones también presentan un aumento en la actividad de las neuronas POMC. Los autores plantean que durante HFD, los elevados niveles de insulina activan la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*) abriéndose canales de potasio que conllevan a una disminución en la actividad de las neuronas SF1 (Klöckener et al., 2011). La eliminación de P110α y P110β (Figura 16), las subunidades catalíticas de PI3K en neuronas SF1, dan lugar a un menor EE y una mayor susceptibilidad a HFD, con P110β además afectando a la sensibilidad a la insulina periférica (Fujikawa et al., 2019; Xu et al., 2010). La eliminación de FOXO1 (*forkhead box protein O1*) (Figura 16), un factor de transcripción *downstream* en la vía de la insulina y PI3K, da lugar a un fenotipo delgado con un elevado gasto energético incluso durante estados de ayuno (Kim et al., 2012). Aparentemente la leptina e insulina actúan sobren diferentes agrupaciones de neuronas SF1, de manera que leptina puede activar e inhibir neuronas SF1, mientras que la insulina solo las inhibiría (Sohn et al., 2016). Por último, otras hormonas importantes en el balance energético son los estrógenos. La eliminación de ERα en las neuronas SF1 da lugar a fenotipos obesos, debido a un menor gasto energético y a una menor capacidad termogénica del BAT, de forma exclusiva en hembras (Xu et al., 2011).

De estos estudios cabe destacar el importante papel que juegan las neuronas SF1 en el balance energético y la homeostasis de la glucosa, sobre todo en condiciones de dieta alta en grasa (Fosch et al., 2021).

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.2.2 Neurotransmisores y receptores

Previamente ya se mencionó como la mayor parte de neuronas de VMH son glutamatérgicas, mientras que muy pocas son GABAérgicas y estas suelen distribuirse por la zona exterior (s*hell*) del VMH (Fu & van den Pol, 2008). Nuevamente, el grupo de Lowell desarrolló un ratón que carecía del transportador de glutamato vesicular 2 (VGLUT2, *vesicular glutamate transporter 2*) en las neuronas SF1. Estos ratones presentaban cierto grado de obesidad, solo en condiciones de HFD, debido a una deficiente homeostasis de la glucosa incluso en ayuno y a una respuesta contrarreguladora deficiente (Tong et al., 2007). Durante *clamps* hipoglucémicos estos animales eran incapaces de producir hormonas hiperglucemiantes como glucagón o adrenalina, así como aumentar la expresión de enzimas gluconeogénicas en el hígado. Este trabajo fue de los primeros en manifestar la importancia de las neuronas SF1 en la respuesta contrarreguladora (Choi et al., 2013). Recientemente, otro grupo ha mostrado como la deficiencia del receptor metabotrópico de glutamato 5 (*mGluR5, metabotropic glutamate receptor 5*) afecta a la actividad, excitabilidad y transmisión de señales en las neuronas SF1, de forma exclusiva en hembras, facilitando el control lipídico y glucémico. Posicionando a este receptor como clave en la señalización de los estrógenos en el VMH (Fagan et al., 2020).

La señalización de endocannabinoides también es relevante para el balance energético. La eliminación del receptor de cannabinoides 1 (CB1R, *cannabinoid type-1 receptor*), en las neuronas SF1 afecta a la flexibilidad metabólica de los animales y su respuesta a la leptina. Así en condiciones de STD estos animales, disminuyen su adiposidad debido a un mayor tono simpático y una mayor lipólisis y, sin embargo, en condiciones de HFD, se produce una resistencia a leptina y un aumento de la adiposidad (Cardinal et al., 2014). Sin embargo, recientemente otro grupo observó como la eliminación de CB1R en neuronas SF1, no alteraba la masa corporal de los animales en condiciones STD o HFD y solo vieron cambios en la homeostasis de la glucosa (Castorena et al., 2021).

1.5.2.3 SIRT1 y AMPK

La sirtuina 1 (SIRT1, *sirtuin 1*) es una desacetilasa cuya expresión también se encuentra en el VMH y parece ser relevante para el balance energético (Coppari, 2012). La eliminación de SIRT1 en neuronas POMC, da lugar a una mayor susceptibilidad a HFD, especialmente en hembras debido a una reducción en el gasto energético, afectando también a las acciones centrales de la leptina (Ramadori et al., 2010). En el caso de las neuronas SF1, ocurre lo mismo solo que en ambos sexos. Los ratones son más susceptibles a HFD debido a una reducción el gasto energético, la actividad locomotora y presentan una elevada resistencia a insulina en el músculo esquelético. Esto se cree que es debido por una respuesta alterada a orexina A y leptina. Sin embargo, la sobreexpresión de SIRT1 en SF1 da lugar a una resistencia a obesidad inducida por dieta y al desarrollo de resistencia a la insulina (Ramadori et al., 2011). También se ha observado como SIRT1 actúa como un sensor de nutrientes en el VMH, proporcionando información al SCN y conectando la ingesta con los ritmos circadianos (Orozco-Solis et al., 2015). En ausencia de luz y nutrientes, SIRT1 en el VMH contribuye a la actividad y expresión de genes en el SCN. La eliminación de BMAL1 en neuronas SF1, también da lugar a alteraciones en el reloj circadiano, afectando a la termogénesis en el BAT (Orozco-Solis et al., 2016), reforzando la idea de que las neuronas SF1 son importantes para el mantenimiento de los ritmos circadianos y la homeostasis energética (Fosch et al., 2021).

AMPK será tratada en detalle en el siguiente apartado debido a su importancia dentro de esta tesis doctoral. Sin embargo, aquí introduciremos uno de los modelos también más relevantes en esta tesis doctoral, como es el *knock-out* de AMPKα1 en las neuronas SF1 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). En este ratón,

la ausencia de la isoforma catalítica α1 de AMPK, da lugar a una disminución en la masa corporal, sin afectar a la ingesta y con un incremento en el gasto energético y la termogénesis en el BAT. Estos ratones presentan además una mayor captación de glucosa por el BAT (medida mediante 18-fluorodeoxiglucosa), así como un incremento de los marcadores termogénicos y del tono simpático. Ante una exposición a dieta alta en grasa, estos animales presentaban una disminución de la masa corporal de forma independiente a la ingesta, siendo resistentes al desarrollo de obesidad. Nuevamente esto se debía a un aumento del gasto energético y de la termogénesis en el BAT, así como de *browning* en el WAT. Por último, estos animales también presentaban una mejora en el manejo de la glucemia, pero sin cambios en la sensibilidad a la insulina en condiciones de HFD (Figura 17) (Seoane-Collazo et al., 2018).

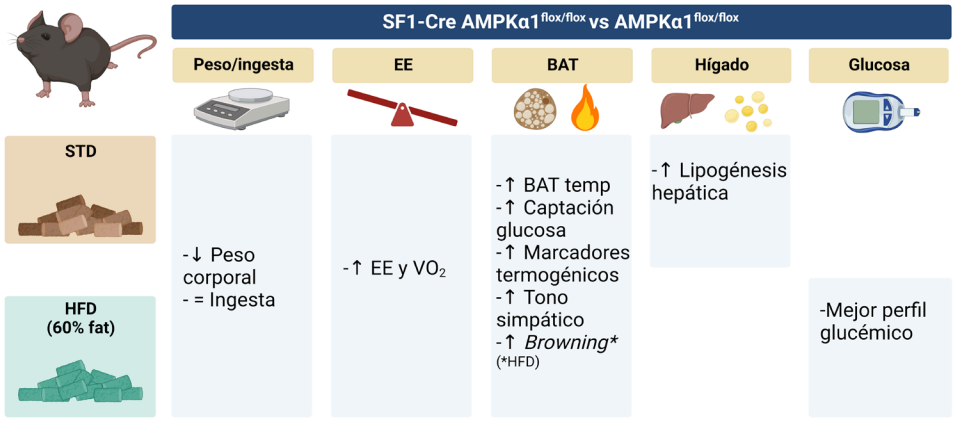


Figura 17. Características fenotípicas del ratón SF1-Cre AMPKα1$^{flox/flox}$. Figura creada con biorrender.com

1.6 AMPK SENSOR ENERGÉTICO GLOBAL

La homeostasis energética también es esencial que esté en equilibrio en el entorno celular. La mayoría de los procesos que requieren energía en las células eucariotas, provienen directa o indirectamente de la hidrólisis de ATP a ADP, AMP y grupos fosfato. Se podría establecer una analogía entre los niveles de estos nucleótidos y una batería recargable. Una ratio elevada de ATP/ADP significaría que tenemos la batería alta, bien cargada, mientras que, si esta ratio cae la batería celular empezaría a estar baja (Hardie, 2016). La célula necesita entonces de sensores energéticos, que le permitan detectar estos cambios y actuar en consecuencia manteniendo la homeostasis energética celular. Aquí surge la quinasa activada por AMP o AMPK, monitorizaría los niveles de energía celular (Carling, 2017; Carling et al., 2011; López et al., 2016). AMPK, es una serina/treonina quinasa, muy conservada evolutivamente, con ortólogos de sus subunidades en todas las especies de eucariotas, excepto algún parásito intracelular obligado, y que constituye el principal sensor energético de las mismas (Hardie, 2008). De hecho, estrictamente hablando, AMPK es el único sensor energético puro.

Al detectar los cambios en las ratios de ATP, ADP y AMP, AMPK se activará durante aquellos procesos que consumen la energía celular (estrés, hipoxia, hipoglucemia) o que aumentan el consumo de ATP (contracción muscular). De forma global, su respuesta será reducir aquellos procesos que consumen energía (típicamente, anabólicos), como la síntesis de biomoléculas, y favorecer aquellos procesos catabólicos que la generen (oxidación de ácidos grasos, o biogénesis mitocondrial). Para, de forma simplificada, devolver a la célula a un estado de equilibrio energético, restaurar los niveles de ATP y las ratios AMP:ATP y ADP:ATP (López et al., 2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.1 Estructura y regulación de AMPK

Estructuralmente se trata de un heterotrímero, formado por: una subunidad α catalítica (con dos isoformas α1 y α2) y dos subunidades reguladoras β (isoformas β1 y β2) y γ (isoformas γ1, γ2 y γ3). Cada isoforma proviene de un gen distinto, pudiendo combinarse en total 12 heterotrímeros diferentes (Ross et al., 2016). En humanos, las diferentes subunidades presentan un patrón de expresión específico de cada tejido (Birk & Wojtaszewski, 2006; Kim et al., 2012; Lang et al., 2000; Quentin et al., 2011; Wu et al., 2013). La subunidad α, posee un N-terminal con el dominio serina/treonina quinasa, unido a un extremo C-terminal que interviene en la unión a las otras subunidades. El extremo C-terminal de la subunidad β actúa como andamio para unir la subunidades α y γ y posee una región denominada módulo de unión a carbohidratos (CBM, *carbohydrate binding domain*), también llamado dominio de unión a glucógeno (GDB, *glycogen binding domain*). Por último, la subunidad γ presenta dos dominios Bateman (Bateman, 1997) con a su vez cada uno 2 dominio sintasa-β de cistationina (CBS, *cystathionine-β-synthase*), que son aquellos que se unen a AMP, ADP o ATP (Carling, 2017; Xiao et al., 2007) (Figura 18). Aunque existen 4 potenciales sitios de unión en mamíferos, solo 3 son funcionales quedándose el CBS2, normalmente, sin unir nucleótidos (Lin & Hardie, 2018). Modelos recientes indicarían, que el CBS1 normalmente estaría ocupado con ATP, CBS4 con AMP, afectando ambos al sitio de unión del CBS3, que sería el que uniría AMP (o ADP) en competición con ATP, siendo por tanto el responsable de detectar los pequeños cambios en las ratios celulares de AMP:ATP (Gu et al., 2017).

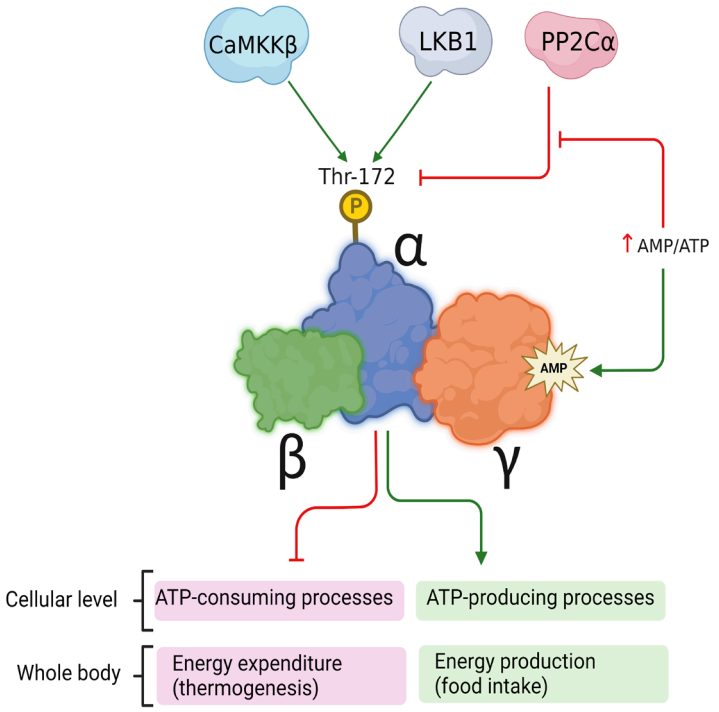


Figura 18. AMPK estructura, regulación y función. Figura creada con biorrender.com

Como su propio nombre indica, el 5'-AMP es capaz de activar AMPK, aumentando sus niveles de activación unas 10 veces. Aparte del efecto alostérico directo, el AMP facilita la fosforilación de AMPK en la treonina 172 (Thr172), en el lazo de activación que se encuentra en el dominio quinasa de la subunidad α. Esta es la principal forma de activar AMPK, aumentando sus niveles de actividad unas 100 veces más y con un efecto global de activación de 1000 veces su nivel basal (Hardie, 2008). Esta fosforilación ocurre principalmente por quinasas que se encuentran *upstream* AMPK. La fosforilación en Thr172 se consigue principalmente por un complejo heterotrimérico que contiene la quinasa hepática B1 (LKB1, *liver kinase B1*) y las pseudoquinasa relacionada con el adaptador STE20 (STRAD, *STE20-related adaptor*) y la proteína andamio, proteína de ratón 25 (MO25, *mouse protein 25*) (Hardie, 2016; Hawley et al., 2003). Aunque también se puede fosforilar por la isoforma β de la quinasa quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMKKβ o CaMKK2) (Hardie, 2014; Hawley et al., 2005; A. Woods et al., 2005). Este mecanismo alternativo permite activar AMPK ante cambios en los niveles de Ca^{+2} celular y sin cambios en los niveles de nucleótidos (aunque

ambos estímulos pueden converger para activar AMPK). Esto es relevante, ya que muchas hormonas actuarían sobre AMPK a través del aumento de los niveles de Ca^{+2} celular y la activación de CaMKKβ (Garcia & Shaw, 2017; López et al., 2016) (Figura 18). Por último, existe un tercer tipo de quinasa upstream, la quinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1, *transforming growth factor-β-kinase*), que también puede fosforilar AMPK en la Thr172, pero su relevancia fisiológica este probablemente vinculada al efecto de AMPK sobre el metabolismo proteico y vías mitogénicas (Aashaq et al., 2019; Hindi et al., 2018; Momcilovic et al., 2006; Neumann, 2018; Xie et al., 2006). De forma adicional, la unión de AMP a la subunidad γ impide la acción de fosfatasas, como la proteína fosfatasa 2Cα (PP2Cα, *protein phosphatase 2Cα*) sobre la Thr172, manteniendo a AMPK en un estado de activación (Ross et al., 2016; Sanders et al., 2007; Xiao et al., 2011).

De forma resumida, el AMP induce la activación de AMPK a través de 3 mecanismos, donde los tres son antagonizados por la unión de ATP a las subunidades γ:

1.- Promoviendo la fosforilación de la Thr172 por LKB1 y no por CAMKKβ.

2.- Evitando la desfosforilación por fosfatasas, debido a cambios conformacionales tras su unión.

3.- Activando de forma alostérica la quinasa fosforilada en Thr172.

De estos tres mecanismos se cree que el ADP también podría dar lugar a los dos primeros y aunque las concentraciones celulares son mayores que las del AMP, parece que el efecto global del ADP es menor (Gowans et al., 2013). Siendo AMP el principal regulador de AMPK (Hardie, 2016; Hardie, 2014; Lin & Hardie, 2018).

La regulación por parte de nucleótidos de adenina es fundamental, pero existen también mecanismos independientes que pueden activar AMPK. Recientemente, se ha descrito un mecanismo mediante el cual los niveles bajos de glucosa en la célula pueden incrementar la fosforilación en la Thr172 por parte de LKB1 (C.-S. Zhang et al., 2017). Durante una disminución en los niveles de glucosa intracelular, disminuyen también los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP, *frucotse 1,6-bisphosphate*), lo que altera la unión de este metabolito con la aldolasa y la ATPasa de la vacuola (v-ATPasa). Este mecanismo, da lugar a la formación de un complejo de activación de AMPK, a través de la interacción entre axina, v-ATPasa, ragulator y LKB1. De esta manera AMPK también es capaz de detectar los niveles de glucosa y prepararse para una sucesiva disminución del status energético celular (Lin & Hardie, 2018; Steinberg & Carling, 2019).

Por último, AMPK también puede ser activada por diversos compuestos como: AICAR (Corton et al., 1995), metformina, (G. Zhou et al., 2001), salicilato (Hawley et al., 2012) u otros activadores sintéticos (Cool et al., 2006; Hunter et al., 2014; Xiao et al., 2013), que se han propuesto como agentes para el tratamiento de ciertas enfermedades metabólicas (Hardie, 2016). También se han descrito diversos compuestos nutracéuticos o derivados de la medicina tradicional que activan AMPK. Todos estos compuestos activan AMPK tras convertirse a derivados similares al AMP, otros inhiben la síntesis de ATP al actuar sobre la respiración mitocondrial y finalmente otros se unen a un sitio conocido como ADaM (*allosteric drug and metabolite*), entre las subunidades α y β (Hardie, 2016; Hardie, 2008, 2014; Hardie et al., 2016).

1.6.2 Metabolismo celular

Una vez activa, AMPK fosforila una gran cantidad de proteínas *downstream*, donde trabajos recientes apuntan por lo menos a unas 60 proteínas bien caracterizadas como dianas directas de AMPK (Hardie et al., 2016b). El objetivo final, como se mencionó previamente, es devolver a la célula al equilibrio energético, inhibiendo rutas que consuman ATP, normalmente implicadas en la biosíntesis de moléculas y activando aquellas que generen ATP, a través de la

oxidación de biomoléculas. AMPK también fosforila factores de transcripción muy relevantes en rutas metabólicas (Garcia & Shaw, 2017).

1.6.2.1 Regulación de rutas catabólicas

AMPK favorece la captación de glucosa a través de la traslocación de transportadores de glucosa (GLUTs, *glucose transporter*). En el músculo durante la contracción muscular, favorece la liberación de GLUT4 y su fusión con la membrana (Pehmøller et al., 2009) y a largo plazo favorece un aumento en su expresión, al fosforilar deacetilasas nucleares (McGee et al., 2008). También favorece la traslocación de GLUT1 (Wu et al., 2013). En algunos tipos celulares, AMPK fosforila la 6-fosfofructo-2-quinasa, aumentando los niveles celulares de fructosa-2,6-bifosfato, un activador alostérico de la enzima glucolítica 6-fosfofructo-1-quinasa, activando por tanto la glucolisis celular (Rider et al., 2004).

En cuanto al metabolismo lipídico, AMPK favorece la entrada de ácidos grasos en la mitocondria para su oxidación. Al fosforilar la acetil CoA carboxilasa (ACC, *acetyl-CoA carboxilase*), esta se inhibe, disminuyen los niveles de malonil-CoA y en consecuencia cesa la inhibición de este sobre CPT1, favoreciendo la entrada y oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (Merrill et al., 1997). Más a largo plazo, AMPK también favorece la biogénesis mitocondrial, mediante la activación de PGC1α (Cantó et al., 2009; Jäger et al., 2007), así como la mitofagia (autofagia mitocondrial) y la fisión de mitocondrias a través de la fosforilación de proteínas como ULK1 y el factor de fosforilación mitocondrial (MFF, *mitocondrial fision factor*) (Egan et al., 2011; Kundu, et al., 2011; Toyama et al., 2016) (Figura 19).

1.6.2.2 Regulación de rutas anabólicas

En contraposición, AMPK va a inhibir todas aquellas rutas anabólicas, incluyendo la biosíntesis de lípidos, carbohidratos, proteínas y ARN ribosómico. AMPK fue descubierta inicialmente como la quinasa que era capaz de fosforilar ACC y la HMG-CoA reductasa (HMGR, *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase/HMG-CoA reductase*), enzimas clave en la síntesis de lípidos y colesterol, en este caso inhibiendo ambas (Bové & Hegardt, 1978; Carling et al., 1987; Ferrer et al., 1985; Hardie et al., 1989). También fosforila de forma inhibitoria a la glucógeno sintasa, de hígado y músculo (Bultot et al., 2012; Jørgensen et al., 2004). AMPK inhibe mTORC1 y por tanto síntesis de proteínas, al fosforilar e inhibir la proteína asociada a mTOR (RAPTOR) y al activar la proteína tuberina (TSC2, *tuberin/tuberous sclerosis 2*) (Dibble et al., 2012; Gwinn et al., 2008). Por último, también inhibe la síntesis de ARN ribosómico al fosforilar el factor de transcripción de la ADN polimerasa I, TIF-1a (codificado por el gen *Rrn3*) (Hoppe et al., 2009). AMPK también consigue la inhibición de otros enzimas lipogénicos al fosforilar SREBP1c (s*terol regulatory element-binding protein 1C)* y de enzimas gluconeogénicos al fosforilar también el coactivador 2 del regulador de la transcripción de CREB (CRTC2/TORC2, *CREB-regulated transcription co-activator 2*) (Koo et al., 2005; Li et al., 2011). Muchas de estas rutas o enzimas están implicadas en el crecimiento celular y por tanto se encuentran activas en procesos tumorales. Por tanto, AMPK, igual que su quinasa *upstream* LKB1, no solo preserva el ATP, sino que posee un rol antitumoral y citoestático en ciertos tipos de tumores (Hardie et al., 2012; Vara-Ciruelos et al., 2019) (Figura 19).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

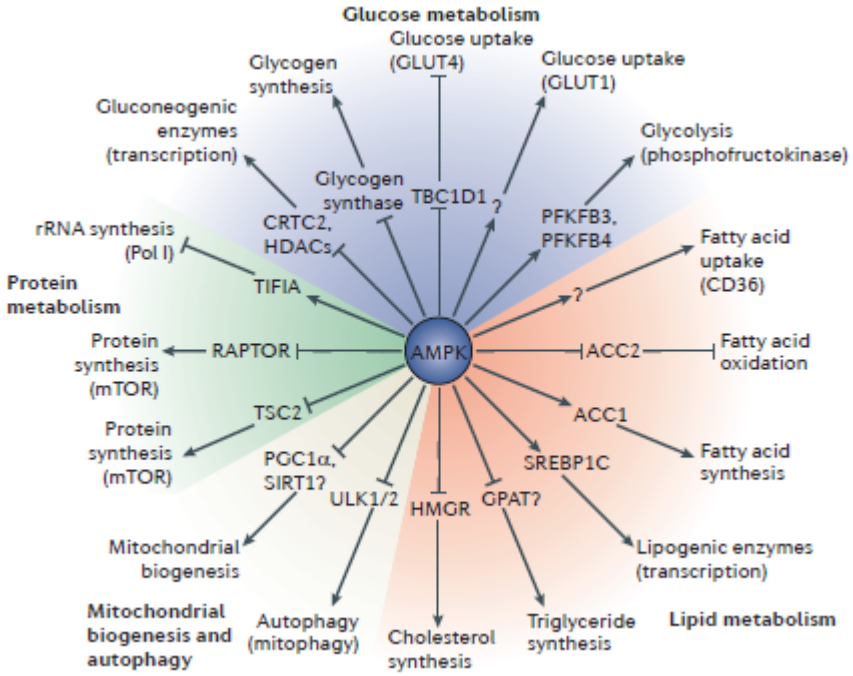


Figura 19. Principales dianas de AMPK en relación al metabolismo celular y principales rutas implicadas. Reproducida con permiso de Springer Nature - Order license: 5659481171461 (Hardie, et al., 2012)

1.6.3 AMPK en el hipotálamo

Más allá de su importante rol como sensor energético celular y regulador esencial del metabolismo celular, AMPK también constituye un regulador fundamental de la homeostasis energética global, con un papel clave en el hipotálamo (Figura 20) (López et al., 2016).

En el hipotálamo encontramos expresión de α1, α2, β1 y γ1, en núcleos como el ARC, VMH, PVH o LHA (López et al., 2016). Situaciones fisiológicas como el ayuno, aumentan la actividad de AMPK en el hipotálamo, mientras que la ingesta la inhibe (López et al., 2008). La administración de virus en el hipotálamo, que expresan una isoforma constitutivamente activa de AMPK aumentan la ingesta y la masa corporal, mientras que la sobreexpresión de una isoforma dominante negativa promueve la pérdida de masa corporal y anorexia (Andersson et al., 2004; López et al., 2010; Minokoshi et al., 2004). La modulación de la ingesta por AMPK tiene lugar al alterar la producción de neuropéptidos clave como AgRP/NPY y POMC/CART. Así, tras la sobreexpresión de isoformas dominantes negativas, se disminuye la expresión de AgRP y NPY, y con las isoformas constitutivamente activas aumentan los niveles de AgRP y NPY en el ARC y de MCH en el LHA, durante períodos de ayuno (Minokoshi et al., 2004). De acuerdo con esto, la administración ICV del activador de AMPK, AICAR o un inhibidor inespecífico de quinasas como el compuesto C (*compound C*), aumentan o disminuyen la ingesta respectivamente (Andersson et al., 2004; M.-S. Kim et al., 2004; Viollet, 2009).

Una gran cantidad de señales orexigénicas y anorexigénicas convergen en el hipotálamo activando e inhibiendo AMPK respectivamente (Figura 20). Aquellas hormonas que inhiben la ingesta como leptina (Andersson et al., 2004; S. Gao et al., 2007; Minokoshi et al., 2002, 2004), GLP-1 (Beiroa et al., 2014; SEO et al., 2008), estradiol (Martínez de Morentin et al., 2014) e insulina (Minokoshi et al., 2004), todas ellas disminuyen la actividad de AMPK en el hipotálamo. Por otra banda, la ghrelina (Andersson et al., 2004; López et al., 2008; Müller et al., 2015), los cannabinoides (Kola et al., 2005, 2008), glucocorticoides (Shimizu et al., 2008), la adiponectina (Kubota et al., 2007) y AgRP (Minokoshi et al., 2004) todos ellos activan

AMPK y poseen un efecto orexigénico. Ciertos compuestos farmacológicos como los agonistas del receptor de melanocortinas (melanotan II), o la nicotina también ejercen sus efectos a través de AMPK (Martínez de Morentin et al., 2012; Minokoshi et al., 2004; Seoane-Collazo et al., 2014). La olanzapina, un antipsicótico con un conocido efecto orexigénico también activa AMPK (M. He et al., 2014). E igual que en el entorno celular, a nivel hipotalámico, ciertos metabolitos también modulan la actividad de AMPK, como pueden ser: ácidos grasos, citrato, lactato, ácido α-lipoico o aminoácidos, cuyo efecto global es anorexigénico. El mecanismo es nuevamente la inhibición de AMPK, la activación de ACC y el acúmulo de malonil-CoA, que presenta una señal anorexigénica a nivel hipotalámico (López, 2018; López et al., 2006; López et al., 2016).

El determinante papel de AMPK en la regulación de la ingesta, sugiere que podría tener efectos específicos dentro de cada núcleo hipotalámico o poblaciones neuronas distintas. Para ello, Claret y colaboradores eliminaron AMPKα2 en neuronas POMC y AgRP. Al eliminar AMPKα2 en neuronas POMC, los animales desarrollaban obesidad, mientras la eliminación en AgRP daba lugar a un fenotipo delgado dependiente de la edad (Claret et al., 2007).

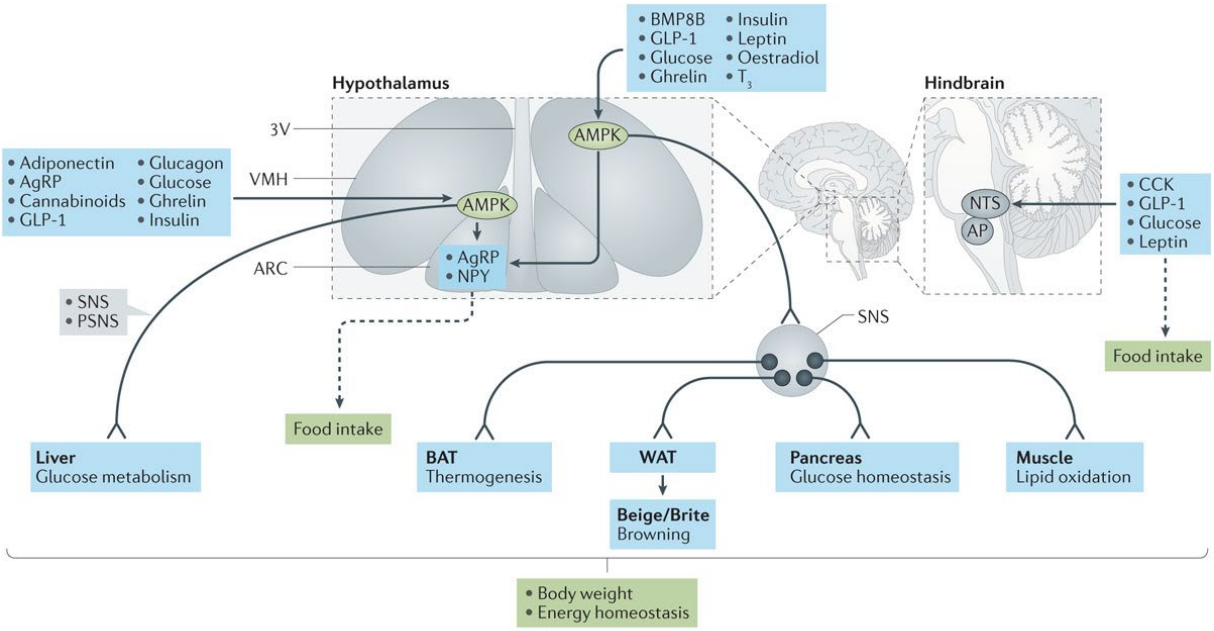


Figura 20. AMPK en el hipotálamo como regulador central de la homeostasis energética. Reproducida con permiso de Springer Nature - Order license: 5662620810194 (López, et al., 2016).

1.6.3.1 AMPK y homeostasis de la glucosa

AMPK a nivel hipotalámico también actúa como un sensor de glucosa, regulando la glucemia global y por tanto regulando el principal sustento energético del cerebro (Figura 20). La administración de glucosa ICV disminuye la actividad de AMPK, mientras que la inhibición de la utilización de glucosa a nivel intracelular activa AMPK (Alquier et al., 2007; Wolfgang et al., 2007). La inhibición de AMPK en el MBH (ARC + VMH), produce cambios en la respuesta contrarreguladora, afectando a la liberación de glucagón o cortisol y provocando hipoglucemia. Mientras que, su activación en el VMH aumenta la liberación de hormonas contrarreguladoras y disminuye la sensibilidad a insulina (Canabal et al., 2007; Han et al., 2005; McCrimmon et al., 2008). La modulación de AMPK hipotalámica también afecta a la producción hepática de glucosa (Lam et al., 2011; C. S. Yang et al., 2010). La acción de determinadas hormonas como

la leptina y su consecuente efecto sobre el BAT (a través del SNS) o sobre el hígado (nervio vago), también dependen de AMPK afectando en consecuencia a la glucemia global (Tanida et al., 2013b, 2015). La administración de fructosa a nivel periférico o central, activa AMPK en el LHA, ARC y PVH y en consecuencia aumenta la gluconeogénesis hepática (Kinote et al., 2012).

En el modelo mencionado previamente *knock-out* para AMPKα2 en neuronas POMC y AgRP, se mostró como, aunque estos animales respondían de forma correcta a insulina y leptina, no eran capaces de responder a cambios en la glucosa extracelular (Claret et al., 2007). Los mismos autores eliminaron también LKB1 en neuronas POMC, y los ratones mostraron una homeostasis de la glucosa alterada, pero con una masa corporal normal (Claret et al., 2011). Lo que parece indicar que las acciones de AMPK en ingesta y glucosa, podrían requerir poblaciones neuronales diferentes. Un estudio reciente ha reportado como AMPK es necesaria para la actividad de neuronas inhibidas por glucosa en el VMH, al controlar la expresión del enzima antioxidante Txn2 (Quenneville et al., 2020).

Por último, AMPK también es capaz de regular la homeostasis glucémica, fuera del hipotálamo, a nivel del tronco del encéfalo. Las neuronas que expresan GLUT2 en el NTS, responden a la hipoglucemia, aumentando la actividad de AMPK. Estas neuronas GABAérgicas envían proyecciones al DMV y su activación optogenética aumenta el tono parasimpático y la secreción de glucagón para responder a la hipoglucemia (Lamy et al., 2014).

1.6.3.2 AMPK hipotalámica, gasto energético y termogénesis

Evidencia actual, apunta al posible rol de AMPK como regulador de la termogénesis en el BAT, a través de la modulación de la actividad del SNS (Figura 20). Los ratones deficientes en AMPKα2, de forma global, presentan una secreción urinaria elevada de catecolaminas, lo que es indicativo de una alteración en la actividad del SNS, que podría explicar la sensibilidad y liberación de insulina alterada en estos animales (Viollet et al., 2003). Además, los ratones deficientes en PTP1B, un regulador negativo de las rutas de insulina y leptina, son resistentes al desarrollo de obesidad inducida por dieta, y muestran baja masa corporal. Esto se asoció también a una menor actividad hipotalámica de AMPKα2, y de forma contraria, un aumento de la actividad de AMPKα2 en músculo y BAT, con cambios en los perfiles de expresión de estos tejidos hacia un mayor gasto energético, probablemente siendo responsables del fenotipo observado (Xue et al., 2009a).

Uno de los hallazgos más destacados en este aspecto fue que la administración de T3 (triyodotironina) en el VMH (pero no en el ARC), provoca un aumento de la termogénesis en el BAT, cursando con una disminución de la actividad de AMPK en este núcleo y aumento de la actividad del SNS sobre el BAT (López et al., 2010). Otras señales como E2 ejercen también su acción termogénica sobre el BAT, al inhibir AMPK en el VMH y reducir la masa corporal de los animales de forma independiente a la ingesta (Martínez de Morentin et al., 2014). En ambos casos, la administración de una forma constitutivamente activa de AMPK en el VMH, revertía este efecto termogénico sobre el BAT, la actividad del SNS y los efectos sobre la masa corporal, al administrar bien E2 o T3. Este mecanismo canónico para la regulación del gasto energético es compartido por otras hormonas como BMP8B, donde su efecto termogénico también desaparece al sobreexpresar formas constitutivamente activas de AMPK en el VMH (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012). La acción de la leptina sobre el SNS y el BAT también depende de AMPK (Tanida et al., 2013b). Otras señales como la nicotina, o el agonista de GLP-1R, la liraglutida, ejercen también su efecto termogénico sobre el BAT, y *browning* del WAT, al inhibir AMPK en el VMH, pero no en otros núcleos, nuevamente acompañando estos efectos de una pérdida de la masa corporal (Beiroa et al., 2014; Martínez de Morentin et al.,

2012). Resistina y adiponectina, de forma opuesta, activan AMPK en el hipotálamo y disminuyen la termogénesis, aunque todavía no se sabe si este efecto sobre AMPK ocurre de forma específica en el VMH (Kubota et al., 2007; Vázquez et al., 2008; Wen et al., 2010). Finalmente, como introducimos anteriormente[3], la eliminación específica de AMPKα1 en las neuronas SF1 del VMH, da lugar a un fenotipo termogénico, tanto en STD como en HFD en estos animales, protegiéndolos frente al desarrollo de obesidad cuando se someten a HFD (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Por ello, el eje AMPK(VMH)-SNS-BAT constituye un eje canónico prometedor para el tratamiento de la obesidad (Figura 20).

En este sentido, la inhibición de AMPK en las neuronas SF1 del VMH se ha conseguido recientemente mediante la administración periférica de vesículas extracelulares pequeñas (sEVs, *small extracellular vesicles*). La inyección en la vena de la cola de sEVs, que codifican para una isoforma dominante negativa de AMPKα1, bajo el promotor de SF1, reduce la masa corporal de animales obesos debido a un aumento del tono simpático y de la termogénesis en el BAT, al inhibir AMPK en estas neuronas (Milbank et al., 2021). Posteriormente, Milbank y colaboradores también demostraron que este acercamiento es una diana terapéutica posible para el tratamiento de la obesidad genética. Así, la administración de estos sEVs era capaz de reducir la masa corporal de forma independiente a la ingesta, al aumentar el SNS sobre el BAT y la termogénesis, en ratones obesos que carecen del receptor de leptina (*db/db*) (Milbank et al., 2023).

La evidencia acumulada actualmente, apunta a AMPK en el hipotálamo como un regulador esencial de varios componentes del balance energético, como la ingesta, el gasto energético y la homeostasis de la glucosa (López et al., 2016). La integración de nutrientes, señales hormonales y distintos fármacos, en el hipotálamo, modulan la actividad de AMPK y en consecuencia se produce una respuesta que afecta a la homeostasis energética global. Esto sitúa a esta enzima como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas, ya que, fármacos como la metformina y liraglutida, ejercen su función a través de AMPK (Beiroa et al., 2014; G. Zhou et al., 2001). El *knock-out* de AMPKα1 en las neuronas SF1 (mayoritarias en el VMH), es un ratón resistente al desarrollo de obesidad debido a su incrementada termogénesis (Seoane-Collazo et al., 2018). De hecho, como acabamos de mencionar la inhibición específica de AMPKα1 en las neuronas SF1, tras la administración de sEVs, es capaz de reducir la masa corporal de ratones obesos (Milbank et al., 2021, 2023). Sin embargo, queda por elucidar cual es el papel de otras subunidades de AMPK en estas neuronas y su implicación en el gasto energético.

USC

[3] Ver epígrafe *1.5.1.3 SIRT1 y AMPK*

2. HIPÓTESIS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. HIPÓTESIS

Evidencia actual de nuestro grupo ha demostrado como la inhibición selectiva de la subunidad AMPKα1 en las neuronas SF1, bien a través de su ablación genética o mediante la administración de vesículas extracelulares, conlleva un aumento del gasto energético y la termogénesis, protegiendo a los animales frente al desarrollo de obesidad inducida por dieta. Dado que estos animales también defendían mejor su temperatura corporal durante una disminución de la temperatura ambiental, en esta Tesis se hipotetizó que la inhibición de AMPK en el VMH podría ser necesaria para la aclimatación de los animales durante dicho estímulo ambiental. Por otro lado, actualmente se desconoce el papel que desempeñan otras subunidades de AMPK en las neuronas SF1, como la subunidad catalítica α2 o la subunidad reguladora γ2. Por ello, en esta Tesis se generaron también dos modelos *knock-out* para las subunidades α2 y γ2 con el fin de elucidar el rol diferencial de cada subunidad en la regulación del balance energético global.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. OBJETIVOS

En vista al papel clave de AMPK en el hipotálamo como sensor energético capaz de regular el gasto energético y la termogénesis, los objetivos de este trabajo fueron:

1) Estudiar el papel de AMPK en el VMH durante una aclimatación al descenso en temperatura ambiental y la consecuente activación de la termogénesis.
2) Estudiar el fenotipo de animales deficientes en AMPKα2 en neuronas SF1 en condiciones de dieta estándar o de dieta alta en grasa.
3) Estudiar el fenotipo de animales deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 en condiciones de dieta estándar o de dieta alta en grasa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MODELOS ANIMALES

4.1.1 Consideraciones éticas y aspecto legislativo

Los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación animal realizados durante esta tesis doctoral fueron realizados bajo la supervisión y aprobación del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela, con los números de procedimiento ID 15010/14/006 e ID 15012/202/010, con responsable del proyecto Miguel Antonio López Pérez y posteriormente aprobados también por el jefe de servicio provincial del servicio de ganadería del departamento territorial de la *Consellería do Medio Rural e do Mar* de la provincia de la Coruña, órgano competente para dicha resolución.

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

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

En referencia a este último Real Decreto 53/2013, se tuvo en especial consideración el artículo 4 de dicho decreto, que hace referencia a los principios básicos de las 3R en experimentación animal: reemplazo, reducción y refinamiento, donde el objetivo final es asegurar un número mínimo de animales en los procedimientos que no causen un dolor o sufrimiento innecesario. En consecuencia, se evitó la duplicación innecesaria de experimentos y dentro de ellos se redujo el número experimental de animales empleados en cada grupo para obtener un poder estadístico suficiente, sin comprometer la finalidad del estudio. Se ha puesto especial énfasis en la atención al bienestar animal, reduciendo en la medida de lo posible, el sufrimiento o el estrés causado por dolor o daño duradero en los animales, mediante una valoración continuada y estrecha de los animales durante la realización de los procedimientos.

4.1.2 Modelos animales empleados

En la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon los siguientes modelos:

1) Ratas macho (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Sprague-Dawley* suministrados por el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela y por el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), con una masa corporal aproximada de 250 gramos y una edad en torno a 8-10 semanas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2) Ratones macho y hembra (*Mus* musculus) knock-out para los genes AMPKα2 y AMPKγ2 en los tejidos que expresan SF1, generados de forma específica para esta tesis[4].

Todos los animales fueron estabulados en condiciones estables de temperatura (22±2ºC), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 AM – 20:00 PM). Los procedimientos en los que se modificó la temperatura a la que estuvieron sometidos los animales (termoneutralidad o frío), serán explicados en detalle más adelante[5]. Antes de la realización de cualquier procedimiento los animales estuvieron una semana previamente en las instalaciones de cara una correcta aclimatación de estos.

Durante los períodos de aclimatación y los diferentes procedimientos los animales se mantuvieron con acceso libre a alimento y agua (*ad libitum*) con excepción de aquellos procedimientos en los que se especifique lo contrario. Las dietas empleadas han sido, dieta estándar (STD, *standart diet*) (STD, 18,4% proteína, 6,2% grasa, 44,2% carbohidratos, 3,1 kcal/g; *Teklad Global Rodent Diets* #2198; *ENVIGO*; Barcelona España) y dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) (HFD, 26,2% proteína, 34,9% grasa, 26,3% de carbohidratos, 5,24% kcal/g; *Research Diets, Inc*.; New Brunswick, NJ).

De cara maximizar el bienestar de los animales durante los procedimientos estos fueron monitorizados periódicamente, valorando su aspecto físico y apariencia, la aparición de diferentes signos clínicos, su comportamiento espontáneo y sobre todo un seguimiento de su masa corporal e ingesta de comida y bebida. Los animales fueron, además, acostumbrados al manejo por el personal de laboratorio para mitigar, en la medida de lo posible el estrés ocasionado por el manejo de estos, durante los procedimientos llevados a cabo. Teniendo en cuenta el comportamiento social de los roedores, en la mayoría de los procedimientos los animales fueron estabulados de manera colectiva. En aquellos procedimientos en los que fuera necesaria su individualización, evitamos mantenerlos en situación de aislamiento en períodos superiores a los 10 días.

4.2 Anestesia y analgesia

De forma previa a todos los procedimientos quirúrgicos, los animales recibieron una dosis de anestesia general, mediante una inyección intraperitoneal (IP). Los procedimientos quirúrgicos de esta tesis doctoral fueron realizados de forma exclusiva en rata, por lo que las dosis y volúmenes citados a continuación hace referencia a ese modelo experimental. La dosis administrada fue de 0,2 ml cada 100 g de masa del animal, mediante una única inyección intraperitoneal. La composición de la anestesia consistía en un 37,5% de ketamina (100 mg/ml (Imalgene® o Ketaminador®, *Merial*; Barcelona, España), un 37,5% de suero fisiológico estéril (Suero fisiológico isotónico, *Physan*; Madrid, España) y un 25% de xilacina (20mg/ml) (Rompún® 2%, *Bayer Health Care*; Berlín, Alemania). En caso de necesitar redosificar un animal, se administró solo ketamina a 1/3 de la dosis inicial (30 mg/kg). Para verificar la efectividad de la anestesia, consideramos la ausencia de reflejo palpebral y la pérdida del reflejo podal como confirmación del estado de anestesia general de los animales y comienzo de los procedimientos.

Como analgesia, los animales recibieron una primera dosis de analgesia opiode, con buprenorfina (Bupaq®, 0,3 mg/ml solución inyectable, *VetViva Richter GmbH*, Wels, Austria), vía subcutánea (SC) el mismo día del procedimiento con una dosis de 0,01-0,05 mg/kg, e inyectando un volumen final de 0,1-0,5 ml cada 300g. Los días posteriores al procedimiento,

[4] Ver en detalle *3.4.1 Generación de ratones knock-out condiciones SF1 parra AMPKα2 y AMPKγ2*
[5] Ver en detalle **3.4.5 Modificaciones de la temperatura ambiental**

los animales recibieron como analgesia antiiflamatorios no esteroideos (AINEs), como Meloxicam (Metacam®, 5mg/ml inyectable, *Boehringer Ingelheim*; Ingelheim am Rhein, Alemania), a una dosis de 1 mg/kg, también de forma SC, inyectando en este caso 0,1 ml por cada 100 g, durante los 2-3 días siguientes.

En los procedimientos de punto final, como la perfusión intracardiaca, se empleó una combinación de ketamina-xilacina diferente, con el objetivo de causar una anestesia general que causase una sobredosis y consecuente sacrificio de los animales sin sufrimiento. En el caso de ratas, se administró una combinación de 100 mg de ketamina y 10 mg de xilacina por cada kg de masa, sin previa dilución. En ratón, se empleó una combinación de 86% de salino, 10% de ketamina y 4% de xilacina, administrando un volumen de 0,15 ml por cada 10 g.

Las combinaciones de anestesia y analgesia presentes en esta tesis doctoral fueron supervisadas y proporcionadas por Ana Torres Caldas (Veterinaria designada).

4.3 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

4.3.1 Vía subcutánea (SC)

Esta vía de administración no requiere anestesia previa y debido a la elasticidad del tejido subcutáneo se admiten volúmenes de líquido relativamente grandes, sin ocasionar malestar o complicaciones. En el caso de las ratas, con la ayuda de un trapo, se cubrió la zona rostral y anterior del animal y aplicando ligera fuerza sobre la zona media del animal se redujeron los movimientos. Con ayuda de la otra mano, se formó un pequeño pliegue en la piel con los dedos índice y pulgar, se levantó algo la piel y se introdujo la aguja de manera paralela a la superficie del cuerpo. La inyección de líquido pudo notarse a través de los dedos al formarse un ligero abultamiento de la zona, que se conoce como habón. Por lo general escogió la zona dorsal del animal, a la altura lumbar o lateral. En los ratones, se procedió a la inmovilización completa del animal con una mano, mediante la sujeción de la piel de toda la zona dorsal, y las sustancias fueron administradas igualmente, en la zona dorsal a la altura escapular o bien ventralmente cerca de la pierna. Se emplearon agujas de 25 G (BD Microlance, 25G 5/8” 0,5x16mm, *BD Medical Surgicals Systems*; Madrid, España), acopladas a jeringas de 1 ml (1 ml, BD slip-tip syringe bulk non-sterile, *BD Medical Surgicals Systems*; Madrid, España), en ambos modelos animales.

4.3.2 Vía intraperitoneal (IP)

Esta vía de administración tampoco requiere anestesia y requiere de la correcta inmovilización del animal, a través de la región dorsal del mismo de manera que su cabeza tenga la menor movilidad posible y su parte anterior quede extendida. Se inclinó el animal ligeramente hacia abajo, para minimizar el riesgo de desgarro de las vísceras. La zona para inyectar se trató del extremo inferior derecho del animal, a 1cm aproximadamente de la línea media, para evitar inyectar la vejiga, y unos 2 cm caudalmente a la última costilla para evitar inyectar el hígado, estómago o las vísceras. La aguja debe formar un ángulo de 45º con respecto al vientre y nuevamente se utilizaron agujas de 25G y jeringas de 1 ml.

4.3.3 Vía núcleo-específica

Esta vía requiere la anestesia general de los animales, mediante los protocolos previamente descritos. En este caso, se trató de la administración bilateral en núcleos hipotalámicos, usando como guía el bregma del animal y utilizando coordenadas específicas para cada núcleo. Se utilizaron tres coordenadas: antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV), seleccionadas mediante las indicaciones de un atlas anatómico específico para el cerebro de rata

USC DE SANTIAGO

(George Paxinos & Charles Watson, 2013). De acuerdo con el atlas, se escogieron las siguientes coordenadas, para el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH): -2,85 y -3,2 mm posterior al bregma (AP); ± 0,6 mm de forma lateral a la línea media (L); -10,1 mm de profundidad (DV).

Una vez anestesiado el animal, se coloca en un aparato de estereotaxia (*David Kopf Instruments*; Tujunga, CA, USA)[6] y mediante el uso de jeringuillas de microinyección (*Hamilton*, Serie 700, modelo 7001, 1 µl de volumen y 25G de calibre; Reno, USA), se administraron las sustancias de interés con un flujo de inyección de 200 nl/min durante 5 minutos.

4.4 Procedimientos no quirúrgicos

4.4.1 Generación de ratones knock-out condiciones SF1 para AMPKα2 y AMPKγ2.

Para la generación de los ratones knock-out para AMPKα2 y AMPKγ2, de forma específica en las neuronas SF1 del VMH, se cruzaron ratones SF1-Cre (Tg(Nr5a1-cre)Lowl/J, número de catálogo 012462; *The Jackson Laboratory*; Bar Harbor, ME, USA) con ratones AMPKα2 floxeados y ratones AMPKγ2 floxeados (*Prkaa2*$^{tm1.1Sjm}$/j número de catálogo 014142 y B6N.Cg-*Prkag2*$^{tm1.1Rto}$/J con número de catálogo 030979, respectivamente, *The Jackson Laboratory*; Bar Harbor, ME, USA). Mediante cruces selectivos y genotipado de los animales se establecieron cruces que nos proporcionaron animales: SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ o bien SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ (los que denominamos KO o *knock-out*) y animales AMPKα2$^{fl/fl}$ o bien animales AMPKγ2$^{fl/fl}$ (que denominamos *wild-type*, controles, o compañeros de camada).

Los animales SF1-Cre, son animales que expresan la Cre recombinasa bajo la dirección del promotor del receptor nuclear de la subfamilia5, grupo A, miembro 1 (*Nr5a1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*). La recombinasa Cre, en estos ratones presenta actividad en aquellos tejidos en donde se detecta expresión génica de este gen: las neuronas positivas para SF1 en el VMH, la hipófisis, gónadas y tejido adrenal. Los animales SF1-Cre empleados eran hemicigotos para el inserto transgénico que contenía la Cre recombinasa, viables, fértiles, de tamaño normal y no presentaban ninguna anomalía física o de comportamiento grave.

Estos animales se cruzaron por una parte con animales mutantes para el gen *Prkaa2*, en donde la isoforma catalítica α2 de AMPK, se encontraba en su exón 2 flanqueada por las secuencias loxP. Por otro lado, con animales mutantes para el gen *Prkag2*, en donde la isoforma reguladora γ2 de AMPK, se encontraba en su exón 6 flanqueada también por las secuencias loxP. Ambas cepas de animales se mantuvieron en homocigosis para las secuencias loxP, siendo fértiles, viables, normales de tamaño y sin mostrar ningún tipo de anomalía física o de comportamiento grave. Tras la recombinación de la Cre recombinasa, los exones floxeados, fueron eliminados de forma tejido-específica.

Para los estudios realizados en esta tesis doctoral, empleamos los ratones *knock-out* macho y hembra (SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$) y como controles se emplearon sus hermanos de camada, que no presentaban el alelo para SF1-Cre, pero igualmente eran homocigotos para AMPKα2$^{fl/fl}$ o AMPKγ2$^{fl/fl}$. El genotipado de los animales se realizó mediante PCR[7].

4.4.2 Monitorización de la ingesta y la masa corporal

La determinación de la masa corporal y la ingesta de los animales se realizó con la ayuda de una balanza de precisión (PS602, *Fisherbrand*; Hampton, New Hampshire, USA). Para los

[6] Ver **3.5.1 Estereotaxia núcleo-específica (3.5 Procedimientos quirúrgicos)**
[7] Ver **3.7.7 PCR genotipado**

procedimientos en que los animales estaban individualizados, la masa corporal e ingesta se determinaron diariamente, aproximadamente a la misma hora del día (14:00-16:00 pm). Para los registros más largos, durante 20 o 30 semanas la masa corporal se registró semanalmente a partir de las cuatro o cinco semanas de vida de los animales, en adelante. En este caso, para el control de la ingesta, los animales fueron individualizados durante 7 o 9 días, en los cuales se determinó su ingesta promedio.

4.4.3 Medición de la temperatura corporal

Para registrar la temperatura corporal se empleó una sonda rectal conectada a un termómetro (BAT-12 Microprobe-Thermometer, *Physitemp*; Clifton, NJ). Las medidas se tomaron mientras el animal estaba parcialmente inmovilizado pero consciente, tratando nuevamente de realizar las medidas siempre durante los mismos momentos del día.

4.4.4 Medición de la temperatura del BAT y base de la cola

Para la medición de la temperatura del BAT se empleó una cámara infrarroja (B335: Compact-Infrarred-Thermal-Imaging-Camera; *FLIR*; West Malling, Kent, UK). La zona escapular de los animales fue rasurada previamente, mediante una ligera inmovilización de estos. Las imágenes fueron posteriormente analizadas con un software específico (FLIR-Tools-Software, *FLIR*; West Malling, Kent, UK), delimitando bien la zona del BAT o la base de la cola. Por norma general, un mínimo de 3 fotos y hasta un máximo de 5 fotos, fueron empleadas por animal para el BAT y unas 2-3 fotos para la base de la cola.

4.4.5 Modificaciones de la temperatura ambiental de los animales

4.4.5.1 Exposición a frío

En esta tesis se realizaron dos tipos de exposiciones a frío (4ºC): agudas y crónicas. En ambos casos, los animales fueron previamente individualizados y se introdujeron en una cámara fría, previamente enfriada a 4ºC, con acceso normal a comida y bebida. Para las exposiciones agudas, los animales estuvieron un total de 6 horas y fueron monitorizados para su temperatura y temperatura de BAT, durante cada hora. La masa corporal y la ingesta fueron determinados de forma inicial y de forma final. En las exposiciones crónicas, los animales estuvieron 24h o 72h en la cámara fría, donde su masa corporal e ingesta, se determinaron diariamente, igual que su temperatura corporal y temperatura de BAT. La cámara fría posee una puerta de cristal que permite a los animales mantener los ciclos de luz y oscuridad de la sala.

4.4.5.2 Termoneutralidad

Para los experimentos en termoneutralidad, la temperatura de la sala se fue elevando de forma gradual, desde los ±22ºC, +2ºC diariamente hasta alcanzar los 30ºC. Una vez a 30ºC los animales se individualizaron y se mantuvieron en dichas condiciones 72h, para poder compararse con las exposiciones crónicas de frío. De igual manera, la ingesta, la masa corporal, temperatura y temperatura de BAT de estos animales fue monitorizada de forma diaria.

4.4.5.3 Test de disipación de temperatura

Para elucidar la posible implicación de la disipación de calor por la base de la cola, como mecanismo termorregulador, medimos la temperatura de la base de la cola a ratones brevemente aclimatados a una temperatura por debajo de la termoneutralidad (26ºC), en termoneutralidad (30ºC) o a una temperatura por encima de la termoneutralidad (34ºC), en

USC DE COMPOSTELA

diferentes días (dejando 3-4 días entre exposición) utilizando nuevamente la cámara térmica. La temperatura corporal se determinó con una sonda rectal conectada a un termómetro. Para la aclimatación se empleó una placa calefactora, previamente calentada a la temperatura deseada (monitorizando su temperatura superficial con la cámara térmica) y delimitada con un tubo de PVC de forma que los animales podían moverse libremente, pero se mantenían confinados en dicha área. Tras 10 minutos de exposición se realizaron imágenes térmicas y se midió la temperatura rectal.

4.4.6 Determinación de la composición corporal

Para determinar la composición corporal de los animales se utilizó un aparato de resonancia magnética nuclear de dominio temporal (TD-NMR, *time-domain magnetic nuclear resonance*) (Minispec LF-110, *Bruker*; Billerica, Massachussetts, USA). Este analizador nos permitió obtener los valores de grasa, masa magra y fluídos libres de los animales, en un período corto de tiempo (menos de 2 min) y sin la necesidad de anestesiar el animal. El animal se introdujo en un restrainer especial, donde se limita temporalmente la movilidad del animal durante la adquisición de los valores. Por norma general, cada animal se midió dos veces y se tomó la media de ambas medidas.

4.4.7 Ensayos relacionados con el metabolismo de la glucosa

4.4.7.1 GTT, ITT y PTT

Para valorar la tolerancia a la glucosa de los animales (GTT), la sensibilidad a la insulina (ITT) y la capacidad gluconeogénica de los animales (PTT), se realizaron una serie de test que presentan varias características en común. Para GTTs y PTTs, los animales se sometieron a un ayuno de 12h, durante la fase oscura; mientras que, para las ITTs, se realizó un ayuno de solo 6h durante la fase diurna, para normalizar los niveles basales de glucosa circulantes de los animales, evitando diferencias causadas por el tiempo trascurrido tras la última ingesta de cada ratón. Antes de comenzar los test, se realizaron medidas de la masa corporal y los niveles basales de glucosa, mediante una pequeña incisión en la punta de la cola, tiras reactivas y glucómetros (Accu-check Guide Me, *Roche*; Basilea, Suiza). Posteriormente se administró de forma IP en función de la masa corporal del animal: una inyección de D-glucosa (2mg/kg para GTTs) (D-glucosa G8270, *Sigma-Aldrich*; Darmstadt, Alemania) una inyección de piruvato sódico (1,25 mg/kg para PTTs) (piruvato sódico P2256, *Sigma-Aldrich*; Darmstadt, Alemania) o una inyección de insulina (0,75 o 1 IU/kg para animales en STD y 1,5 IU/kg para animales en HFD, para las ITTs) (Actrapid 100 UI/ml, *Novo Nordisk*; Bagsværd, Dinamarca). Posteriormente se midió la glucosa circulante, a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos (para GTTs e ITTs) y 20, 40, 60, 80 y 120 minutos (para PTTs) después de la inyección. Con la curva obtenida de los datos, también se calculó el AUC para cada grupo experimental, restando los niveles basales de glucosa para evitar confusiones debido a posibles cambios en la glucosa basal.

4.4.7.2 Test de tolerancia a la glucosa postprandial

Este es un test muy sensible e informativo que nos permite conocer la capacidad sobre el control glucémico que tienen los diferentes individuos. Unos niveles de glucosa elevados tras la ingesta son indicativos de un control glucémico inadecuado y es una anormalidad temprana típica en pacientes que cursan con desarrollo de diabetes tipo II (American Diabetes Association, 2001). Para este test, los animales se sometieron también a 12h de ayuno durante la fase oscura y posteriormente se les dió acceso *ad libitum* a su dieta estándar. Se midió la masa

corporal, la ingesta y los niveles de glucosa basales, así como a los 30, 60, 120 y 240 minutos tras el inicio de la ingesta.

4.4.7.3 Restricción calórica

Para la realización de este ensayo, los animales son individualizados previamente durante 5 días, en los que se monitorizó su ingesta promedio diaria, debido a los posibles cambios que ocurren tras su individualización al tratarse de animales sociales. Tras la monitorización de la ingesta, durante esos 5 días, se realizó una restricción calórica del 60%. De manera que, los animales reciben su porción diaria de alimento, un 40% de la ingesta de los días previos, siempre a las 18:00. Previamente, cada día a las 17:30, se monitorizó la masa corporal de los animales y su glucosa basal. La restricción calórica se mantuvo durante 5 días. Durante el período de restricción calórica, se mantuvo paralelamente un grupo control, en las mismas condiciones, pero con acceso *ad libitum* a comida, para cerciorarnos de que los cambios observados en masa corporal y glucosa no se debían a posibles perturbaciones en la sala.

4.4.7.4 Test de hormonas hiperglucemiantes

En este ensayo se trató de ver la respuesta a diferentes hormonas hiperglucemiantes, como glucagón y adrenalina. Los animales se sometieron a ayuno 12h durante la fase oscura, y al día siguiente recibieron una inyección IP de glucagón (200 µg/kg) (Glucagón, G1774, *Sigma-Aldrich*; Darmstadt, Alemania) o de adrenalina (L-adrenaline, L04911, *ThermoFisher*; Waltham, Massachusetts, USA), o bien de suero fisiológico. De esta manera, un grupo de animales recibieron un día salino y otro grupo una de las hormonas; y al cabo de una semana o diez días, del tratamiento contrario. De esta manera cada animal actúa como su propio control. Para los animales que se sometieron a tratamientos con hormonas diferentes, el orden fue siempre glucagón-adrenalina, dejando nuevamente períodos de mínimo una semana entre ellos, y alternando con semanas de tratamiento con suero fisiológico.

4.4.8 Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora.

Para la determinación del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora se utilizó un sistema de calorimetría indirecta. Para estos análisis los animales fueron individualizados en unas cajas especiales que presentan un sistema de ventilación cerrado y mediante diferentes sensores, a través del análisis de gases y otros detectores, determinan diferentes parámetros del balance energético (LabMaster, *TSE Systems*; Bad Homburg, Alemania). El sistema fue previamente calibrado con gases de referencia (20,9% O_2, 0,05% CO_2 y 79,05% N_2), de manera que la atmosfera de gases de cada jaula, así como sus condiciones de temperatura y luz estaban controladas. Los animales se aclimataron previamente a estas jaulas, durante un mínimo de 48h antes de realizar las mediciones, en donde siempre se tuvieron en cuenta las últimas 48h del análisis. Los diferentes parámetros analizados, gasto energético, cociente respiratorio y actividad locomotora fueron medidos cada 30 minutos.

4.5 Procedimientos quirúrgicos

4.5.1 Estereotaxia núcleo específica

Esta técnica requiere la sedación previa del animal. Una vez comprobada la anestesia general de los animales, estos se colocaron en un equipo de estereotaxia, de manera que su cabeza permanece estable e inmóvil. Con la ayuda de un bisturí se realizó un corte transversal

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

en la piel de la cabeza (previamente rasurada), para exponer el cráneo. La piel se separó con la ayuda de una pinza mosquito para ganar claridad en el campo quirúrgico y se eliminó el tejido subcutáneo adyacente al cráneo, para localizar el bregma. Una vez establecidas las coordenadas del bregma, el aparato estereotáxico se desplazó a una de las 4 coordenadas empleadas en el caso del VMH en ratas (-2,85 y -3,2 mm posterior al bregma (AP); ± 0,6 mm de forma lateral a la línea media (L); -10,1 mm de profundidad (DV)). Posteriormente se perforó el cráneo con la ayuda de una broca quirúrgica en la coordenada deseada, y con la ayuda de una jeringuilla de microinyección se procedió a la administración del tratamiento. Se inoculó un volumen de 1 µl de sustancia en cada inyección, durante 5 minutos a una velocidad de administración de 200nl/min. Una vez finalizado el procedimiento, se procedió a la liberación del animal del aparato a la a sutura de la piel del cráneo con seda quirúrgica (Ethicon Mersilk Soie, Special 2-0, *Ethicon*; NJ, USA). Tras la administración de analgesia, los animales fueron estabulados de forma individual.

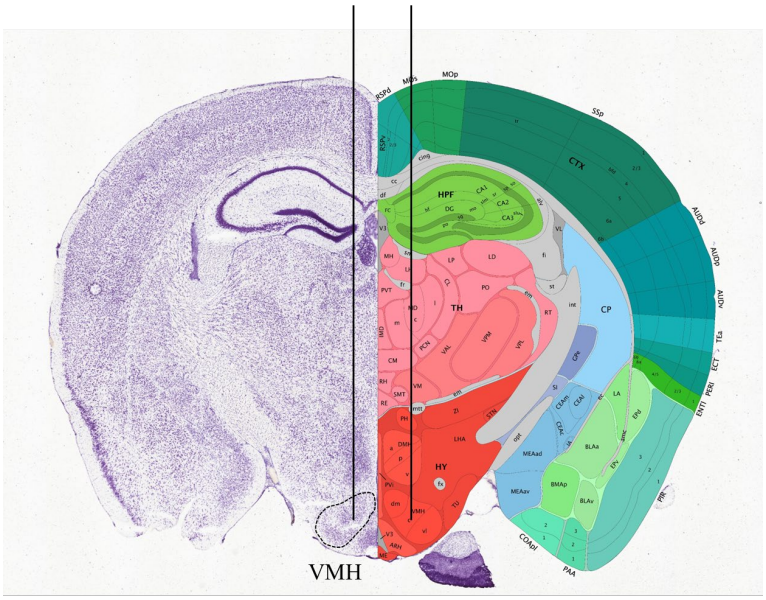


Figura 21. Esquema anatómico del VMH. Reproducida con permiso de Allen Reference Atlas – Mouse brain [brain atlas]. Disponible enatlas.brain-map.org

4.5.2 Implantación de registradores de temperatura subcutáneos

Para un registro más sensible y continuo de la temperatura, se emplearon unos registradores de temperatura (DST Nano-T, *StarOddi;* Islandia), que se implantaron de forma subcutánea. Tras la anestesia general de los animales, se procedió a rasurar un área cuadrada, en la región dorsal y lumbar de los animales en uno de sus laterales. Se realizó una incisión en la piel y con la ayuda de unas pinzas mosquito se formó un pequeño hueco, despegando el tejido subcutáneo y los registradores previamente desinfectados se introdujeron en el espacio subcutáneo. La herida se cerró con ayuda de unas grapas (AutoClip® system 12022-09, *F.S.T.*; California, USA) para evitar que los animales se retirarán la sutura y cerciorarnos de que la herida se cerraba y cicatrizaba correctamente.

Estos registradores, son previamente programados con la frecuencia de medidas deseadas, así como su fecha de inicio y la cantidad de medidas que se quieren realizar, mediante un software (Mercury, *StarOddi*; Islandia) y su conexión a un ordenador. Una vez finalizado el experimento, se recuperaron los registradores, los datos fueron transferidos al ordenador y los registradores se pusieron en modo reposo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5.3 Perfusión intracardiaca

Para los ensayos de inmunofluorescencia e hibridación *in situ* los cerebros de los animales fueron previamente fijados mediante perfusión intracardiaca. Tanto para rata como para ratón se empleó una dosis de anestesia general, superior a la normal para una inducción rápida y profunda del animal, al tratarse de procedimientos de punto final. Tras la anestesia, los animales fueron colocados en posición decúbito dorsal y se procede a la apertura de la cavidad abdominal, con ayuda de unas tijeras. Tras la localización del apéndice xifoides, se levantó con ayuda de unas pinzas mosquito para facilitar la rotura del diafragma y las parrillas costales con ayuda de unas tijeras. Una vez expuesto el corazón, se inyectó una dosis de 200 µl de heparina (sólo en el caso de ratas) (Heparina sódica 5%, *Mayne Pharma*, Australia) en el ventrículo izquierdo para evitar problemas de coagulación de los vasos durante la perfusión.

A continuación, se introduce una aguja conectada a una bomba peristáltica programable (PeriPump ONEB, NE-9000B-EP, *Biogen*, Masscachusetts, USA), en el caso de las ratas a través del ventrículo izquierdo hasta la raíz de la aorta y en ratones simplemente en el ventrículo izquierdo. Posteriormente se procedió a clampar la aguja y a la sección de la aurícula derecha. A través de la bomba se bombea suero fisiológico, con el fin de limpiar la sangre de los tejidos de interés, en este caso el cerebro. La decoloración del hígado, así como de la propia solución salina que emana de la aurícula marca el inicio del proceso de fijado. A través de esa vía se introdujo una solución de formalina (Formalina 10% neutra tamponada, *Bio-Optica*, Italia), durante aproximadamente 5 o 10 minutos (para ratón o rata, respectivamente). La eficacia de la perfusión puede constatarse por la rigidez plena del animal.

Finalmente, los tejidos son diseccionados y mantenidos en formalina, durante 12 horas, para luego ser deshidratados con una solución de sacarosa 30% en tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*).

4.5.4 Disección y extracción de tejidos

Al finalizar los procedimientos los animales fueron sacrificados mediante luxación cervical y posterior decapitación, según las leyes y normas de experimentación animal. De cada animal se extrajeron los siguientes tejidos: cerebro e hipotálamo (ARC, VMH, LHA), BAT, tejido adiposo subcutáneo (scWAT, *subcutaneous white adipose tissue*), tejido adiposo gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), tejido adiposo visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*), hígado y sangre. Los tejidos fueron conservados a -80ºC hasta su procesamiento y análisis. En el caso de los análisis inmunohistoquímicos de scWAT, un pedazo de muestra fue fijada en formalina al 10% para su posterior inclusión en parafina.

4.6 Diseños experimentales

4.6.1 Exposición a 4ºC con diferentes tiempos y termoneutralidad

Para establecer un modelo de exposición a frío y elucidar el rol de AMPK en el VMH durante el mismo, se utilizaron ratas Sprague Dawley, que fueron estabuladas en grupos de 3 individuos tras su llegada al animalario (día 0). Posteriormente se establecieron 4 grupos experimentales, dividiendo los animales en los siguientes grupos: 30ºC (72h), 4ºC (1h), 4ºC (24h), 4ºC (72h).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El día 8, el grupo de 4ºC (1h) fue estabulado individualmente y los animales se introdujeron en la cámara fría. Al cabo de una hora se tomaron fotos térmicas y los animales fueron sacrificados. El mismo día 8, se introdujo en la cámara fría el grupo de 4ºC (24h) tras ser también estabulados individualmente. El día 9 se tomaron imágenes térmicas y los animales fueron sacrificados. Finalmente, el día 9, los dos grupos restantes: 30ºC (72h) y 4ºC (72h), fueron individualizados, y se tomaron medidas basales de su temperatura, fotos térmicas, masa corporal e ingesta. Se realizó un seguimiento diario de la ingesta, la masa corporal, temperatura y temperatura de BAT, hasta el día 12 en el cuál tras el curso de las 72h, los animales fueron sacrificados (Figura 22).

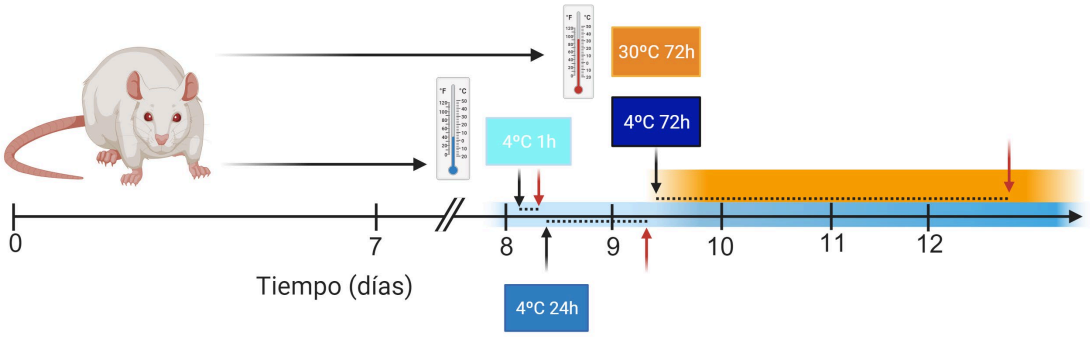


Figura 22. Representación gráfica del diseño experimental utilizado durante la exposición a 4ºC y termoneutralidad. Figura creada con biorrender.com

4.6.2 Inoculación de adenovirus AMPKα1-CA en ratas y exposición a 4ºC

Para ver como respondían los animales al mismo estímulo a 4ºC, pero expresando una isoforma constitutivamente activa de AMPKα1 en el VMH, se emplearon nuevamente ratas Sprague Dawley. Tras una semana estabuladas en grupos de 3, los animales fueron inoculados en el VMH con adenovirus AMPKα1-CA o virus control que solo expresaban la proteína fluorescente GFP. Durante este procedimiento también se produjo la implantación de los registradores de temperatura, previamente programados y desinfectados. Tras la operación las ratas fueron individualizadas y se dividieron en tres grupos:

- 23ºC GFP VMH -4ºC GFP VMH -4ºC AMPKα1-CA VMH

Tras 5 días de recuperación durante los cuales se realizó también un seguimiento diario de la ingesta y la masa corporal, los animales se introdujeron en la cámara fría a 4ºC, excepto el grupo 23ºC GFP VMH que se mantuvo a temperatura estándar en la sala a modo de control. Durante las últimas 72h, se monitorizó la temperatura con los registradores previamente programados, se tomaron imágenes termográficas y se midió tanto la ingesta como la masa corporal. Al cabo de 72h, los animales fueron sacrificados (Figura 23)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

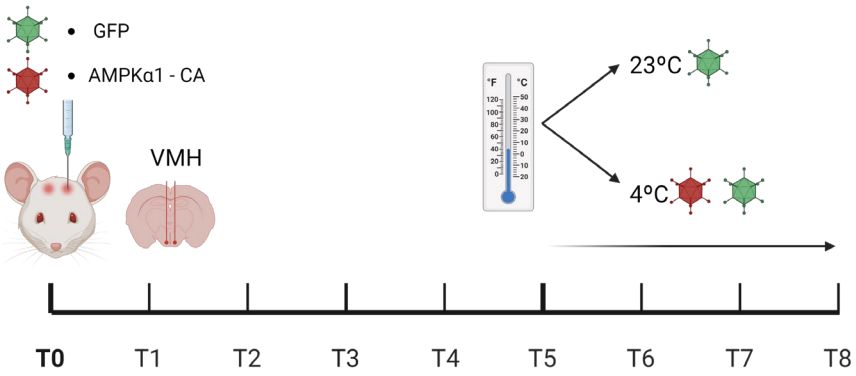


Figura 23. Representación gráfica del diseño experimental utilizado durante la inoculación de virus AMPKα1-CA y GFP y la posterior exposición a 4ºC. Figura creada con biorrender.com

4.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.7.1 Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

4.7.1.1 Extracción de ARN

A partir de las muestras de tejido congelado, se tomó un trozo pequeño de tejido y se homogenizó mecánicamente con la ayuda de unas bolas metálicas en 1 ml de Trizol (Trizol Reagent; *Invitrogen*; Carlsbad, CA, USA), durante 5 minutos a 25 Hz (TissueLyser II, *Quiagen*; Hilden, Alemania). Finalizada la homogenización las muestras se centrifugan a 12.000 rcf durante 10 minutos, siempre manteniendo la centrífuga previamente enfriada a 4ºC para evitar la degradación del ARN, e igualmente, manteniendo siempre las muestras en hielo. Se aspira la fase intermedia, con especial cuidado en el caso de BAT y scWAT para evitar coger la capa lipídica superior y se añaden 200 µl de cloroformo (Chloroform, 650498, *Sigma-Aldrich*; St. Louis, Missouri, USA). Las muestras se mezclan con ayuda de un vórtex durante 15 segundos hasta que las fases se vean homogéneas. Tras un reposo de 3 minutos a temperatura ambiente, las muestras son nuevamente centrifugadas a 12.000 rcf durante 15 minutos. Al finalizar la centrífuga, se distinguen dos fases: una fase superior acuosa y traslúcida donde se encuentra el ARNm y una fase inferior orgánica que contiene proteínas y lípidos. En el medio de ambas se encuentra la fase que contiene ADN. Una vez recuperada la fase superior con cuidado, se añaden 500 µl de isopropanol (2-propanol, *Sigma-Aldrich*; St. Louis, Missouri, USA), mezclando nuevamente con un vórtex para homogenizar las fases. Las muestras se mantienen 10 minutos a -20ºC para ayudar a precipitar el ARNm y se centrifugan de nuevo a 12.000 rcf durante 10 minutos. En función de la cantidad de ARNm, tras la centrífuga se debería ver un precipitado blanco en el fondo del tubo. Se elimina el sobrenadante con cuidado de no perder el precipitado y se añade 1 ml de etanol absoluto (Ethanol absolute 131086, *PanReacAppliChem*, Darmstadt, Alemania) al 70% diluido en agua desionizada con DEPC (dietilpirocarbonato al 0,1%), mezclando para lavar el precipitado. Se centrifuga de nuevo a 12.000 rcf durante 5 minutos, se elimina nuevamente el sobrenadante y se realiza un última centrífuga de 1 minuto a 16.000 rfc. Retiramos el sobrenadante con ayuda de una pipeta, para eliminar los posibles restos de etanol y finalmente el precipitado se resuspende en agua DEPC a 60ºC durante 10 minutos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.7.1.2 Cuantificación de ARNm

La cuantificación de ARNm se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop 2000, *Thermo Fisher Scientific*; Waltham, Massachusetts, USA), que proporciona dos longitudes de onda: 260 nm, que nos informa sobre la cantidad de ácidos nucleicos y 280 nm, que se corresponde a la cantidad de proteína. El grado de pureza de las muestras se determina a través de la ratio 260/280, considerándose valores entre 1,8 y 2 como valores ideales de pureza. Una vez conocida la cantidad de ARNm, se realizaron alícuotas de un concentración de 500 ng/µl para BAT y de 1 µg/µl para scWAT.

4.7.1.3 Retrotranscripción (RT)

Para la reacción de retrotranscripción, se empleó un volumen final de 30 µl en tubos de PCR de 0,2 ml (PCR-02-B, *Axygen*; Nueva Hampshire, USA). Empleando un volumen de 10 µl de las alícuotas de concentración conocida y 20 µl de los siguientes componentes de la reacción de retrotranscripción:

- 6 µl de tampón de reversotranscripción (*5x first strand tampon;* 250 nM Tris-HCl, pH 8,3, 3,75 nM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 50 nM DDT) (*Invitrogen*; Carlsbad, CA, EEUU).
- 6 µl de una mezcla de dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP, dATP a una concentración de 10 mM cada uno) (*Invitrogen*; Carlsbad, CA, EEUU).
- 1,5 µl Mg_2Cl 50 mM (Mg_2Cl 50 mM, *Invitrogen*; Carlsbad, CA, EEUU)
- 0,17 µl de cebadores aleatorios (Random primers, *Invitrogen*; Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,25 µl inhibidor de ARNasa (RNAseOUT, 40 U/µl; *Invitrogen,* Carlsbad, CA, EEUU).
- 1 µl de M-MLV reversotranscriptasa (M-MLV, 200 U/µl, *Invitrogen*, Carlsbad, CA, EEUU).
- 10 µl de alícuota de concentración conocida.
- 5,08 µl de agua DEPC para un volumen final de 30 µl.

A mayores se realiza un control negativo de la RT, con un tubo en el que se echa la misma mezcla de componentes, excepto la reversotranscriptasa, cuyo volumen se sustituye por agua. Finalmente, todas las muestras se introducen en el termociclador con los siguientes parámetros: 50 minutos a 37ºC; 15 minutos a 42ºC; 5 minutos a 95ºC. Tras ello las muestras son guardadas a 4ºC o a -20ºC, en función de si se utilizasen a corto o largo plazo.

4.7.1.4 PCR en tiempo real

Los genes analizados en esta tesis doctoral fueron detectados mediante sondas *Taqman*, que se caracterizan por presentar un fluoróforo en un extremo y un *quencher* en el otro. De forma que durante la amplificación por la ADN polimerasa, su actividad exonucleasa 5'-3' escinde la sonda, liberándose fluorescencia, lo que nos permite obtener una medida cuantitativa de la acumulación de producto generado durante la PCR. El fluoróforo utilizando fue FAM (FAM™, *Applied Biosystems*; Massachusetts, Estados Unidos).

El volumen final de la reacción a amplificar es de 12 µl y para cada uno de los genes a estudiar se emplean cebadores y sondas específicos (Tabla 1). Los componentes de la reacción son los siguientes:

- 2,92 µl de agua MiliQ
- 0,36 µl de oligonucleótido sentido (10 µM) (*Eurofins Genomics GmbH*; Ebersberg, Alemania)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- 0,36 µl de oligonucleótido antisentido (10 µM) (*Eurofins Genomics GmbH*; Ebersberg, Alemania)
- 0,36 µl de sonda (5 µM) (*Eurofins Genomics GmbH*; Ebersberg, Alemania)
- 6 µl de *Master Mix* universal de Taqman para PCR (*Applied Biosystems;* Massachusetts, Estados Unidos)
- 2 µl de muestra de la RT.

Tabla 1. Genes y sondas específicas empleadas para PCR en tiempo real

ARNm	Código Gen Bank	Tipo	Secuencia
Adrb3 (Rata)	Nm_013108.2	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn01478698_g1
Adrb3 (Ratón)	Nm_013462.3	Sentido Antisentido Sonda	5'-TGCTAGATCTCCATGGTCCTTCA-3' 5'-AAATCACCGCTGAACAGGTTTGATGCC-3' FAM-5'-TCCCTTACGGACAGCTTACCTTT-3'-TAMRA
Cidea (Rata)	Nm_001170467.1	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn04181355_m1
Cidea (Ratón)	Nm_007702.2	Sentido Antisentido Sonda	5'-CCTACGACATCCGATGCACAA-3' 5'-TCTGTGCAGCATAGGACATAAACC-3' FAM-5'-CTTCAAGGCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'-TAMRA
Elovl3 (Rata)	Nm_001107602.1	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn01411024_m1
Hprt (Rata)	Nm_012583.2	Sentido Antisentido Sonda	5'-AGCCGACCGGTTCTGTCAT-3' 5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3' FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'-TAMRA
Pparg (Ratón)	Nm_001127330.3	Sentido Antisentido Sonda	5'-TGGGCCAGAATGGCATCTC-3 5'-CTGATGCACTGCCTATGAGCACTTCACA-3' FAM-5'-CTAACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3'-TAMRA
Ppargc1a (Rata)	Nm_031347.1	Sentido Antisentido Sonda	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3' 5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3' FAM-5'-AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'-TAMRA
Ppargc1a (Ratón)	Nm_008904.3	Sentido Antisentido Sonda	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3' 5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3' FAM-5'-AGGTCCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'-TAMRA
Ppargc1b (Rata)	Nm_176075.2	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn00598552_m1
Ppargc1b (Ratón)	NM_133249.3	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Mm00504730_m1
Prdm16 (Rata)	XM_039111362.1	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn01516224_m1
Prdm16 (Ratón)	NM_027504.3	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Mm01266512_m1
Rn18s (Ratón)	Nr_003278.3	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Mm03928990_g1
Ucp1 (Rata)	Nm_012682.2	Sentido Antisentido	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3' 5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

		Sonda	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
Ucp1 (Ratón)	Nm_009463.3	Sentido Antisentido Sonda	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGAA-3' 5'-GACCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3' FAM-5'-ACCGACGGCCTTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
Ucp3 (Rata)	Nm_013167.2	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn_00565874_m1
Tfam (Rata)	Nm_031326.1	Comercial	Applied Biosystems Taqman® Gene Expression Assays Assay ID: Rn_00580051_m1

Las muestras se cargaron por duplicado en una placa de medición (MicroAmp Optical 384-Well Reaction plates, 4309849, *Applied Biosystems*, Massachusetts, Estados Unidos), junto con una curva patrón para cada uno de los genes, así como el control negativo de la RT y un blanco para la PCR en tiempo real. La curva patrón se realiza con 6 puntos de que se obtienen a partir de una dilución seriada (1:4), de un tubo que consta de 2 µl de cada muestra, de forma que es presentativa de los niveles totales de ARNm de los diferentes grupos. La reacción se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real (QuantStudio 5 Real-Time PCR, *Applied Biosystems;* Massachusetts, Estados Unidos), con las siguientes condiciones de amplificación:

Tabla 2. Pograma de la PCR en tiempo real

Tiempo	Temperatura
2 minutos	50ºC
10 minutos	95ºC
15 segundos	95ºC
1 minuto	65ºC
Secuencia repetida durante 40 ciclos	

El análisis de los datos se realizó comparando la ratio entre el gen de referencia y el gen problema, para los diferentes grupos experimentales. El gen de referencia para rata fue *Hprt* (*Hipoxanthine phosphoribosyltransferase* 1) y para ratón *Rn18s* (*18S ribosomal RNA*).

4.7.2 Análisis de proteína por western blot

4.7.2.1 Extracción de proteína

A partir de los tejidos congelados, se secciona un pequeño trozo, que se introduce en un tubo de seguridad de 2 ml (Safe-lock Tubes 2,0 ml, *Eppendorf*; Hamburgo, Alemania). El proceso se realiza en hielo para evitar la degradación de la muestra, y el resto de tejido vuelve a conservarse a -80ºC. En el tubo se añade una bolita de acero, y una cantidad determinada (Tabla 3) en función del tejido de tampón de lisis (Tabla 4), con inhibidor de proteasas (Complete TM, *Roche;* Basilea, Suiza) y de fosfatasas (PhosSTOP, *Roche;* Basilea, Suiza). Las muestras son homogenizadas mediante disgregación mecánica, durante 5 minutos a frecuencia de 25 Hz (TissueLyser II, *Quiagen*; Hilden, Alemania). A continuación, las muestras son centrifugadas a 13.200 rpm durante 30 minutos y se extrae el sobrenadante a un tubo de seguridad de 1,5 ml (Safe-Lock Tubers 1,5 ml, *Eppendorf*; Hamburgo Alemania), descartando el precipitado formado. Para BAT, especialmente de animales en HFD, se realizaron centrífugas adicionales previas de 5 minutos (2-3 dependiendo de la muestra), para eliminar de forma eficiente los abundantes lípidos de la muestra.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Volúmenes de tampón de lisis

Tejido	Volumen
VMH rata/ratón	180/60 µl
BAT rata/ratón	500 µl

Tabla 4. Componentes del tampón de lisis

Reactivo	Cantidad/Volumen
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
Ortavanadato Sódico 0,1 M	5 ml
Fluoruro Sódico	1 g
Pirofosfato Sódico	1,1 g
Sacarosa 46 g	46 g
Ajustar con H_2O a 500 ml y pH 7,5	
Inhibidor de proteasas (1 pastilla/50 ml) Inhibidor fosfatasas (1 pastilla/25 ml)	

4.7.2.2 Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteínas se empleó el método colorimétrico de Bradford (Protein Assay Dye Reagent, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA). El primer pasó consistió en la dilución de las muestras, introduciendo 10 µl de muestra en 250 µl de H_2O destilada para: VMH de rata y BAT de rata o ratón; para VMH de ratón se utilizaron 5 µl de muestra en 50 µl de H_2O. Es decir, diluciones 1:26 y 1:10 respectivamente. A partir de un estándar de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA *bovine serum albumine*, *Sigma-Aldrich*; St. Louis, Missouri, USA), se crea una curva estándar de concentraciones de proteína conocidas (Tabla 5).

Tabla 5. Recta patrón BSA

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

Se cargaron 10 µl de muestra y de curva, por duplicado en una placa para espectrofotómetro (Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, *Thermo Scientific*; Massachusetts, USA). Luego se les añadieron 250 µl a cada pocillo de una dilución 1:5 del reactivo Bio-Rad Protein Assay, previamente incubado a 37ºC durante 10 minutos, protegido de la luz. La placa se introdujo en el espectrofotómetro, donde se incubó nuevamente a 37ºC durante 5 minutos. La densidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

óptica se midió a 595 nm y la cantidad de proteína fue extrapolada gracias a la curva patrón, a través del software Magellan 6 del espectrofotómetro.

4.7.2.3 Preparación de los geles

Las proteínas se separan mediante una electroforesis basada en geles de Tris/glicina-SDS (*Sodium dodecyl sulfate*)-Poliacrilamida, que forma una red que permite a las proteínas separarse en función de su peso molecular. Lo primero que se hizo fue montar un soporte con dos cristales (entre los que polimerizará el gel) y comprobar que no perdían líquido.

Los geles constan de dos partes, una parte separadora y una parte concentradora. La parte separadora supone la mayor parte del gel ¾, y es la encargada de separar las proteínas en función de su peso molecular, por lo que, en función del tamaño molecular de las proteínas, tendrá un porcentaje u otro (Tabla 6a-b). La parte concentradora se encarga de concentrar las proteínas previamente, antes de pasar a la parte separadora, por lo que su porcentaje es fijo (Tabla 7a-b). Una vez mezclados los componentes de la parte concentradora, se agregaron entre los dos cristales y se añadió isopropanol 70% para eliminar las posibles burbujas y nivelar el borde superior del gel. Una vez polimerizó el gel, se retiró el isopropanol y se lavó en gel con H_2O destilada. Tras retirar el exceso de H_2O con ayuda de un poco papel de filtro, se procedió a verter la parte concentradora encima y finalmente se añaden los peines (Mini-PROTEAN Combs, 15-well, 1,5 mm, 40 µl 1653366, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA).

Tabla 6a. Gel separador de electroforesis 6,5%

Gel 6,5%	
H_2O destilada	2,45 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	2,18 ml
Tampón A	5,06 ml
APS 10%	56,2 µl
TEMED	28,1 µl

Tabla 6b. Gel separador de electroforesis 10%

Gel 10%	
H_2O destilada	4,0 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	3,3 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml
APS 10%	0,1 ml
TEMED	4 µl

Tabla 7a. Geles concentradores de electroforesis 6,5% y 10%

Gel concentrador del gel separador 6,5%		Gel concentrador del gel separador 10%	
H_2O destilada	1, 77 ml	H_2O destilada	3,4 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	0,65 ml	Acrilamida/bisacrilamida (30%)	0,83 ml
Tampón B	2,5 ml	1M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
		SDS 10%	50 µl
APS 10%	25 µl	APS 10%	50 µl
TEMED	12,5 µl	TEMED	4 µl

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7b. Elaboración de los tampones A y B para geles del 6,5 %

Tampón A		Tampón B	
Tris-HCl	90,1 g	Tris-HCl	30,2 g
SDS	2 g	SDS	2 g
Ajustar con H_2O hasta 1 L y pH a 8,8		Ajustar con H_2O hasta 1 L y pH a 6,8	

4.7.2.4 Preparación de las muestras para la electroforesis

A partir de los datos que se obtenidos de espectrofotometría, de concentración de proteína. Se realizan unas alícuotas de concentración conocida, en función del tejido (Tabla 8), añadiendo a las muestras, tampón de lisis y tampón de carga 1X (Tabla 9).

Tabla 8. Concentración de proteína cargada en función del tejido

Tejido	Concentración
BAT (rata)	15 µg/16 µl
BAT (ratón)	10 µg/16 µl
VMH (rata)	15 µg/16 µl
VMH (ratón)	10 µg/16µl

Tabla 9. Concentración de proteína de los distintos tejidos

Reactivo	Cantidad/Volumen
SDS	15 µg/16 µl
Trizma-base	10 µg/16 µl
ß-mercaptoetanol	15 µg/16 µl
Azul de bromofenol	10 µg/16µl
Glicerol	10 ml
Ajustar a H_2O MiliQ hasta 1L y pH 6,8	

4.7.2.5 Electroforesis

Una vez polimerizados los geles y realizadas las alícuotas, se procedió a colocar los geles en una carcasa (Mini-PROTEAN Tetra Cell, *Bio-Rad*; Hercules, CA, USA). En el medio de los geles se añadió tampón de electroforesis 1X (100 ml de tampón de electroforesis al 10x (Tabla 10) en 900 ml de H_2O), de manera que ambos quedaron cubiertos completamente. Las alícuotas se calentaron a 95ºC durante 10 minutos, y se procedió a cargar 16 µl de muestra en cada pocillo, dejando el primer pocillo izquierdo siempre libre para cargar 4 µl de un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, 161-0374, *Bio-Rad*; Hecules, CA, USA). La carcasa se cubrió con una tapa que posee electrodos para conectar a la fuente de alimentación. La electroforesis ocurrió siempre a voltaje constante 100 o 110 V y a un amperaje de 180 mA. La electroforesis se detuvo cuando el frente de migración de los geles alcanzó 1 cm del borde inferior del gel.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis 10X

Reactivo	Cantidad
Glicina	144 g
Tris-HCl	30 g
SDS	10 g
Ajustar H_2O destilada a 1L	

4.7.2.6 Transferencia

Finalizada la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a membranas de polivinilideno (Inmuno-Blot® PVDF membranes for protein blotting, 0,2 µm 1620177, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA), mediante un sistema de transferencia semihúmeda (Trans-Blot Semy-Dry Transference, *Bio-Rad,* Hercules, CA, USA). Las membranas se cortaron con unas dimensiones de 8,5x6,5 cm, de forma proporcional al gel y se activaron sumergiéndolas en metanol, agua destilada y tampón de transferencia 1x (Tabla 11 y Tabla 12), consecutivamente durante 5 minutos cada sustancia. Se cortó también papel absorbente (Extra thick blot paper, *Bio-Rad*, Hercules, CA, USA), con unas dimensiones de 9x7 cm y se sumergió en tampón de transferencia.

Una vez activadas las membranas, se colocó primero una capa de papel absorbente, previamente humedecido en tampón de transferencia 1x, por encima se colocó la membrana, luego el gel y finalmente otra capa de papel absorbente, formándose un sándwich y eliminando en cada paso las posibles burbujas que se formen durante el proceso. Por último, se cierra el Trans-Blot y se conecta a una fuente de alimentación, durante 1h y 50 minutos. La transferencia ocurrió a un amperaje constante de 25 v y 250 mA.

Tabla 11. Composición del tampón de transferencia 25x

Reactivo	Cantidad
Glicina	36,5 g
Tris-HCl	72,5 g
SDS	4,5 g
Ajustar H_2O destilada a 500 ml	

Tabla 12. Composición del tampón de transferencia 1x

Reactivo	Cantidad
Tampón transferencia 25x	40 ml
Metanol	200 ml
Ajustar H_2O destilada a 1 L	

4.7.2.7 Inmunodetección

Una vez finalizada la transferencia, las membranas son bloqueadas con BSA al 3% (3 gr de BSA en 100 ml de TBS-Tween 1x) (Tabla 13) (Tabla 14), durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se cortó tomando como referencia los pesos moleculares, para aislar la región de cada una de las proteínas de interés. Cada fragmento de membrana fue incubado con un anticuerpo primario diluido en BSA 3% (Tabla 15) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4ºC, dependiendo de las especificaciones del anticuerpo y nuestra experiencia previa con los tejidos.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, este se retiró y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 1x a temperatura ambiente. A continuación, se incubó cada fragmento de membrana con un anticuerpo secundario, específico para la especie en la que se desarrolló el anticuerpo primario, diluido 1:5000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron de nuevo 3 lavados con TBS-Tween 1x durante 5 minutos. Todo el proceso de inmunodetección se realizó en agitación suave.

Tabla 13. Composición del TBS 10X

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl	24,2 g
NaCl	80 g
Ajustar a H_2O destilada 1L y pH 7,6	

Tabla 14. Composición del TBS 1x

Reactivo	Cantidad
TBS 10x	100 ml
Tween 20	1 ml
Ajustar a H_2O destilada 1L	

Tabla 15. Relación de los anticuerpos utilizados, diluciones y referencia

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
Mouse monoclonal anti-α-tubulin	1:5000	Sigma-Aldrich	T5168; RRID: AB_477579
Mouse monoclonal anti-ß-actin	1:5000	Sigma-Aldrich	A5316; RRID: AB_476743
Rabbit monoclonal anti-AcetylCoaCarboxylase 1	1:1000	Cell Signalling	3662S; RRID: AB_2219400
Rabbit polyclonal Anti-AMPKα1	1:1000	EMD Millipore	07-350; RRID: AB_310542
Rabbit polyclonal Anti-AMPKα2	1:1000	EMD Millipore	07-363; RRID: AB_310553
Mouse monoclonal Anti-Fatty Acid Synthase	1:1000	BD Science	610963; RRID: AB_398276
Rabbit monoclonal Anti-AcetylCoa Carboxylase (Ser79)	1:000	Cell Signalling	3661S; RRID: AB_330337
Rabbit monoclonal Anti-phospho-AMPK α (Thr172)	1:1000	Cell Signalling	2535S; RRID: AB_331250
Rabbit Anti-phospo-HSL (S660)	1:1000	Cell Signalling	4126S; RRID: AB_490997
Rabbit polyclonal Anti-UCP1	1:1000	Abcam	Ab10983; RRID: AB_2241462
Polyclonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins/HPR	1:5000	DAKO	P0448; RRID: AB_2617138
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse inmunoglobulins/HPR	1:5000	DAKO	P0260; RRID: AB_2636929
Anti-Mouse IgG HPR-linked	1:5000	Cell Signalling	7076; RRID: AB_330924
Anti-Rabbit IgG HPR-linked	1:5000	Cell Signalling	7074; RRID: AB_2099233

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.7.2.8 Revelado

Para proceder al revelado de las membranas se preparó un sustrato de revelado (Pierce ECL Western blotting substrate, 32106 *Thermo Scientific*; Massachusetts, USA) en una proporción 1:1 de ambos reactivos, de un volumen determinado en función de las membranas. Las membranas se retiraron del TBS-Tween 1x y se incuban con 1 ml/membrana durante 4 minutos en oscuridad. Los fragmentos posteriormente se colocaron en un cassette de revelado (Hypercassette, *Amersham Bioscience*; Amersham, UK), entre dos papeles de acetato transparentes, procurando eliminar las burbujas que se formaron encima de las membranas. Se procedió entonces al revelado en cámara oscura, mediante la exposición de una película de revelado (Fuji Medical X-Ray Film, *Fujifilm Corporation*; Tokio Japan) sobre el acetato superior, durante un tiempo de entre 10 segundos y 5 minutos, en función de la proteína y tejido a estudio. Las películas fueron reveladas en una solución reveladora (dilución 1:10) (Developer G150, *AGFA Healthcare NV*; Mortsel, Bélgica) y seguidamente en solución fijadora (dilución 1:5) (Manual fixing bath, *AGFA Healthcare* NV; Morstel, Bélgica) y finalmente se lavaron en agua.

Antes de retirar las membranas de los cassettes, los pesos moleculares fueron copiados a las películas de revelado para poder identificar las proteínas en función de su peso molecular. Las membranas se secaron y fueron preservadas entre papeles Whatman (3MM Cromatography paper 3030-931, *Tisch Scientific*; Ohio, USA).

4.7.2.9 Cuantificación de las proteínas

Para la cuantificación de las proteínas, las películas de revelado fueron pegadas sobre un folio blanco y escaneadas con un escáner. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con un software informático FIJI (Schindelin et al., 2012), en donde tras la selección de un área fija rectangular cuyas dimensiones se ajustasen a la señal de los pocillos, se midió la densidad óptica de cada una de las muestras, así como de una zona dentro del gel, pero sin señal para utilizarse como fondo. El valor del fondo se resta a cada una de las muestras para obtener la señal real. Finalmente, la señal de cada una de las muestras es representada en relación a la señal obtenida para los controles de carga (α-tubulina o β-actina) de cada una de las muestras.

4.7.3 Inmunohistoquímica

Se empleó inmunohistoquímica para detectar la presencia de determinadas proteínas en el propio tejido y su localización. En esta tesis doctoral se ha realizado inmunohistoquímica en scWAT de rata sobre muestras parafinadas. Tras la extracción de los tejidos, un pedazo pequeño fue fijado en formalina 10% durante 24h, con la ayuda de unos moldes (Cassette universal 100722, *Labolan*; Navarra, España), para su posterior deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol, su montaje en xileno e inclusión en parafina. Los bloques parafinados fueron cortados en secciones de 3 μm, desparafinados en xileno, rehidratados y enjuagados en agua destilada. Se realizó una recuperación antigénica con un tampón de citrato y se bloquearon las muestras con peroxidasa al 3% durante 10 minutos. A continuación, las muestras fueron teñidas para UCP1, incubándose toda la noche con anticuerpo primario (Anti-rabbit UCP1 10983, *Abcam*; Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:800, y se incubaron con un anticuerpo secundario (Envision SM802, *DAKO*; California, Estados Unidos) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron reveladas con DAB (K3468, *DAKO*; California, Estados Unidos) y contra-teñidas con Hematoxilina (SM806, *DAKO;* California, Estados Unidos). Finalmente, las muestras fueron montadas en portas con un medio de montaje permanente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para la adquisición de imágenes, se realizaron fotografías a 20x con una cámara digital (Olympus XC50, *Olympus Corporation*; Tokyo, Japón), que posteriormente fueron analizadas con FIJI. Se ajustaron los umbrales de las imágenes para que coincidiesen con la tinción marrón característica de UCP1, y se calculó el % de tinción para cada muestra. Para cada animal, se tomaron 4 fotos de cada sección y se calculó el valor medio para cada animal.

4.7.4 Histología tinción hematoxilina-eosina

Para determinar el tamaño de los adipocitos del scWAT se empleó una tinción de hematoxilia-eosina, que nos permite observar la morfología de las células del tejido. Las muestras parafinadas, fueron tratadas con xilol para eliminar los excesos de parafina. A continuación, los cortes fueron rehidratados con soluciones decrecientes de alcohol (100º, 95º y 70ºC) y tras lavarlos con H_2O destilada fueron sumergidos en hematoxilina durante 10 minutos, tras lo cual se levantaron rápidamente y tras lavarse en un alcohol ácido se sumergieron en eosina durante 30 segundos. Los cortes se deshidrataron, volviendo a pasarse por los alcoholes, pero esta vez en sentido reciente. Previamente al montaje las muestras fueron sumergidas en xilol durante 10 minutos. Se tomaron imágenes con un cámara digital Olympus XC50 a 20x. Las imágenes fueron cuantificadas con el software FIJI (Schindelin et al., 2012) y el plugin *Adiposoft* (Galarraga et al., 2012), que permite un conteo automático (con la posibilidad de editar manualmente células) de todos los adipocitos de la muestra. De esta manera se consiguió analizar una media de entre 150-300 adipocitos por foto y para la media de cada animal se emplearon al menos 3 fotos.

4.7.5 Inmunofluorescencia

Para las técnicas de inmunofluorescencia se requiere previamente de la perfusión de los animales[8]. Una vez congelados los cerebros, estos son seccionados en un criostato a 30 µm (CM3050S, *Leica*; Wetzlar, Alemania) y recogidos en PBS. Luego se escogieron secciones representativas del área de estudio, en esta tesis el núcleo ventromedial. Se escogieron 2 secciones rostrales, dos secciones de la zona media y dos secciones de la zona más caudal, para cada animal. Las secciones fueron lavadas primero con TBS 1x (100 ml de TBS 10x (Tabla 16) y 900 ml de H_2O) y luego fueron bloqueadas con la solución SUMI (Tabla 17) e incubadas durante toda la noche a 4ºC con los anticuerpos primarios (Tabla 18), en la misma solución SUMI. Al día siguiente los cerebros se lavaron 3 veces con TBS durante 10 minutos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (Tabla 18), diluidos en SUMI. Las secciones se lavaron 2 veces con TBS durante 10 minutos, y en el tercer lavado se incluyó DAPI (D3571, *Life Technologies;* Carlsbad, Estados Unidos), disuelto en el TBS (dilución 1:5000). Finalmente, se realiza un último lavado de 10 minutos con TBS y los cerebros son montados en portas de polilisina (SuperFrost slides, Cat 15438060, *Fisher Scientific*; Massachusetts, Estados Unidos), con medio de montaje elvanol (Tabla 19).

Tabla 16. Composición del TBS

Reactivo	Cantidad
Tris	121 g
NaCl	180 g
Ajustar a 2 L H_2O y pH 7,6	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

[8] Detallado en **3.5.3 Perfusión intracardiaca**

Tabla 17. Composición de la solución SUMI

Reactivo	Cantidad
Gelatina porcina	0,625 g
Triton 100X	1,25 ml
Ajustar a 250 ml TBS	

Tabla 18. Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia, dilución y referencia

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
Goat polyclonal anti-GFAP	1:1000	Sigma-Aldrich	SAB2500462; RRID: AB_10603437
Rabbit polyclonal anti-cFOS	1:500	Synaptic Systems	226003; RRID: AB_2231974
Donkey anti-goat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific	AB_2535853; RRID: AB_2535792
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	1:1000	Thermo Fisher Scientific	A-31573; RRID: AB_2536183

Tabla 19. Composición elvanol

Reactivo	Cantidad
Mowiol	12 g (diluido en 30 H_2O)
DABCO	2g
Ajustar a 60 ml con Tris pH 8,5 200 mM (centrífugar y descartar el pellet)	

4.7.5.1 Inmunofluorescencia directa

Para la localización de GFP durante los procedimientos de cirugía estereotáxica y para los animales que presentaban un gen reportero fluorescente, el procedimiento fue idéntico al arriba descrito, obviando ambas incubaciones con los anticuerpos. De manera que, tras el bloqueo de las muestras con SUMI, se procedió a realizar 2 lavados con TBS, un tercero con DAPI diluido en TBS y un último lavado de nuevo con TBS antes de montar las muestras directamente. Como en ambos casos, bien mediante la expresión de GFP a partir de adenovirus, o la expresión de Td-Tomato bajo el promotor SF1, las muestras ya poseían fluorescencia, simplemente se añadió DAPI a las secciones para tener referencias estructurales de los cortes.

4.7.5.2 Adquisición de imágenes por microscopía confocal

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal (Leica TCS SP8 y Leica TCS SP5, *Leica*; Wetzlar, Alemania), con objetivo seco a 20x y objetivo sumergido en glicerol a 43x. Se emplearon secciones de 3 µm en el plano Z y las mimas condiciones de ganancia, sensibilidad del detector y potencia del láser fueron aplicadas para las imágenes que se compararon entre sí. Las imágenes representativas mostradas, fueron editadas con el software FIJI, para ajustar el brillo y el contraste.

Para la cuantificación de procesos de astrogliosis, se cuantificó la fluorescencia media de regiones de interés: ARC y VMH. Para la estimación de actividad neuronal a través de cFOS, también se emplearon regiones de interés y se contaron las células teñidas para cFOS como partículas (ajustando el tamaño de la partícula, esfericidad y umbral) con ayuda del software FIJI de forma semiautomatizada. En ambas cuantificaciones una media de 6 secciones por animal, fueron empleadas para obtener el valor medio por animal.

4.7.5.3 Adquisición de imágenes con microscopia de fluorescencia

Para la localización de GFP en muestras inyectadas con adenovirus, mediante cirugía estereotáxica, se empleó un microscopio con fluorescencia (Thunder Imager Tissue, Leica; Wetzlar, Alemania), que posee un software que permite realizar un aclarado computacional de las imágenes para tener una mayor resolución. Las imágenes fueron tomadas a 20x.

4.7.6 Hibridación in situ (Tecnología BaseScope v2 RED Assay)

Para la validación del modelo SF1-Cre AMPKγ2, se realizó una hibridacón *in situ* para el exón 6 del gen *Prkag2* (exón que se encuentra flanqueado por las secuencias loxP en este modelo), mediante la tecnología Base Scope (BaseScope™ Detection Reagen Kit v2-Red, *ACD Bio – Biotechne*; Minnesota, Estados Unidos), que permite la detección de secuencias cortas de ARNm (50-300 nucleótidos). La sonda empleada para dicho gen fue: BaseScope™ Probe-BA-Mm-Prkag2-2zz-st (Cat 717761).

Los cerebros de los animales, previamente perfundidos y deshidratados con sacarosa, fueron cortados a 10 µm en el criostato y montados en portas específicos (SuperFrost slides, Cat 15438060, *Fisher Scientific*; Massachusetts, Estados Unidos) incluyendo en cada porta varias regiones representativas de forma rostral-caudal, de la zona de interés (VMH). Los cerebros se lavaron con PBS 1x y posteriormente se incubaron durante 30 min a 60ºC en un horno para fijarlas a los portas (HybEZ II™ Hybridization Oven, *ACD-Bio*; Minnesota, Estados Unidos). A continuación, las muestras se fijaron nuevamente con formalina 10%, durante 15 minutos, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los cerebros fueron incubados con peroxidasa durante 10 minutos y luego con la ayuda de una máquina de vapor (Braun household FS 5100, Dampfgarer, *Braun*; Kronberg, Alemania), se realizó una recuperación antigénica de las muestras (RNAscope® 1X Target Retrieval Reagent, *ACD-Bio*). Con ayuda de un bolígrafo hidrofóbico (Super PAP Pen Liquid Blocker, *Daido Sangyo;* Japón), se construyó una barrera alrededor de las muestras para facilitar la incubación de las sondas y se dejó secar durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras fueron tratadas con proteasa IV, durante 30 minutos a 40ºC tras lo cual fueron sumergidas en agua destilada. A continuación, se incubó la sonda dentro da la zona delimitada por el bolígrafo hidrofóbico (4-5 gotas/porta) y se dejaron hibridar durante 2 horas a 40ºC. Tras retirar la sonda y lavar las muestras con tampón de lavado (RNA Scope® Wash buffer 1x, *ACD-Bio*), se procedió a amplificar la señal (Base Scope™ v2 AMP 1-8, *ACD-Bio*), mediante 8 incubaciones alternas de 30 y 15 minutos, con lavados entre ellas, de la señal hibridada. Finalmente, la señal fue detectada con ayuda de los reactivos BaseScope™ Fast RED-B y RED-A, en una proporción de 1:60 incubando las muestras durante 10 minutos. Las muestras fueron teñidas con hematoxilia 50%, durante 2 minutos para tener referencias anatómicas y celulares y las muestras fueron montadas con medio de montaje (ProDiamond Antifade Mountant P36961, *Life Technologies*, California, Estados Unidos).

Las imágenes fueron tomadas con ayuda de una cámara digital a 20x y 40x (Olympus XC50, *Olympus Corporation*; Tokyo, Japón). Se tomaron fotografías de 3 animales AMPKγ2$^{fl/fl}$ y 3 animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$. Dada la clara ausencia de señal de la sonda en el VMH de todos los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$, las imágenes no fueron cuantificadas y se mostraron imágenes representativas de ambos genotipos.

4.7.7 PCR genotipado

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.7.7.1 Extracción de ADN

Todo el proceso se realizó manteniendo las muestras en hielo y centrifugando a 4ºC con el fin de evitar la degradación del ADN.

Se obtuvo una sección de cola (aproximadamente de 1-2 cm) de los ratones tras ser destetados, y se introdujo en un tubo estéril, con 0,5 ml de tampón de lisis (Tabla 20), con 10 µl de proteinasa K (Proteinase K 600 U/ml, *Thermo Fisher*; Massachusetts, Estados Unidos), y se mantuvieron en agitación constante a 55ºC toda la noche para su digestión. Se procedió a centrifugar las muestras a 13200 rpm durante 10 minutos para precipitar los restos celulares y se recuperó el sobrenadante. Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron 500 µl de isopropanol y se invierten los tubos manualmente varias veces. Se centrifugaron de nuevo a 13200 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado formado con 1 ml de etanol 70%. Nuevamente se centrifugaron los tubos a máxima velocidad, durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante antes de resuspender el precipitado en 100 µl de H_2O. Para disolver el precipitado se calentaron las muestras a 55ºC durante 10 minutos.

Tabla 20. Composición del tampón de lisis de cola

Reactivo	Cantidad/Volumen
1 M Tris-HCl pH 8	50 ml
500 mM EDTA pH 8	5 ml
SDS 10%	10 ml
5M NaCl	20 ml
Ajustar a H_2O MiliQ hasta 500 ml	

4.7.7.2 Amplificación por PCR

Para el genotipado de las distintas colonias de ratones se utilizaron PCR para determinar su genotipo. Se utilizó un set específico de cebadores (Tabla 21) y unas condiciones de temperatura y ciclos de amplificación, concretos en función de los alelos a estudiar. Finalmente, los fragmentos de ADN son separados mediante una electroforesis en geles de agarosa y el tamaño de las bandas se determina con ayuda de un marcador de peso molecular de ADN conocido. Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados con un método de purificación tipo HPSF y una concentración de 0,01 µM (*Eurofins Genomics GmbH*; Ebersberg, Alemania).

Los diferentes protocolos de PCR y secuencia de los primers pueden ser encontrados en la web del distribuidor (The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, Estados Unidos), para las diferentes cepas stock utilizadas: SF1-Cre (Tg(Nr5a1-cre)Lowl/J número de catálogo 012462; AMPKα2$^{fl/fl}$ *Prkaa2*$^{tm1.1Sjm}$/j número de catálogo 014142 y AMPKγ2$^{fl/fl}$ B6N.Cg-*Prkag2*$^{tm1.1Rto}$/J con número de catálogo 030979.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 21. Cebadores utilizados en los distintos genotipados

Alelo		Secuencia
AMPKα2 alelo floxeado	Forward 11530	GCA GGC GAA TTT CTG AGT TC
	Reverse 11531	TCC CCT TGA ACA AGC ATA CC
AMPKα2 alelo deleccionado	Forward 11530	GCA GGC GAA TTT CTG AGT TC
	Reverse	TGG TCC CCG AGT GAC ATT A
AMPKγ2 alelo floxeado	Forward 37331	TAG CTT GTT GTG GGT TGC TG
	Reverse 37332	CGG GGA TGT AGA CAA AAC CT
Transgen SF1 Cre	Forward oIMR6243	CTG AGC TGC AGC GCA GGG ACA T
	Reverse oIMR6244	TGC GAA CCT CAT CAC TCG TTG CAT
Control positivo transgen SF1 Cre	Forward oImr8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	Reverse oIMR8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

- PCR para AMPKα2$^{fl/fl}$

En esta PCR se detecta el estado del gen *Prkaa2* en referencia a las secuencias loxP. Un animal *wild-type*, presentará una única banda de en torno a 341 pares de bases (pb); un animal heterocigoto, con un alelo *wild-type* y un alelo flanqueado por las secuencias loxP, poseerá un peso mayor, y por tanto se detectarán dos bandas una de 341 pb y otra de 450 pb. Por último, los animales homocigotos para loxP, con ambas secuencias floxeadas, presentan nuevamente una única banda, de 450 pb, ya que ambos alelos son más pesados que el alelo *wild-type* (ausente en este caso). Las condiciones de la PCR se describen en las Tablas 22 y 23.

Tabla 22. Condiciones de la PCR para el genotipado de los animales AMPKα2 floxeados

Paso	T (ºC)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización incial	94ºC	2 min	1
Desnaturalización (touch down)	94ºC	20 segundos	10
Alineamiento (touch down)	65ºC (-0,5ºC/ciclo)	15 segundos	10
Extensión (touch down)	68ºC	10 segundos	10
Desnaturalización	94ºC	15 segundos	28
Alineamiento	60ºC	15 segundos	28
Extensión	72ºC	10 segundos	28
Elongación final	72ºC	2 minutos	1

Tabla 23. Composición de la mezcla de PCR para el genotipado de los animales AMPKα2 floxeados

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen
H_2O destilada	-	-	8 µl
Kapa2G Fast HotStart ReadyMix PCR kit	*Roche;* Basilea, Suiza	1x	12,5 µl
Cebador Forward 11530	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	0,5 µM	1,25 µl
Cebador Reverse 11531	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	0,5 µM	1,25 µl
Añadir 23 µl de mezcla y 2 µl de ADN genómico			

- PCR para el alelo recombinado en AMPKα2$^{fl/fl}$

En la validación del modelo SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ se realizó a mayores una PCR en tejidos que expresaban SF1 (Hipófisis, VMH, glándulas adrenales y gónadas), así como tejidos que no

USC DE COMPOSTELA

expresaban SF1 (Corteza, hígado y cerebelo), mostrando para los primeros la recombinación de Cre, mediante la aparición de una banda que no se observaba en los segundos tejidos. Se diseñó un primer "AMPKα2 alelo deleccionado reverse" (Tabla 21), que junto con el primer de genotipado "Forward 11530", da lugar a una banda de 1075 pb, tanto para animales AMPKα2$^{fl/fl}$ como para animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$. Pero, en aquellos tejidos en los que ha ocurrido la recombinación de las secuencias loxP, este primer se acerca al primer forward dando lugar a una banda de 402 pb (Resultados, Figura 8a), solo aparente en los animales SF1-Cre y en aquellos tejidos en los que se expresa SF1. Este protocolo ha sido proporcionado en colaboración con el Dr. Juan Roa Rivas y el Dr. Manuel Tena Sempere del grupo *GC10 – Regulación hormonal del balance energético, la pubertad y la reproducción* (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba – Córdoba, España).

Tabla 24. Condiciones de la PCR para la detección del alelo recombinado en SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$

Paso	T (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 segundos	40
Alineamiento	62	30 segundos	40
Extensión	72	45 segundos	40
Elongación final	72	5 minutos	1

Tabla 25. Composición de la mezcla de PCR para el genotipado del alelo recombinado en SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen
H_2O destilada	-	-	3,96 µl
Tampón DreamTaq 10x (20 mM $MgCl_2$	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	1x	1,2 µl
2,5 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp)	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,2 mM	0,96 µl
Cebador Forward 11530	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µm	0,6 µl
Cebador Reverse	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µm	0,6 µl
5 mM tampón de carga para DNA	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,69 mM	1,66 µl
Taq ADN polimerasa (5U/µl	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,03 U/1 µl	0,0 µl
Añadir 10 µl de mezcla y 2 µl de ADN genómico			

- PCR para AMPKγ2$^{fl/fl}$

En esta PCR se detecta el estado del gen *Prkag2* en referencia a las secuencias loxP. Para los animales *wild-type* se detectó una única banda de 103 pb; los animales heterocigotos mostraron dos bandas en 103 pb y 141 pb; y finalmente los animales homocigotos para las secuencias loxP, presentaron una única banda en 141 pb. De forma semejante a lo anteriormente explicado para los animales AMPKα$^{fl/fl}$. Las condiciones de la PCR se describen en las Tablas 26 y 27.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 26. Condiciones de la PCR para el genotipado de los animales AMPKγ2 floxeados

Paso	T (ºC)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización incial	94ºC	2 min	1
Desnaturalización (touch down)	94ºC	20 segundos	10
Alineamiento (touch down)	65ºC (-0,5ºC/ciclo)	15 segundos	10
Extensión (touch down)	68ºC	10 segundos	10
Desnaturalización	94ºC	15 segundos	28
Alineamiento	60ºC	15 segundos	28
Extensión	72ºC	10 segundos	28
Elongación final	72ºC	2 minutos	1

Tabla 27. Composición de la mezcla de PCR para el genotipado de los animales AMPKγ2 floxeados

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen
H_2O destilada	-	-	8 µl
Kapa2G Fast HotStart ReadyMix PCR kit	*Roche;* Basilea, Suiza	1x	12,5 µl
Cebador Forward 37331	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	0,5 µM	1,25 µl
Cebador Reverse 37332	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	0,5 µM	1,25 µl
Añadir 23 µl de mezcla y 2 µl de ADN genómico			

- PCR para el transgén SF1-Cre

En esta PCR se detecta el transgén SF1-Cre, para ambos modelos de ratones utilizados en esta tesis doctoral. Esta PCR, no diferencia animales hemicigotos de animales homocigotos para el transgén SF1-Cre, por ello el alelo debe permanecer siempre en hemicigosis. El resultado de la PCR es una única banda de 250 pb, por ello en este genotipado también se necesita realizar un control interno positivo, que nos detecta otra banda de 200 pb y nos asegura la presencia de ADN en las muestras y no un falso negativo. Las condiciones de la PCR se detallan en las tablas 28, 29, 30 y 31.

Tabla 28. Condiciones de la PCR para el genotipado del transgén SF1-Cre

Paso	T (ºC)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94ºC	3 min	1
Desnaturalización	94ºC	30 segundos	40
Alineamiento	53ºC	1 minuto	40
Extensión	72ºC	1 minuto	40
Elongación final	72ºC	2 minutos	1

Tabla 29. Composición de la mezcla de PCR para el genotipado del transgén SF1-Cre

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen
H_2O destilada	-	-	3,96 µl
Tampón DreamTaq 10x	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	1x	1,20 µl
25 mM $MgCl_2$	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	2 mM	0,96 µl
2,5 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp)	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,2 mM	0,96 µl
Cebador Forward oIMR6243	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6 µl

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cebador Reverse oIMR6244	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6 µl
5 mM tampon de carga para DNA	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,69 mM	1,66 µl
ADN Taq polimerasa (5 U/µl)	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,03 U/µl	0,06 µl
Añadir 10 µl de mezcla y 2 µl de ADN genómico			

Tabla 30. Condiciones de la PCR para el control interno, en el genotipado del transgén SF1-Cre

Paso	T (ºC)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94ºC	3 min	1
Desnaturalización	94ºC	30 segundos	40
Alineamiento	64ºC	30 segundos	40
Extensión	72ºC	1 minuto	40
Elongación final	72ºC	2 minutos	1

Tabla 31. Composición de la mezcla de PCR para el control interno, en el genotipado del transgén SF1-Cre

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen
H_2O destilada	-	-	3,96 µl
Tampón DreamTaq 10x	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	1x	1,20 µl
25 mM $MgCl_2$	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	2 mM	0,96 µl
2,5 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp)	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,2 mM	0,96 µl
Cebador Forward oImr8744	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6 µl
Cebador Reverse oIMR8745	*Eurofins Genomics* GmbH; Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6 µl
5 mM tampón de carga para DNA	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,69 mM	1,66 µl
ADN Taq polimerasa (5 U/µl)	*Invitrogen*; Waltham, MA USA	0,03 U/µl	0,06 µl
Añadir 10 µl de mezcla y 2 µl de ADN genómico			

4.7.7.3 Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN correspondientes a los alelos estudiados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Se prepararon geles de agarosa de un porcentaje entre 1,5-3% en función de la banda deseada, con tampón de electroforesis TAE (Tris 40 mM pH 7,6; ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) y se añadió un colorante que se une al ADN al gel para la visualización de las bandas (Red Safe 21141, *Intron Biotechnology*; Corea del Sur). Se cargó en el primer pocillo un marcador de peso molecular, que presenta bandas cada 100 pb (100 bp DNA Ladder, *Thermo Fisher*; Waltham, MA, Estados Unidos), todas las muestras y al final de los geles un control negativo (una PCR sustituyendo el ADN genómico por agua destilada) y un control positivo. Las electroforesis ocurrieron a 90 V durante 1 hora, sumergiendo el gel en tampón de electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se visualizaron con la ayuda de un transiluminador con luz ultravioleta (Gel Doc 1000, *Bio-Rad*; Hercules, CA, Estados Unidos).

4.7.8 Estadística

La representación gráfica de los datos obtenidos se ha presentado como la media de cada grupo y el error como la desviación estándar de la media (SEM). Para los análisis moleculares, los diferentes grupos experimentales se han presentado como porcentaje respecto al grupo control, mientras que para la mayoría de los parámetros y resultados de experimentos *in vivo*, se han utilizado los valores crudos. El número de animales o muestras empleados en cada panel se encuentran reflejados en los pies de figura.

USC DE SANTIAGO

De forma previa a los análisis estadísticos, se realizó un cribado de las muestras y/o animales atípicos empleando el software *GrahPad Prism 8* (GraphPad Software; Boston, MA, Estados Unidos), que presenta una funcionalidad empleando la prueba de Grubbs para ello. Durante la realización de los procedimientos experimentales también se tuvo en cuenta el comportamiento anómalo, el estado físico de los animales, su apariencia externa, la presencia de malestar o estereotipias, como motivos de exclusión de alguno de los animales para los análisis. Adicionalmente, se realizaron test de normalidad para los datos obtenidos. Con el mismo software se analizaron los datos a través de los test: Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wil y Kolmogorov-Smirnov, comprobando que las muestras cumplían las condiciones de normalidad y por tanto nos permitían la realización de test paramétricos. No se encontraron datos que no cumpliesen las condiciones de normalidad y por tanto implicasen la aplicación de test no-paramétricos.

4.7.8.1 T-test

Esta prueba compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test sólido que permite comparar poblaciones con un tamaño pequeño (N <5) (J.C.F de Winter, 2013; Student, 1908). En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (de una cola) la desigualdad en la hipótesis se señala en una dirección. En esta tesis se emplearon siempre T-test de dos colas, como viene especificado en los pies de figura, para evitar asunciones erróneas sobre variables con un efecto conocido previamente.

4.7.8.2 ANOVA de una vía

En el análisis de varianza (ANOVA) de una vía se comprueba si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de tres o más grupos de datos, que sigan una distribución normal y sean independientes entre sí (Kao & Green, 2008). Tras realizar el ANOVA, si los grupos presentan un comportamiento distinto, para analizar las posibles diferencias entre los grupos se realizó un test de Tukey para comparaciones múltiples (Tukey, 1949), para saber entre que grupos había diferencias de forma individual. Este test fue el recomendado por el software para los datos introducidos.

4.7.8.3 ANOVA de medidas repetidas

El análisis de varianza (ANOVA), para dos vías permite estudiar la relación entre una variable cuantitativa (por ejemplo, la masa corporal de un ratón) y dos variables independientes cualitativas y estudiar como estas variables afectan a nuestra variable cuantitativa. Como en muchos de los análisis de esta tesis, una de las variables no es independiente (por ejemplo, el tiempo), ya que las medidas ocurren siempre sobre el mismo sujeto, se requiere un ANOVA que tenga en cuenta que los datos son pareados. Para las comparaciones múltiples se empleó un test de Sidak (Šidák, 1967), recomendado por el software en función de los datos introducidos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. RESULTADOS

5.1 AMPK se inhibe en el hipotálamo tras una exposición a frío y la consecuente activación de la termogénesis y *browning* del WAT

Para establecer un modelo de exposición a frío, un grupo de ratas se mantuvo en una cámara fría a 4ºC durante 72h, mientras que los animales control se mantuvieron en condiciones de termoneutralidad (~30ºC para roedores), con el fin de evitar el posible estrés térmico al que suelen estar sometidos los animales en condiciones por debajo de esta temperatura (Cannon & Nedergaard, 2011; Gordon, 2012; Tran et al., 2022). La exposición a frío disminuye la masa corporal de los animales (Figura 24A), a pesar de una ingesta incrementa (Figura 24B), cursando también con una disminución de la temperatura corporal duranta la duración del experimento (Figura 24C-D).

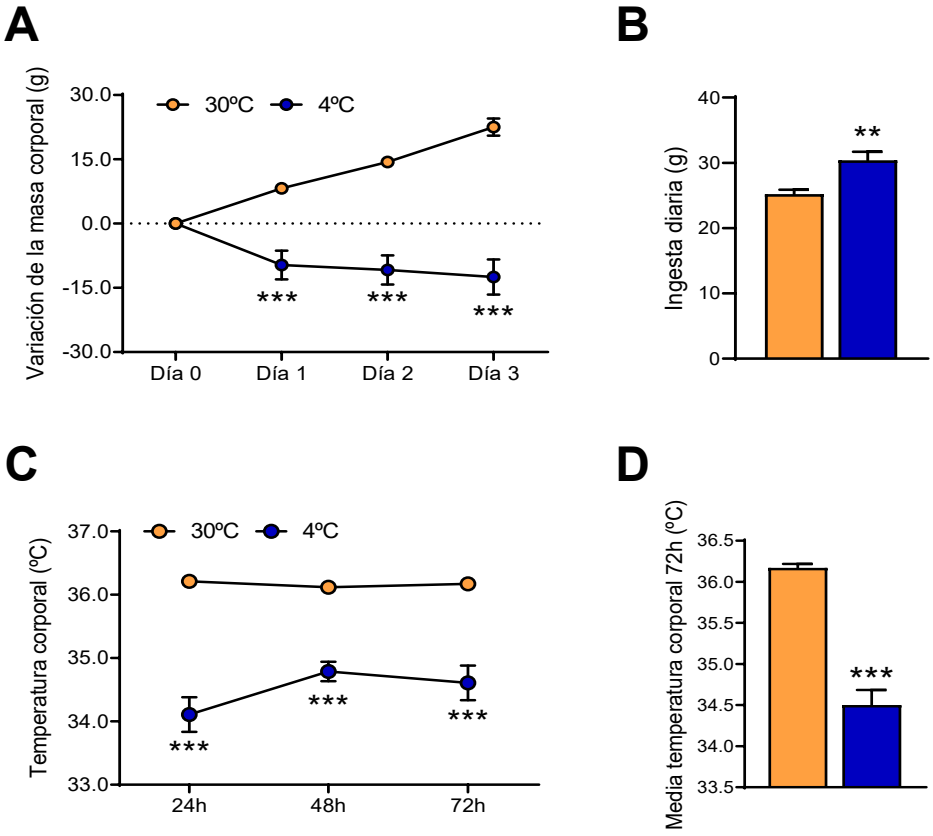


Figura 24. Efecto de una exposición a frío (4ºC) durante 72h y sus efectos sobre la masa corporal, la ingesta y la temperatura corporal. (A) Variación de la masa corporal de los animales control (30ºC) en comparación con animales expuestos a frío (4ºC). (B) Ingesta promedio durante 72h del experimento. (C-D) Temperatura corporal media durante el experimento. 30ºC N=10 y 4ºC N=7, para todos los paneles. Test estadístico t de student (2 colas), **P<0,01, ***P<0,001 vs 30ºC(72h). Datos representados como media ± SEM.

En experimentos posteriores decidimos incluir dos grupos adicionales, de exposición a frío: 1h y 24h, de cara observar más de cerca la evolución en la aclimatación de los animales y para los análisis moleculares. La temperatura del BAT de los animales expuestos a 4ºC 1h y 24h, era menor que los animales a 30ºC, pero a las 72h, se observaba una mayor temperatura que a las 24h, indicando una mejor aclimatación y un mayor reclutamiento del BAT (Figura 25A-B). La exposición a frío aumentó los niveles de ARNm en el BAT de varios marcadores termogénicos en todos los grupos de 4ºC en el BAT (Figura 25C) como: *Ucp1, Ppargc1a, Elovl3, Ucp3*, mientras que otros no mostraron cambios (*Ppargc1b, Prdm16, Tfam y CIDEA*). Por último, la

exposición a frío también aumentó los niveles de UCP1 en el BAT, en todos los grupos experimentales de 4ºC, mientras que pHSL (forma activa, Ser660), solo se elevó de forma significativa en el grupo de 4ºC (1h) (Figura 25D-E).

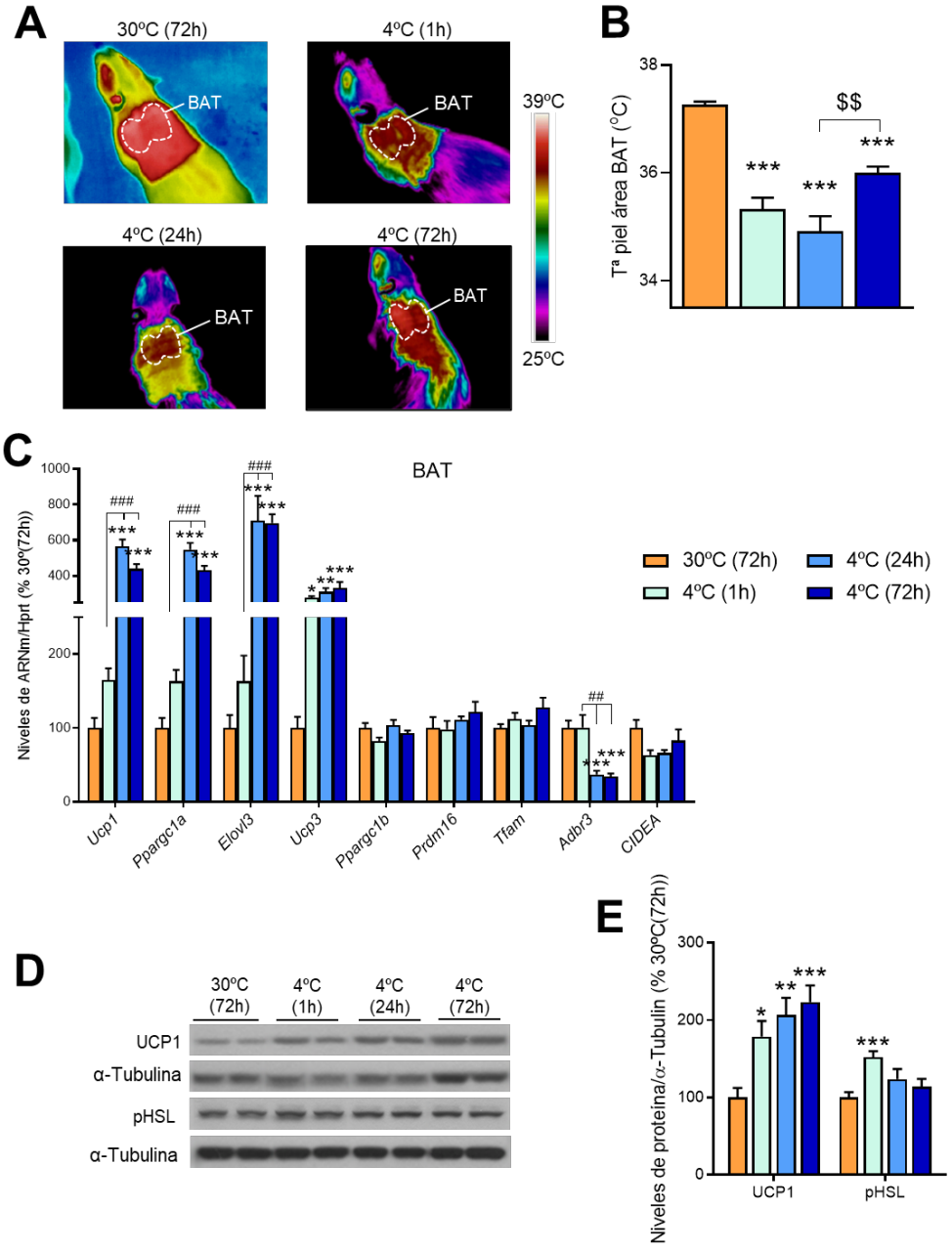


Figura 25. Efecto de una exposición a frío (4ºC) sobre la temperatura del BAT, niveles de ARNm y proteína de marcadores termogénicos. (A-B) Imágenes termográficas y cuantificación de la temperatura del área del BAT (30ºC (72h) N=10; 4ºC (1h) N=8; 4ºC (24h) N=10; 4ºC (72h) N=8). (C) Niveles de ARNm de varios marcadores termogénicos en el BAT (30ºC (72h) N=10; 4ºC (1h) N=8; 4ºC (24h) N=8; 4ºC (72h) N=8). (D-E) Niveles proteicos de UCP1 y pHSL en el BAT (30ºC (72h) N=7; 4ºC (1h) N=7; 4ºC (24h) N=7; 4ºC (72h) N=7). Test estadístico ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs 30ºC(72h). $$P<0,01 vs 4ºC(24h). #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs 4ºC(1h). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

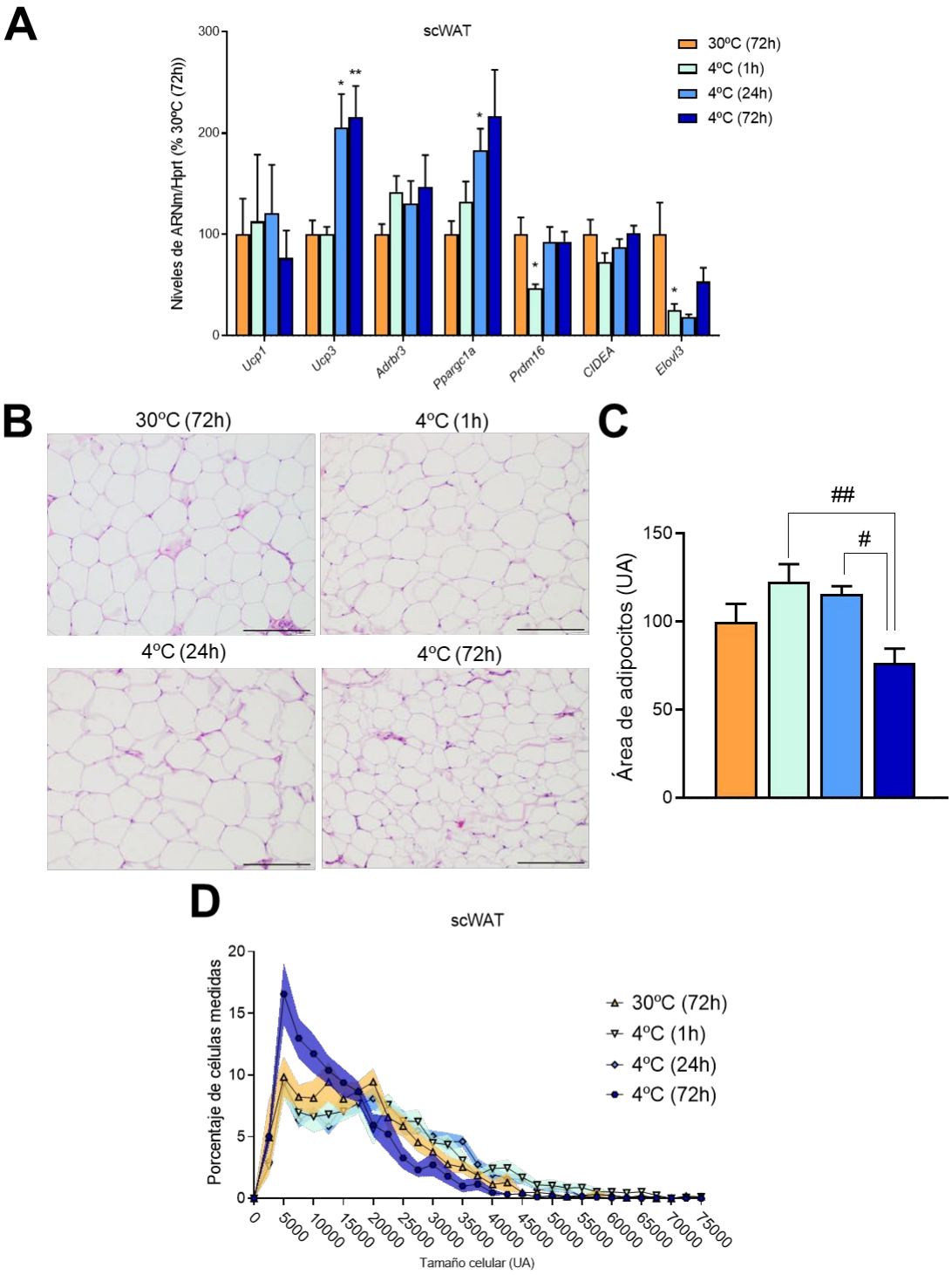


Figura 26. Efecto de una exposición a frío (4ºC) sobre el *browning* del scWAT. (A) Niveles de ARNm de varios marcadores termogénicos en el scWAT (30ºC (72h) N=9; 4ºC (1h) N=7; 4ºC (24h) N=7; 4ºC (72h) N=7). (B-C) Tinción hematoxilina-eosina del WAT subcutáneo (panel izquierdo; 20x, barra de escala: 75 µm) y área media de los adipocitos (panel derecho, relativizada respecto al grupo 30ºC(72h), unidades arbitrarias) (30ºC (72h) N=9; 4ºC (1h) N=8; 4ºC (24h) N=8; 4ºC (72h) N=8), 3-4 fotos por animal. (D) Frecuencia relativa del tamaño de los adipocitos en los distintos grupos (unidades arbitrarias) 150-300 adipocitos contados por animal (30ºC (72h) N=9; 4ºC (1h) N=8; 4ºC (24h) N=8; 4ºC (72h) N=8). Test estadístico ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison) *P<0,05, **P<0,01 vs 30ºC(72h). #P<0,05, ##P<0,01 vs 4ºC(72h). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

También comprobamos, si la exposición a frío inducía *browning* en el WAT subcutáneo (scWAT). Mediante RT-qPCR, se vio el aumento significativo de ciertos marcadores termogénicos como *Ucp3* o *Ppargc1a* en el scWAT (Figura 26A). Mediante hematoxilina-eosina también se vio como existían diferencias en el tamaño de los adipocitos (Figura 26B-D), donde el grupo de 4ºC(72h) presentaba adipocitos más pequeños que los otros grupos a 4ºC (aunque no se vieron diferencias respecto al grupo control). De igual forma, el grupo de 4ºC(72h) presentaba una frecuencia relativa mayor, de adipocitos pequeños, nuevamente respecto a los otros grupos de 4ºC (Figura 26D), aunque no se encontraron diferencias significativas. Mediante inmunohistoquímica también analizamos los niveles de UCP1 en la scWAT de estos animales, donde el grupo con una exposición más larga incrementaba los niveles de UCP1 de forma significativa (Figura 27A-B).

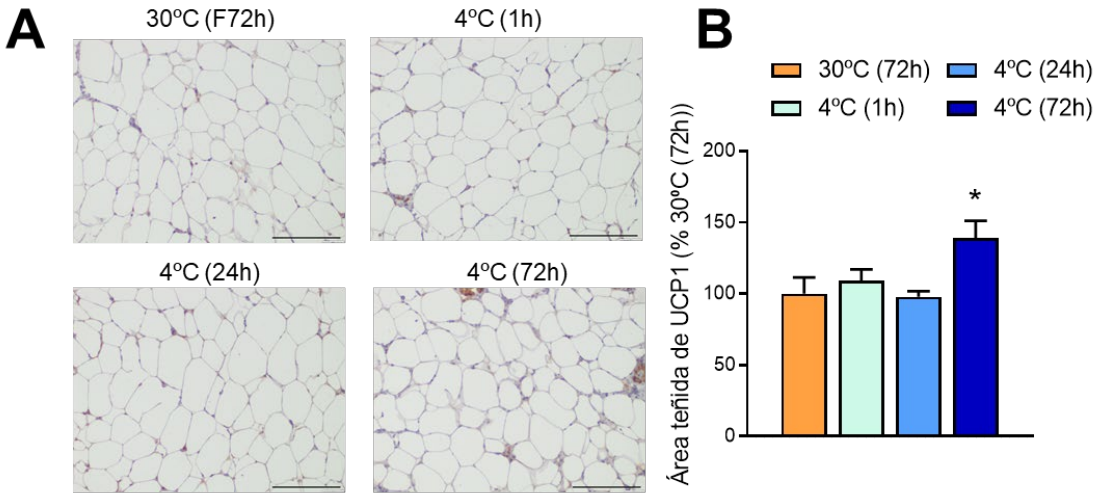


Figura 27. Efecto de una exposición a frío (4ºC) sobre UCP1 en el scWAT. (A-B) Inmunohistoquímica para UCP1 del WAT subcutáneo (panel izquierdo; 20x, barra de escala: 75 µm) y área inmunorreactiva (30ºC (72h) N=7; 4ºC (1h) N=8; 4ºC (24h) N=7; 4ºC (72h) N=7), 2-4 fotos por animal. Test estadístico ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison). *P<0,05 vs 30ºC(72h). Datos representados como media ± SEM.

Finalmente se analizaron los niveles de la ruta de AMPK en el VMH. La exposición a frío disminuyó los niveles de la forma activa de AMPK [p-AMPKα (Thr172)], en los grupos de 4ºC (24h) y 4ºC (72h), que se vieron acompañados de un descenso en los niveles de p-ACCα (Ser79) (la forma inactiva de la proteína) en todos los grupos de 4ºC. Adicionalmente la isoforma catalítica AMPKα1, también vio sus niveles reducidos con la exposición más larga [4ºC (72h)], mientras que AMPKα2 disminuyó sólo en el grupo 4ºC(24h) (Figura 28A-B). De esta forma, estos datos indican que una exposición a 4ºC, inhibe la ruta de AMPK en el VMH, es capaz de inducir la termogénesis del BAT, el *browning* del WAT e inducir cambios en la masa corporal, la ingesta, temperatura y termogénesis de los animales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

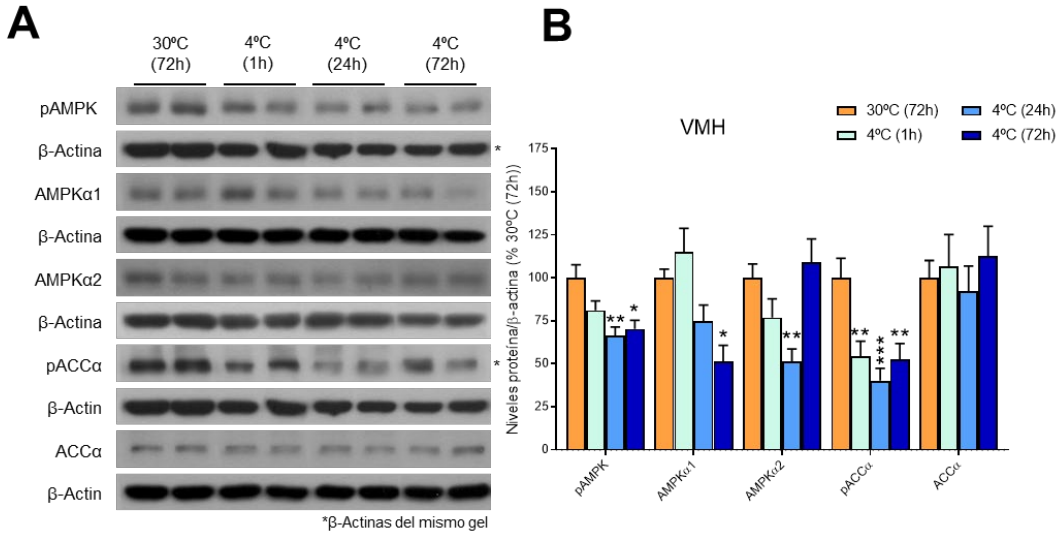


Figura 28. Efecto de una exposición a frío (4ºC) sobre la ruta de AMPK en el VMH. (A-B) Niveles proteicos de pAMPK, AMPKα1, AMPKα2, pACCα y ACCα en el VMH (30ºC (72h) N=7; 4ºC (1h) N=7; 4ºC (24h) N=7; 4ºC (72h) N=7). Test estadístico ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs 30ºC. ##P<0,01 vs 4ºC(24h). Datos representados como media ± SEM. Las bandas cortadas de los geles provienen del mismo gel original.

5.2 La sobreexpresión de una isoforma constitutivamente activa de AMPKα1 en el VMH dificulta la aclimatación a frío de los animales

Dado que: i) AMPKα1 era la isoforma que presentaba una disminución significativa al cabo de 72h a 4ºC, ii) las hormonas tiroideas regulan los niveles de AMPKα1, pero no AMPKα2 en el hipotálamo (López et al., 2010) y iii) el ratón SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$, presenta una termogénesis y temperatura elevadas (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018); decidimos administrar mediante estereotaxia núcleoespecífica adenovirus que expresan una isoforma constitutivamente activa (CA) de AMPKα1 (López et al., 2010; Martínez de Morentin et al., 2014; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017) en el VMH de ratas y ver como estas se comportaban ante el mismo estímulo de 4ºC.

La correcta administración e infección de los virus se comprobó mirando la expresión de GFP en el VMH (Figura 29A). Los animales se introdujeron en la cámara fría al 5º día, tras la operación, una vez recuperados. Ambos grupos a 4ºC, perdieron masa corporal de forma significativa respecto al control a temperatura ambiente (Figura 29B). El grupo 4ºC AMPKα1-CA, mostró una clara tendencia (P=0.06) a perder más masa corporal durante la exposición a frío que el grupo 4ºC GFP VMH (Figura 29B). Este grupo de animales también presentaban una ingesta disminuida respecto al grupo 4ºC GFP VMH, que comían más que el grupo a temperatura ambiente GFP VMH (Figura 29C), una respuesta característica, ante una exposición al frío (Figura 24B). Lo más destacable, fue que los animales 4ºC AMPKα1-CA VMH, presentaron un cambio en la temperatura media, más baja que el grupo 4ºC GFP VMH (Figura 29D), indicando que presentaban mayores dificultades para defender su temperatura. Mediante implantes subcutáneos, se corroboró esa idea, demostrando como el grupo 4ºC AMPKα1-CA VMH, se mantuvo por debajo del grupo 4ºC GFP VMH, durante todo el transcurso del experimento (Figura 29E). Estableciendo una coordenada Y = 1 para tener en cuenta al grupo 23ºC GFP VMH, calculamos el área bajo la curva (AUC) y vimos como para el grupo que expresaba AMPKα1-CA, esta era significativamente mayor que para el grupo 4ºC GFP VMH (Figura 29F).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

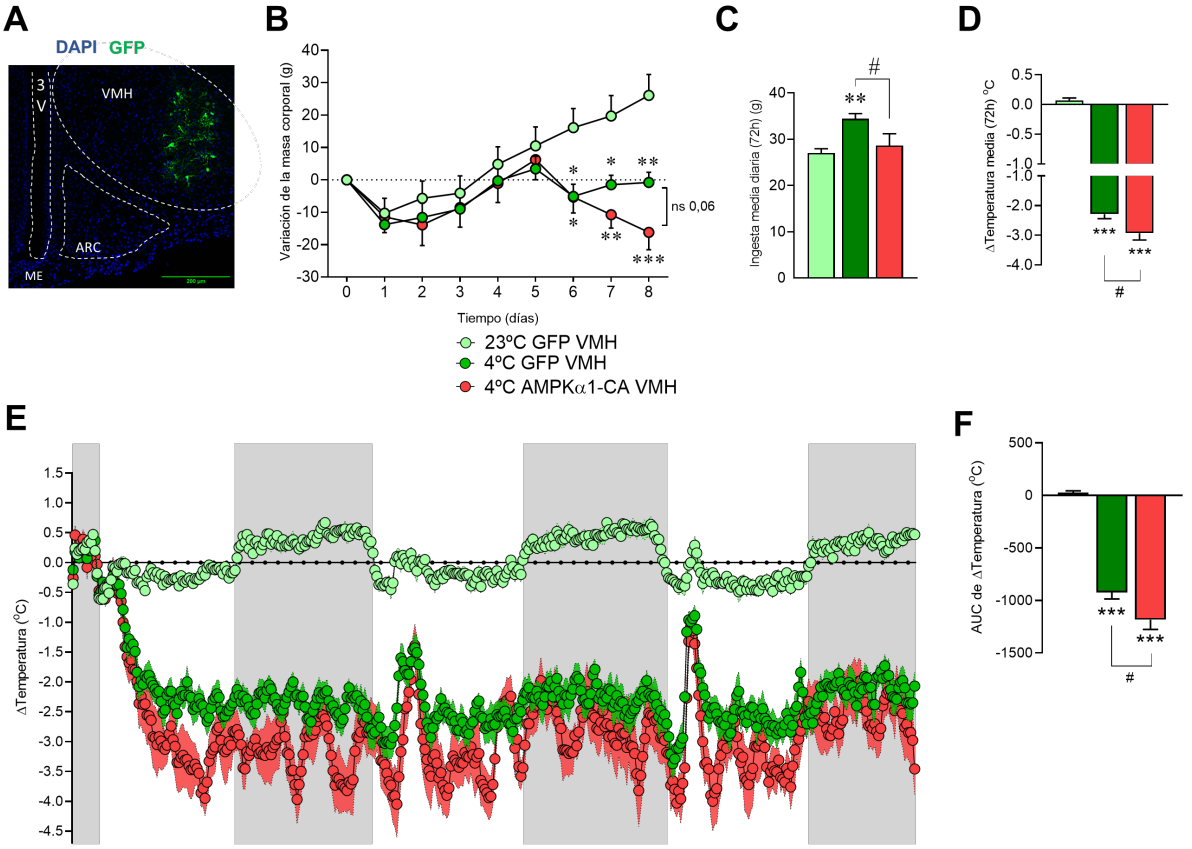


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de AMPKα1-CA en el VMH sobre la aclimatación a frío. (A) Inmunofluorescencia directa de GFP en el VMH (20x, escala 200 µm). (B) Variación de la masa corporal durante el experimento (23ºC GFP VMH N=10, 4ºC GFP VMH N=10, 4ºC AMPKα1-CA N=8). (C) Ingesta promedio durante las últimas 72h del experimento (23ºC GFP VMH N=11, 4ºC GFP VMH N=10, 4ºC AMPKα1-CA N=9). (D) Media del cambio en la temperatura corporal durante las últimas 72h (23ºC GFP VMH N=11, 4ºC GFP VMH N=10, 4ºC AMPKα1-CA N=8). (E) Temperatura corporal de los animales durante las últimas 72h (23ºC GFP VMH N=11, 4ºC GFP VMH N=10, 4ºC AMPKα1-CA N=8). (F) Área bajo la curva para E. Test estadístico ANOVA two-way (Tukey's multiple comparison) para (A) y (E); ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison) para (C), (D) y (F). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs 23ºC GFP VMH. #P<0,05 vs 4ºC GFP VMH. Datos representados como media ± SEM

Apoyando este resultado, los animales 4ºC GFP VMH presentaban unos menores niveles de UCP1 y una tendencia a unos menores niveles de pHSL (Figura 30A-B). Estos datos indican que la sobreexpresión de una isoforma de AMPKα1 constitutivamente activa en el VMH de ratas, da lugar a una peor aclimatación al frío, al mostrar los animales una tendencia a perder más masa corporal, una ingesta reducida y sobre todo una disminución en la temperatura corporal, acompañada de unos menores niveles de UCP1 en el BAT.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

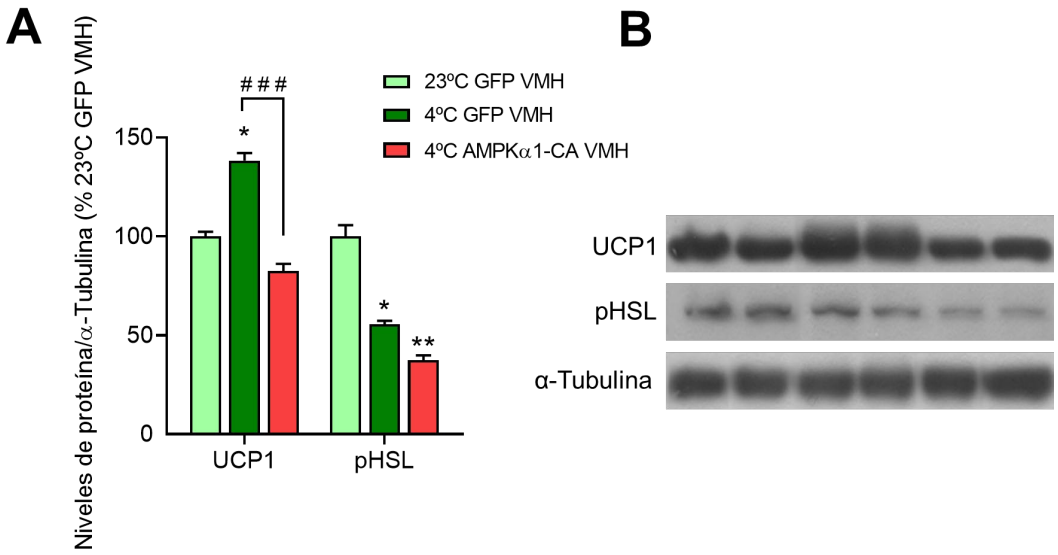


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión de AMPKα1-CA en el VMH sobre el BAT. (A-B) Niveles proteicos de UCP1 y pHSL en el BAT (23ºC GFP VMH N=9, 4ºC GFP VMH N=9, 4ºC AMPKα1-CA N=9). Test estadístico ANOVA one-way (Tukey's multiple comparison). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs 23º GFP VMH. ###P<0,001 vs 4ºCGFP VMH. Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

5.3 Caracterización de la eliminación de AMPKα2 en las neuronas SF1 del VMH.

AMPKα1 y AMPKα2 constituyen la dos principales subunidades catalíticas de AMPK. Sin embargo, la manipulación de AMPKα1 frente a AMPKα2 en el VMH es la responsable del aumento de la termogénesis del BAT, durante la acción de las hormonas tiroideas en este núcleo (López et al., 2010). Asimismo, la administración de adenovirus que sobreexpresan una isoforma dominante negativa de AMPKα1 en el VMH, revierte el fenotipo de obesidad inducida por dieta, al aumentar la pérdida de masa corporal debido a una termogénesis elevada, que no ocurre con AMPKα2 (Seoane-Collazo et al., 2018). Posteriormente, el modelo SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$, un ratón deficiente para AMPKα1 en las neuronas SF1 en el VHM, confirmó la importancia del eje SF1(VMH)-SNS-BAT en el control de la homeostasis energética (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Resultado que, además demostró tener una relevancia traslacional, ya que la administración de vesículas extracelulares (sEVs, *small extracellular vesicles*), cargadas con una isoforma dominante negativa de AMPKα1 y dirigidas específicamente a las neuronas SF1, fue capaz de revertir la obesidad inducida por HFD y de modelos genéticos, al aumentar la termogénesis del BAT, sin afectar a la ingesta (Milbank et al., 2021, 2023).

A pesar de ello, sabemos que AMPKα2 también posee un rol importante, tanto en el hipotálamo como en otros tejidos (Claret et al., 2007; Viollet, 2009). Siendo, por tanto, importante elucidar el papel de AMPKα2 en las neuronas SF1. Para ello decidimos cruzar animales que poseían el exón 2 de la subunidad AMPKα2, flanqueado por las secuencias loxP con ratones que expresan la Cre recombinasa bajo el promotor de SF1, de forma que eliminaríamos dicha isoforma en estas neuronas del VMH.

La efectividad de la eliminación de AMPKα2 en dichas neuronas se validó mediante PCR y por fluorescencia cruzando el animal con un gen reportero fluorescente. Los cebadores de PCR fueron diseñados de forma específica para que amplificasen una banda recombinante, en torno a 402 pb, sólo cuando hubiese recombinación por parte de la Cre-recombinasa y mediante

USC DE COMPOSTELA

un protocolo que favorece la amplificación de esa banda, frente a la banda WT de 1075 pb (presente en todas las muestras), que requiere un tiempo de extensión mayor. De esta manera, observamos recombinación en los tejidos positivos para SF1, como el VMH, glándulas adrenales y gónadas, pero no en tejidos como el córtex, hígado o cerebelo (Figura 31A). En la hipófisis también encontramos expresión para SF1, pero no se logró la amplificación de la banda recombinante. Estos datos se obtuvieron en colaboración con el Dr. Juan Roa Rivas y el Dr. Manuel Tena Sempere del grupo *GC10 – Regulación hormonal del balance energético, la pubertad y la reproducción* (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba – Córdoba, España).

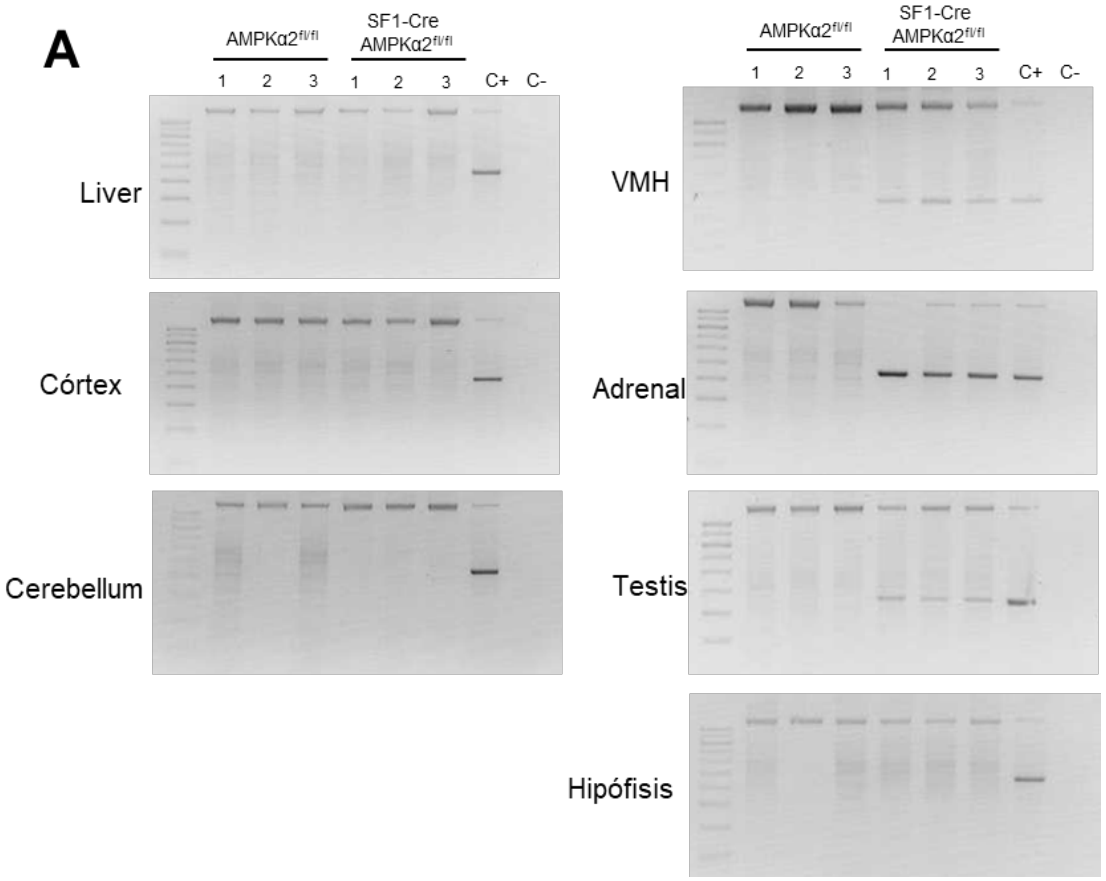


Figura 31. Estudio sobre la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1. (A) PCRs para la detección del alelo recombinado del gen *Prkaa2* en los tejidos de ratones AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ en los tejidos: VMH, adrenales, gónadas e hipófisis, así como, hígado, córtex y cerebelo.

Para validar el modelo morfológicamente, cruzamos los animales AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ con un gen reportero, de manera que cuando la Cre-recombinasa, escindía las secuencias *loxP* se producía la eliminación de un codón de stop y se produce la expresión de una proteína *Td-Tomato* fluorescente (Figura 32A). De esta manera, pudimos observar cómo los animales positivos para SF1-Cre, presentaban fluorescencia de Td-Tomato en la mayor parte del VMH (Figura 32B-D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

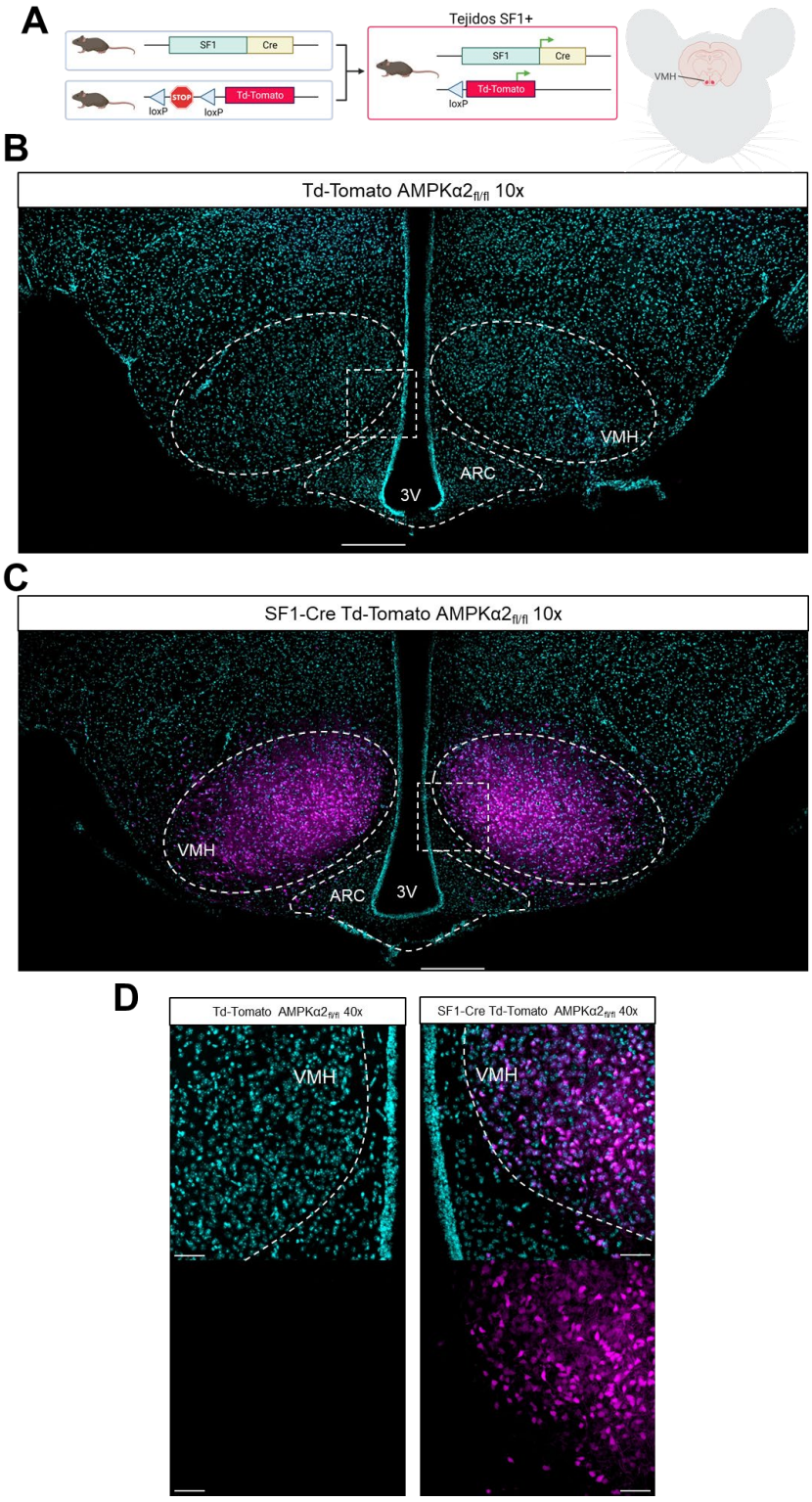


Figura 32. Recombinación de los animales SF1-Cre AMPKα2^{flfl}/Td-Tomato. (A) Esquema gráfico del funcionamiento de la tecnología Cre-loxP con genes reporteros. (B) Imágenes de microscopía confocal para animales Td-Tomato AMPKα2$^{fl/fl}$, DAPI = cian, Td-Tomato = magenta (10x, barra de escala 200 µm). (C) Imágenes de microscopía confocal para animales SF1-Cre Td-Tomato AMPKα2$^{fl/fl}$ DAPI = cian, Td-Tomato = magenta (10x, barra de escala 200 µm). (D) Imágenes de microscopía confocal procedentes de los recuadros de B y C, para animales Td-Tomato AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre Td-Tomato AMPKα2$^{fl/fl}$ DAPI = cian, Td-Tomato = magenta (40x, barra de escala 50 µm). Panel A creado con biorrender.com

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.4 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta a la masa corporal ni a la termogénesis en ambos sexos.

Tras la confirmación de la eliminación de AMPKα2, se realizó un seguimiento de la masa corporal de los animales durante 20 semanas en dieta estándar (STD, *standart diet*). No se observaron diferencias en la masa corporal (Figura 33A), ingesta (Figura 33B), o depósitos grasos (Figura 33C) en el caso de los machos SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ al compararse con sus compañeros de camada. De forma paralela, tampoco observamos diferencias en las hembras SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ en comparación a sus controles AMPKα2$^{fl/fl}$, para ninguno de estos parámetros (Figura 34A-C).

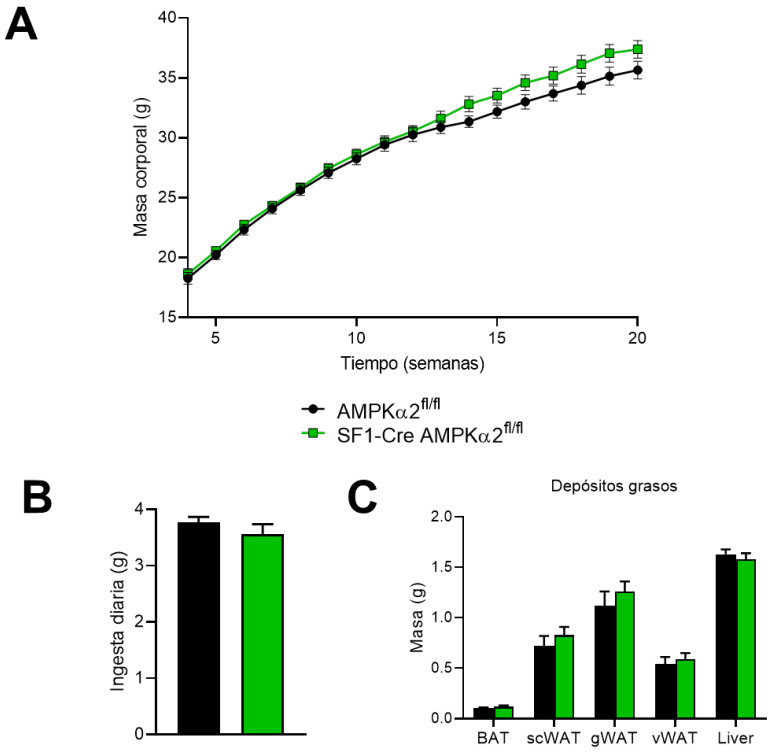


Figura 33. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre el balance energético en machos. (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=30, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=38). (B) Ingesta promedio durante 7 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (C) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=21, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=31). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A) y t de Student (2 colas) para (B) y (C). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

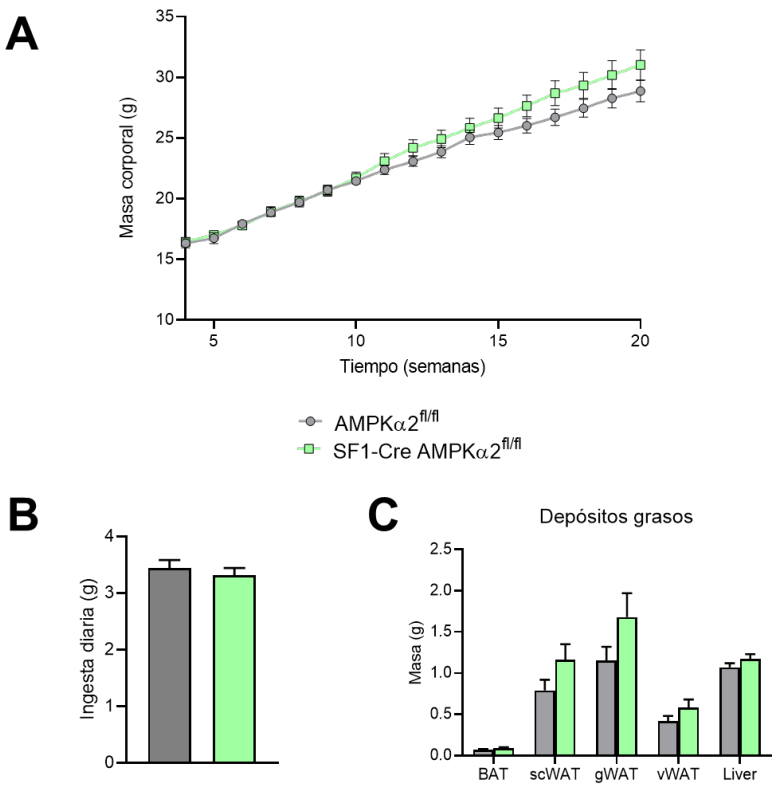


Figura 34. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre el balance energético en hembras. (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=29, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=28). (B) Ingesta promedio durante 7 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=13, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=14). (C) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=22, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=18). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A) y t de Student (2 colas) para (B) y (C). Datos representados como media ± SEM.

Seguidamente también analizamos la capacidad termogénica de estos animales. No se encontraron diferencias en la temperatura corporal de los machos (Figura 35A), ni en la termogénesis en el BAT (Figura 35B), así como tampoco vimos diferencias en los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 35C). Nuevamente, las hembras se comportaban de forma similar, también sin diferencias en la temperatura corporal (Figura 36A), la termogénesis en el BAT (Figura 36B) y los niveles de UCP1 en el BAT (Figura 36C).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

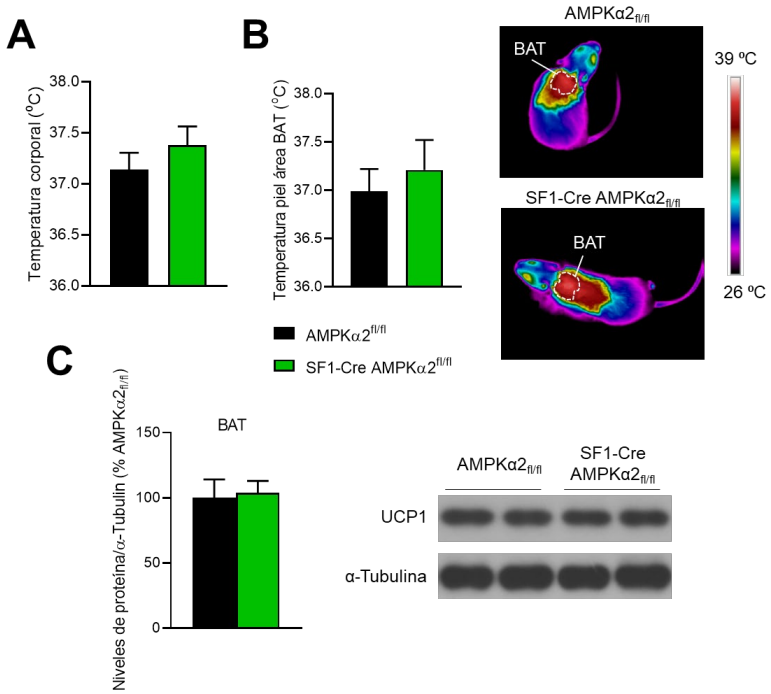


Figura 35. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en machos. (A) Temperatura corporal media durante una semana (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (B) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (C) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

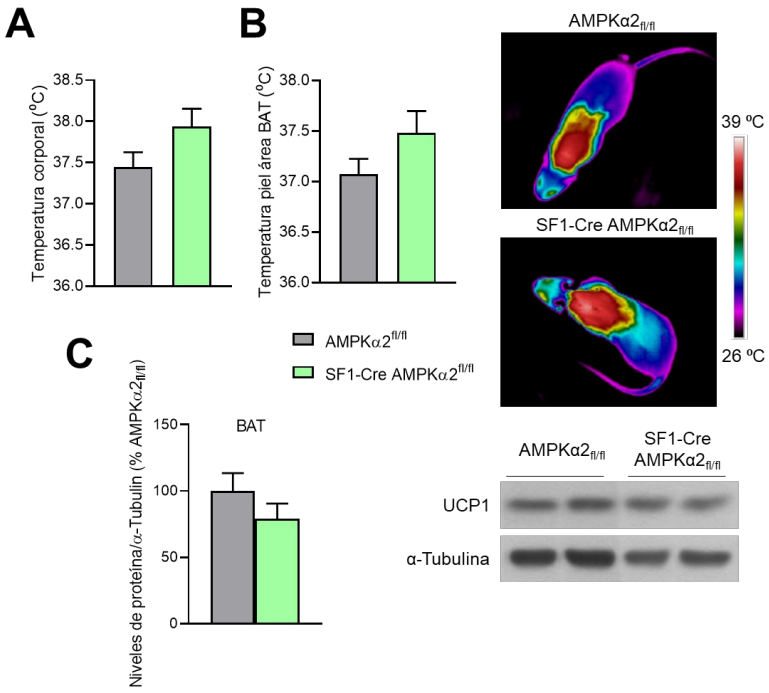


Figura 36. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en hembras. (A) Temperatura corporal media durante una semana (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (B) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (C) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

Estos datos demuestran que, en contraposición a la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1, la eliminación de la subunidad AMPKα2 en estas mismas neuronas, parece no tener efectos evidentes sobre la homeostasis energética, al no observarse cambios en la masa corporal, la ingesta o la termogénesis en ninguno de los dos sexos.

5.5 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora.

Mediante ANCOVA, utilizando la masa corporal como covariable vimos como ambos animales AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$, no presentaban diferencias en el gasto energético de los machos (Figura 37A, C). Los animales analizados también se sometieron a resonancia magnética, donde no se observaron diferencias en la composición corporal de los machos (Figura 37B). De igual manera, tampoco vimos diferencias en el cociente respiratorio o la actividad locomotora (Figura 37D, E).

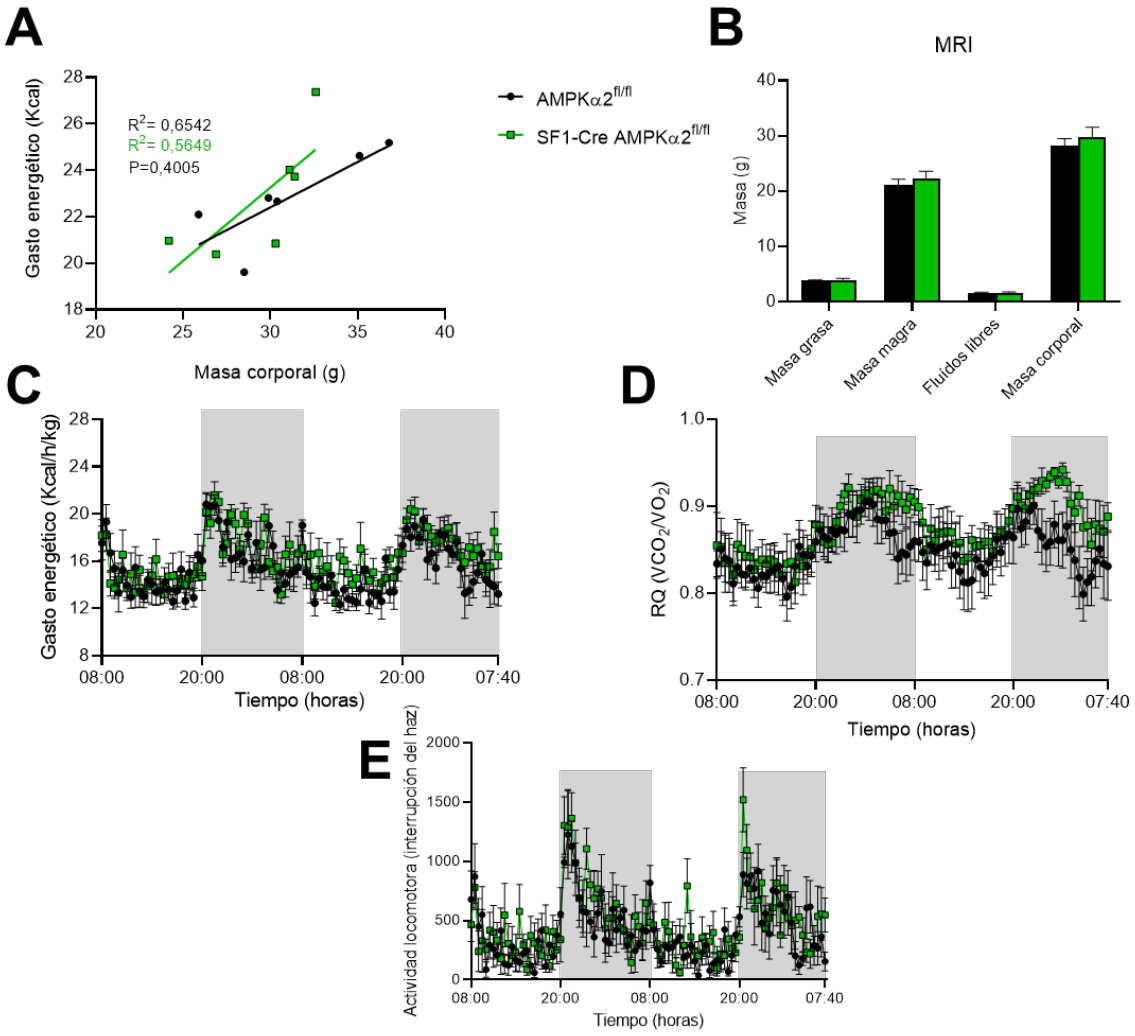


Figura 37. Resultados de calorimetría indirecta para los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada en machos. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable. (B) Resultados de resonancia magnética (C) Gasto energético de los animales a lo largo de 48h. (D) Coeficiente respiratorio durante 48h. (E) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para todos los paneles AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6. Test estadístico T de student (B) y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-E). Datos representados como media ± SEM.

USC DE COMPOSTELA

De igual manera, las hembras presentaron un comportamiento similar en los análisis de calorimetría. No encontramos diferencias en el gasto energético de las hembras SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ respecto a sus compañeras de camada AMPKα2$^{fl/fl}$ (Figura 38A, C). Tampoco vimos diferencias en la composición corporal de las hembras analizadas por calorimetría indirecta (Figura 38B), o en los otros parámetros obtenidos: el cociente respiratorio y la actividad locomotora (Figura 38D, E).

Estos datos demuestran que, la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afectaba a los distintos componentes del gasto energético analizados por calorimetría indirecta, en ninguno de los dos sexos.

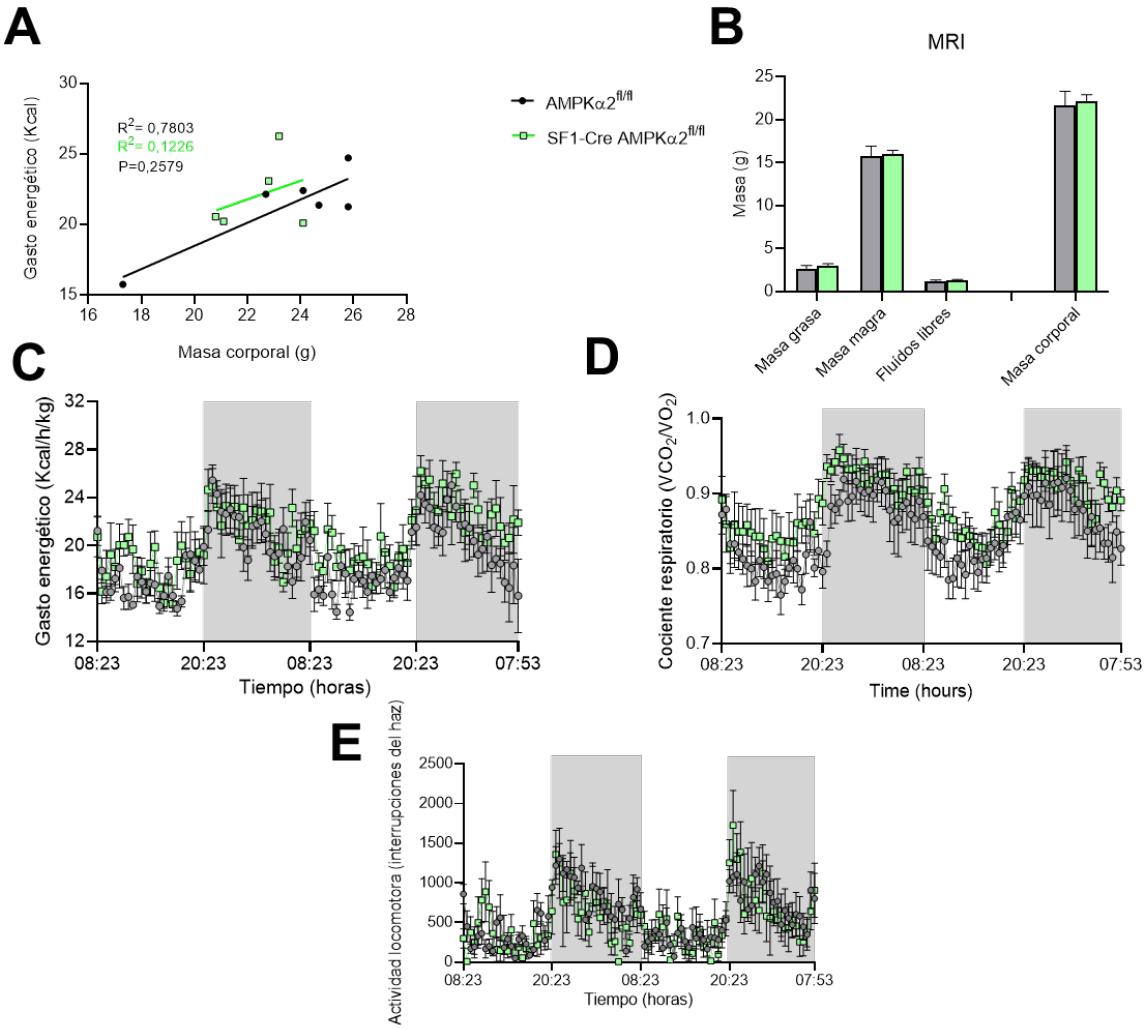


Figura 38. Resultados de calorimetría indirecta para los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada, en hembras. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable. (B) Resultados de resonancia magnética (C) Gasto energético de los animales a lo largo de 48h. (D) Coeficiente respiratorio durante 48h. (E) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para todos los paneles AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5. Test estadístico T de student (B) y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-E). Datos representados como media ± SEM.

5.6 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al metabolismo de la glucosa

El VMH y más concretamente las neuronas SF1, poseen un papel muy relevante en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Borg et al., 1997; Borg et al., 1994, 1995; Choi et

al., 2013; Coutinho et al., 2017; Shimazu & Minokoshi, 2017; Tu et al., 2022). El ratón SF1-Cre AMPKα1-SF1 presentaba alteraciones en el metabolismo de la glucosa, al someterse a dieta alta en grasa (Seoane-Collazo et al., 2018). Por ello decidimos investigar la homeostasis de la glucosa en los ratones SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$.

Como anteriormente en las comparaciones entre AMPKα2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ no se observaron diferencias entre machos y hembras para los distintos parámetros analizados, los ensayos detallados a continuación se realizaron de forma exclusiva en machos. Realizamos test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucosa tolerance test*), donde no observamos diferencias (Figura 39A). Tampoco se observaron diferencias en los test de sensibilidad a la insulina (ITT, *insulin tolerance test*) (Figura 39B) y en test de tolerancia al piruvato (PTT, *piruvate tolerance test*) (Figura 16C).

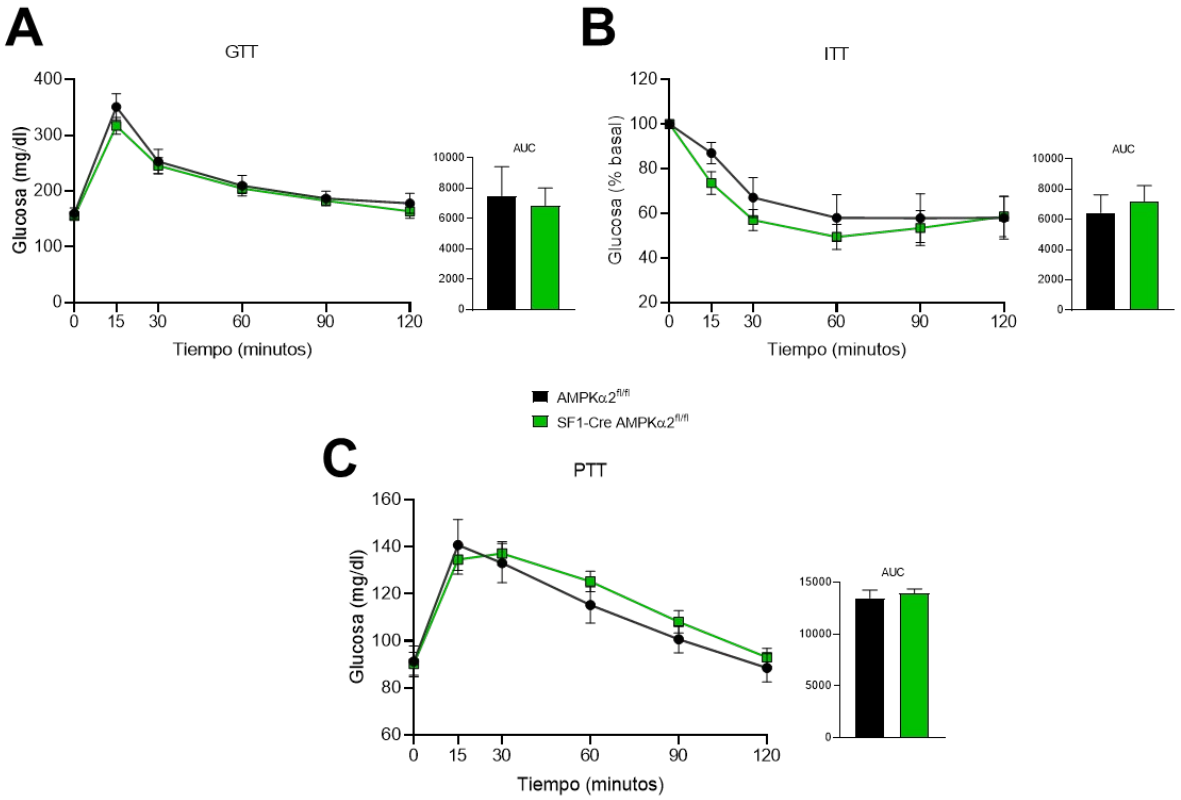


Figura 39. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre la homeostasis de la glucosa. (A) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa (GTT) y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10). (B) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (C) Panel izquierdo test de tolerancia al piruvato y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10). Test estadístico T de Student 2 colas. Datos representados como media ± SEM.

También realizamos un test de tolerancia a la glucosa post-pandrial, donde después de un ayuno *overnight* de 12 horas, los animales se les suministra comida de nuevo y se observan los cambios en los niveles de glucosa, ya que de existir cambios indicarían un manejo pobre de la glucosa. No se observaron cambios, en los niveles de glucosa post-pandrial (Figura 40A, B), ni en la comida ingerida, ni la masa corporal (Figura 40C, D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

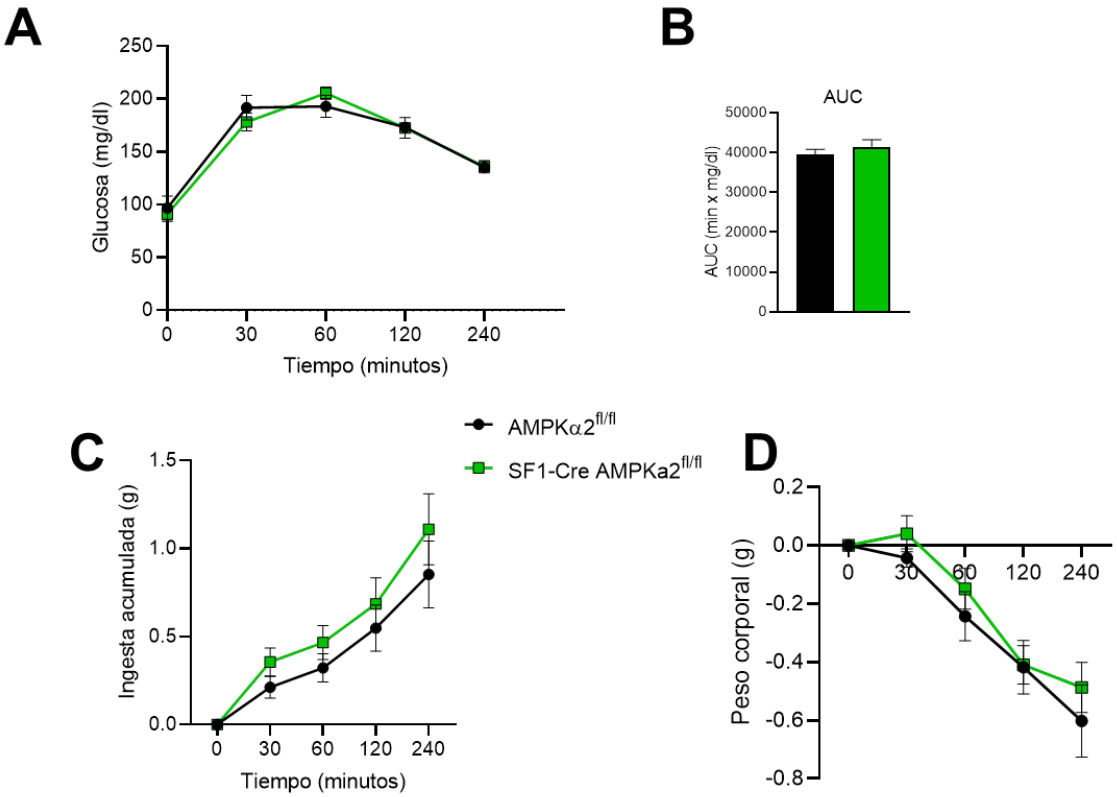


Figura 40. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre la glucosa postpandrial. (A) Niveles plasmáticos de glucosa post-pandrial tras un ayuno de 12h (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (B) Área bajo la curva de A. (C) Ingesta acumulada durante 4h tras el ayuno (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (D) Evolución de la masa corporal tras el ayuno y la comida suministrada. Test estadístico T de Student 2 colas. Datos representados como media ± SEM.

Para profundizar un poco más, realizamos una restricción calórica del 60%. En ella, tras individualizar los animales durante una semana y monitorizar su ingesta, los animales reciben un 40% de la cantidad de comida que venían ingiriendo siempre a las 18:00, posteriormente a la evaluación de su masa corporal y sus niveles de glucosa en sangre. Durante dicha restricción, tampoco observamos cambios drásticos en el manejo de la glucemia de los animales o su masa corporal, de forma previa a recibir su porción de comida (Figura 41A, B). A continuación, estudiamos también la respuesta a hormonas hiperglucemiantes, suministrando glucagón o adrenalina. Cada animal recibió en distintos días, bien una de las hormonas o salino, de manera que cada uno fue su propio control. De nuevo no se observaron diferencias significativas en la respuesta hiperglucemiante a estas hormonas, entre los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada (Figura 41C, D). Estos resultados demostraban que, la subunidad AMPKα2 en neuronas SF1, no presenta un rol relevante en el mantenimiento de la glicemia corporal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

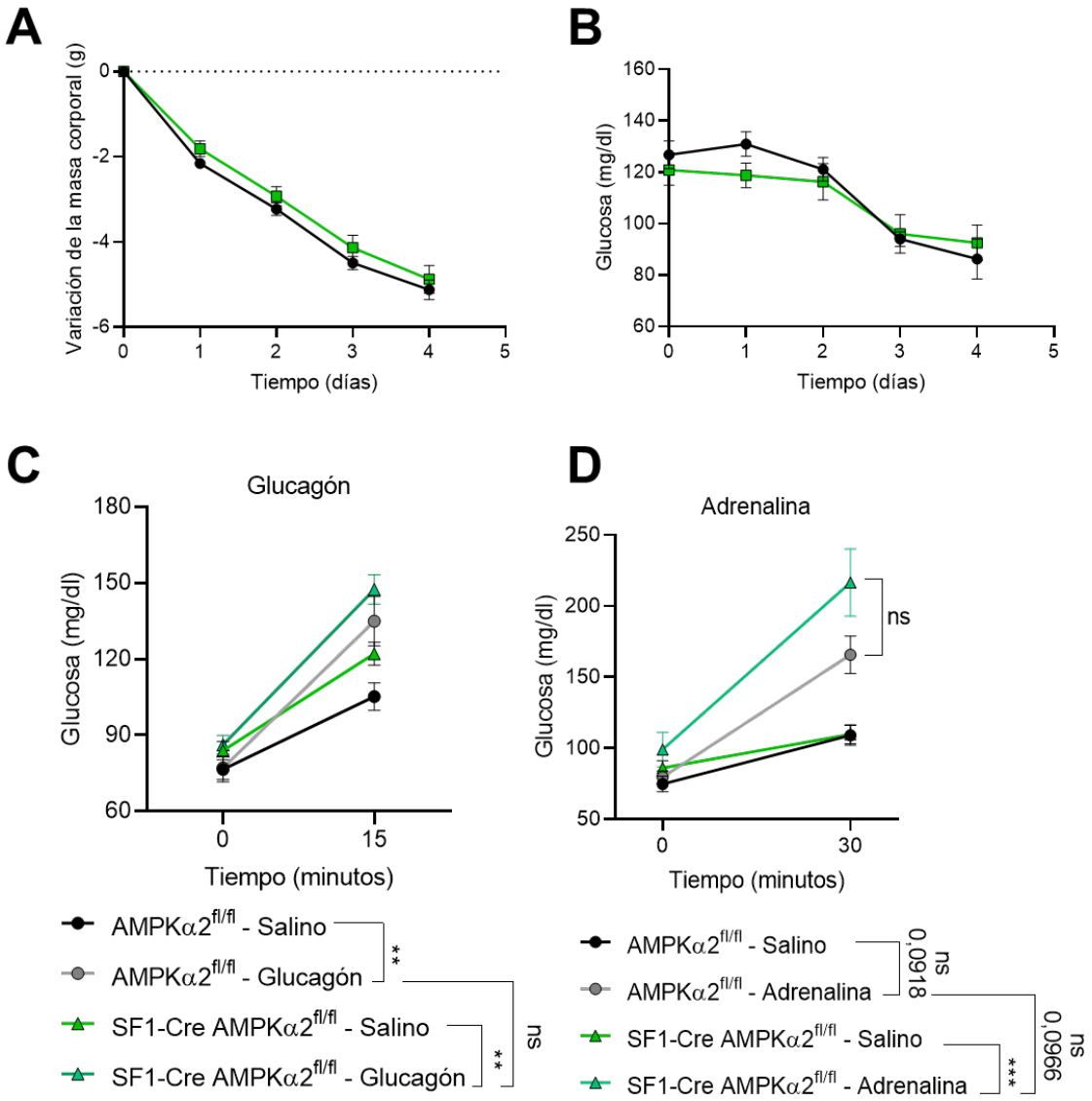


Figura 41. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre una restricción calórica y tratamientos con hormonas hiperglucemiantes. (A) Variación de la masa corporal durante el período de restricción calórica (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (B) Niveles de glucosa en sangre durante el período de restricción calórica (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (C) Niveles de glucosa en sangre tras la administración de salino o glucagón (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=13, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=16). (D) Niveles de glucosa en sangre tras la administración de salino o adrenalina (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10). Test estadístico ANOVA two way (Sidak's multiple comparison). Datos representados como media ± SEM.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.7 Los ratones deficientes en AMPKα2 en las neuronas SF1 no muestran cambios en la termorregulación ante diferentes estímulos térmicos

En experimentos previos de este trabajo vimos como AMPKα1 en el VMH parece jugar un rol importante en la aclimatación a frío. Por ello, decidimos realizar una exposición a 4ºC en los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$. No observamos diferencias en la temperatura corporal de los animales, tras una exposición a 4ºC durante 6 horas (Figura 42A). Tampoco observamos cambios en la termogénesis en el BAT (Figura 42B). Sin embargo, si vimos cambios en la temperatura basal de la cola (Figura 42C, D) (ANOVA p valor = 0,0013 entre genotipos) una zona relevante en la termorregulación en roedores (Blenkuš et al., 2022; Gordon, 1993; Owens et al., 2002; Warner et al., 2013).

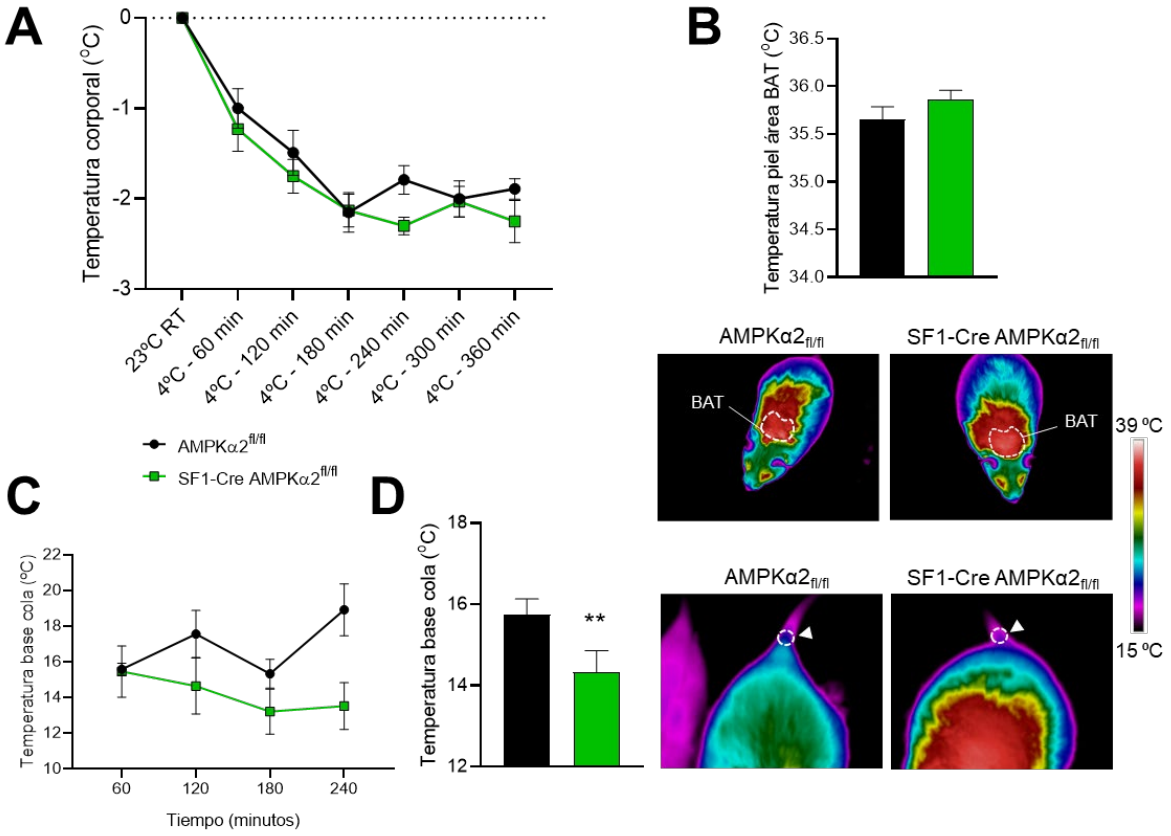


Figura 42. Aclimatación térmica a 4ºC en ratones SF1-Cre AMPKα2-SF1. (A) Variación de la temperatura corporal durante el período de exposición a 4ºC (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6). (B) Panel superior, temperatura media de BAT y panel inferior imágenes termográficas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6). (C) Temperatura de la base de la cola durante las primeras 4 horas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5). (D) Panel izquierdo temperatura media de la cola y panel derecho imágenes termográficas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5). Test estadístico ANOVA two-way (Bonferroni's multiple comparison) para (A); ANOVA two-way (mixed effects analysis, Sidak's multiple comparison) para (C); T de student (2 colas) para (B) y (D). Datos representados como media ± SEM.

Mediante inmunofluorescencia, también analizamos los niveles del marcador neuronal de activación c-FOS y de la proteína gliofibrilar acídica (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) en el VMH y el ARC. No se observó un patrón distinto de activación neuronal, estimado a través de células cFOS positivas en el ARC y VMH de animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ respecto a sus controles (Figura 43A). GFAP es un marcador típico de astrocitos e indicativo de gliosis, fenómeno por el cual los astrocitos adquieren un fenotipo reactivo o hipertrófico como respuesta a daños o enfermedades, o insultos metabólicos como dieta alta en grasa (García-

Cáceres et al., 2012, 2019). En algunos trabajos también se han visto cambios morfológicos en las células gliales del hipotálamo durante una exposición a frío (Sugama et al., 2011). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de GFAP en el ARC o VMH de los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ tras una exposición a 4ºC (Figura 43B).

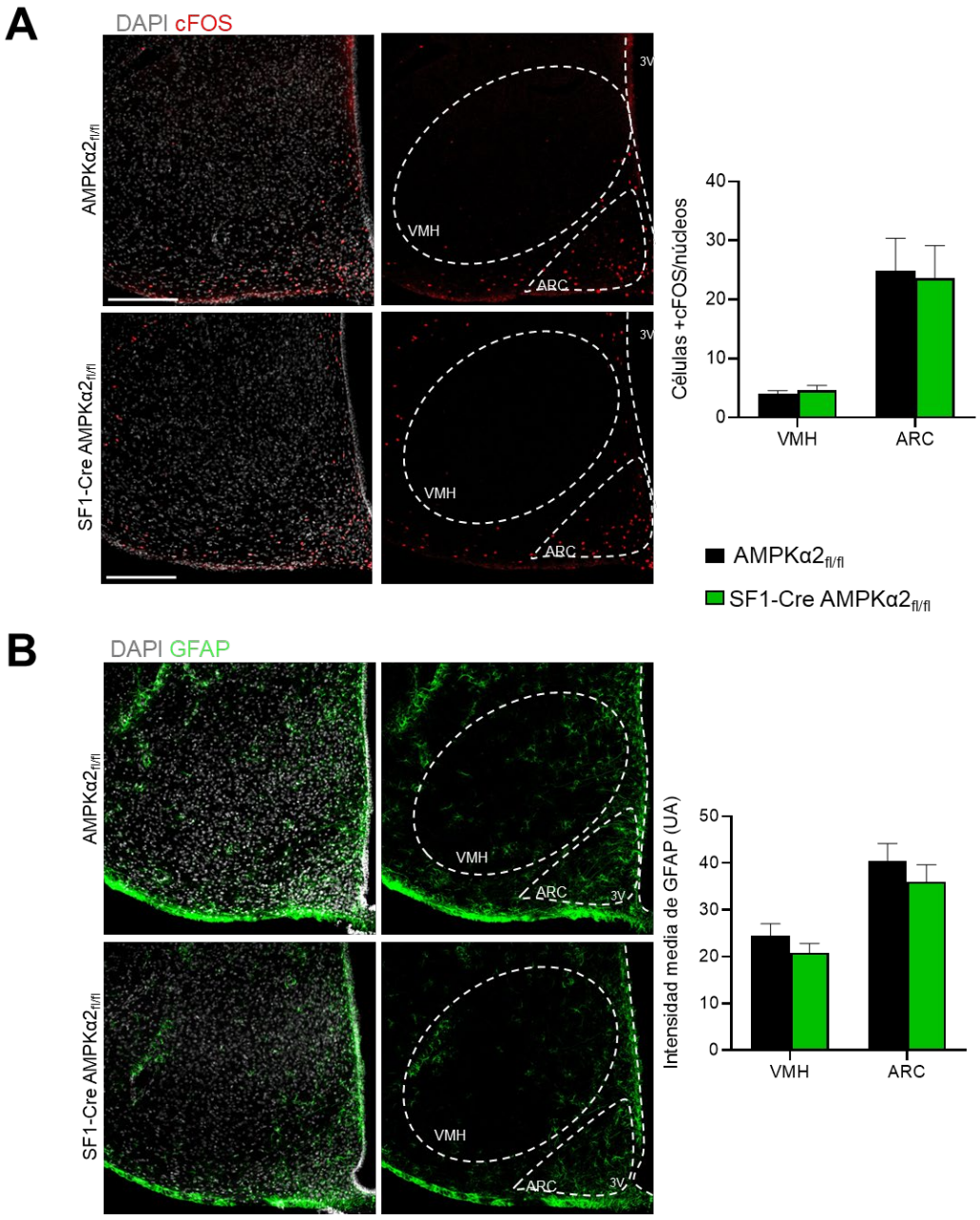


Figura 43. Inmunofluorescencia del VMH y ARC para GFAP y cFOS en animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$. (A) Paneles izquierdos imágenes de microscopía confocal para GFAP (verde) y DAPI (gris); panel derecho cuantificación de las intensidades medias de GFAP en el ARC y VMH (AMPKα2fl/fl N=5 y SF1-Cre AMPKα2fl/fl N=3; 6-7 secciones por animal) (10x). (B) Paneles izquierdos imágenes de microscopía confocal para cFOS (rojo) y DAPI (gris); panel derecho cuantificación de los núcleos cFOS+ en el ARC y VMH (AMPKα2fl/fl N=5 y SF1-Cre AMPKα2fl/fl N=3) (10x, barra de escala 200 µm).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Datos previos de nuestro laboratorio mostraban que aunque el ratón deficiente para AMPKα1 en neuronas SF1, mostraba una mayor termogénesis, sin embargo la temperatura corporal no era superior a sus compañeros de camada (Seoane-Collazo, 2018). Para elucidar a que se debía este efecto, se estudió la temperatura de la cola en diferentes temperaturas, por su papel en la disipación de calor mediante la vasodilatación de los vasos sanguíneos. Se observó como los ratones SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$ poseían una mayor temperatura de la cola, a temperaturas por debajo de termoneutralidad (26ºC) y en termoneutralidad (30ºC), lo que daba lugar a una temperatura corporal comparable a los animales control. Sin embargo, a temperaturas por encima de termoneutralidad (34º C), este mecanismo dejaba de ser eficiente y los ratones SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$ mostraban una mayor temperatura corporal, debido su activación basal del BAT superior a los controles (Seoane-Collazo, 2018). De forma paralela y con los datos observados durante una exposición a 4ºC, decidimos observar la aclimatación de los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ también ante distintas temperaturas cercanas a la termoneutralidad. A temperatura ambiente no se encuentran diferencias en la temperatura corporal (Figura 44A, B). Durante exposiciones a 26ºC, 30ºC y 34ºC, tampoco se observaron diferencias significativas en la temperatura de la base de la cola (Figura 44C, D), ni en la temperatura corporal (Figura 44E). En conjunto, todos estos datos, demuestran que AMPKα2 en las neuronas SF1, no juega un papel relevante de cara a la termorregulación de los animales, bien en condiciones de 4ºC o en condiciones de termoneutralidad (o cercanas).

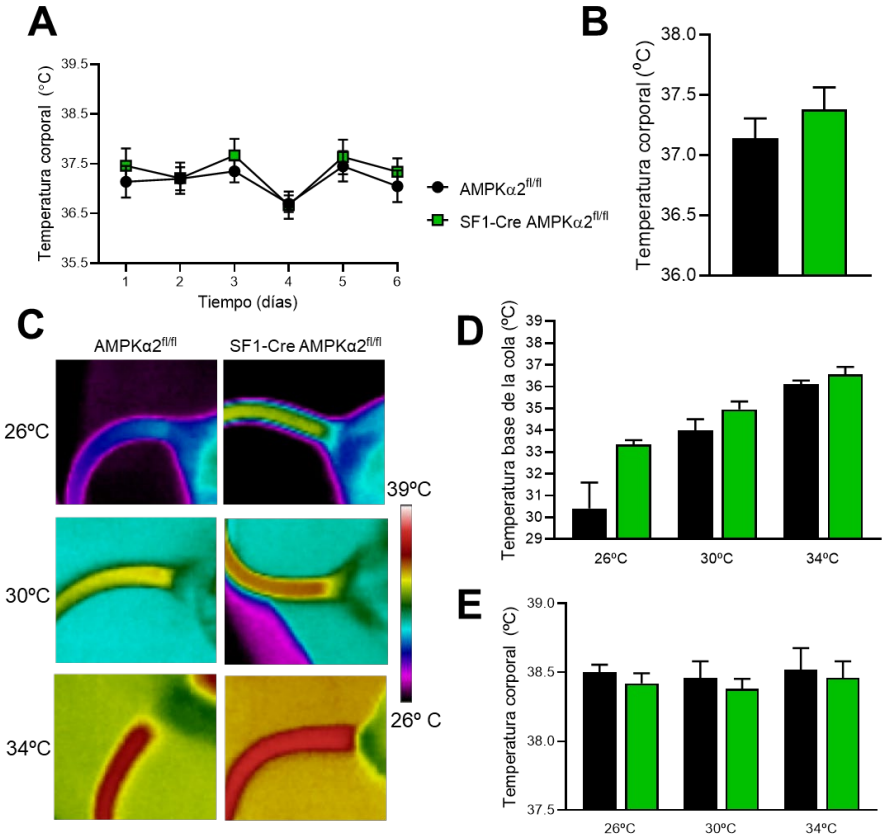


Figura 44. Aclimatación térmica de los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ a temperaturas cercanas a la termoneutralidad (A) Seguimiento de la temperatura corporal durante 6 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (B) Temperatura corporal media durante 6 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7). (C) Imágenes termográficas de la base de la cola de los ratones a diferentes temperaturas. (D) Cuantificación de la temperatura de la base de la cola de los ratones a 26ºC, 30ºC y 34ºC (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5). (E) Temperatura corporal de los animales expuestos a 26ºC, 30ºC y 34ºC (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5). Test estadístico ANOVA two-way (A); t de Student (2 colas) (B, D y E). Datos representados como media ± SEM.

5.8 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 da lugar a un aumento de la masa corporal en condiciones de HFD en machos

Una vez observado el fenotipo de los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ en condiciones de dieta estándar, decidimos someter a los animales a un paradigma de obesidad inducida por dieta, suministrándoles HFD. Ya que, en muchos modelos con mutaciones en neuronas SF1, el fenotipo metabólico debuta cuando se les suministra HFD (Choi et al., 2013). Los animales macho SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$, presentaron más masa corporal que los controles en condiciones de HFD (Figura 45A), sin cambios en la ingesta (Figura 45B). Mediante resonancia magnética y análisis de los depósitos grasos, se observó como los machos presentaban una mayor masa grasa y unos mayores niveles de masa hepática (Figura 45C, D).

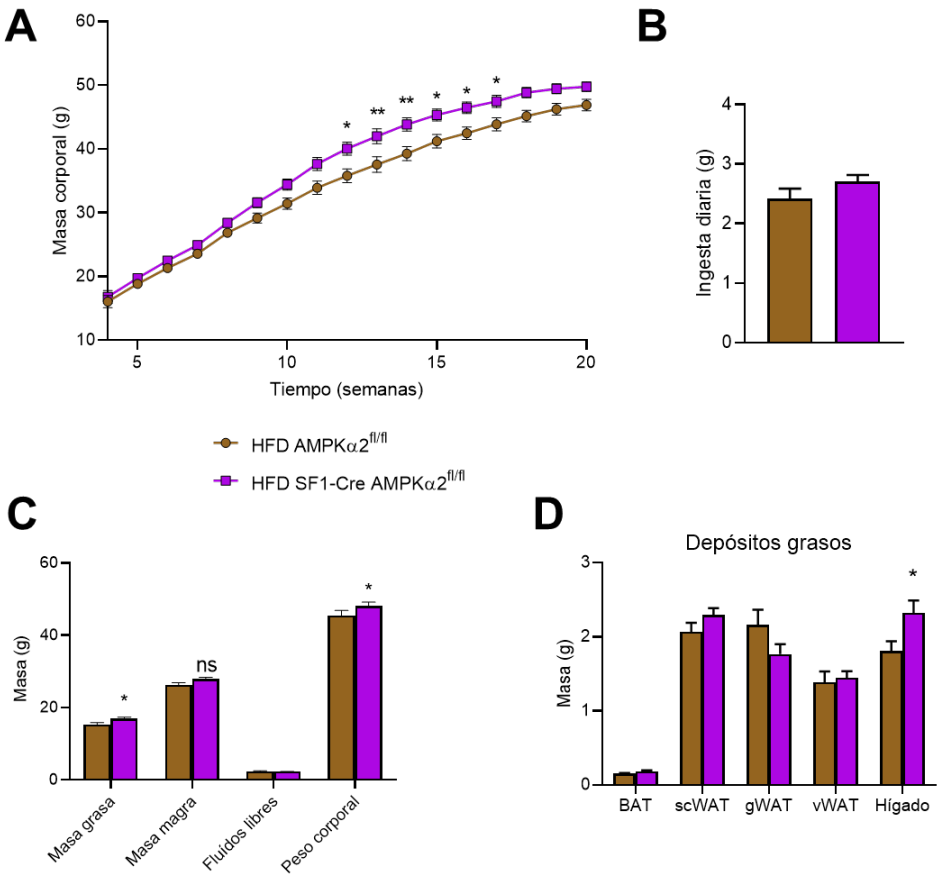


Figura 45. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 en condiciones de HFD en machos (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=28 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=34). (B) Ingesta diaria de los animales durante 9 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=11). (C) Resultados de resonancia magnética (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=24 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=27). (D) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=13 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=21). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A); T de student para (B, C y D). Datos representados como media ± SEM.

Sin embargo, estos efectos no fueron observados en las hembras. En las cuales la masa corporal de las SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ no se diferenciaba de sus compañeras de camada (Figura 46A), tampoco su ingesta diaria (Figura 46B) ni sus depósitos grasos se vieron modificados (Figura 46C, D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

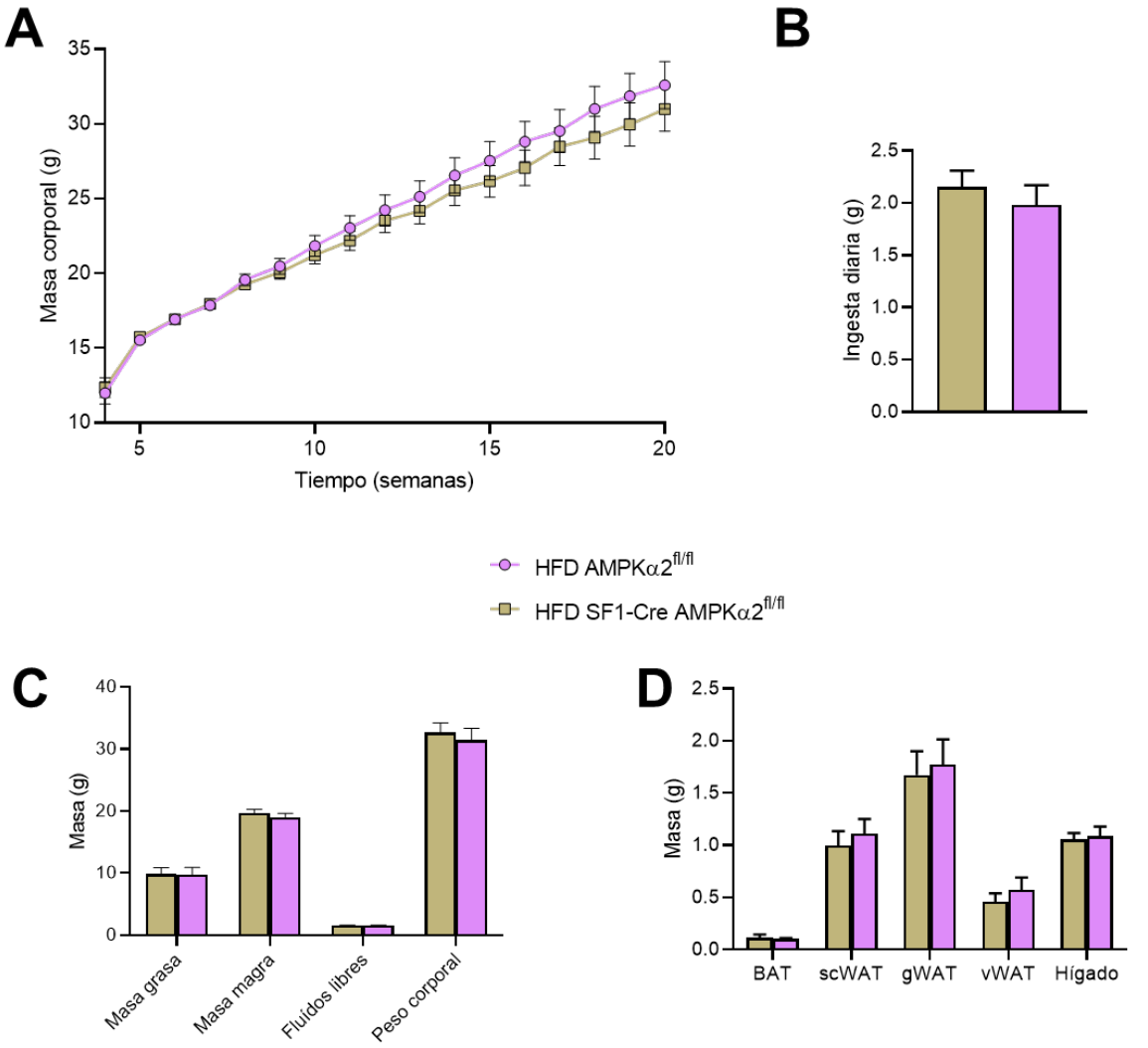


Figura 46. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 en condiciones de HFD en hembras (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=30 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=30). (B) Ingesta diaria de los animales durante 9 días (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=7 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5). (C) Resultados de resonancia magnética (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=20 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=22). (D) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=21 y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=16). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A); T de student para (B, C y D). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

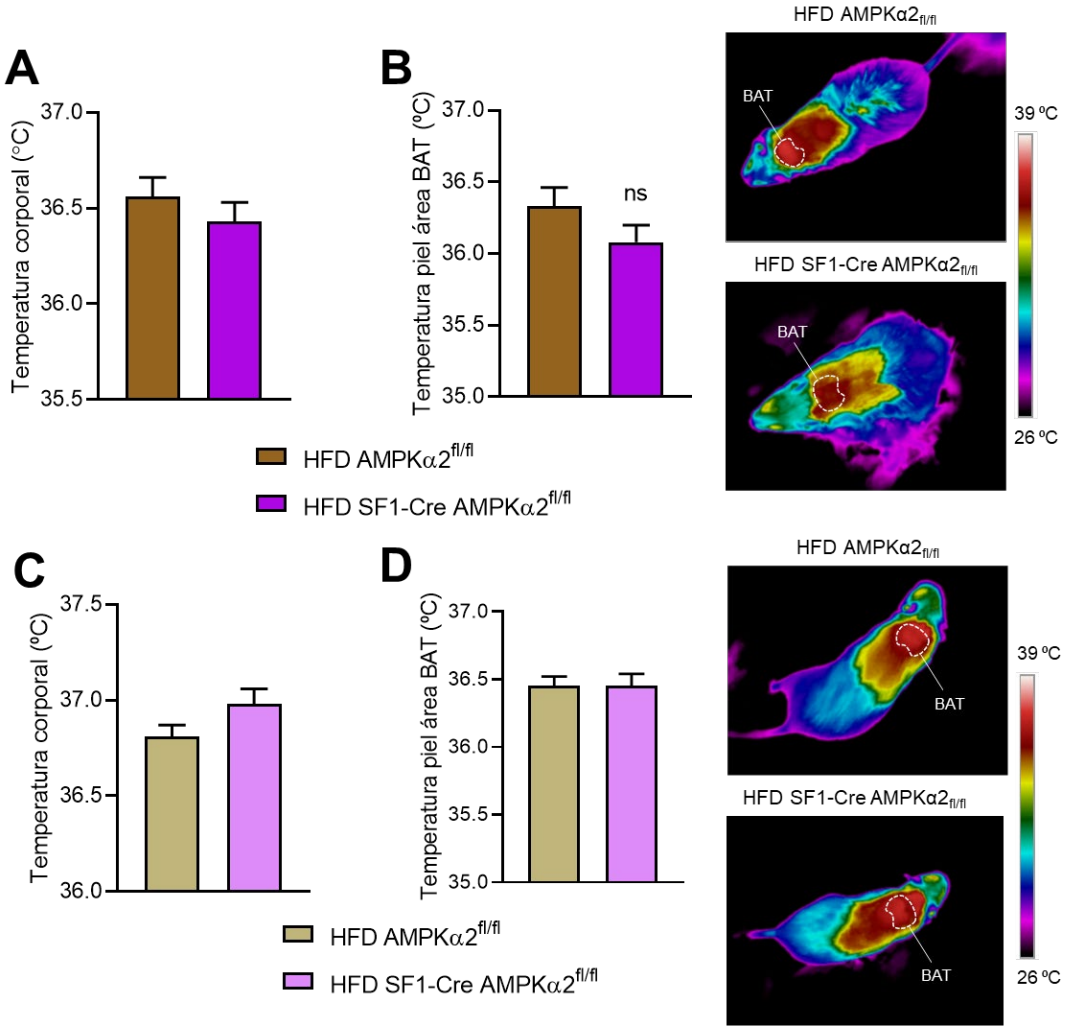


Figura 47. Efecto de la administración de HFD en animales SF1-Cre AMPKα2 sobre la termogénesis. (A) Temperatura corporal media durante 9 días en machos (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=11). (B) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas de machos (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=11). (C) Temperatura corporal media durante 9 días en hembras (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6). (D) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas de hembras (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM.

En cuanto a cambios en la termogénesis, no observamos cambios en la temperatura corporal de machos o hembras SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ tras 20 semanas en HFD (Figura 47A, C), ni tampoco niveles diferentes en la temperatura de BAT en comparación a sus compañeros de camada, ni en machos ni en hembras (Figura 47B, D).

Estos análisis parecen indicar, que la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1, produce un aumento de masa corporal en condiciones de HFD en machos, que también manifiesta un aumento de la masa grasa. Sin embargo, esto no ocurre en las hembras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.9 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1, no afecta al gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora en condiciones de HFD.

De igual manera que en condiciones de STD, también analizamos este modelo en HFD mediante calorimetría indirecta. En los machos, no encontramos diferencias en el gasto energético mediante ANCOVA utilizando como covariable la masa corporal (Figura 48 A), tampoco el cociente respiratorio o la actividad locomotora (Figura 48 B-D). De forma paralela, tampoco encontramos diferencias en las hembras, para los distintos parámetros analizados (Figura 49 A-D). Estos datos indican que la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 en condiciones de HFD, no afecta a los distintos componentes del gasto energético analizados por calorimetría indirecta, en ninguno de los dos sexos.

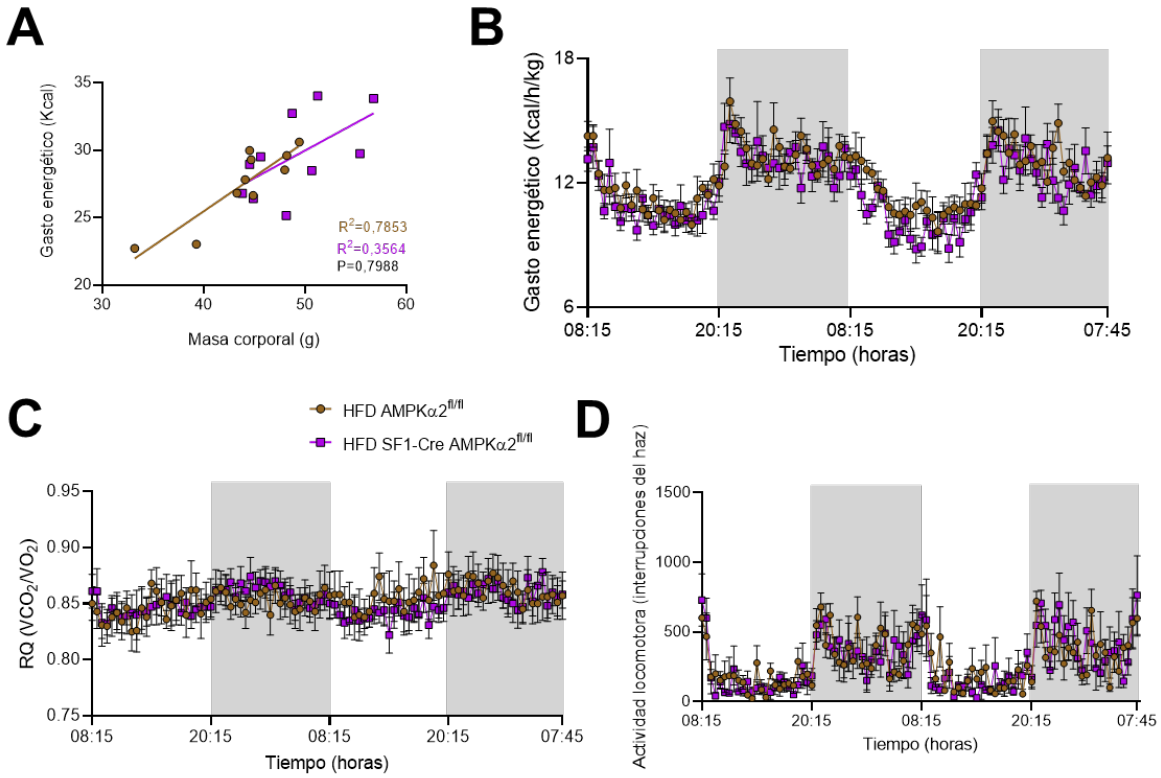


Figura 48. Resultados de calorimetría indirecta para los animales macho SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ en HFD y sus compañeros de camada. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). (B) Gasto energético de los animales a lo largo de 48h. (C) Coeficiente respiratorio durante 48h. (D) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para los paneles (B-D) AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5. Test estadístico ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-E). Datos representados como media ± SEM.

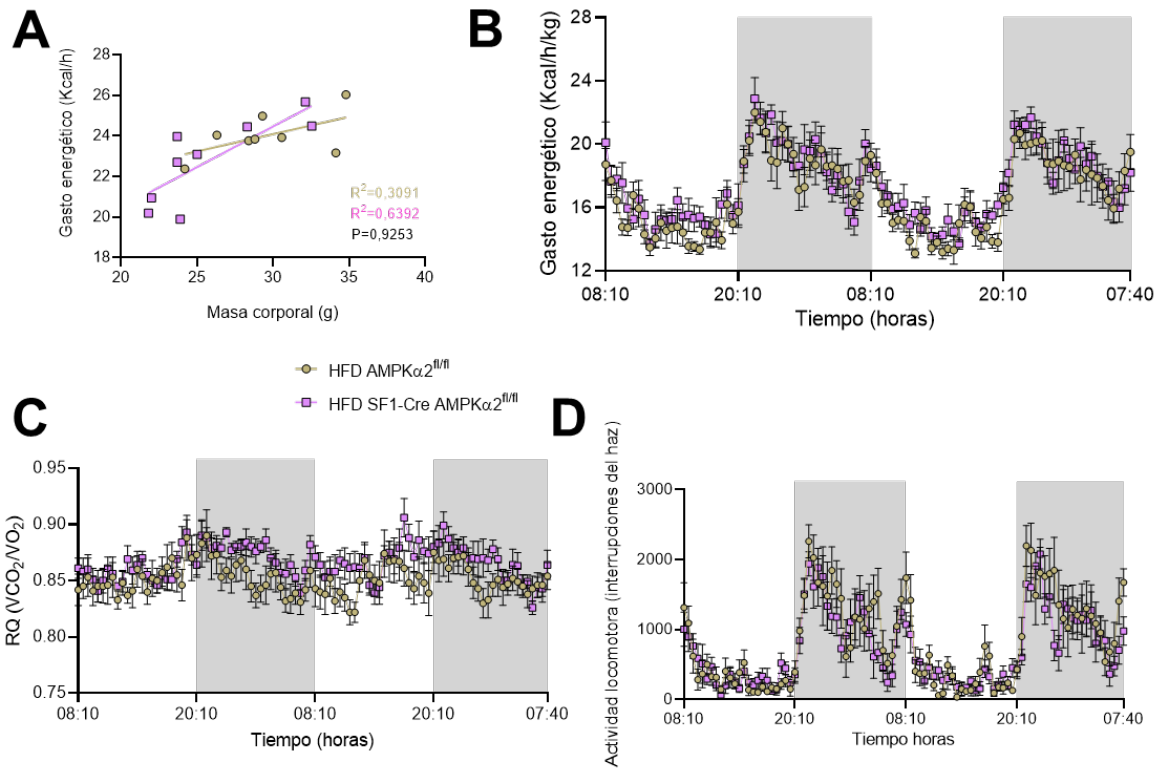


Figura 49. Resultados de calorimetría indirecta para los animales hembra SF1-Cre AMPKα2fl/fl en HFD y sus compañeros de camada. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable. (C) Coeficiente respiratorio durante 48h. (D) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para todos los paneles AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9. Test estadístico regresión lineal (A), y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-D). Datos representados como media ± SEM.

5.10 La eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 no afecta al metabolismo de la glucosa en condiciones de HFD

A continuación, decidimos ver si existían alteraciones en el metabolismo de la glucosa, realizando GTTs e ITTs en ambos sexos. No observamos diferencias para el manejo de la glucosa en ambos sexos en condiciones de HFD (Figura 50A-D). A pesar de ello, sí que observamos una mejor tolerancia a la glucosa (Figura 50A) en los machos, durante el cálculo del AUC sustrayendo los niveles basales de glucosa.

5.11 Validación de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1

Tras la caracterización de los animales deficientes para AMPKα1 en neuronas SF1 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018) y en el presente trabajo de la otra isoforma catalítica, AMPKα2 también en las neuronas SF1, nuestro siguiente paso fue, la caracterización de la eliminación de una de las isoformas reguladoras de AMPK, AMPKγ2. AMPKγ2, es una de las isoformas encargas de unir ATP/AMP (Carling, 2017; Cheung et al., 2000; Xiao et al., 2007) y mutaciones en el gen de humanos se asocian a activaciones crónicas de AMPKγ2, que resultan en cardiomiopatías metabólicas (Y. Cao et al., 2017; M. Kim et al., 2014; Yavari et al., 2017; Zou et al., 2005). Esta misma mutación cardíaca, expresada de forma

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

global, da lugar a un fenotipo obeso de los ratones, con hiperfagia y una alteración en la función de las células β (Yavari et al., 2016).

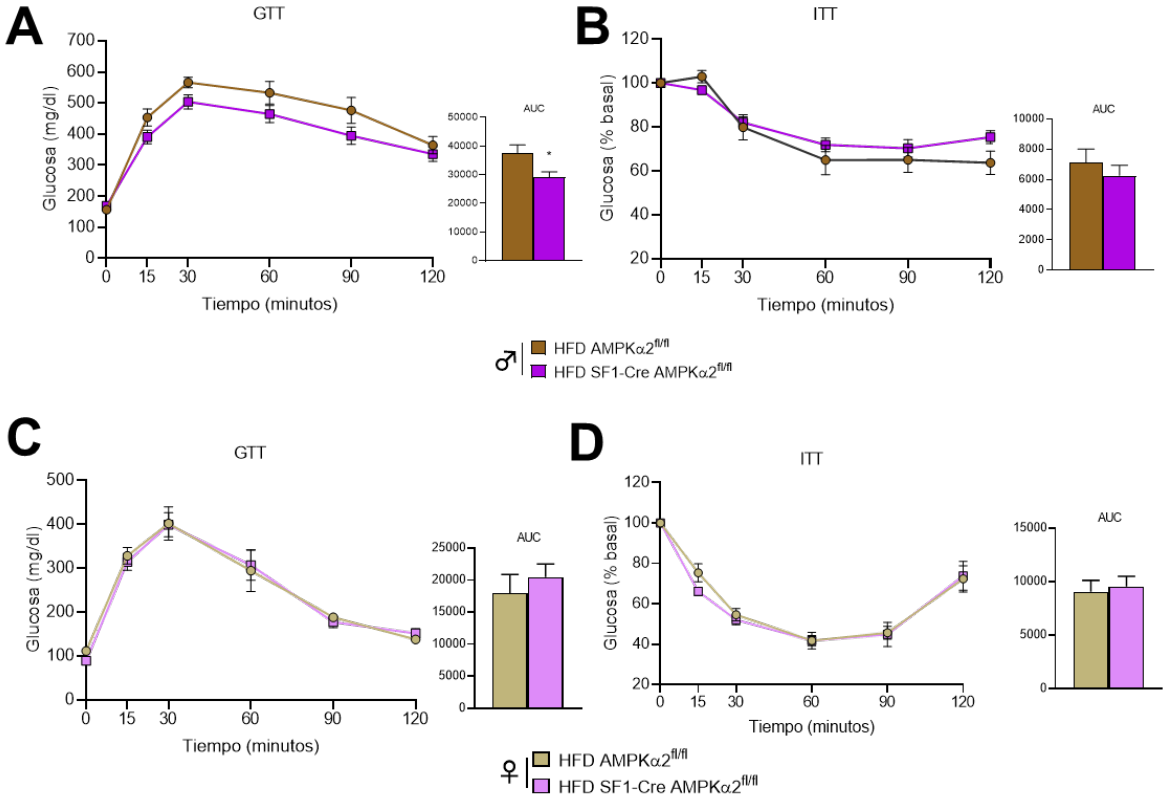


Figura 50. Efecto de la eliminación de AMPKα2 en neuronas SF1 sobre la homeostasis de la glucosa en condiciones de HFD en ambos sexos. (A) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa (GTT) y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10). (B) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=10). (C) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=6). (D) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho área bajo la curva (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ N=9). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para paneles izquierdos A-D, T de Student 2 colas para AUC (A-D). Datos representados como media ± SEM.

Por ello nos pareció interesante, elucidar el papel de esta isoforma en las neuronas SF1. De igual manera, se cruzaron animales SF1-Cre con animales AMPKγ2$^{fl/fl}$, para obtener ratones deficientes en esta subunidad en dichas neuronas. La validación de la eliminación de AMPKγ2, se comprobó a través de una hibridación *in situ* utilizando la tecnología *Base Scope* y morfológicamente a través de cruzar los ratones con un gen reportero.

Mediante hibridación *in situ* se utilizó una sonda específica del gen *Prkag2* (AMPKγ2) que cubría el exón *floxeado* (6) y se observaron los niveles de expresión a nivel hipotalámico para animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y AMPKγ$^{fl/fl}$. En los animales AMPKγ2$^{fl/fl}$ observamos expresión de AMPKγ2 (puntos rojos) en el VMH, ARC y zonas exteriores a estos (Figura 51 A y A'). Sin embargo, en los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ observamos una completa ausencia de puntos rojos en el VMH para casi todas las células, mientras que en el ARC o zonas fuera del VMH, observábamos nuevamente una expresión normal (Figura 51B y B'). Los escasos puntos rojos que se encuentran en el VMH (Figura 51 B', cabeza de flecha roja), probablemente provengan de otros tipos celulares diferentes a SF1.

De nuevo decidimos cruzar el modelo SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ con un gen reportero, para asegurarnos de que la recombinación ocurriría de forma mayoritaria a nivel central, dentro del VMH (misma estrategia que la reportada en la Figura 32A). Nuevamente los animales Cre

positivos y Td-Tomato positivos, presentaban fluorescencia en el VMH, mientras que no ocurría lo mismo para los animales Td-Tomato AMPKγ2$^{fl/fl}$ (Figura 52A-B).

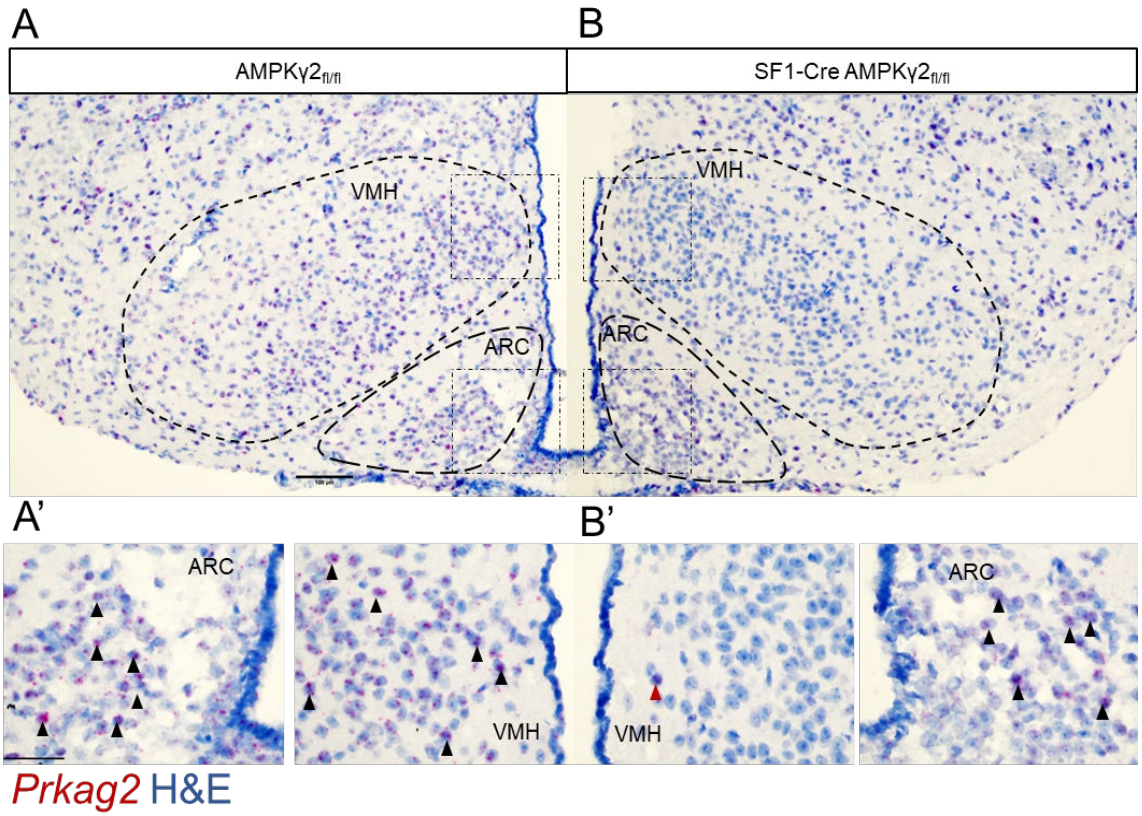


Figura 51. Hibridación in situ para el exón 6 de Prkag2 en animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/f}$ y sus compañeros de camada. (A) Imagen bilateral del hipotálamo de un animal AMPKγ2$^{fl/fl}$ (10x, barra de escala 100 µm). (A') Detalles de los cuadros de A, a 40x mostrando ARC y VMH (40x barra de escala 50µm). (C) Imagen bilateral del hipotálamo de un animal SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$. (B') Detalles de los cuadros de A, a 40x mostrando ARC y VMH. Las células fueron teñidas con hematoxilia-eosina, los puntos rojos indican señal de Prkag2. Las flechas negras indican células con señal positiva. La flecha roja indica células con señal de Prkag2 en el VMH de animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$.

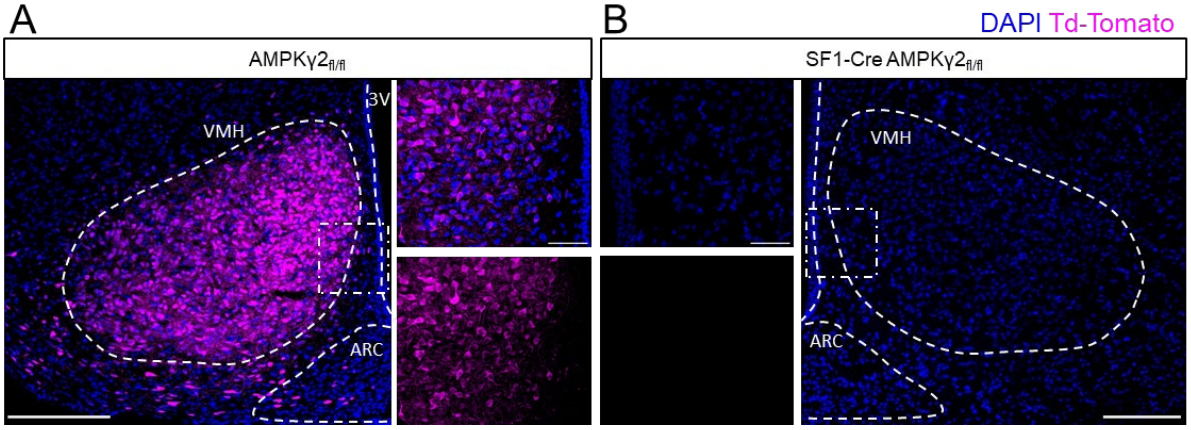


Figura 52. Recombinación de los animales SF1-Cre AMPKγ2^{flfl}/Td-Tomato. (A) Imágenes de microscopía confocal para animales Td-Tomato AMPKγ2$^{fl/fl}$, DAPI = cián, Td-Tomato = magenta (Izquierda 20x, barra de escala 200 µm; derecha 40x, barra de escala 50 µm). (B) Imágenes de microscopía confocal para animales SF1-Cre Td-Tomato AMPKγ2$^{fl/fl}$ DAPI = cián, Td-Tomato = magenta (Izquierda 20x, barra de escala 200 µm; derecha 40x, barra de escala 50 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.12 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1 activa la ruta de AMPK en el VMH

Para una validación funcional del modelo, evaluamos los niveles de la ruta de AMPK en el VMH. Aunque no observamos diferencias significativas, sí que existía una clara tendencia a unos mayores niveles de de pAMPKα y AMPKα1 en el VMH, así como una elevación significativa de FAS (Figura 53A)

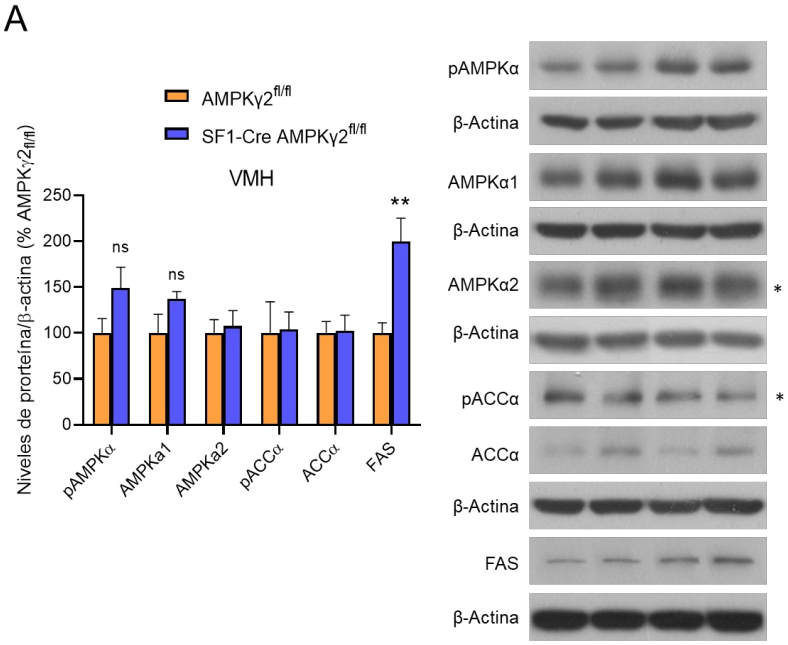


Figura 53. Niveles proteicos de la ruta de AMPK en el VMH de animales macho SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$. (A) Niveles proteicos de pAMPKα, AMPKα1, AMPKα2, pACCα, ACCα y FAS en el VMH (SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico T de student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original (*provienen del mismo gel, comparten la ß-actina entre ambos).

5.13 La eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 provoca un aumento de masa sin cambios en la termogénesis.

Tras la validación del modelo, procedimos a realizar un seguimiento de la masa corporal de los animales tras suministrarles una dieta estándar (STD), durante 30 semanas. Los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ machos presentaban mayor masa corporal que sus compañeros de camada (Figura 54A), sin presentar cambios en la ingesta (Figura 54B) y mostrando un aumento de ciertos depósitos grasos como el subcutáneo (scWAT, *subcutaneous white adipose tissue*) y el visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*) (Figura 54C).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

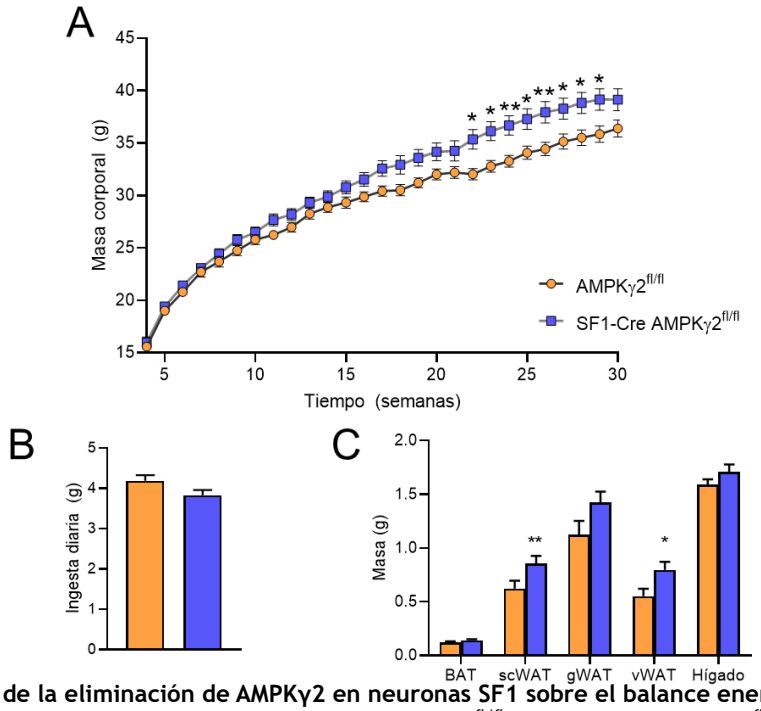


Figura 54. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre el balance energético en machos. (A) Masa corporal de los animales durante 30 semanas (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=35, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=36). (B) Ingesta promedio durante 7 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=23). (C) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=31, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=32). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A) y t de Student (2 colas) para (B) y (C). Datos representados como media ± SEM.

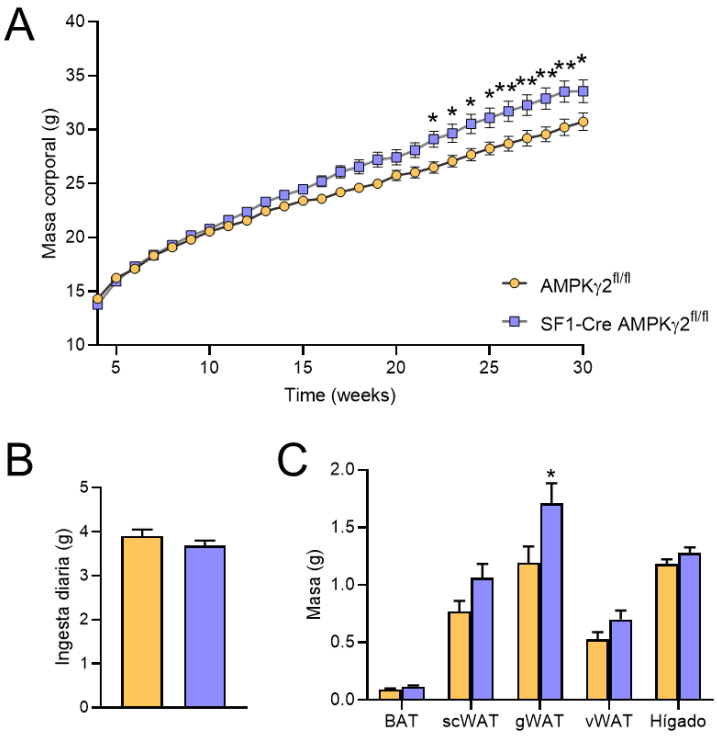


Figura 55. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre el balance energético en hembras. (A) Masa corporal de los animales durante 30 semanas (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=41, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=45). (B) Ingesta promedio durante 7 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=19, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25). (C) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=31, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=36). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A) y t de Student (2 colas) para (B) y (C). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En hembras, observamos algo parecido, con una mayor masa corporal para las ratonas *knock-out* para AMPKγ2 en neuronas SF1, respecto a sus controles (Figura 55A), sin cambios nuevamente en la ingesta (Figura 55B) y con un aumento de la grasa gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*) (Figura 55C).

En cuánto la termogénesis en machos, estos presentaron la misma temperatura corporal (Figura 56A), misma temperatura de BAT (Figura 56B), sin cambios en los marcadores termogénicos analizados en el BAT mediante RT-qPCR (Figura 56C), con la excepción de *Prdm16* y contrariamente, unos niveles disminuidos de UCP1 en el BAT (Figura 56D). En las hembras, encontramos una tendencia a una menor temperatura corporal y de BAT (Figura 57A, B), sin cambios para los marcadores termogénicos y para UCP1 en el BAT (Figura 57C, D). De forma global, ambos sexos presentan un balance energético positivo, pero sin un patrón termogénico muy claro, a través de los análisis realizados.

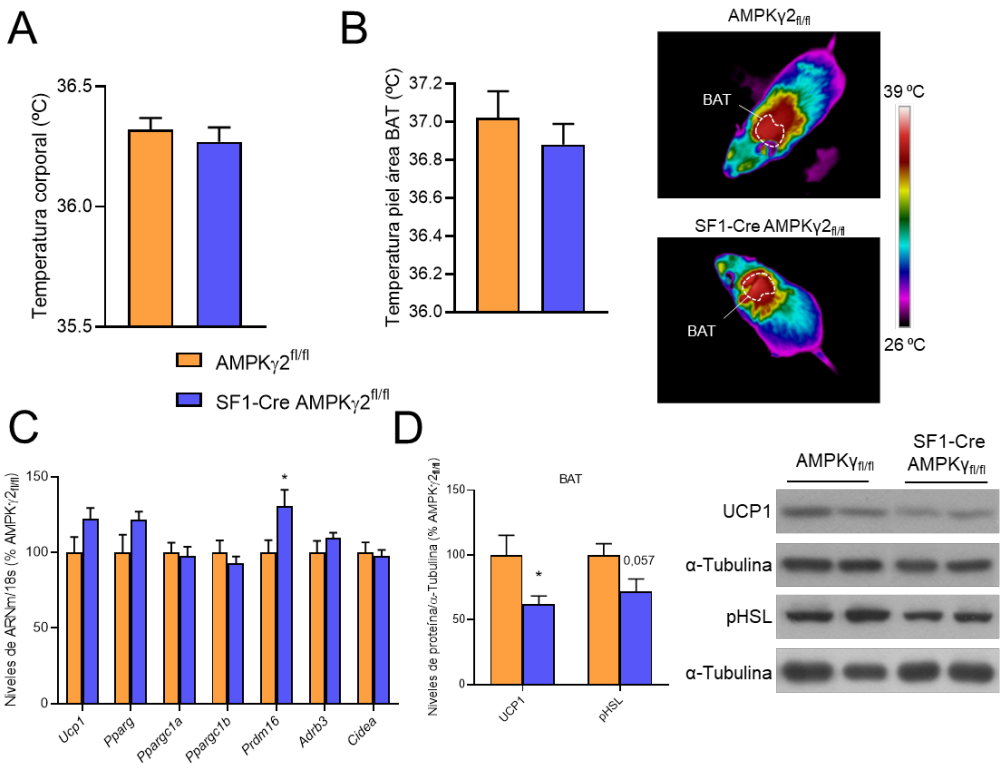


Figura 56. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en machos. (A) Temperatura corporal media durante 9 dias (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=23). (B) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas (AMPKα2$^{fl/fl}$ N=24, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=23). (C) Niveles de ARNm en el BAT, para varios marcadores termogénicos (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (D) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

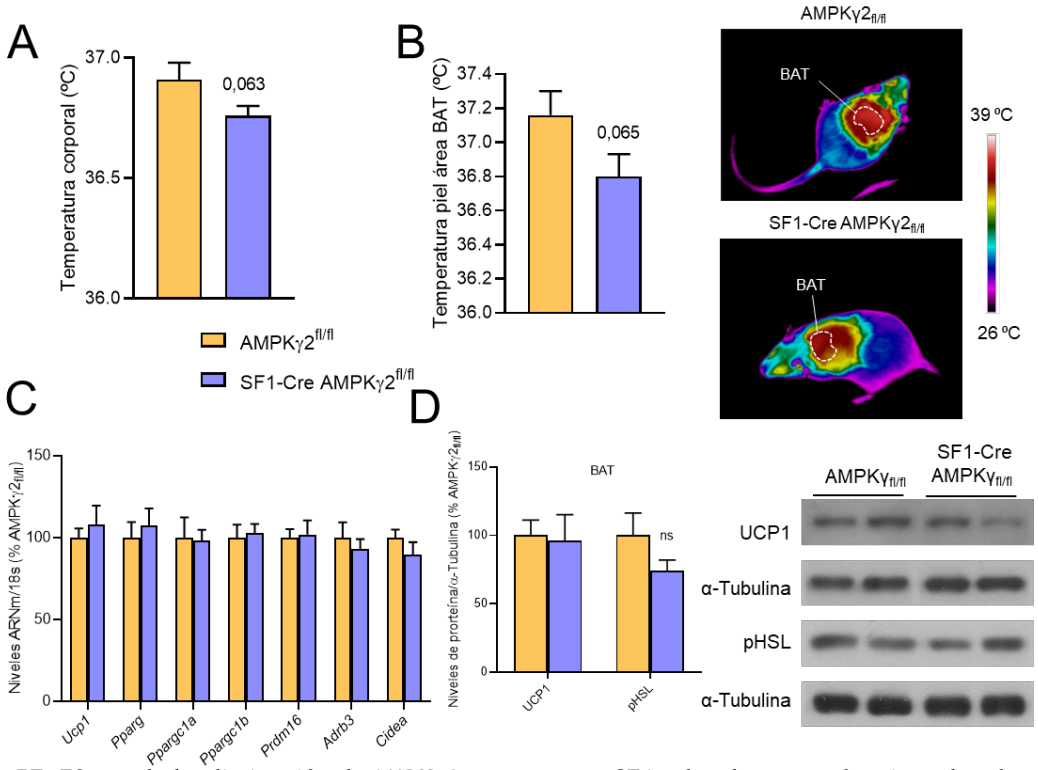


Figura 57. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en hembras. (A) Temperatura corporal media durante 9 dias (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=19, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25). (B) Panel izquierdo cuantificación temperatura del BAT y panel derecho imágenes termográficas (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=19, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25). (C) Niveles de ARNm en el BAT, para varios marcadores termogénicos (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (D) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

5.14 Los ratones macho deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 presentan una disminución del gasto energético

Mediante análisis de calorimetría indirecta, se observó como el gasto energético de los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ era menor que sus compañeros de camada (Figura 58A) (ANCOVA p=0,0202). En los análisis de resonancia magnética vimos como los machos analizados también poseían una mayor masa grasa (Figura 58B). No se encontraron diferencias para la actividad locomotora y el cociente respiratorio (Figura 58C, D).

Sin embargo, en hembras no observamos una diferencia en el gasto energético entre los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y sus compañeras de camada (Figura 59A). Las hembras analizadas tampoco presentaron diferencias en su composición corporal (Figura 59B) y tampoco mostraron cambios en su actividad locomotora y cociente respiratorio (Figura 59C, D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

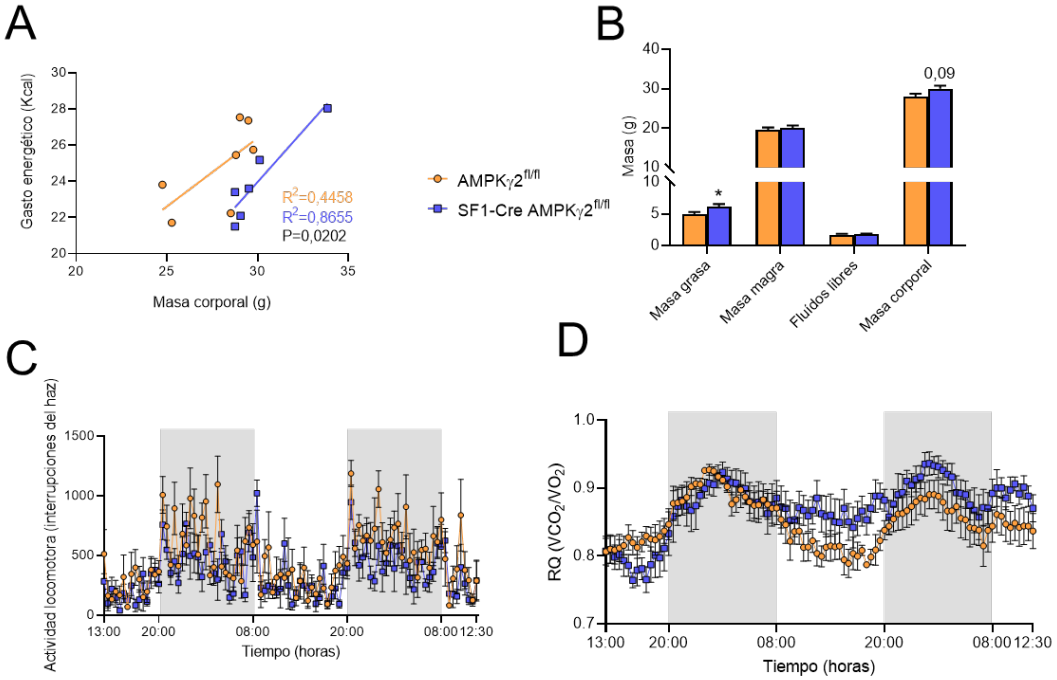


Figura 58. Resultados de calorimetría indirecta para los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada en machos. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable. (B) Resultados de resonancia magnética. (C) Actividad locomotora a lo largo de 48h. (E) Coeficiente respiratorio durante 48h. Para todos los paneles AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6. Test estadístico ANCOVA (masa corporal como covariable) (A), T de student (B) y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-D). Datos representados como media ± SEM

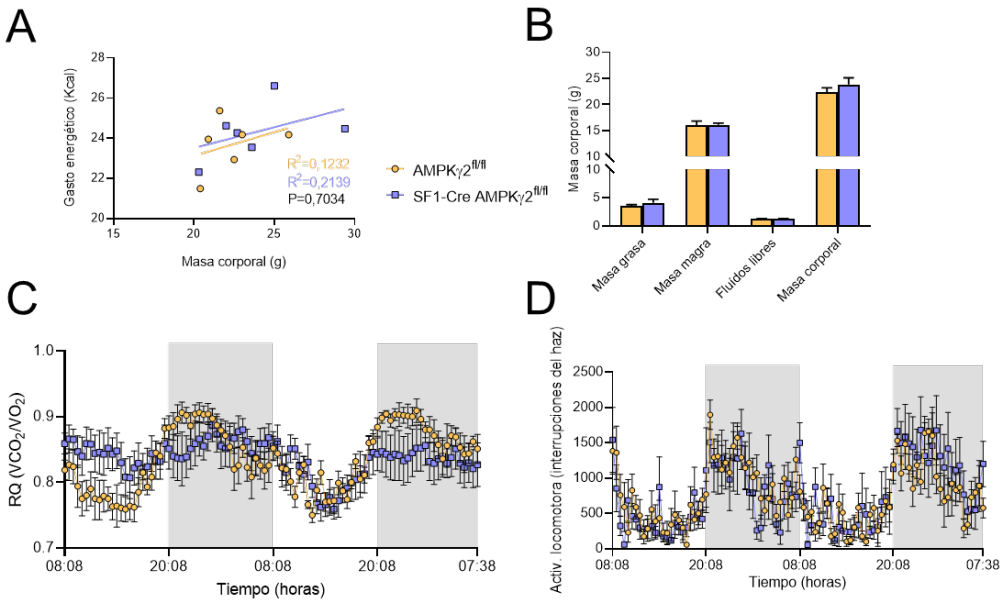


Figura 59. Resultados de calorimetría indirecta para los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada en hembras. (A) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable (C) Gasto energético de los animales a lo largo de 48h, corregido por la masa magra. (D) Coeficiente respiratorio durante 48h. (E) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para todos los paneles AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6. Test estadístico Regresión lineal (A), T de student (B) y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (C-E). Datos representados como media ± SEM

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.15 La eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 no afecta al manejo de la glucemia.

Para valorar el manejo de glucemia de estos animales, realizamos GTTs e ITTs en ambos sexos. No observamos diferencias en la tolerancia a la glucosa, ni en la sensibilidad a la insulina para los machos (Figura 60A-B), ni tampoco en ninguno de ambos parámetros para las hembras (Figura 60C-D).

También realizamos en machos, un ensayo de glucosa postprandial. Tras un ayuno previo de 12 horas, se les suministró comida a los animales y monitorizamos su respuesta, glucémica, en la que no se vieron cambios (Figura 61A-B) y su ingesta las siguientes 10 horas, en la que tampoco se vieron diferencias (Figura 61C).

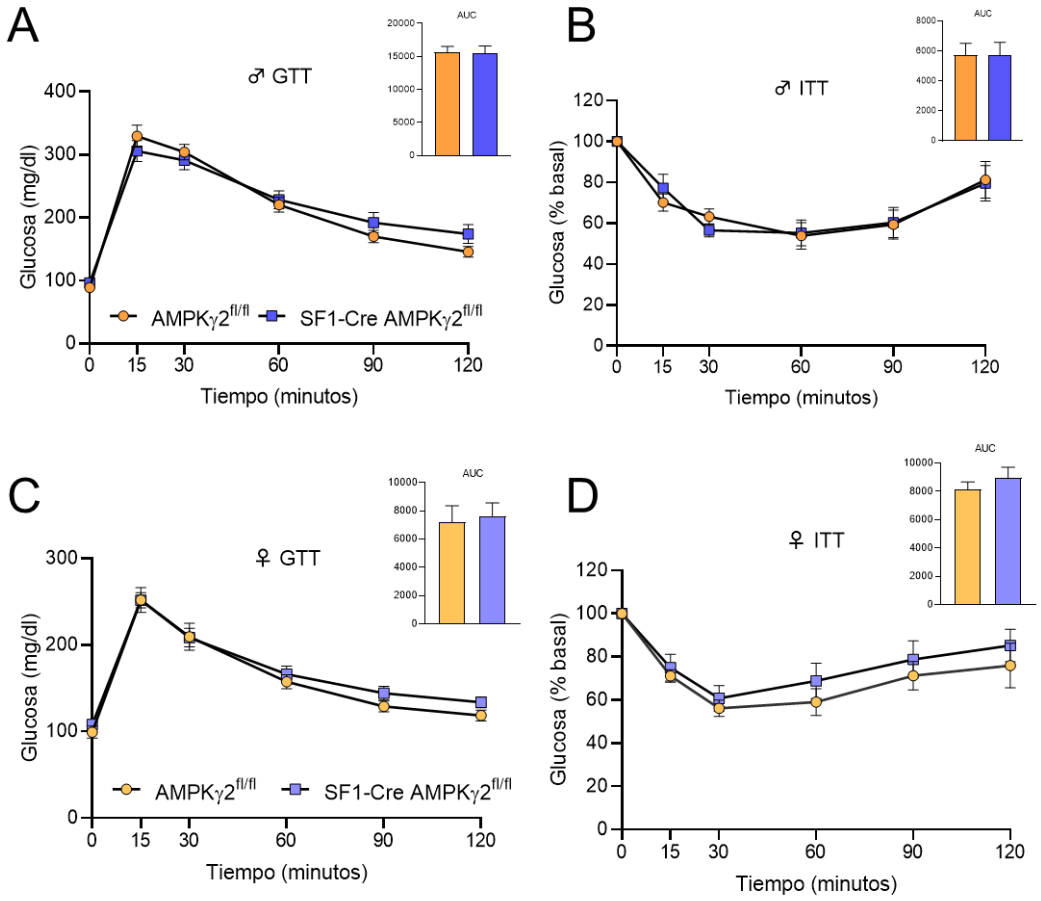


Figura 60. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la homeostasis de la glucosa en ambos sexos. (A) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa (GTT) y panel derecho arriba área bajo la curva en machos (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=16, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=18). (B) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho arriba área bajo la curva en machos (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=10, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=9). (C) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa y panel derecho arriba área bajo la curva en hembras (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=16, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=21). (D) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho arriba área bajo la curva (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=10, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=16). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para paneles izquierdos (A-D) y T de Student 2 colas para AUC (A-D). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

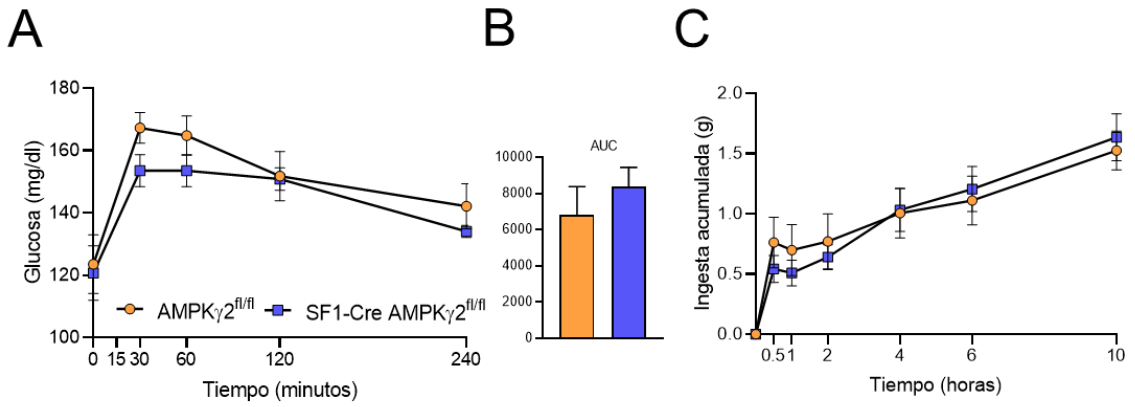


Figura 61. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la glucosa postpandrial en machos. (A) Niveles plasmáticos de glucosa post-pandrial tras un ayuno de 12h (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6). (B) Área bajo la curva de A. (C) Ingesta acumulada durante 10h tras el ayuno (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6). Test estadístico ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) para (A-C) y T de Student 2 colas para B. Datos representados como media ± SEM.

5.16 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1 no afecta a la termorregulación ante la exposición a diferentes estímulos térmicos.

Dado el diferente rol que observamos en la termorregulación para las isoformas catalíticas de AMPK α1 y α2, empleamos una estrategia similar para AMPKγ2. Tras una exposición a frío durante 6h, no vimos grandes diferencias en la temperatura corporal de los animales AMPKγ2-SF1 machos frente a sus compañeros de camada (Figura 62A). Sin embargo, si observamos que estos animales defendían mejor su temperatura de BAT, en comparación a los niveles basales, a lo largo de la exposición a frío (Figura 62B-D), pero sin cambios en la temperatura de la cola (Figura 62E).

A continuación, realizamos nuevamente ensayos de inmunofluorescencia para cFOS y GFAP, en MBH. No se observó un patrón distinto de activación neuronal, estimado a través de células cFOS positivas, en el ARC y VMH de de los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ respecto a sus controles (Figura 63A). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de GFAP en el ARC o VMH de los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ tras una exposición a 4ºC, respecto a sus compañeros de camada macho (Figura 63B).

Por último, también realizamos el mismo test que en los animales AMPKα2 y AMPKα1 de aclimatación de los animales a diferentes temperaturas cercanas a la termoneutralidad. A temperatura ambiente no se encontraron diferencias en la temperatura corporal (Figura 41A-B). Durante las exposiciones a 26ºC, 30ºC y 34ºC, tampoco se observaron diferencias significativas en la temperatura de la base de la cola (Figura 64C-D), ni tampoco en la temperatura corporal resultante (Figura 64E).

En conclusión, la termorregulación de los animales macho SF1-Cre AMPKγ2 no parece diferir de la de sus compañeros de camada, en situaciones normales y cercanas a la termoneutralidad. A pesar de ello, defienden mejor su temperatura de BAT ante un estímulo de 4ºC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

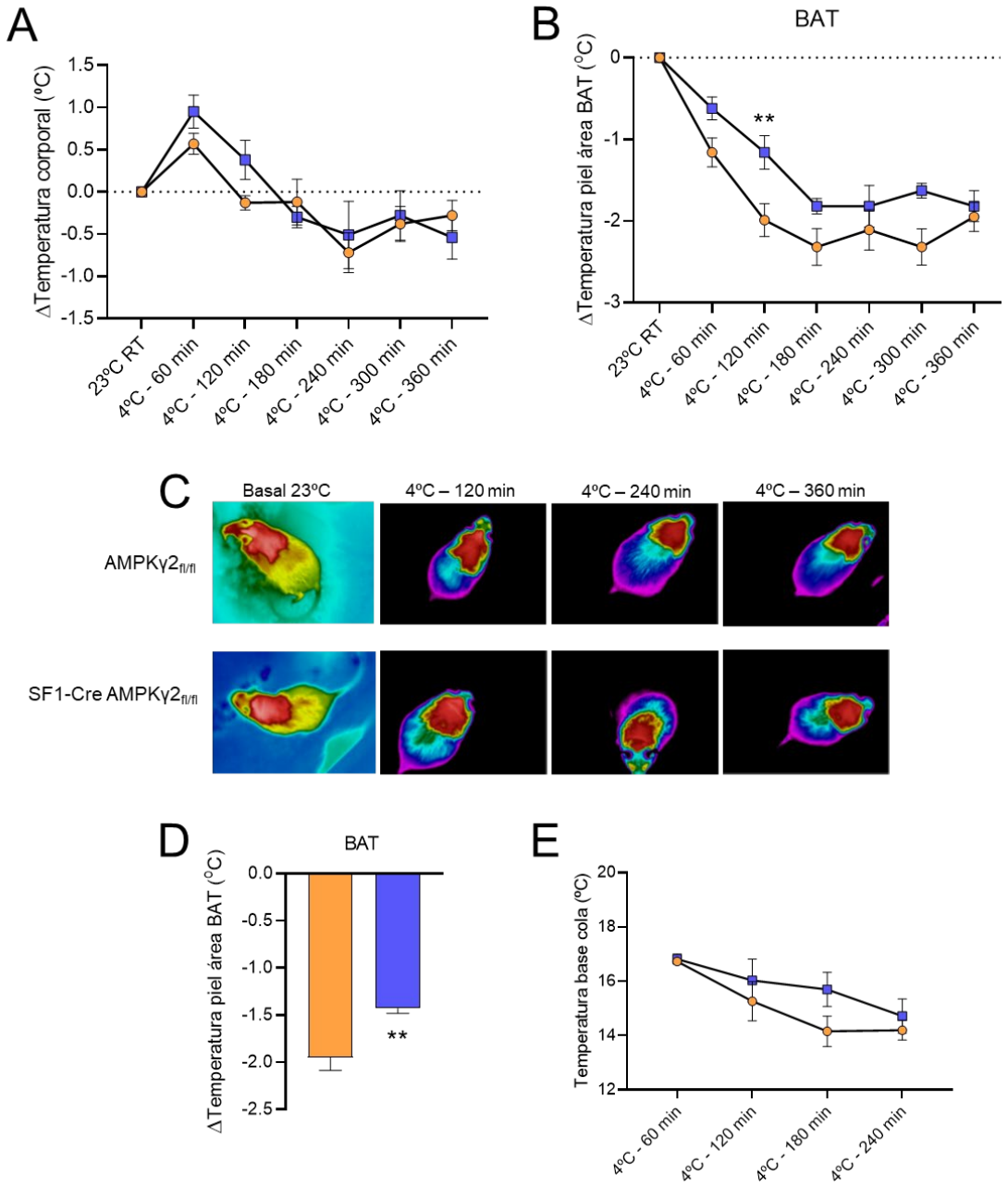


Figura 62. Aclimatación térmica a 4ºC en ratones macho SF1-Cre AMPKγ2-SF1. (A) Variación de la temperatura corporal durante el período de exposición a 4ºC (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (B) Variación de la temperatura del BAT respecto a los valores basales (23ºC) (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (C) Imágenes termográficas representativas, basales y al cabo de 2h, 4h y 6h para animales AMPKγ2$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKγ$^{fl/fl}$. (D) Variación media de la temperatura media de BAT a lo largo de la exposición a frío (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (E) Temperatura de la base de la cola durante las primeras 4h del experimento. Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A); ANOVA two-way (mixed effects analysis, Sidak's multiple comparison) para (B); T de student (2 colas) para (C). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

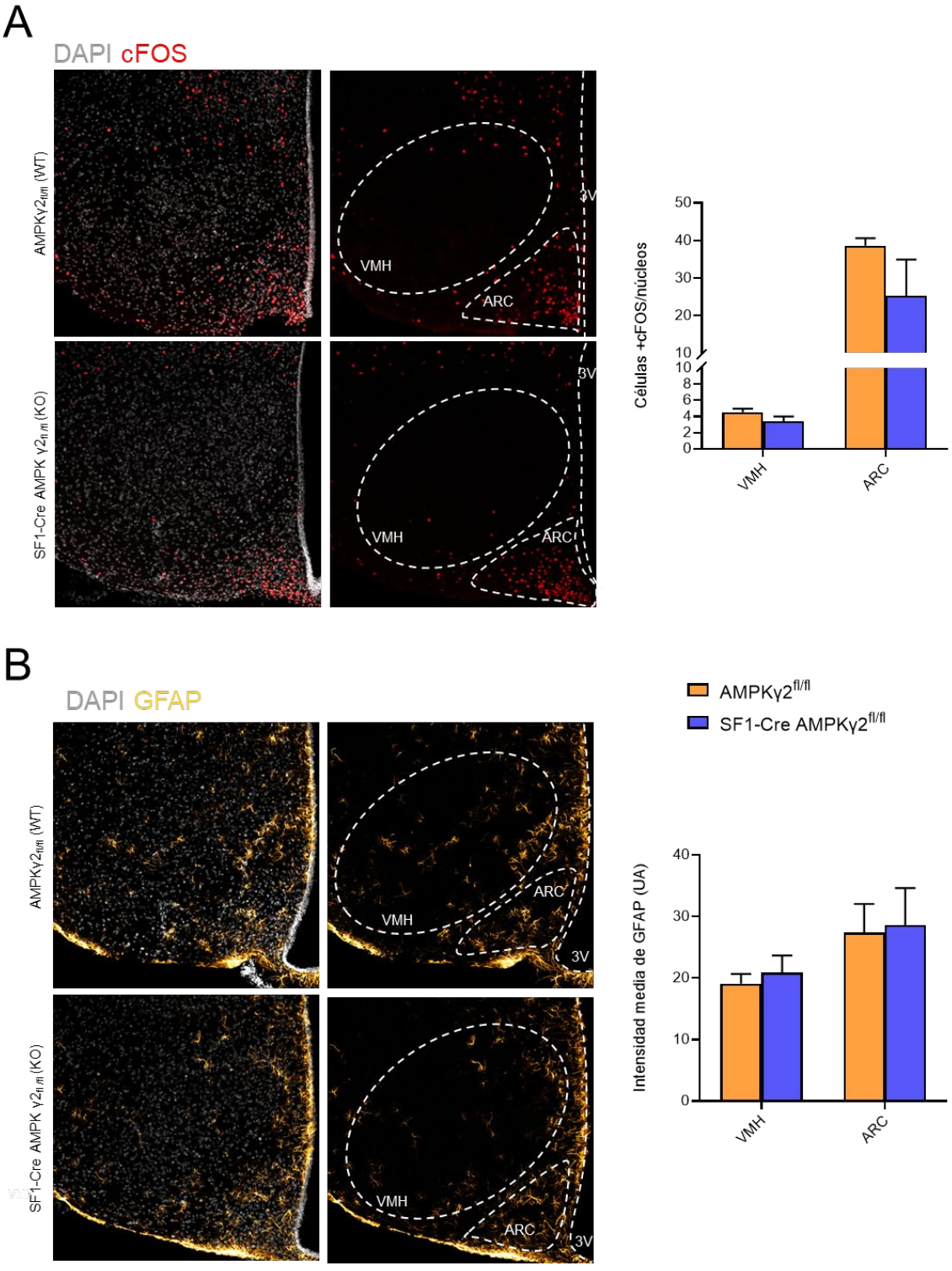


Figura 63. Inmunofluorescencia del VMH y ARC para GFAP y cFOS en animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$. (A) Paneles izquierdos imágenes de microscopía confocal para GFAP (dorado) y DAPI (gris); panel derecho cuantificación de las intensidades medias de GFAP en el ARC y VMH (AMPKγ2fl/fl N=4 y SF1-Cre AMPKγ2fl/fl N=4; 6-7 secciones por animal) (10x). (B) Paneles izquierdos imágenes de microscopía confocal para cFOS (rojo) y DAPI (gris); panel derecho cuantificación de los núcleos cFOS+ en el ARC y VMH (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=4 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=4) (10x, barra de escala 200 µm).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

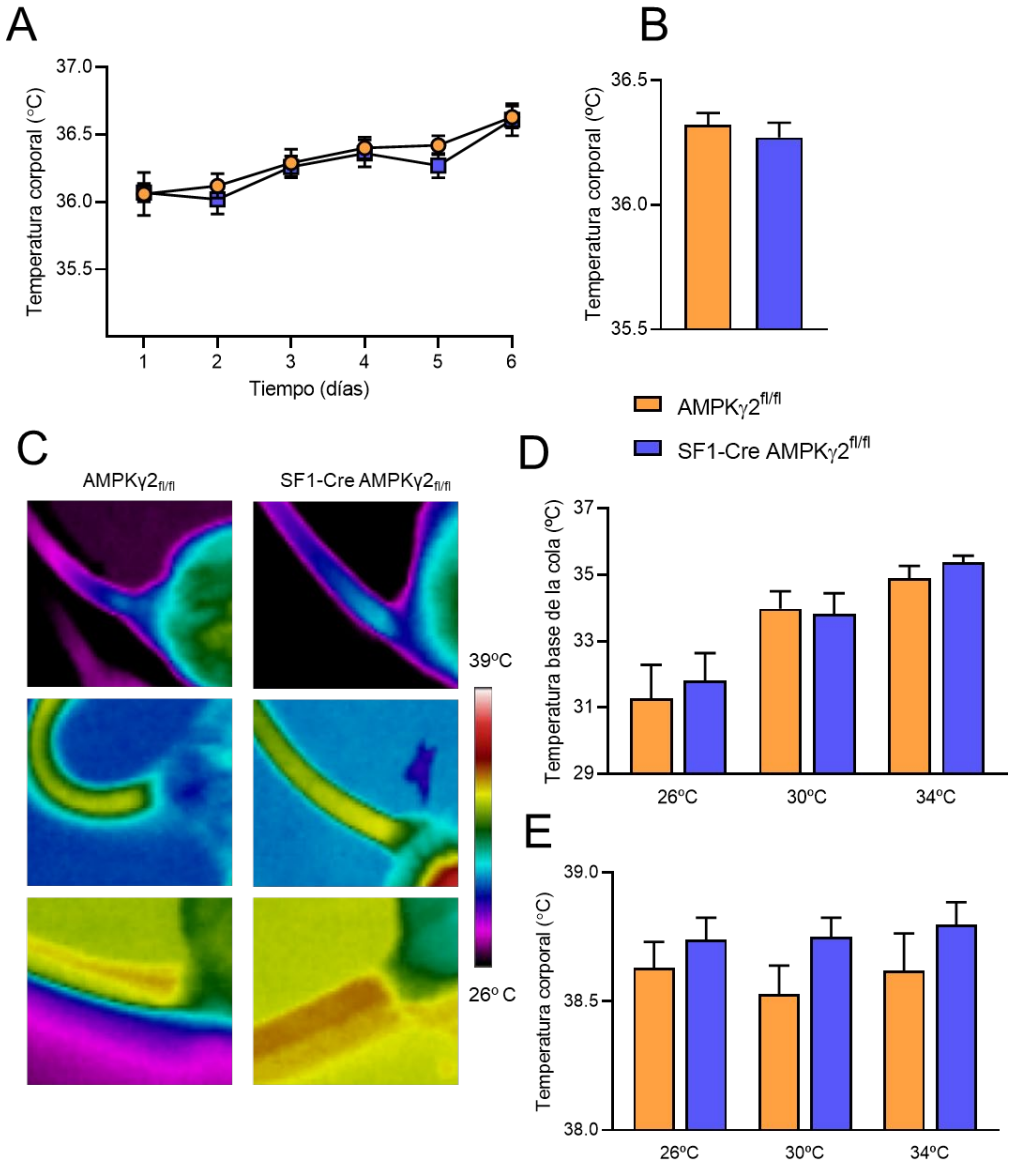


Figura 64. Aclimatación térmica de los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ a temperaturas cercanas a la termoneutralidad (A) Seguimiento de la temperatura corporal durante 6 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=23). (B) Temperatura corporal media durante 6 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=25 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=26). (C) Imágenes termográficas de la base de la cola de los ratones a diferentes temperaturas. (D) Cuantificación de la temperatura de la base de la cola de los ratones a 26ºC, 30ºC y 34ºC (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6). (E) Temperatura corporal de los animales expuestos a 26ºC, 30ºC y 34ºC (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=6). Test estadístico ANOVA two-way (A); t de Student (2 colas) (B, D y E). Datos representados como media ± SEM.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.17 La eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1, provoca un aumento de masa corporal en los machos en condiciones de HFD.

Continuando el mismo camino que con modelos anteriores, decidimos someter a estos animales, a obesidad inducida por dieta suministrándoles HFD a partir de la 8A semana. Los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ macho, ganaron más masa que los controles de forma significativa desde la semana 15 en adelante (Figura 65A), sin cambios en la ingesta (Figura 65B). Mediante resonancia magnética, vimos aumentados la masa magra, fluidos libres y la masa corporal (Figura 65C) y aunque no se vieron cambios en la masa grasa, si vimos aumentos de ciertos depósitos grasos como el BAT y el vWAT, así como de la masa de hígado (Figura 65D).

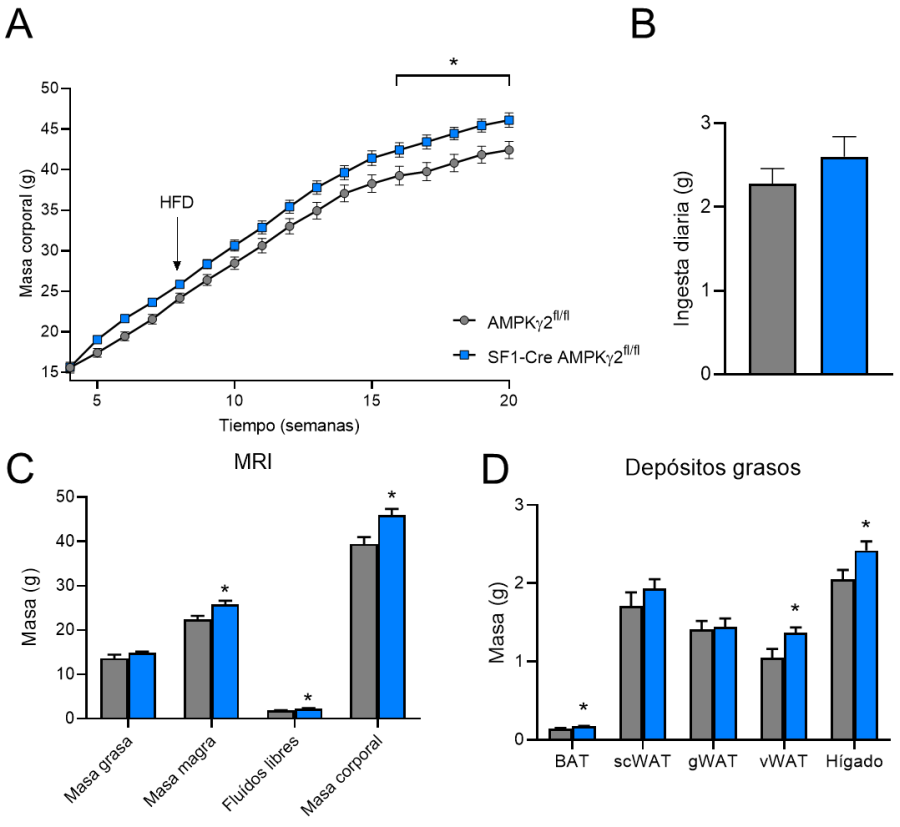


Figura 65. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 en condiciones de HFD en machos (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=30 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=28). (B) Ingesta diaria de los animales durante 9 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=9 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5). (C) Resultados de resonancia magnética (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=12 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=11). (D) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKγ2$^{fl/fl}$ fl N=18 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=21). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A); T de student para (B, C y D). Datos representados como media ± SEM.

Sin embargo, las hembras ante un estímulo de HFD, no mostraron cambios en su masa corporal (Figura 66A), ni en su ingesta (Figura 66B) y de forma paralela tampoco vimos cambios mediante resonancia magnética o en los diferentes depósitos grasos e hígado (Figura 66C-D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

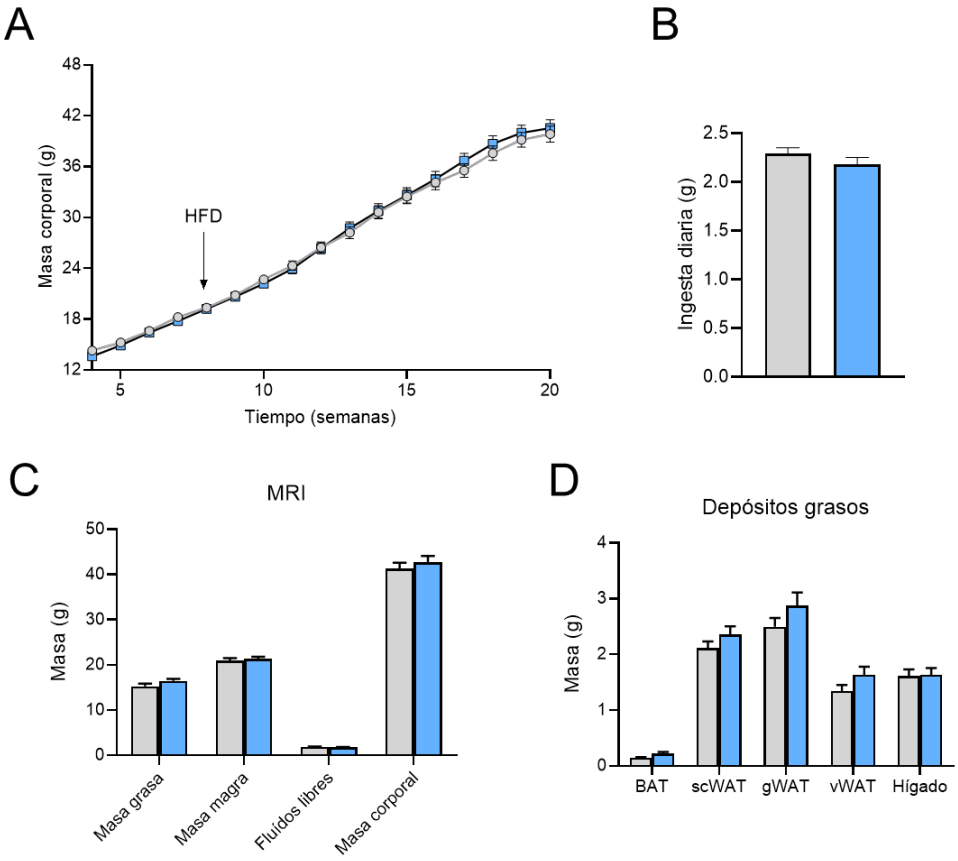


Figura 66. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 en condiciones de HFD en hembras (A) Masa corporal de los animales durante 20 semanas (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=46 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=40). (B) Ingesta diaria de los animales durante 9 días (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=11 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). (C) Resultados de resonancia magnética (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=22 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=19). (D) Masa de los principales depósitos grasos e hígado (AMPKγ2$^{fl/fl}$ fl N=22 y SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=18). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para (A); T de student para (B, C y D). Datos representados como media ± SEM.

En los análisis para valorar la termogénesis, en machos no vimos cambios en la temperatura corporal (Figura 67A), pero si una tendencia a presentar una menor temperatura de BAT y niveles proteicos de UCP1 (Figura 67B-D), no estadísticamente significativas. En hembras tampoco se observaron diferencias en la temperatura corporal (Figura 68A), la temperatura de BAT (Figura 68B-C) o los niveles proteicos de UCP1 en el BAT (Figura 68D).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

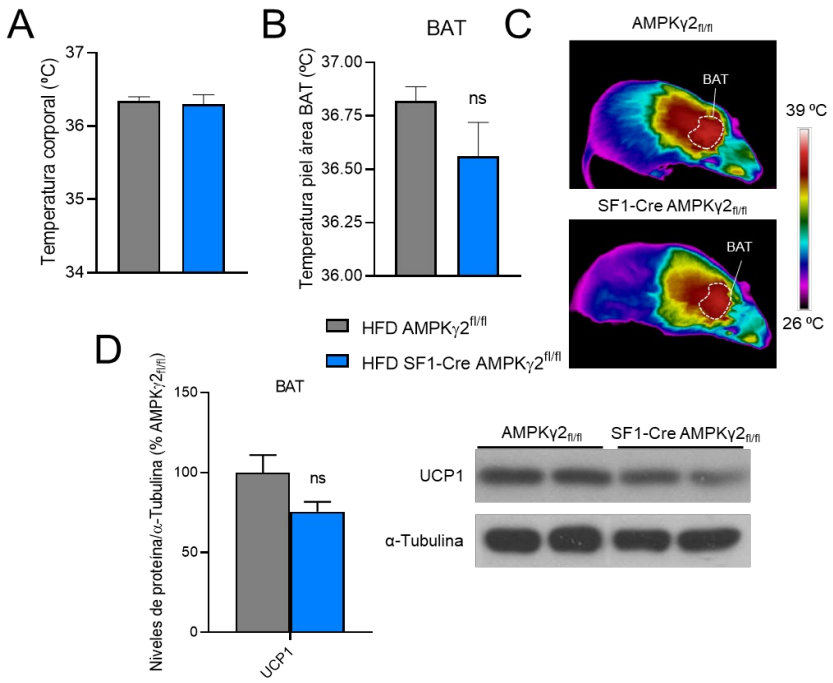


Figura 67. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en machos en condiciones de HFD. (A) Temperatura corporal media durante 9 dias (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=9, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5). (B) Temperatura del BAT en machos (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=9, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5) (C) Imágenes termográficas representativas (D) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

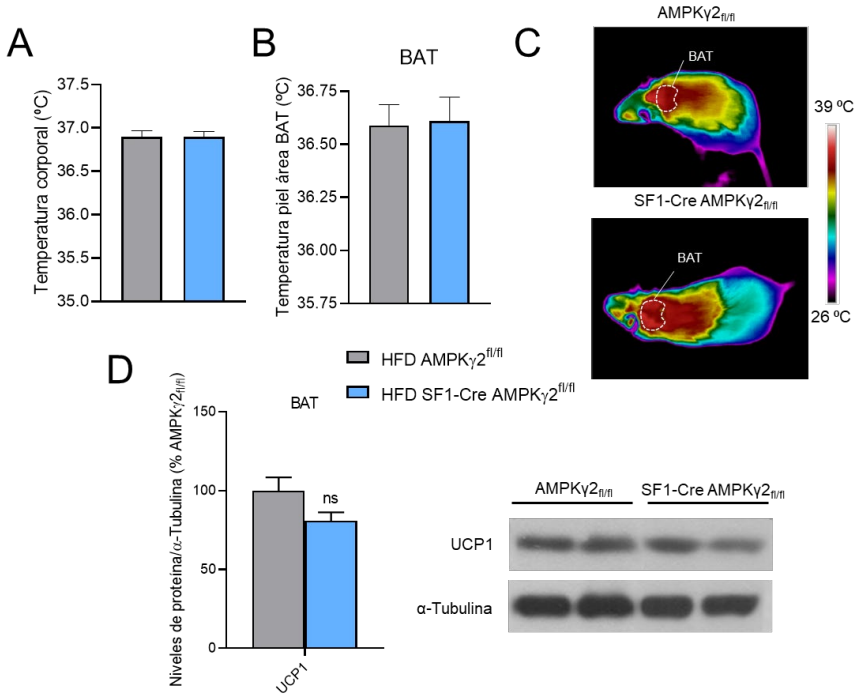


Figura 68. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la termogénesis en hembras en condiciones de HFD. (A) Temperatura corporal media durante 9 dias (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=11, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). (B) Temperatura del BAT en hembras (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=11, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7) (C) Imágenes termográficas representativas (D) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=7). Test estadístico t de Student (2 colas). Datos representados como media ± SEM. Las bandas de los geles provienen del mismo gel original.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En resumen, parece que la obesidad inducida por dieta agrava el fenotipo de los machos SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$, que ganan más masa que sus compañeros de camada, acompañado de un aumento en ciertos depósitos grasos, y presentan una tendencia a una menor termogénesis. Sin embargo, estos efectos no se presentan en hembras, donde la HFD afecta igual a ambos genotipos.

5.18 Los animales deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 no muestra cambios en el control glucémico en condiciones de HFD.

Se realizaron GTTs e ITTs para valorar la homeostasis de la glucosa tras la administración de HFD. No se observaron diferencias en la tolerancia a la glucosa o sensibilidad a la insulina en ninguno de ambos sexos, al comparar los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ con sus controles (Figura 69A-D).

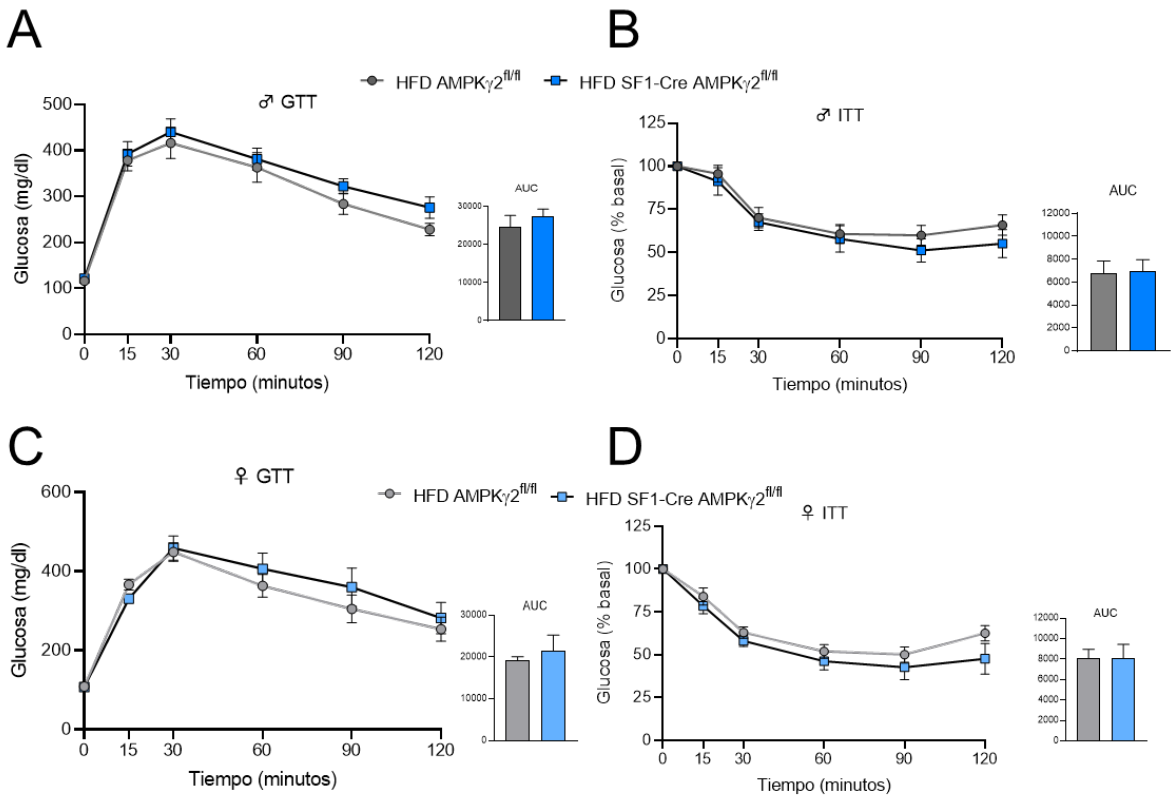


Figura 69. Efecto de la eliminación de AMPKγ2 en neuronas SF1 sobre la homeostasis de la glucosa en condiciones de HFD en ambos sexos. (A) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa (GTT) y panel derecho área bajo la curva (HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=11, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5). (B) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho área bajo la curva (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=9, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5). (C) Panel izquierdo test de tolerancia a la glucosa y panel derecho área bajo la curva (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=14, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8). (D) Panel izquierdo test de sensibilidad a la insulina y panel derecho área bajo la curva (AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=8, SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=14). Test estadístico ANOVA two-way (Sidak's multiple comparison) para paneles izquierdos A-D, T de Student 2 colas para AUC (A-D). Datos representados como media ± SEM.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.19 Los animales deficientes en AMPKγ2 en neuronas SF1 no muestran cambios en el gasto energético y la actividad locomotora en condiciones de HFD

Al no observarse un fenotipo en el caso de las hembras, los análisis de calorimetría se realizaron de forma exclusiva en machos. No se observaron diferencias en el gasto energético, entre los animales F1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada, mediante ANCOVA (Figura 70A). No se observó tampoco una diferencia para el gasto energético (Figura 70B). En cuanto al cociente respiratorio, si se observaron unos valores más elevados en los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$, durante la fase de luz (Figura 70D) y aparentemente a lo largo del experimento (Figura 70C), solo que estadísticamente no significativos (ANOVA two way p valor = 0,155). Por último, tampoco se observaron cambios en la actividad locomotora (Figura 70E).

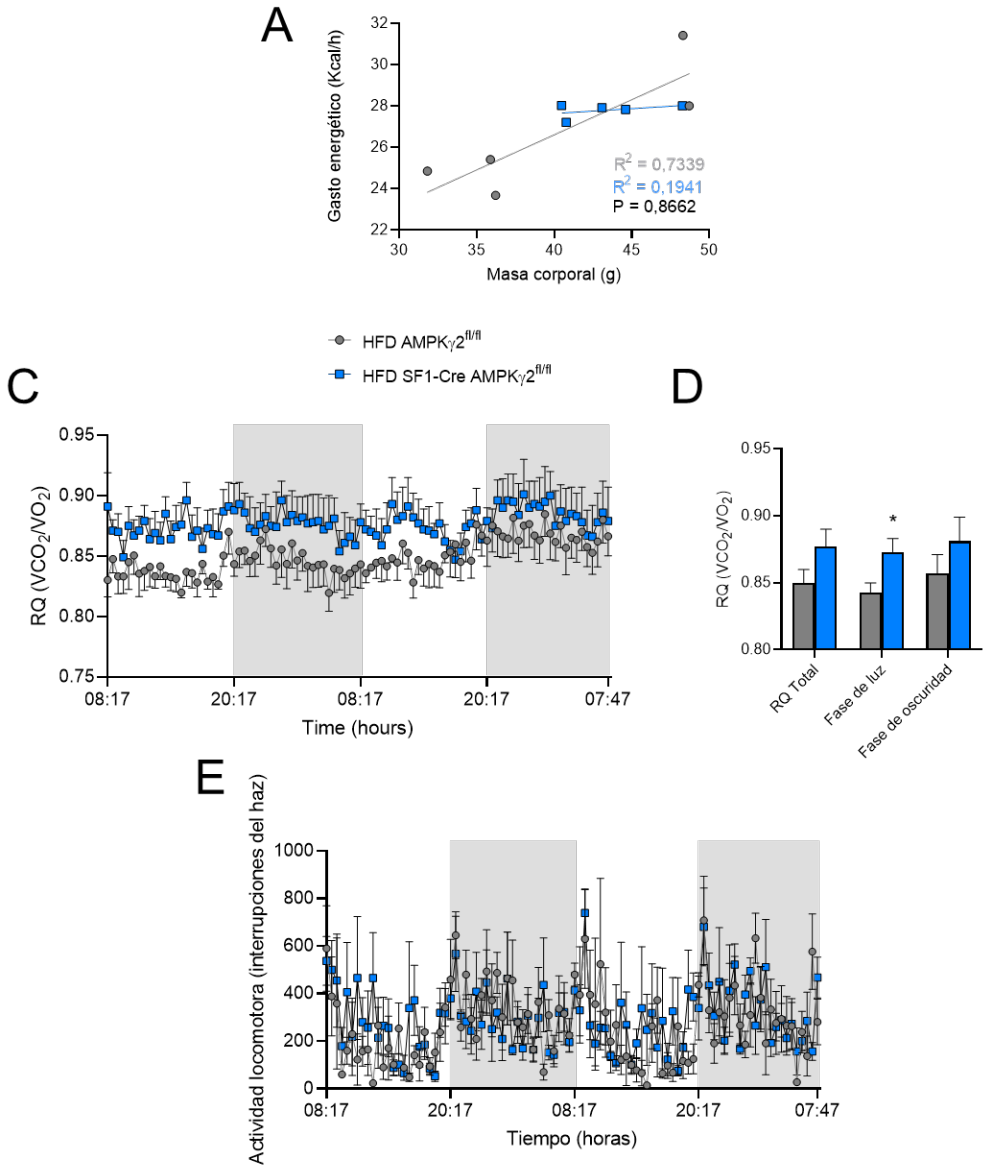


Figura 70. Resultados de calorimetría indirecta para los animales macho SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ y sus compañeros de camada. (A)) Análisis del gasto energético mediante ANCOVA utilizando la masa corporal como covariable. (C) Coeficiente respiratorio durante 48h. (D) Coeficiente respiratorio medio, durante las diferentes fases de luz. (E) Actividad locomotora a lo largo de 48h. Para todos los paneles HFD AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5, HFD SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$ N=5. Test estadístico Regresión lineal (A), T de student (D) y ANOVA two way (Sidak's multiple comparison) (B, C, E). Datos representados como media ± SEM

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. DISCUSIÓN

Históricamente, los tratamientos para la obesidad se han centrado en afectar solo a uno de los lados de la balanza: bien sobre el gasto energético (como los simpaticomiméticos, hormonas tiroideas, desacopladores químicos); o bien sobre la ingesta (compuestos serotorinérgios, dopaminérgicos o antagonistas de endocanabinoides), ambas opciones con resultados adversos o falta de efectividad (Dragano et al., 2020; Tschöp et al., 2016). El desarrollo actual de fármacos muy prometedores y efectivos, basados en agonistas múltiples (dobles o triples), ha destacado la necesidad de actuar simultáneamente sobre diferentes componentes del balance energético, y tener una perspectiva profunda de un trastorno multifactorial como la obesidad (Clemmensen et al., 2019; Dragano et al., 2020; Müller et al., 2018; Nogueiras et al., 2023; Tschöp et al., 2016).

Dentro del encéfalo el hipotálamo constituye un centro clave en la regulación del balance energético, debido a la integración de señales periféricas y la coordinación entre diferentes núcleos y redes neuronales que gobiernan la homeostasis energética (Morton et al., 2006; Myers & Olson, 2012; Saper & Lowell, 2014; Seoane-Collazo et al., 2015; Williams et al., 2001). Dentro el hipotálamo, AMPK destaca como una vía canónica, en la regulación del balance energético (Hardie & Ashford, 2014; López et al., 2016; Schneeberger & Claret, 2012), al integrar metabolitos y hormonas con redes neuronales complejas. Se ha demostrado como AMPK a nivel hipotalámico es capaz de regular la ingesta (Andersson et al., 2004; López et al., 2008; Minokoshi et al., 2004), la termogénesis en el BAT y el *browning* del WAT, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo hepático (Liu et al., 2020; López et al., 2016; López & Tena-Sempere, 2017; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Schneeberger & Claret, 2012). A pesar del incuestionable rol de AMPK hipotalámica en la regulación de la ingesta, abundante evidencia apunta a que las modificaciones de AMPK en el hipotálamo afectan sobre todo al gasto energético a través de la modulación del BAT a través del SNS. Señales hormonales como las hormonas tiroideas (Alvarez-Crespo et al., 2016; López et al., 2010; Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017), la leptina (Tanida et al., 2013b), los estrógenos (Martínez de Morentin et al., 2014), el BMP8b (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012) e incluso liraglutida un agonista de GLP-1R (Beiroa et al., 2014), todos ellos afectan a la termogénesis en el BAT al actuar sobre la vía AMPK(VMH)-SNS-BAT.

Uno de los estímulos fisiológicos evolutivamente más relevantes para los mamíferos, ha sido el frío y en consecuencia el desarrollo de la termogénesis en el BAT, que ha sido clave para la supervivencia neonatal, en procesos de hibernación y permitiendo la vida activa en ambientes fríos (Cannon & Nedergaard, 2004; Urisarri et al., 2021). Por ello en esta tesis, decidimos evaluar si este estímulo también formada parte del eje AMPK(VMH)-SNS-BAT. Nuestros datos muestran como un estímulo de 4ºC en comparación con animales expuestos a condiciones de termoneutralidad (30ºC), produce una disminución de la masa corporal a pesar de una ingesta incrementada y una disminución de la temperatura corporal. Las exposiciones más largas a 4ºC, mostraron un mejor reclutamiento del BAT, con mayor temperatura, mayores niveles de ARNm de marcadores termogénicos y niveles proteicos de UCP1, así como una inducción del *browning* en el scWAT. Tras analizar los niveles de AMPK en el VMH, se observaron unos niveles disminuíos de la ruta de AMPK en los animales expuestos a frío, algo que concuerda con los diferentes estímulos hormonales que inhiben AMPK en el VMH y aumentan la termogénesis del BAT (López, 2018; López et al., 2016).

Se ha observado que la acción de las hormonas tiroideas actuando en el VMH y en consecuencia aumentando la termogénesis del BAT, depende de la isoforma catalítica de AMPKα1 y no AMPKα2 (López et al., 2010). Datos previos de nuestro grupo, también indicaban que la inhibición de AMPKα1 en el VMH, sobreexpresando una isoforma dominante negativa, era la responsable de la pérdida de masa corporal de forma independiente a la ingesta a través de un aumento de la termogénesis en el BAT y la temperatura corporal, efecto que se revertía con antagonistas β-3. (Seoane-Collazo et al., 2018). Por tanto, decidimos observar si la expresión de una isoforma constitutivamente activa de AMPKα1 (AMPKα1-CA) en el VMH, daría lugar a una peor aclimatación de los animales a 4ºC. A los 5 días de la administración estereotáxica, los animales se sometieron a un estímulo de 4ºC y aquellos que sobreexpresaban AMPKα1-CA, presentaban una tendencia clara a una mayor pérdida de masa corporal y presentaron una menor ingesta, que el grupo GFP 4ºC. Además, los animales 4º AMPKα1-CA, defendieron peor su temperatura corporal a 4ºC, mostrando una mayor hipotermia durante la duración del experimento. Posteriormente, detectamos unos menores niveles de UCP1 en el BAT de estos animales, indicándonos que la sobreexpresión de AMPKα1 de forma constitutivamente activa, empeoraba la aclimatación de los animales a 4ºC, afectando a la termorregulación de estos. El VMH ha sido tradicionalmente una zona muy relacionada con el balance energético y en especial con la termogénesis en el BAT (King, 2006; Tran et al., 2022). Dentro del VMH, diversas poblaciones neuronales como SF1 (tratadas a continuación) y ERα (Seoane-Collazo et al., 2018; Ye et al., 2022), son también claves en la regulación de la termogénesis. Estudiar AMPK en otras poblaciones neuronales del VMH implicadas en la termogénesis, ayudaría a profundizar en el ya consolidado papel clave de esta proteína en el VMH y su importancia en la termogénesis del BAT.

Las neuronas SF1 son una población mayoritaria en el VMH, con un rol indiscutible en la homeostasis energética (Dhillon et al., 2006; Kim, Sohn, et al., 2011), pero también en el control glucémico (Tu et al., 2022) y la termogénesis en el BAT (Liu et al., 2020). SF1 es necesario para un correcto desarrollo del VMH e incluso su delección postnatal agrava los fenotipos de obesidad en condiciones de HFD debido a una resistencia a la leptina (C. C. Cheung et al., 2013; Choi et al., 2013; Davis et al., 2004; Ikeda et al., 1995; Kim, Sohn, et al., 2011; Shinoda et al., 1995; P. V Tran et al., 2003; Zhao et al., 2008). Se ha visto como estas neuronas, proyectan caudalmente a través del PAG, a centros autonómicos del troncoencéfalo, como PBN, LC, NTS, RTN y RVLM, regiones que conectan con el SNS y que controlan la termogénesis en el BAT (Cano et al., 2003; Lindberg et al., 2013; Morrison, 2011; Uno & Shibata, 2001).

La delección de AMPKα1 en neuronas SF1, da lugar a una menor masa corporal, con menor adiposidad, sin cambios en la ingesta y con un mayor gasto energético y termogénesis en el BAT (Seoane-Collazo et al., 2018). Dado que la eliminación de AMPKα2 en neuronas POMC da lugar a un fenotipo obeso debido a hiperfagia, mientras que su delección en neuronas AgRP da lugar a un fenotipo delgado (Claret et al., 2007), nos planteamos observar si también existía cierta dicotomía al eliminar AMPKα2 en neuronas SF1. Tanto machos como hembras, SF1-Cre AMPKα2, no presentaron alteraciones evidentes en su masa corporal, ni en su ingesta, su temperatura corporal o termogénesis en el BAT. De igual manera, tampoco se observaron cambios en el gasto energético, cociente respiratorio o actividad locomotora, en ninguno de los dos sexos, mediante calorimetría indirecta. La masa corporal en ambos sexos se monitorizó durante 20 semanas, donde parece que existe una ligera tendencia a una mayor masa corporal de los animales KO. Es posible que un seguimiento más longevo de los animales, igual que en

USC DE COMPOSTELA

el caso de los animales AgRPα2-KO, diese lugar aun fenotipo de obesidad con la edad, lo cual indicaría roles opuestos de AMPKα1 y AMPKα2 en las neuronas SF1.

Las neuronas SF1, también están muy implicadas en la homeostasis de la glucosa (Choi et al., 2013; Shimazu & Minokoshi, 2017; Tu et al., 2022). Los resultados de su activación o inhibición mediante métodos farmacogenéticos o optogenéticos, mostrando resultados contrarios, probablemente debido a la inespecificidad de algunos métodos o más probablemente a la heterogeneidad de las neuronas SF1 (Coutinho et al., 2017; Meek et al., 2016; Toda et al., 2016; J. Zhang et al., 2020). AMPK en el VMH juega un papel clave en la respuesta contrarreguladora (McCrimmon et al., 2004, 2006, 2008). La administración intraperitoneal o intracerebroventricular de glucosa, disminuye la actividad de AMPKα2 en el VMH y otros núcleos hipotalámicos (Minokoshi et al., 2004). Sin embargo, en nuestro modelo, SF1-Cre AMPKα2, no se observaron cambios en el metabolismo de la glucosa, mediante GTT, ITT o PTT. Tampoco observamos cambios durante ensayos de tolerancia a la glucosa postprandial, la restricción calórica, ni en tratamientos con hormonas hiperglucemiantes. Sería interesante observar cómo se comportan estos animales durante *clamps* glucémicos, o estudiar más a fondo la respuesta contrarreguladora de los mismos y los niveles circulantes de las hormonas implicadas, estudios que llevaremos a cabo en breve.

El modelo SF1-Cre AMPKα1, presentaba una termogénesis incrementaba en el BAT, con una mayor captación de glucosa. Esto hacía que los animales defendiesen mejor su temperatura durante una exposición a 4ºC. En condiciones basales, los animales no presentaban una mayor temperatura corporal, debido a que la disipación de temperatura por la base de la cola era mayor en los animales KO, respecto a sus controles de camada (Patricia Seoane Collazo, 2018; Seoane-Collazo et al., 2018). El mismo paradigma, fue estudiado en los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$. En condiciones de 4ºC no se observaron cambios en la temperatura corporal defendida entre estos animales y sus compañeros de camada, ni tampoco en la temperatura de BAT. Estos animales, presentaron una temperatura de la cola más baja en condiciones de 4ºC, algo que no ocurría en el modelo SF1-Cre AMPKα1. Esta menor temperatura, podría asociarse a un menor flujo sanguíneo y una mayor vasoconstricción en los animales SF1-Cre AMPKα2, de cara retener y defender mejor su temperatura corporal a 4ºC, como ocurre con los animales deficientes para UCP1 (Wang et al., 2006). Sin embargo, al no observarse cambios en la temperatura corporal o del BAT a 4ºC, no podemos concluir la naturaleza de estas diferencias en la cola. En condiciones cercanas a la termoneutralidad (26º-30º-34ºC) tampoco observamos cambios en la temperatura corporal o de disipación de temperatura por la base de la cola. De forma general, en condiciones de STD, parece que los animales SF1-Cre AMPAKα2 no presentan un fenotipo metabólico claro a diferencia del modelo SF1-Cre AMPKα1, lo que parece indicar un rol dicotómico de ambas subunidades en las neuronas SF1.

Muchas de las manipulaciones genéticas de distintos genes en neuronas SF1, muestran un fenotipo más claro o que debuta, cuando los animales son expuestos a obesidad inducida por dieta (Choi et al., 2013). Lo mismo ocurre con el modelo SF1-Cre AMPKα1, que es resistente a obesidad, debido a un mayor gasto energético y termogénesis en el BAT y a una mejor homeostasis de la glucosa. Los animales macho SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$, sin embargo, presentan el fenotipo opuesto, ya que presentaban una mayor masa corporal, acompañada de una mayor masa grasa y una mayor masa hepática. En hembras no se detectaron cambios en este sentido. A pesar de esta masa corporal elevada en machos, no observamos cambios en la temperatura corporal o la termogénesis de estos animales, ni tampoco cambios en su gasto energético u otros

USC DE COMPOSTELA

componentes al analizados por calorimetría indirecta. En hembras, de nuevo tampoco se observaron diferencias para esos parámetros. Sorprendentemente, en machos si observamos una mejora en la homeostasis de la glucosa para los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$, al calcular el AUC de la GTT restando los valores de la glucosa basal (Virtue & Vidal-Puig, 2021). En definitiva, en condiciones de HFD si encontramos que los animales SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$ presentan una masa corporal elevada respecto a sus controles, de forma contraria al modelo SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$ que en condiciones de HFD, presentaban una resistencia al desarrollo de la obesidad.

Animales que carecen de AMPKα2 de forma global, también presentan un aumento de la masa corporal y de la adiposidad en condiciones de HFD igual que en el modelo aquí descrito (Villena et al., 2004). Sin embargo, el mismo animal en STD presentaba alteraciones en el metabolismo de la glucosa, que no se veían en HFD, debido a una sobre actividad del SNS y aumento en la secreción de catecolaminas (Viollet et al., 2003). La eliminación neuronal de PTP1b, un inhibidor de los receptores de insulina y leptina, presentaban resistencia al desarrollo de obesidad y menor masa corporal, algo que se asociaba a una menor actividad de AMPKα2 y aun aumento de la biogénesis mitocondrial y marcadores termogénicos en el BAT, así como una mayor oxidación muscular, dando lugar en conjunto, a un mayor gasto energético (Xue et al., 2009b). Esta heterogeneidad y amplio abanico de fenotipos indican la importancia de la isoforma AMPKα2 en función del tejido o tipo celular, e incluso dentro del mismo tipo neuronal como es SF1, donde se observan roles divergentes para las isoformas α1 y α2. Estudios clásicos, han mostrado como la isoforma AMPKα2 parece presentar una localización más nuclear, que la isoforma AMPKα1 que presentaría una distribución más citosólica (Ross, MacKintosh, et al., 2016; Salt et al., 1998). Estas diferencias podrían ser especialmente relevantes a nivel neuronal, debido a la estructura celular de las neuronas, con una forma compleja y distancia significativa entre axones y núcleo. Un estudio detallado de la sublocalización celular de AMPKα1 y AMPKα2, y de sus posibles diferentes sustratos a nivel celular ayudaría a entender mejor su rol en neuronas SF1. En este sentido, estamos realizando análisis fosfoproteómicos, comparando las dianas *downstream* AMPKα1 y AMPKα2 en el hipotálamo de los ratones SF1-Cre AMPKα1$^{fl/fl}$ y SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$.

A parte de la importancia de las isoformas catalíticas de AMPK, sus diferentes isoformas reguladoras β y γ también pueden tener un papel importante en el balance energético. La subunidad γ, es la encargada de unir ATP/AMP y por tanto juega un papel clave en la activación de la quinasa, tanto de forma alostérica, como favoreciendo la fosforilación de la Thr172 y evitando a su vez su desfosforilación (Carling, 2017; Cheung et al., 2000; Xiao et al., 2007). La subunidad γ es la que presenta más variabilidad entre sus isoformas, principalmente debido al extremo N-terminal, siendo el de γ2 el más largo (250 aminoácidos), frente al de γ3 (180 aminoácidos), ambos sin mucha relación y estando ausente en la isoforma γ1. Se cree que este extremo de las isoformas γ, también ayuda a la localización celular de AMPK en función del heterotrímero formado con las otras subunidades (Ross, Jensen, et al., 2016). La isoforma γ2, está expresaba principalmente en el músculo cardíaco, donde en humanos su mutación da lugar una actividad alterada de AMPKγ2, que resultan en cardiomiopatías metabólicas (Wolff-Parkinson-Syndrome) (Cao et al., 2017; Kim et al., 2014; Yavari et al., 2017; Zou et al., 2005). Yavari y colaboradores expresaron una mutación análoga a la de los humanos en ratones, de forma global y estos ratones presentaban obesidad y alteraciones en la secreción de insulina (Yavari et al., 2016). Sin embargo, actualmente no existen prácticamente datos sobre el papel de AMPKγ2 en el hipotálamo.

USC DE COMPOSTELA

Por ello, nos pareció interesante estudiar la eliminación de AMPKγ2 en las neuronas SF1. A diferencia de las isoformas catalíticas, donde en ambos casos se veía cierto dimorfismo sexual en el fenotipo (solo presente en machos). Los animales SF1-Cre AMPKγ2$^{fl/fl}$, tanto machos como hembras, presentaban una masa corporal elevada, con mayor adiposidad, pero sin cambios en la ingesta. En ambos modelos se observó una tendencia a una menor termogénesis y temperatura corporal, que no llegó a ser significativa de acuerdo también con una tendencia a unos menores niveles de UCP1 en el BAT (sí significativos en los machos) y sin cambios en marcadores termogénicos en el BAT. En machos también se encontró un menor gasto energético al realizar ANCOVA con la masa corporal como covariable. Sin embargo, en ambos sexos no se encontraron diferencias para los distintos parámetros analizados por calorimetría indirecta. En ambos sexos, el cociente respiratorio mostró cierta variabilidad circadiana respecto a los controles, por lo que quizás sería interesante analizar el comportamiento circadiano de estos animales, o de sus parámetros metabólicos, teniendo en cuenta la relación entre el VMH y los ritmos circadianos, recientemente reportada (Mendoza-Viveros et al., 2023; Orozco-Solis et al., 2015, 2016). No encontramos diferencias significativas en el manejo de la glucemia para este modelo, ni en machos ni en hembras. De igual manera que el animal SF1-Cre AMPKα2$^{fl/fl}$, dada la implicación en la termogénesis de las neuronas SF1, decidimos realizar experimentos de aclimatación térmica. En machos, vimos como la temperatura defendida del BAT, durante una exposición a 4ºC era menor que en los animales *wild-ype*, pero sin darse cambios en la temperatura corporal. Tampoco se observaron cambios en la temperatura de la cola o la temperatura corporal, de los animales a temperaturas cercanas a la termoneutralidad. En el trabajo de Yavari y colaboradores, la mutación introducida, daba lugar a una isoforma con una mayor actividad basal de AMPKγ2 (Yavari et al., 2016) y parte del fenotipo se debe a una activación central de AMPKγ2 y una mayor sensibilidad a las acciones orexigénicas de la ghrelina, un aumento de la lipogénesis de novo en el hígado y una resistencia a la insulina. En nuestro modelo, la eliminación del exón 6 de *Prkag2* en neuronas SF1, da lugar a una tendencia a unos mayores niveles de pAMPK en el VMH, aunque no de forma significativa. En este sentido sería interesante realizar estudios sobre la actividad de AMPK en este modelo, de forma específica en neuronas SF1, por ejemplo, estudios de actividad enzimática o electrofisiología en explantes de VMH *ex vivo* con diferentes activadores o inhibidores de AMPK.

Finalmente, también expusimos este modelo a un estímulo obesogénico mediante dieta alta en grasa. En machos se mantuvo el fenotipo, con un mayor masa corporal y adiposidad sin cambios en la ingesta, pero no en las hembras. Nuevamente, parece que los machos presentan una tendencia a una menor temperatura del BAT y niveles de UCP1, pero que no fueron estadísticamente significativos. En el caso de las hembras, estos parámetros permanecieron inalterados también. Tampoco observamos cambios en el manejo de la glucemia, en ambos sexos. Como las hembras no presentaban un fenotipo claro, solo realizamos estudios de calorimetría en los machos que no presentaron cambios destacables a excepción del RQ, que a pesar de estar en HFD, parecía estar más elevado para los animales KO.

En conclusión, los datos de esta tesis apuntan, a que AMPK en el VMH presenta un papel clave durante la activación de la termogénesis en el BAT, igual que otros estímulos hormonales termogénicos. La sobreexpresión de AMPKα1-CA en el VMH conlleva una peor aclimatación a frío. El modelo SF1-Cre AMPKα2-SF1, presenta ausencia de alteraciones metabólicas destacables en STD, pero en HFD da lugar a un fenotipo obeso, contrario al encontrado para AMPKα1 en las neuronas SF1. Y por último el modelo SF1-Cre AMPKγ2, también presenta

USC DE COMPOSTELA

alteraciones en la masa corporal, en STD para ambos sexos. Ambos modelos precisan de un estudio más profundo de su metabolismo para elucidar el papel de ambas isoformas de AMPK en las neuronas SF1 y el resultado metabólico de su eliminación. En concreto, habría que aumentar el tamaño muestral de algunos parámetros, como los análisis de BAT por termografía o los niveles de UCP1, en nuevas cohortes de animales, para ver si las claras tendencias observadas arrojan resultados significativos en un futuro. Sin embargo, es destacable la importancia no solo de AMPK, sino de sus diferentes subunidades, dentro del VMH y más concretamente en las neuronas SF1, donde la modificación específica de unas isoformas u otras conlleva fenotipos divergentes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONS

The results obtained during the completion of this Doctoral Thesis let us state, the following conclusions:

- VMH AMPKα1 plays and important role during acclimatation of rodents to 4ºC.
- AMPKα2 deletion in SF1 neurons, shows no substantial metabolic alterations in standard diet conditions.
- AMPKα2 deletion in SF1 neurons, reveals higher body weight gain and adiposity in high fat diet conditions, exclusively in male mice.
- AMPKγ2 deletion in SF1 neurons, reveals higher body weight gain and adiposity in both sexes. In HFD conditions, only male mice show higher body weight.
- AMPK and its different subunits in SF1 neurons display a major role in the regulation on energy balance.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

Aashaq, S., Batool, A., & Andrabi, K. I. (2019). TAK1 mediates convergence of cellular signals for death and survival. *Apoptosis*, *24*(1–2), 3–20. https://doi.org/10.1007/s10495-018-1490-7

Abdullah, A., Wolfe, R., Stoelwinder, J. U., de Courten, M., Stevenson, C., Walls, H. L., & Peeters, A. (2011). The number of years lived with obesity and the risk of all-cause and cause-specific mortality. *International Journal of Epidemiology*, *40*(4), 985–996. https://doi.org/10.1093/ije/dyr018

Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Sleeman, M. W., Picciotto, M. R., Tschöp, M. H., Gao, X.-B., & Horvath, T. L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(12), 3229–3239. https://doi.org/10.1172/JCI29867

Adamantidis, A. R., Zhang, F., Aravanis, A. M., Deisseroth, K., & de Lecea, L. (2007). Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, *450*(7168), 420–424. https://doi.org/10.1038/nature06310

Aherne, W., & Hull, D. (1966). Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *91*(1), 223–234. https://doi.org/10.1002/path.1700910126

Ahima, R. S., & Antwi, D. A. (2008a). Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *37*(4), 811–823. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.08.005

Ahima, R. S., & Antwi, D. A. (2008b). Brain Regulation of Appetite and Satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *37*(4), 811–823. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.08.005

Al-Massadi, O., Müller, T., Tschöp, M., Diéguez, C., & Nogueiras, R. (2018). Ghrelin and LEAP-2: Rivals in Energy Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, *39*(8), 685–694. https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.06.004

Alon, T., & Friedman, J. M. (2006). Late-Onset Leanness in Mice with Targeted Ablation of Melanin Concentrating Hormone Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *26*(2), 389–397. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1203-05.2006

Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., & Kahn, B. B. (2007). Role of Hypothalamic Adenosine 5′-Monophosphate-Activated Protein Kinase in the Impaired Counterregulatory Response Induced by Repetitive Neuroglucopenia. *Endocrinology*, *148*(3), 1367–1375. https://doi.org/10.1210/en.2006-1039

Alvarez-Crespo, M., Csikasz, R. I., Martínez-Sánchez, N., Diéguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., & López, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Molecular Metabolism*, *5*(4), 271–282. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.008

Amatuzio, D. S., Grande, F., & Wada, S. (1962). Effect of glucagon on the serum lipids in essential hyperlipemia and in hypercholesterolemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *11*, 1240–1249.

American Diabetes Association. (2001). Postprandial Blood Glucose. *Diabetes Care*, *24*(4), 775–778. https://doi.org/10.2337/diacare.24.4.775

Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951a). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *24*(2), 123–140.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951b). Localization of a "Feeding Center" in the Hypothalamus of the Rat. *Experimental Biology and Medicine*, *77*(2), 323–325. https://doi.org/10.3181/00379727-77-18766

Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., Witters, L. A., Kemp, B. E., & Means, A. R. (2008). Hypothalamic CaMKK2 Contributes to the Regulation of Energy Balance. *Cell Metabolism*, *7*(5), 377–388. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.011

Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C. R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S. R., Carling, D., & Small, C. J. (2004). AMP-activated Protein Kinase Plays a Role in the Control of Food Intake. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12005–12008. https://doi.org/10.1074/jbc.C300557200

Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, *14*(3), 351–355. https://doi.org/10.1038/nn.2739

Arase, K., York, D. A., Shimizu, H., Shargill, N., & Bray, G. A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *255*(3), E255–E259. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.3.E255

Arrigoni, E., Chee, M. J. S., & Fuller, P. M. (2019). To eat or to sleep: That is a lateral hypothalamic question. *Neuropharmacology*, *154*, 34–49. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.017

Asakawa, A., Inui, A., Yuzuriha, H., Ueno, N., Katsuura, G., Fujimiya, M., Fujino, M. A., Niijima, A., Meguid, M. M., & Kasuga, M. (2003). Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*, *124*(5), 1325–1336. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00216-6

Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, *488*(7410), 172–177. https://doi.org/10.1038/nature11270

Bailey, Von Englehardt, Leng, Smith, & Dickson. (2001). Growth Hormone Secretagogue Activation of the Arcuate Nucleus and Brainstem Occurs Via a Non-Noradrenergic Pathway. *Journal of Neuroendocrinology*, *12*(3), 191–197. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00398.x

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S. M., Lee, C. E., Tang, V., Kenny, C. D., McGovern, R. A., Chua, S. C., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2004). Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis. *Neuron*, *42*(6), 983–991. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.004

Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2005). Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure. *Cell*, *123*(3), 493–505. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.035

Bamshad, M., Aoki, V. T., Adkison, M. G., Warren, W. S., & Bartness, T. J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *275*(1), R291–R299. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.1.R291

Bamshad, M., Song, C. K., & Bartness, T. J. (1999a). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *276*(6), R1569–R1578. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1569

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bamshad, M., Song, C. K., & Bartness, T. J. (1999b). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *276*(6), R1569–R1578. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1569

Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B., & Maness, L. M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, *17*(2), 305–311. https://doi.org/10.1016/0196-9781(96)00025-3

Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L. S. M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, *17*(2), 200–205. https://doi.org/10.1038/nm.2297

Bartness, T. J., Vaughan, C. H., & Song, C. K. (2010a). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*, *34*(S1), S36–S42. https://doi.org/10.1038/ijo.2010.182

Bartness, T. J., Vaughan, C. H., & Song, C. K. (2010b). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International Journal of Obesity*, *34*(S1), S36–S42. https://doi.org/10.1038/ijo.2010.182

Baskin, D. G., Breininger, J. F., & Schwartz, M. W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, *48*(4), 828–833. https://doi.org/10.2337/diabetes.48.4.828

Baskin, D. G., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D., Breininger, J. F., Jonak, Z., Schaefer, J., Krouse, M., Burghardt, C., Campfield, L. A., Burn, P., & Kochan, J. P. (1999). Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *47*(3), 353–362. https://doi.org/10.1177/002215549904700309

Baskin, D. G., Wilcox, B. J., Figlewicz, D. P., & Dorsa, D. M. (1988). Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends in Neurosciences*, *11*(3), 107–111. https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90155-5

Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences*, *22*(1), 12–13. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)30046-7

Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C., & Schwartz, M. W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *Journal of Clinical Investigation*, *92*(4), 1824–1830. https://doi.org/10.1172/JCI116773

Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Fernø, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Frühbeck, G., & Nogueiras, R. (2014). GLP-1 Agonism Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Browning Through Hypothalamic AMPK. *Diabetes*, *63*(10), 3346–3358. https://doi.org/10.2337/db14-0302

Benoit, S. C., Air, E. L., Coolen, L. M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D. J., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2002). The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins. *The Journal of Neuroscience*, *22*(20), 9048–9052. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-09048.2002

Bentham, J., Di Cesare, M., Bilano, V., Bixby, H., Zhou, B., Stevens, G. A., Riley, L. M., Taddei, C., Hajifathalian, K., Lu, Y., Savin, S., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Chirita-Emandi, A.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hayes, A. J., Katz, J., Kelishadi, R., Kengne, A. P., Khang, Y. H., … Cisneros, J. Z. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, *390*(10113). https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3

Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1993). The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *17*(2), 141–193. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80149-6

Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1998). The Dorsomedial Hypothalamic Nucleus Revisited: 1998 Update. *Experimental Biology and Medicine*, *218*(4), 284–306. https://doi.org/10.3181/00379727-218-44296

Bernardis, L. L., & Frohman, L. A. (1971). Effects of hyothalamic lesions at different loci on development of hyperinsulinemia and obesity in the weanling rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *141*(1), 107–115. https://doi.org/10.1002/cne.901410109

Berthoud, H.-R., Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2017). Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*, *152*(7), 1728–1738. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.050

Betley, J. N., Cao, Z. F. H., Ritola, K. D., & Sternson, S. M. (2013). Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior. *Cell*, *155*(6), 1337–1350. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002

Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2015). Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*, *64*(7), 2352–2360. https://doi.org/10.2337/db15-0146

Bi, S., Kim, Y. J., & Zheng, F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides*, *46*(6), 309–314. https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002

Bi, S., & Moran, T. H. (2002). Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: Lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides*, *36*(2–3), 171–181. https://doi.org/10.1054/npep.2002.0895

Bi, S., Robinson, B. M., & Moran, T. H. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *285*(5), R1030–R1036. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00734.2002

Billington, C. J., Briggs, J. E., Link, J. G., & Levine, A. S. (1991). Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *261*(2), R501–R507. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.2.R501

Bingham, N. C., Anderson, K. K., Reuter, A. L., Stallings, N. R., & Parker, K. L. (2008). Selective Loss of Leptin Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus Results in Increased Adiposity and a Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, *149*(5), 2138–2148. https://doi.org/10.1210/en.2007-1200

Birk, J. B., & Wojtaszewski, J. F. P. (2006). Predominant α2/β2/γ3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, *577*(3), 1021–1032. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120972

Blenkuš, U., Gerós, A. F., Carpinteiro, C., Aguiar, P. de C., Olsson, I. A. S., & Franco, N. H. (2022). Non-Invasive Assessment of Mild Stress-Induced Hyperthermia by Infrared Thermography in Laboratory Mice. *Animals*, *12*(2), 177. https://doi.org/10.3390/ani12020177

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Blevins, J. E., Schwartz, M. W., & Baskin, D. G. (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *287*(1), R87–R96. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00604.2003

Blondin, D. P., Labbé, S. M., Tingelstad, H. C., Noll, C., Kunach, M., Phoenix, S., Guérin, B., Turcotte, É. E., Carpentier, A. C., Richard, D., & Haman, F. (2014). Increased Brown Adipose Tissue Oxidative Capacity in Cold-Acclimated Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *99*(3), E438–E446. https://doi.org/10.1210/jc.2013-3901

Borg, M. A., Sherwin, R. S., Borg, W. P., Tamborlane, W. V, & Shulman, G. I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(2), 361–365. https://doi.org/10.1172/JCI119165

Borg, W. P., During, M. J., Sherwin, R. S., Borg, M. A., Brines, M. L., & Shulman, G. I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(4), 1677–1682. https://doi.org/10.1172/JCI117150

Borg, W. P., Sherwin, R. S., During, M. J., Borg, M. A., & Shulman, G. I. (1995). Local Ventromedial Hypothalamus Glucopenia Triggers Counterregulatory Hormone Release. *Diabetes*, *44*(2), 180–184. https://doi.org/10.2337/diab.44.2.180

Bové, J., & Hegardt, F. G. (1978). Reversible modulation of rat liver 3-hydroxy 3-methyl glutaryl coenzyme a reductase Evidence for an enzyme-catalyzed phosphorylation-dephosphorylation system. *FEBS Letters*, *90*(2), 198–202. https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80368-8

Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase -- a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, *66*(1), 717–749. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.717

Brandt, S. J., Götz, A., Tschöp, M. H., & Müller, T. D. (2018). Gut hormone polyagonists for the treatment of type 2 diabetes. *Peptides*, *100*, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.021

Brobeck, J. R. (1946). Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiological Reviews*, *26*(4), 541–559. https://doi.org/10.1152/physrev.1946.26.4.541

Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. G., & Hökfelt, T. (1998). Hypocretin/Orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *The Journal of Comparative Neurology*, *402*(4), 460–474. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981228)402:4<460::AID-CNE3>3.0.CO;2-S

Brown, J. A., Wright, A., Bugescu, R., Christensen, L., Olson, D. P., & Leinninger, G. M. (2019). Distinct Subsets of Lateral Hypothalamic Neurotensin Neurons are Activated by Leptin or Dehydration. *Scientific Reports*, *9*(1), 1873. https://doi.org/10.1038/s41598-018-38143-9

Brüning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., & Kahn, C. R. (2000). Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science*, *289*(5487), 2122–2125. https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122

Bultot, L., Guigas, B., Von Wilamowitz-Moellendorff, A., Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J. J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Hue, L., & Rider, M. H. (2012). AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochemical Journal*, *443*(1), 193–203. https://doi.org/10.1042/BJ20112026

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. In *Comprehensive Physiology* (pp. 623–643). Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c150023

Buwalda, B., Van Kalkeren, A. A., de Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (1998). Behavioral and physiological consequences of repeated daily intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, *23*(3), 205–218. https://doi.org/10.1016/S0306-4530(97)00096-6

Campbell, R. E., Grove, K. L., & Smith, M. S. (2003). Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus. *Brain Research*, *973*(2), 223–232. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02487-9

Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*, *269*(5223), 546–549. https://doi.org/10.1126/science.7624778

Campos, A., Port, J. D., & Acosta, A. (2022). Integrative Hedonic and Homeostatic Food Intake Regulation by the Central Nervous System: Insights from Neuroimaging. *Brain Sciences*, *12*(4), 431. https://doi.org/10.3390/brainsci12040431

Canabal, D. D., Song, Z., Potian, J. G., Beuve, A., McArdle, J. J., & Routh, V. H. (2007). Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*(4), R1418–R1428. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00216.2006

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277–359. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *Journal of Experimental Biology*, *214*(2), 242–253. https://doi.org/10.1242/jeb.050989

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metabolism*, *26*(5), 697–698. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.012

Cano, G., Passerin, A. M., Schiltz, J. C., Card, J. P., Morrison, S. F., & Sved, A. F. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *The Journal of Comparative Neurology*, *460*(3), 303–326. https://doi.org/10.1002/cne.10643

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056–1060. https://doi.org/10.1038/nature07813

Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W., & Collins, S. (2001). β-Adrenergic Activation of p38 MAP Kinase in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(29), 27077–27082. https://doi.org/10.1074/jbc.M101049200

Cao, W.-H., & Morrison, S. F. (2006). Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology*, *51*(3), 426–437. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.03.031

Cao, Y., Bojjireddy, N., Kim, M., Li, T., Zhai, P., Nagarajan, N., Sadoshima, J., Palmiter, R. D., & Tian, R. (2017). Activation of γ2-AMPK Suppresses Ribosome Biogenesis and Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research*, *121*(10), 1182–1191. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311159

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cardinal, P., André, C., Quarta, C., Bellocchio, L., Clark, S., Elie, M., Leste-Lasserre, T., Maitre, M., Gonzales, D., Cannich, A., Pagotto, U., Marsicano, G., & Cota, D. (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular Metabolism*, *3*(7), 705–716. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.004

Carling, D. (2017a). AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *45*, 31–37. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005

Carling, D. (2017b). AMPK signalling in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *45*, 31–37. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005

Carling, D., Mayer, F. V, Sanders, M. J., & Gamblin, S. J. (2011). AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature Chemical Biology*, *7*(8), 512–518. https://doi.org/10.1038/nchembio.610

Carling, D., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, *223*(2), 217–222. https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80292-2

Castorena, C. M., Caron, A., Michael, N. J., Ahmed, N. I., Arnold, A. G., Lee, J., Lee, C., Limboy, C., Tinajero, A. S., Granier, M., Wang, S., Horton, J. D., Holland, W. L., Lee, S., Liu, C., Fujikawa, T., & Elmquist, J. K. (2021). CB1Rs in VMH neurons regulate glucose homeostasis but not body weight. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *321*(1), E146–E155. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00044.2021

Chami, N., Preuss, M., Walker, R. W., Moscati, A., & Loos, R. J. F. (2020). The role of polygenic susceptibility to obesity among carriers of pathogenic mutations in MC4R in the UK Biobank population. *PLOS Medicine*, *17*(7), e1003196. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003196

Chao, P.-T., Yang, L., Aja, S., Moran, T. H., & Bi, S. (2011). Knockdown of NPY Expression in the Dorsomedial Hypothalamus Promotes Development of Brown Adipocytes and Prevents Diet-Induced Obesity. *Cell Metabolism*, *13*(5), 573–583. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.019

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. T., Howard, A. D., MacNeil, D. J., & Qian, S. (2004). Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. *Endocrinology*, *145*(6), 2607–2612. https://doi.org/10.1210/en.2003-1596

Chen, X., Ge, Y.-L., Jiang, Z.-Y., Liu, C.-Q., Depoortere, I., & Peeters, T. L. (2005). Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Research*, *1055*(1–2), 131–136. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.080

Chen, Y., Lin, Y.-C., Kuo, T.-W., & Knight, Z. A. (2015a). Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits. *Cell*, *160*(5), 829–841. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033

Chen, Y., Lin, Y.-C., Kuo, T.-W., & Knight, Z. A. (2015b). Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits. *Cell*, *160*(5), 829–841. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.033

Cheung, C. C., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (1997). Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology*, *138*(10), 4489–4492. https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5570

Cheung, C. C., Kurrasch, D. M., Liang, J. K., & Ingraham, H. A. (2013). Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(6), 1268–1288. https://doi.org/10.1002/cne.23226

Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G., & Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *The Biochemical Journal*, *346 Pt 3*(Pt 3), 659–669.

Chiappini, F., Catalano, K. J., Lee, J., Peroni, O. D., Lynch, J., Dhaneshwar, A. S., Wellenstein, K., Sontheimer, A., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2014). Ventromedial hypothalamus–specific Ptpn1 deletion exacerbates diet-induced obesity in female mice. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(9), 3781–3792. https://doi.org/10.1172/JCI68585

Choi, Y.-H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., & Kim, K. W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*, *7*. https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00071

Chondronikola, M., Volpi, E., Børsheim, E., Porter, C., Saraf, M. K., Annamalai, P., Yfanti, C., Chao, T., Wong, D., Shinoda, K., Labbé, S. M., Hurren, N. M., Cesani, F., Kajimura, S., & Sidossis, L. S. (2016). Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metabolism*, *23*(6), 1200–1206. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.029

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *73*(1), 9–15. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.04.010

Claes, M., De Groef, L., & Moons, L. (2022). The DREADDful Hurdles and Opportunities of the Chronic Chemogenetic Toolbox. *Cells*, *11*(7), 1110. https://doi.org/10.3390/cells11071110

Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G. D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Viollet, B., Vaulont, S., Ashford, M. L. J., Carling, D., & Withers, D. J. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(8), 2325–2336. https://doi.org/10.1172/JCI31516

Claret, M., Smith, M. A., Knauf, C., Al-Qassab, H., Woods, A., Heslegrave, A., Piipari, K., Emmanuel, J. J., Colom, A., Valet, P., Cani, P. D., Begum, G., White, A., Mucket, P., Peters, M., Mizuno, K., Batterham, R. L., Giese, K. P., Ashworth, A., … Withers, D. J. (2011). Deletion of Lkb1 in Pro-Opiomelanocortin Neurons Impairs Peripheral Glucose Homeostasis in Mice. *Diabetes*, *60*(3), 735–745. https://doi.org/10.2337/db10-1055

Clark, P. J., Brodnik, Z. D., & España, R. A. (2022). Chemogenetic Signaling in Space and Time: Considerations for Designing Neuroscience Experiments Using DREADDs. *The Neuroscientist*, 107385842211345. https://doi.org/10.1177/10738584221134587

Clemmensen, C., Finan, B., Müller, T. D., DiMarchi, R. D., Tschöp, M. H., & Hofmann, S. M. (2019). Emerging hormonal-based combination pharmacotherapies for the treatment of metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(2), 90–104. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0118-x

Clifford, G. M., Londos, C., Kraemer, F. B., Vernon, R. G., & Yeaman, S. J. (2000). Translocation of Hormone-sensitive Lipase and Perilipin upon Lipolytic Stimulation of Rat Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 5011–5015. https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5011

Cohen, R. S., & Pfaff, D. W. (1992). Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. *Progress in Neurobiology*, *38*(5), 423–453. https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90045-G

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Coll, A. P., Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2007). The Hormonal Control of Food Intake. In *Cell* (Vol. 129, Issue 2). https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.001

Cone, R. D. (2005a). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571–578. https://doi.org/10.1038/nn1455

Cone, R. D. (2005b). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571–578. https://doi.org/10.1038/nn1455

Cone, R. D. (2005c). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, *8*(5), 571–578. https://doi.org/10.1038/nn1455

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., & Caro, J. F. (1996). Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *New England Journal of Medicine*, *334*(5), 292–295. https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503

Contreras, C., Gonzalez, F., Fernø, J., Diéguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., & López, M. (2015). The brain and brown fat. *Annals of Medicine*, *47*(2), 150–168. https://doi.org/10.3109/07853890.2014.919727

Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D. A., Serra, D., Gallego, R., Gonzalez, F., Casals, N., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Diéguez, C., & López, M. (2014). Central Ceramide-Induced Hypothalamic Lipotoxicity and ER Stress Regulate Energy Balance. *Cell Reports*, *9*(1), 366–377. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.057

Contreras, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Rahmouni, K., & López, M. (2017). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biology*, *12*, 854–863. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.019

Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H. S., & Frevert, E. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*, *3*(6), 403–416. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.005

Coppari, R. (2012). Metabolic actions of hypothalamic SIRT1. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(4), 179–185. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.01.002

Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., & Hardie, D. G. (1995). 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside. A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells? *European Journal of Biochemistry*, *229*(2), 558–565. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20498.x

Couce, M. E., Burguera, B., Parisi, J. E., Jensen, M. D., & Lloyd, R. V. (1997). Localization of Leptin Receptor in the Human Brain. *Neuroendocrinology*, *66*(3), 145–150. https://doi.org/10.1159/000127232

Coutinho, E. A., Okamoto, S., Ishikawa, A. W., Yokota, S., Wada, N., Hirabayashi, T., Saito, K., Sato, T., Takagi, K., Wang, C.-C., Kobayashi, K., Ogawa, Y., Shioda, S., Yoshimura, Y., & Minokoshi, Y. (2017). Activation of SF1 Neurons in the Ventromedial Hypothalamus by DREADD Technology Increases Insulin Sensitivity in Peripheral Tissues. *Diabetes*, *66*(9), 2372–2386. https://doi.org/10.2337/db16-1344

Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, *411*(6836), 480–484. https://doi.org/10.1038/35078085

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L. M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., … Horvath, T. L. (2003). The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*, *37*(4), 649–661. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00063-1

Cummings, D. E., Frayo, R. S., Marmonier, C., Aubert, R., & Chapelot, D. (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *287*(2), E297–E304. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00582.2003

Cummings, D. E., & Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 13–23. https://doi.org/10.1172/JCI30227

Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., & Weigle, D. S. (2001). A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes*, *50*(8), 1714–1719. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714

Cummings, D. E., Weigle, D. S., Frayo, R. S., Breen, P. A., Ma, M. K., Dellinger, E. P., & Purnell, J. Q. (2002). Plasma Ghrelin Levels after Diet-Induced Weight Loss or Gastric Bypass Surgery. *New England Journal of Medicine*, *346*(21), 1623–1630. https://doi.org/10.1056/NEJMoa012908

Cypess, A. M., & Kahn, C. R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, *17*(2), 143–149. https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328337a81f

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., & Kahn, C. R. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1509–1517. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780

Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Elía, E. F., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., & Kolodny, G. M. (2015). Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metabolism*, *21*(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009

Cypess, A. M., White, A. P., Vernochet, C., Schulz, T. J., Xue, R., Sass, C. A., Huang, T. L., Roberts-Toler, C., Weiner, L. S., Sze, C., Chacko, A. T., Deschamps, L. N., Herder, L. M., Truchan, N., Glasgow, A. L., Holman, A. R., Gavrila, A., Hasselgren, P.-O., Mori, M. A., … Tseng, Y.-H. (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature Medicine*, *19*(5), 635–639. https://doi.org/10.1038/nm.3112

Dahl, D., Onishi, Y., Norwood, P., Huh, R., Bray, R., Patel, H., & Rodríguez, Á. (2022). Effect of Subcutaneous Tirzepatide vs Placebo Added to Titrated Insulin Glargine on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA*, *327*(6), 534. https://doi.org/10.1001/jama.2022.0078

Davis, A. M., Seney, M. L., Stallings, N. R., Zhao, L., Parker, K. L., & Tobet, S. A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neurobiology*, *60*(4), 424–436. https://doi.org/10.1002/neu.20030

Day, J. W., Ottaway, N., Patterson, J. T., Gelfanov, V., Smiley, D., Gidda, J., Findeisen, H., Bruemmer, D., Drucker, D. J., Chaudhary, N., Holland, J., Hembree, J., Abplanalp, W., Grant, E., Ruehl, J., Wilson, H., Kirchner, H., Lockie, S. H., Hofmann, S., … Tschöp, M.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

H. (2009). A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nature Chemical Biology*, *5*(10), 749–757. https://doi.org/10.1038/nchembio.209

de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X.-B., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L. F., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(1), 322–327. https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322

Deisseroth, K., & Hegemann, P. (2017). The form and function of channelrhodopsin. *Science*, *357*(6356). https://doi.org/10.1126/science.aan5544

Del Prato, S., Kahn, S. E., Pavo, I., Weerakkody, G. J., Yang, Z., Doupis, J., Aizenberg, D., Wynne, A. G., Riesmeyer, J. S., Heine, R. J., Wiese, R. J., Ahmann, A. J., Arora, S., Ball, E. M., Calderon, R. B., Butuk, D. J., Chaychi, L., Chen, M. C., Curtis, B. M., … Kotsa, K. (2021). Tirzepatide versus insulin glargine in type 2 diabetes and increased cardiovascular risk (SURPASS-4): a randomised, open-label, parallel-group, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet*, *398*(10313), 1811–1824. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02188-7

Delgado, J. M. R., & Anand, B. K. (1952). Increase of Food Intake Induced by Electrical Stimulation of the Lateral Hypothalamus. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *172*(1), 162–168. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1952.172.1.162

Delpino, F. M., dos Santos Rodrigues, A. P., Petarli, G. B., Machado, K. P., Flores, T. R., Batista, S. R., & Nunes, B. P. (2023). Overweight, obesity and risk of multimorbidity: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Obesity Reviews*, *24*(6). https://doi.org/10.1111/obr.13562

Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., White, R. D., Edelstein, E. A., Coppari, R., Balthasar, N., Cowley, M. A., Chua, S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2006a). Leptin Directly Activates SF1 Neurons in the VMH, and This Action by Leptin Is Required for Normal Body-Weight Homeostasis. *Neuron*, *49*(2), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.021

Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., White, R. D., Edelstein, E. A., Coppari, R., Balthasar, N., Cowley, M. A., Chua, S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2006b). Leptin Directly Activates SF1 Neurons in the VMH, and This Action by Leptin Is Required for Normal Body-Weight Homeostasis. *Neuron*, *49*(2), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.021

Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P. M., Kwiatkowski, D. J., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, *47*(4), 535–546. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.009

Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2009). Feeding signals and brain circuitry. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 30, Issue 9). https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06963.x

DiLeone, R. J., Taylor, J. R., & Picciotto, M. R. (2012). The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nature Neuroscience*, *15*(10), 1330–1335. https://doi.org/10.1038/nn.3202

DiMicco, J. A., & Zaretsky, D. V. (2007). The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *292*(1), R47–R63. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2006

Dodd, G. T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S. E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T. L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B. B., Neel, B. G., Bence, K. K., Andrews, Z. B.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cowley, M. A., & Tiganis, T. (2015). Leptin and Insulin Act on POMC Neurons to Promote the Browning of White Fat. *Cell*, *160*(1–2), 88–104. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.022

Doucet, E., Imbeault, P., St-Pierrre, S., Almeras, N., Mauriege, P., Despres, J.-P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2003). Greater than predicted decrease in energy expenditure during exercise after body weight loss in obese men. *Clinical Science*, *105*(1), 89–95. https://doi.org/10.1042/CS20020252

Doucet, E., St-Pierre, S., Alméras, N., Després, J.-P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2001). Evidence for the existence of adaptive thermogenesis during weight loss. *British Journal of Nutrition*, *85*(6), 715–723. https://doi.org/10.1079/BJN2001348

Dragano, N. R. V., Fernø, J., Diéguez, C., López, M., & Milbank, E. (2020). Recent Updates on Obesity Treatments: Available Drugs and Future Directions. *Neuroscience*, *437*, 215–239. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.04.034

Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., & Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(10), 3434–3438. https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3434

Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., & Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science*, *331*(6016), 456–461. https://doi.org/10.1126/science.1196371

Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbæk, C., Flier, J. S., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (1999a). Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Neuron*, *23*(4), 775–786. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80035-0

Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbæk, C., Flier, J. S., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (1999b). Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Neuron*, *23*(4), 775–786. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80035-0

Elmquist, J. K., Ahima, R. S., Elias, C. F., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(2), 741–746. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.741

Elmquist, J. K., Elias, C. F., & Saper, C. B. (1999). From Lesions to Leptin. *Neuron*, *22*(2), 221–232. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81084-3

Elmquist, J. K., Maratos-Flier, E., Saper, C. B., & Flier, J. S. (1998). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature Neuroscience*, *1*(6), 445–450. https://doi.org/10.1038/2164

Emery, D. (1984). Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. *Hormones and Behavior*, *18*(3), 313–329. https://doi.org/10.1016/0018-506X(84)90019-9

Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E. M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.-E., & Kozak, L. P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, *387*(6628), 90–94. https://doi.org/10.1038/387090a0

Engström Ruud, L., Pereira, M. M. A., de Solis, A. J., Fenselau, H., & Brüning, J. C. (2020). NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

neurons. *Nature Communications*, *11*(1), 442. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14291-3

Enriori, P. J., Sinnayah, P., Simonds, S. E., Garcia Rudaz, C., & Cowley, M. A. (2011). Leptin Action in the Dorsomedial Hypothalamus Increases Sympathetic Tone to Brown Adipose Tissue in Spite of Systemic Leptin Resistance. *The Journal of Neuroscience*, *31*(34), 12189–12197. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2336-11.2011

Faber, C. L., Matsen, M. E., Velasco, K. R., Damian, V., Phan, B. A., Adam, D., Therattil, A., Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2018). Distinct Neuronal Projections From the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Mediate Glycemic and Behavioral Effects. *Diabetes*, *67*(12), 2518–2529. https://doi.org/10.2337/db18-0380

Fagan, M. P., Ameroso, D., Meng, A., Rock, A., Maguire, J., & Rios, M. (2020). Essential and sex-specific effects of mGluR5 in ventromedial hypothalamus regulating estrogen signaling and glucose balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(32), 19566–19577. https://doi.org/10.1073/pnas.2011228117

Farooqi, I. S., Jebb, S. A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A. M., Hughes, I. A., McCamish, M. A., & O'Rahilly, S. (1999). Effects of Recombinant Leptin Therapy in a Child with Congenital Leptin Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *341*(12), 879–884. https://doi.org/10.1056/NEJM199909163411204

FDA. (2022, July 13). *FDA Approves Novel, Dual-Targeted Treatment for Type 2 Diabetes*. Https://Www.Fda.Gov/News-Events/Press-Announcements/Fda-Approves-Novel-Dual-Targeted-Treatment-Type-2-Diabetes.

Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G.-H., Zhao, C., Darnell, R., & Friedman, J. M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(13), 7001–7005. https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.7001

Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009). UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism*, *9*(2), 203–209. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.014

Feng, C., Wang, Y., Zha, X., Cao, H., Huang, S., Cao, D., Zhang, K., Xie, T., Xu, X., Liang, Z., & Zhang, Z. (2022). Cold-sensitive ventromedial hypothalamic neurons control homeostatic thermogenesis and social interaction-associated hyperthermia. *Cell Metabolism*, *34*(6), 888-901.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.05.002

Fenselau, H., Campbell, J. N., Verstegen, A. M. J., Madara, J. C., Xu, J., Shah, B. P., Resch, J. M., Yang, Z., Mandelblat-Cerf, Y., Livneh, Y., & Lowell, B. B. (2017). A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α-MSH. *Nature Neuroscience*, *20*(1), 42–51. https://doi.org/10.1038/nn.4442

Ferrer, A., Caelles, C., Massot, N., & Hegardt, F. G. (1985). Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase kinase by adenosine 5′-monophosphate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *132*(2), 497–504. https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)91161-1

Finan, B., Ma, T., Ottaway, N., Müller, T. D., Habegger, K. M., Heppner, K. M., Kirchner, H., Holland, J., Hembree, J., Raver, C., Lockie, S. H., Smiley, D. L., Gelfanov, V., Yang, B., Hofmann, S., Bruemmer, D., Drucker, D. J., Pfluger, P. T., Perez-Tilve, D., … Tschöp, M. H. (2013). Unimolecular Dual Incretins Maximize Metabolic Benefits in Rodents, Monkeys, and Humans. *Science Translational Medicine*, *5*(209). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007218

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finan, B., Yang, B., Ottaway, N., Smiley, D. L., Ma, T., Clemmensen, C., Chabenne, J., Zhang, L., Habegger, K. M., Fischer, K., Campbell, J. E., Sandoval, D., Seeley, R. J., Bleicher, K., Uhles, S., Riboulet, W., Funk, J., Hertel, C., Belli, S., … Tschöp, M. H. (2015). A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nature Medicine*, *21*(1), 27–36. https://doi.org/10.1038/nm.3761

Fischer, A. W., Hoefig, C. S., Abreu-Vieira, G., de Jong, J. M. A., Petrovic, N., Mittag, J., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2016). Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. *Cell Reports*, *14*(7), 1621–1631. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.041

Fosch, A., Zagmutt, S., Casals, N., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2021). New Insights of SF1 Neurons in Hypothalamic Regulation of Obesity and Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12), 6186. https://doi.org/10.3390/ijms22126186

Frias, J. P., Bastyr, E. J., Vignati, L., Tschöp, M. H., Schmitt, C., Owen, K., Christensen, R. H., & DiMarchi, R. D. (2017). The Sustained Effects of a Dual GIP/GLP-1 Receptor Agonist, NNC0090-2746, in Patients with Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, *26*(2), 343-352.e2. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.011

Frías, J. P., Davies, M. J., Rosenstock, J., Pérez Manghi, F. C., Fernández Landó, L., Bergman, B. K., Liu, B., Cui, X., & Brown, K. (2021). Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, *385*(6), 503–515. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107519

Friedman, J. M. (2009). Obesity: Causes and control of excess body fat. In *Nature* (Vol. 459, Issue 7245). https://doi.org/10.1038/459340a

Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., & García-Velloso, M. J. (2009a). BAT: a new target for human obesity? *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(8), 387–396. https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.003

Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., & García-Velloso, M. J. (2009b). BAT: a new target for human obesity? *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*(8), 387–396. https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.003

Fu, L.-Y., & van den Pol, A. N. (2008). Agouti-Related Peptide and MC3/4 Receptor Agonists Both Inhibit Excitatory Hypothalamic Ventromedial Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *28*(21), 5433–5449. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0749-08.2008

Fujikawa, T., Choi, Y.-H., Yang, D. J., Shin, D. M., Donato, J., Kohno, D., Lee, C. E., Elias, C. F., Lee, S., & Kim, K. W. (2019). P110β in the ventromedial hypothalamus regulates glucose and energy metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, *51*(4), 1–9. https://doi.org/10.1038/s12276-019-0249-8

Funcke, J.-B., & Scherer, P. E. (2019). Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *Journal of Lipid Research*, *60*(10), 1648–1697. https://doi.org/10.1194/jlr.R094060

Futai, M., Noumi, T., & Maeda, M. (1989). ATP SYNTHASE (H+-ATPase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches. *Annual Review of Biochemistry*, *58*(1), 111–136. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000551

Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J. A., Milagro, F., & Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research*, *53*(12), 2791–2796. https://doi.org/10.1194/jlr.D023788

Gao, S., Kinzig, K. P., Aja, S., Scott, K. A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W. W., Tamashiro, K. L. K., Ladenheim, E. E., Ronnett, G. V., Tu, Y., Birnbaum, M. J., Lopaschuk, G. D., & Moran, T. H. (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(44), 17358–17363. https://doi.org/10.1073/pnas.0708385104

Gao, X.-B., & Horvath, T. L. (2022). From Molecule to Behavior: Hypocretin/orexin Revisited From a Sex-dependent Perspective. *Endocrine Reviews*, *43*(4), 743–760. https://doi.org/10.1210/endrev/bnab042

Garcia, D., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular Cell*, *66*(6), 789–800. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032

García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C.-X., Chowen, J. A., Verkhratsky, A., Araque, A., Bechmann, I., & Tschöp, M. H. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nature Neuroscience*, *22*(1), 7–14. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y

García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Argente, J., & Chowen, J. A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Molecular Metabolism*, *1*(1–2), 37–46. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.07.001

Garfield, A. S., Li, C., Madara, J. C., Shah, B. P., Webber, E., Steger, J. S., Campbell, J. N., Gavrilova, O., Lee, C. E., Olson, D. P., Elmquist, J. K., Tannous, B. A., Krashes, M. J., & Lowell, B. B. (2015a). A neural basis for melanocortin-4 receptor–regulated appetite. *Nature Neuroscience*, *18*(6), 863–871. https://doi.org/10.1038/nn.4011

Garfield, A. S., Li, C., Madara, J. C., Shah, B. P., Webber, E., Steger, J. S., Campbell, J. N., Gavrilova, O., Lee, C. E., Olson, D. P., Elmquist, J. K., Tannous, B. A., Krashes, M. J., & Lowell, B. B. (2015b). A neural basis for melanocortin-4 receptor–regulated appetite. *Nature Neuroscience*, *18*(6), 863–871. https://doi.org/10.1038/nn.4011

Garlid, K. D., Jabůrek, M., Ježek, P., & Vařecha, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1459*(2–3), 383–389. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00175-4

Garrison, J. L., & Knight, Z. A. (2017). Linking smell to metabolism and aging. *Science*, *358*(6364), 718–719. https://doi.org/10.1126/science.aao5474

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., & Kaplan, D. D. (2018). LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metabolism*, *27*(2), 461-469.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.016

George Paxinos, & Charles Watson. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (7th Edition). Academic Press.

Ghamari-Langroudi, M., Colmers, W. F., & Cone, R. D. (2005). PYY3–36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y2 receptors. *Cell Metabolism*, *2*(3), 191–199. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.08.003

Ghamari-Langroudi, M., Vella, K. R., Srisai, D., Sugrue, M. L., Hollenberg, A. N., & Cone, R. D. (2010). Regulation of Thyrotropin-Releasing Hormone-Expressing Neurons in Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus by Signals of Adiposity. *Molecular Endocrinology*, *24*(12), 2366–2381. https://doi.org/10.1210/me.2010-0203

Glick, G., Parmley, W. W., Wechsler, A. S., Sonnenblick, E. H., Lewis, R. M., & McGill, R. D. (1968). Glucagon Its Enhancement of Cardiac Performance in the Cat and Dog and Persistence of its Inotropic Action Despite Beta-Receptor Blockade with Propranolol. *Circulation Research*, *22*(6), 789–799. https://doi.org/10.1161/01.RES.22.6.789

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

González-García, I., Milbank, E., Martinez-Ordoñez, A., Diéguez, C., López, M., & Contreras, C. (2020). HYPOTHesizing about central comBAT against obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *76*(2), 193–211. https://doi.org/10.1007/s13105-019-00719-y

Gordon, C. J. (1993). *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511565595

Gordon, C. J. (2012). Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology*, *37*(8), 654–685. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.08.004

Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., & Hardie, D. G. (2013). AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. *Cell Metabolism*, *18*(4), 556–566. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.019

Grahame Hardie, D. (2016a). Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *6*(1), 1–19. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.06.002

Grahame Hardie, D. (2016b). Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *6*(1), 1–19. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.06.002

Grahame Hardie, D., Carling, D., & T.R. Sim, A. (1989). The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, *14*(1), 20–23. https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90084-4

Gu, X., Yan, Y., Novick, S. J., Kovach, A., Goswami, D., Ke, J., Tan, M. H. E., Wang, L., Li, X., de Waal, P. W., Webb, M. R., Griffin, P. R., Xu, H. E., & Melcher, K. (2017). Deconvoluting AMP-activated protein kinase (AMPK) adenine nucleotide binding and sensing. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(30), 12653–12666. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.793018

Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, *9*(1), 88. https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003

Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*, *1*(4), 271–272. https://doi.org/10.1038/1082

Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., & Friedman, J. M. (1995). Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the obese Gene. *Science*, *269*(5223), 543–546. https://doi.org/10.1126/science.7624777

Halvorson, I., Gregor, L., & Thornhill, J. A. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis is activated by electrical and chemical (l-glutamate) stimulation of the ventromedial hypothalamic nucleus in cold-acclimated rats. *Brain Research*, *522*(1), 76–82. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91579-6

Hamilton, B. S., Paglia, D., Kwan, A. Y. M., & Deitel, M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine*, *1*(9), 953–956. https://doi.org/10.1038/nm0995-953

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Han, S.-M., Namkoong, C., Jang, P. G., Park, I. S., Hong, S. W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S. W., Park, J.-Y., Lee, K.-U., & Kim, M.-S. (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia*, *48*(10), 2170–2178. https://doi.org/10.1007/s00125-005-1913-1

Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., & Sakurai, T. (2001). Genetic Ablation of Orexin Neurons in Mice Results in Narcolepsy, Hypophagia, and Obesity. *Neuron*, *30*(2), 345–354. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00293-8

Hardie, D. G. (2008). Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Letters*, *582*(1), 81–89. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.018

Hardie, D. G. (2014). AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels. *Annual Review of Nutrition*, *34*(1), 31–55. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161148

Hardie, D. G., & Ashford, M. L. J. (2014). AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels. *Physiology*, *29*(2), 99–107. https://doi.org/10.1152/physiol.00050.2013

Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 251–262. https://doi.org/10.1038/nrm3311

Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016a). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, *26*(3), 190–201. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013

Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016b). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, *26*(3), 190–201. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013

Harris, G. C., Wimmer, M., & Aston-Jones, G. (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*, *437*(7058), 556–559. https://doi.org/10.1038/nature04071

Harrold, J. A., Widdowson, P. S., & Williams, G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes*, *48*(2), 267–271. https://doi.org/10.2337/diabetes.48.2.267

Haskell-Luevano, C., & Monck, E. K. (2001). Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regulatory Peptides*, *99*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00234-8

Havrankova, J., Roth, J., & Browstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, *272*(5656), 827–829. https://doi.org/10.1038/272827a0

Hawke, Z., Ivanov, T. R., Bechtold, D. A., Dhillon, H., Lowell, B. B., & Luckman, S. M. (2009). PACAP Neurons in the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Are Targets of Central Leptin Signaling. *The Journal of Neuroscience*, *29*(47), 14828–14835. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1526-09.2009

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., Alessi, D. R., & Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADα/β and MO25α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, *2*(4), 28. https://doi.org/10.1186/1475-4924-2-28

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hawley, S. A., Fullerton, M. D., Ross, F. A., Schertzer, J. D., Chevtzoff, C., Walker, K. J., Peggie, M. W., Zibrova, D., Green, K. A., Mustard, K. J., Kemp, B. E., Sakamoto, K., Steinberg, G. R., & Hardie, D. G. (2012). The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science*, *336*(6083), 918–922. https://doi.org/10.1126/science.1215327

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., & Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, *2*(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009

He, M., Zhang, Q., Deng, C., Wang, H., & Huang, X.-F. (2014). Olanzapine-Activated AMPK Signaling in the Dorsal Vagal Complex Is Attenuated by Histamine H1 Receptor Agonist in Female Rats. *Endocrinology*, *155*(12), 4895–4904. https://doi.org/10.1210/en.2014-1326

He, Y., Xu, P., Wang, C., Xia, Y., Yu, M., Yang, Y., Yu, K., Cai, X., Qu, N., Saito, K., Wang, J., Hyseni, I., Robertson, M., Piyarathna, B., Gao, M., Khan, S. A., Liu, F., Chen, R., Coarfa, C., … Xu, Y. (2020). Estrogen receptor-α expressing neurons in the ventrolateral VMH regulate glucose balance. *Nature Communications*, *11*(1), 2165. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15982-7

Hetherington, A. W. (1943). The production of hypothalamic obesity in rats already displaying chronic hypopituitarism. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *140*(1), 89–92. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1943.140.1.89

Hetherington, A. W. (1944). Non-production of hypothalamic obesity in the rat by lesions rostral or dorsal to the ventro-medial hypothalamic nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, *80*(1), 33–45. https://doi.org/10.1002/cne.900800104

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*, *78*(2), 149–172. https://doi.org/10.1002/ar.1090780203

Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *76*(3), 475–499. https://doi.org/10.1002/cne.900760308

Higgs, S. (2016). Cognitive processing of food rewards. *Appetite*, *104*, 10–17. https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.003

Hindi, S. M., Sato, S., Xiong, G., Bohnert, K. R., Gibb, A. A., Gallot, Y. S., McMillan, J. D., Hill, B. G., Uchida, S., & Kumar, A. (2018). TAK1 regulates skeletal muscle mass and mitochondrial function. *JCI Insight*, *3*(3). https://doi.org/10.1172/jci.insight.98441

Hoivik, E. A., Lewis, A. E., Aumo, L., & Bakke, M. (2010). Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, *315*(1–2), 27–39. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.003

Hollander, P., Maggs, D. G., Ruggles, J. A., Fineman, M., Shen, L., Kolterman, O. G., & Weyer, C. (2004). Effect of Pramlintide on Weight in Overweight and Obese Insulin-Treated Type 2 Diabetes Patients. *Obesity Research*, *12*(4), 661–668. https://doi.org/10.1038/oby.2004.76

Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., & Voit, R. (2009). AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(42), 17781–17786. https://doi.org/10.1073/pnas.0909873106

Houten, M. Van, Posner, B. I., Kopriwa, B. M., & Brawer, J. R. (1979). Insulin-Binding Sites in the Rat Brain: In Vivo Localization to the Circumventricular Organs by Quantitative

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Radioautography*. *Endocrinology*, *105*(3), 666–673. https://doi.org/10.1210/endo-105-3-666

Hunter, R. W., Foretz, M., Bultot, L., Fullerton, M. D., Deak, M., Ross, F. A., Hawley, S. A., Shpiro, N., Viollet, B., Barron, D., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., Hardie, D. G., & Sakamoto, K. (2014). Mechanism of Action of Compound-13: An α1-Selective Small Molecule Activator of AMPK. *Chemistry & Biology*, *21*(7), 866–879. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.05.014

Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J. H., & Parker, K. L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Molecular Endocrinology*, *9*(4), 478–486. https://doi.org/10.1210/mend.9.4.7659091

Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1α. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(29), 12017–12022. https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104

Jais, A., & Brüning, J. C. (2022). Arcuate Nucleus-Dependent Regulation of Metabolism—Pathways to Obesity and Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, *43*(2), 314–328. https://doi.org/10.1210/endrev/bnab025

Jastreboff, A. M., Aronne, L. J., Ahmad, N. N., Wharton, S., Connery, L., Alves, B., Kiyosue, A., Zhang, S., Liu, B., Bunck, M. C., & Stefanski, A. (2022). Tirzepatide Once Weekly for the Treatment of Obesity. *New England Journal of Medicine*, *387*(3), 205–216. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2206038

J.C.F de Winter. (2013). Using the Student's T-test with extremely small samples sizes. *Practical Assessment Research and Evaluation*, *18*(10).

Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Daugaard, S., Homøe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., Pedersen, B. K., Møller, K., & Scheele, C. (2013). A Classical Brown Adipose Tissue mRNA Signature Partly Overlaps with Brite in the Supraclavicular Region of Adult Humans. *Cell Metabolism*, *17*(5), 798–805. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.011

Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *284*(4), E671–E678. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00492.2002

Jørgensen, S. B., Nielsen, J. N., Birk, J. B., Olsen, G. S., Viollet, B., Andreelli, F., Schjerling, P., Vaulont, S., Hardie, D. G., Hansen, B. F., Richter, E. A., & Wojtaszewski, J. F. P. (2004). The α2–5′AMP-Activated Protein Kinase Is a Site 2 Glycogen Synthase Kinase in Skeletal Muscle and Is Responsive to Glucose Loading. *Diabetes*, *53*(12), 3074–3081. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3074

Jr, J. L. H., Butte, N. F., & Zinn, A. R. (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Human Molecular Genetics*, *9*(1), 101–108. https://doi.org/10.1093/hmg/9.1.101

Julliard, A.-K., Al Koborssy, D., Fadool, D. A., & Palouzier-Paulignan, B. (2017). Nutrient Sensing: Another Chemosensitivity of the Olfactory System. *Frontiers in Physiology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00468

Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, *22*(4), 546–559. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., & Kalra, P. S. (1999). Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight*. *Endocrine Reviews*, *20*(1), 68–100. https://doi.org/10.1210/edrv.20.1.0357

Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & 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*(11), 2438–2443. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2438

Kammel, L. G., & Correa, S. M. (2020). Selective sexual differentiation of neurone populations may contribute to sex-specific outputs of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, *32*(1). https://doi.org/10.1111/jne.12801

Kao, L. S., & Green, C. E. (2008). Analysis of Variance: Is There a Difference in Means and What Does It Mean? *Journal of Surgical Research*, *144*(1), 158–170. https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.02.053

Khodai, T., & Luckman, S. M. (2021). Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass. *Endocrinology*, *162*(10). https://doi.org/10.1210/endocr/bqab141

Kievit, P., Halem, H., Marks, D. L., Dong, J. Z., Glavas, M. M., Sinnayah, P., Pranger, L., Cowley, M. A., Grove, K. L., & Culler, M. D. (2013). Chronic Treatment With a Melanocortin-4 Receptor Agonist Causes Weight Loss, Reduces Insulin Resistance, and Improves Cardiovascular Function in Diet-Induced Obese Rhesus Macaques. *Diabetes*, *62*(2), 490–497. https://doi.org/10.2337/db12-0598

Kim, C. K., Adhikari, A., & Deisseroth, K. (2017). Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(4), 222–235. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.15

Kim, D.-W., Yao, Z., Graybuck, L. T., Kim, T. K., Nguyen, T. N., Smith, K. A., Fong, O., Yi, L., Koulena, N., Pierson, N., Shah, S., Lo, L., Pool, A.-H., Oka, Y., Pachter, L., Cai, L., Tasic, B., Zeng, H., & Anderson, D. J. (2019). Multimodal Analysis of Cell Types in a Hypothalamic Node Controlling Social Behavior. *Cell*, *179*(3), 713-728.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.020

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, *13*(2), 132–141. https://doi.org/10.1038/ncb2152

Kim, K. W., Donato, J., Berglund, E. D., Choi, Y.-H., Kohno, D., Elias, C. F., DePinho, R. A., & Elmquist, J. K. (2012). FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(7), 2578–2589. https://doi.org/10.1172/JCI62848

Kim, K. W., Sohn, J.-W., Kohno, D., Xu, Y., Williams, K., & Elmquist, J. K. (2011a). SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: A key regulator of homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *336*(1–2), 219–223. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.019

Kim, K. W., Sohn, J.-W., Kohno, D., Xu, Y., Williams, K., & Elmquist, J. K. (2011b). SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: A key regulator of homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *336*(1–2), 219–223. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.019

Kim, K. W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C. F., Lee, C., Parker, K. L., & Elmquist, J. K. (2011a). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10673–10678. https://doi.org/10.1073/pnas.1102364108

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Kim, K. W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C. F., Lee, C., Parker, K. L., & Elmquist, J. K. (2011b). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10673–10678. https://doi.org/10.1073/pnas.1102364108

Kim, M., Hunter, R. W., Garcia-Menendez, L., Gong, G., Yang, Y.-Y., Kolwicz, S. C., Xu, J., Sakamoto, K., Wang, W., & Tian, R. (2014). Mutation in the γ2-Subunit of AMP-Activated Protein Kinase Stimulates Cardiomyocyte Proliferation and Hypertrophy Independent of Glycogen Storage. *Circulation Research*, *114*(6), 966–975. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302364

Kim, M.-S., Park, J.-Y., Namkoong, C., Jang, P.-G., Ryu, J.-W., Song, H.-S., Yun, J.-Y., Namgoong, I.-S., Ha, J., Park, I.-S., Lee, I.-K., Viollet, B., Youn, J. H., Lee, H.-K., & Lee, K.-U. (2004). Anti-obesity effects of α-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, *10*(7), 727–733. https://doi.org/10.1038/nm1061

Kim, Y. H., Liang, H., Liu, X., Lee, J.-S., Cho, J. Y., Cheong, J.-H., Kim, H., Li, M., Downey, T. J., Dyer, M. D., Sun, Y., Sun, J., Beasley, E. M., Chung, H. C., Noh, S. H., Weinstein, J. N., Liu, C.-G., & Powis, G. (2012). AMPKα Modulation in Cancer Progression: Multilayer Integrative Analysis of the Whole Transcriptome in Asian Gastric Cancer. *Cancer Research*, *72*(10), 2512–2521. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3870

King, B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, *87*(2), 221–244. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007

King, G. L., & Johnson, S. M. (1985). Receptor-Mediated Transport of Insulin Across Endothelial Cells. *Science*, *227*(4694), 1583–1586. https://doi.org/10.1126/science.3883490

Kinote, A., Faria, J. A., Roman, E. A., Solon, C., Razolli, D. S., Ignacio-Souza, L. M., Sollon, C. S., Nascimento, L. F., de Araújo, T. M., Barbosa, A. P. L., Lellis-Santos, C., Velloso, L. A., Bordin, S., & Anhê, G. F. (2012). Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels. *Endocrinology*, *153*(8), 3633–3645. https://doi.org/10.1210/en.2012-1341

Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *457*(3), 213–235. https://doi.org/10.1002/cne.10454

Klöckener, T., Hess, S., Belgardt, B. F., Paeger, L., Verhagen, L. A. W., Husch, A., Sohn, J.-W., Hampel, B., Dhillon, H., Zigman, J. M., Lowell, B. B., Williams, K. W., Elmquist, J. K., Horvath, T. L., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2011a). High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nature Neuroscience*, *14*(7), 911–918. https://doi.org/10.1038/nn.2847

Klöckener, T., Hess, S., Belgardt, B. F., Paeger, L., Verhagen, L. A. W., Husch, A., Sohn, J.-W., Hampel, B., Dhillon, H., Zigman, J. M., Lowell, B. B., Williams, K. W., Elmquist, J. K., Horvath, T. L., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2011b). High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nature Neuroscience*, *14*(7), 911–918. https://doi.org/10.1038/nn.2847

Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S. E., Castorena, C. M., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Morozov, Y. M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M. A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M. O., Gao, X.-B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2015).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*, *519*(7541), 45–50. https://doi.org/10.1038/nature14260

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, *402*(6762), 656–660. https://doi.org/10.1038/45230

Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A. B., Fekete, C., & Korbonits, M. (2008a). The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. *PLoS ONE*, *3*(3), e1797. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001797

Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A. B., Fekete, C., & Korbonits, M. (2008b). The Orexigenic Effect of Ghrelin Is Mediated through Central Activation of the Endogenous Cannabinoid System. *PLoS ONE*, *3*(3), e1797. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001797

Kola, B., Hubina, E., Tucci, S. A., Kirkham, T. C., Garcia, E. A., Mitchell, S. E., Williams, L. M., Hawley, S. A., Hardie, D. G., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2005a). Cannabinoids and Ghrelin Have Both Central and Peripheral Metabolic and Cardiac Effects via AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 25196–25201. https://doi.org/10.1074/jbc.C500175200

Kola, B., Hubina, E., Tucci, S. A., Kirkham, T. C., Garcia, E. A., Mitchell, S. E., Williams, L. M., Hawley, S. A., Hardie, D. G., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2005b). Cannabinoids and Ghrelin Have Both Central and Peripheral Metabolic and Cardiac Effects via AMP-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 25196–25201. https://doi.org/10.1074/jbc.C500175200

Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda, S., Fuller, P. M., Krashes, M. J., Vong, L., Ray, R. S., Olson, D. P., & Lowell, B. B. (2012). GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. *Cell*, *151*(3), 645–657. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.020

Könner, A. C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S. D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G. S., Kahn, C. R., Cowley, M. A., Ashcroft, F. M., & Brüning, J. C. (2007a). Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production. *Cell Metabolism*, *5*(6), 438–449. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004

Könner, A. C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S. D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G. S., Kahn, C. R., Cowley, M. A., Ashcroft, F. M., & Brüning, J. C. (2007b). Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production. *Cell Metabolism*, *5*(6), 438–449. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004

Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Screaton, R. A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., Takemori, H., & Montminy, M. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, *437*(7062), 1109–1114. https://doi.org/10.1038/nature03967

Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. In *Nature* (Vol. 404, Issue 6778). https://doi.org/10.1038/35007508

Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., Maratos-Flier, E., Roth, B. L., & Lowell, B. B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

feeding behavior in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1424–1428. https://doi.org/10.1172/JCI46229

Krashes, M. J., Lowell, B. B., & Garfield, A. S. (2016). Melanocortin-4 receptor–regulated energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 206–219. https://doi.org/10.1038/nn.4202

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., & Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, *393*(6680), 72–76. https://doi.org/10.1038/29993

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., & Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics*, *19*(2), 155–157. https://doi.org/10.1038/509

Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., … Kadowaki, T. (2007a). Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metabolism*, *6*(1), 55–68. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.003

Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., … Kadowaki, T. (2007b). Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metabolism*, *6*(1), 55–68. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.003

Kühnen, P., Clément, K., Wiegand, S., Blankenstein, O., Gottesdiener, K., Martini, L. L., Mai, K., Blume-Peytavi, U., Grüters, A., & Krude, H. (2016). Proopiomelanocortin Deficiency Treated with a Melanocortin-4 Receptor Agonist. *New England Journal of Medicine*, *375*(3), 240–246. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512693

Kunwar, P. S., Zelikowsky, M., Remedios, R., Cai, H., Yilmaz, M., Meister, M., & Anderson, D. J. (2015). Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state. *ELife*, *4*. https://doi.org/10.7554/eLife.06633

Kuroshima, A., & Yahata, T. (1979). Thermogenic Responses of Brown Adipocytes to Noradrenaline and Glucagon in Heat-acclimated and Cold-acclimated Rats. *The Japanese Journal of Physiology*, *29*(6), 683–690. https://doi.org/10.2170/jjphysiol.29.683

Kurrasch, D. M., Cheung, C. C., Lee, F. Y., Tran, P. V., Hata, K., & Ingraham, H. A. (2007). The Neonatal Ventromedial Hypothalamus Transcriptome Reveals Novel Markers with Spatially Distinct Patterning. *The Journal of Neuroscience*, *27*(50), 13624–13634. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2858-07.2007

Lage, R., Vázquez, M. J., Varela, L., Saha, A. K., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Diéguez, C., & López, M. (2010). Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *The FASEB Journal*, *24*(8), 2670–2679. https://doi.org/10.1096/fj.09-150672

Lam, C. K. L., Chari, M., Rutter, G. A., & Lam, T. K. T. (2011). Hypothalamic Nutrient Sensing Activates a Forebrain-Hindbrain Neuronal Circuit to Regulate Glucose Production In Vivo. *Diabetes*, *60*(1), 107–113. https://doi.org/10.2337/db10-0994

Lamy, C. M., Sanno, H., Labouèbe, G., Picard, A., Magnan, C., Chatton, J.-Y., & Thorens, B. (2014). Hypoglycemia-Activated GLUT2 Neurons of the Nucleus Tractus Solitarius Stimulate Vagal Activity and Glucagon Secretion. *Cell Metabolism*, *19*(3), 527–538. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.003

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Landsberg, L., Young, J. B., Leonard, W. R., Linsenmeier, R. A., & Turek, F. W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism*, *58*(6), 871–876. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.02.017

Lang, T., Yu, L., Tu, Q., Jiang, J., Chen, Z., Xin, Y., Liu, G., & Zhao, S. (2000). Molecular Cloning, Genomic Organization, and Mapping of PRKAG2, a Heart Abundant γ2 Subunit of 5′-AMP-Activated Protein Kinase, to Human Chromosome 7q36. *Genomics*, *70*(2), 258–263. https://doi.org/10.1006/geno.2000.6376

Langlet, F., Levin, B. E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A. A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013). Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metabolism*, *17*(4), 607–617. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.004

Lean, M. E. J. (1989). Brown adipose tissue in humans. *Proceedings of the Nutrition Society*, *48*(2), 243–257. https://doi.org/10.1079/PNS19890036

Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Hirsch, J. (1995). Changes in Energy Expenditure Resulting from Altered Body Weight. *New England Journal of Medicine*, *332*(10), 621–628. https://doi.org/10.1056/NEJM199503093321001

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A., & Zang, M. (2011). AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism*, *13*(4), 376–388. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009

Li, Y. Z., & Davidowa, H. (2004). Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *Journal of Neuroscience Research*, *77*(4), 596–602. https://doi.org/10.1002/jnr.20192

Liao, G.-Y., An, J. J., Gharami, K., Waterhouse, E. G., Vanevski, F., Jones, K. R., & Xu, B. (2012). Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nature Medicine*, *18*(4), 564–571. https://doi.org/10.1038/nm.2687

Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, *470*(7333), 221–226. https://doi.org/10.1038/nature09736

Lin, S.-C., & Hardie, D. G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, *27*(2), 299–313. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.009

Lindberg, D., Chen, P., & Li, C. (2013). Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *Journal of Comparative Neurology*, *521*(14), 3167–3190. https://doi.org/10.1002/cne.23338

Liu, H., Xu, Y., & Hu, F. (2020). AMPK in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus: A Key Regulator for Thermogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.578830

López, M. (2018). Hypothalamic AMPK and energy balance. *European Journal of Clinical Investigation*, *48*(9). https://doi.org/10.1111/eci.12996

López, M., Lage, R., Saha, A. K., Pérez-Tilve, D., Vázquez, M. J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodríguez-Cuenca, S., Deoliveira, R. M., Castañeda, T., Datta, R., Dong, J. Z., Culler, M., Sleeman, M. W., Álvarez, C. V., Gallego, R., Lelliott, C. J., … Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic Fatty Acid Metabolism Mediates the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Orexigenic Action of Ghrelin. *Cell Metabolism*, *7*(5), 389–399. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.006

López, M., Lelliott, C. J., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., Blount, M., Vázquez, M. J., Finer, N., Powles, T. J., O'Rahilly, S., Saha, A. K., Diéguez, C., & 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*(5), 1327–1336. https://doi.org/10.2337/db05-1356

López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2016a). Hypothalamic AMPK: A canonical regulator of whole-body energy balance. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 12, Issue 7). https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67

López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2016b). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(7), 421–432. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67

López, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2016c). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(7), 421–432. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67

López, M., Seoane, L. M., García, M. del C., Diéguez, C., & Señarís, R. (2002). Neuropeptide Y, but Not Agouti-Related Peptide or Melanin-Concentrating Hormone, Is a Target Peptide for Orexin-A Feeding Actions in the Rat Hypothalamus. *Neuroendocrinology*, *75*(1), 34–44. https://doi.org/10.1159/000048219

López, M., & Tena-Sempere, M. (2017). Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacology & Therapeutics*, *178*, 109–122. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.03.014

López, M., Tovar, S., Vázquez, M. J., Williams, L. M., & Diéguez, C. (2007). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, *66*(1). https://doi.org/10.1017/S0029665107005368

López, M., Varela, L., Vázquez, M. J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C. R., Velagapudi, V. R., Morgan, D. A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., de Morentin, P. B. M., Tovar, S., Nogueiras, R., Carling, D., Lelliott, C., Gallego, R., Orešič, M., Chatterjee, K., Saha, A. K., … Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nature Medicine*, *16*(9), 1001–1008. https://doi.org/10.1038/nm.2207

Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652–660. https://doi.org/10.1038/35007527

Lugilde, J., Casado, S., Beiroa, D., Cuñarro, J., Garcia-Lavandeira, M., Álvarez, C. V., Nogueiras, R., Diéguez, C., & Tovar, S. (2022). LEAP-2 Counteracts Ghrelin-Induced Food Intake in a Nutrient, Growth Hormone and Age Independent Manner. *Cells*, *11*(3), 324. https://doi.org/10.3390/cells11030324

Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S., & Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science*, *310*(5748), 683–685. https://doi.org/10.1126/science.1115524

Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2009). Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *296*(3), R831–R843. https://doi.org/10.1152/ajpregu.91007.2008

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A., & Friedman, J. M. (1995). Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

reduced subjects. *Nature Medicine*, *1*(11), 1155–1161. https://doi.org/10.1038/nm1195-1155

Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., McGarry, J. D., & Parker, K. L. (2002). Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity. *Endocrinology*, *143*(2), 607–614. https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8652

Martínez de Morentin, P. B., Whittle, A. J., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., & López, M. (2012). Nicotine Induces Negative Energy Balance Through Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes*, *61*(4), 807–817. https://doi.org/10.2337/db11-1079

Martínez de Morentin, P. B., González-García, I., Martins, L., Lage, R., Fernández-Mallo, D., Martínez-Sánchez, N., Ruíz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D. A., Pinilla, L., Gallego, R., Saha, A. K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P. H., Diéguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Tena-Sempere, M., & López, M. (2014). Estradiol Regulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis via Hypothalamic AMPK. *Cell Metabolism*, *20*(1), 41–53. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.031

Martínez-Sánchez, N., Moreno-Navarrete, J. M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Fernández-Real, J.-M., & López, M. (2017). Thyroid hormones induce browning of white fat. *Journal of Endocrinology*, *232*(2), 351–362. https://doi.org/10.1530/JOE-16-0425

Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T. C., Vázquez-Martínez, R., González-García, I., Roa, J., Whittle, A. J., Gomez-Santos, B., Velagapudi, V., Tung, Y. C. L., Morgan, D. A., Voshol, P. J., Martínez de Morentin, P. B., … López, M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metabolism*, *26*(1), 212-229.e12. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.014

Martins, L., Fernández-Mallo, D., Novelle, M. G., Vázquez, M. J., Tena-Sempere, M., Nogueiras, R., López, M., & Diéguez, C. (2012). Hypothalamic mTOR Signaling Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin. *PLoS ONE*, *7*(10), e46923. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046923

Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., González, F., Zalvide, J., Gallego, R., Diéguez, C., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Reports*, *16*(8), 2231–2242. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.045

McClellan, K., Parker, K., & Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *27*(2), 193–209. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.002

McCrimmon, R. J., Fan, X., Cheng, H., McNay, E., Chan, O., Shaw, M., Ding, Y., Zhu, W., & 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*(6), 1755–1760. https://doi.org/10.2337/db05-1359

McCrimmon, R. J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R. J., & Sherwin, R. S. (2004). Potential Role for AMP-Activated Protein Kinase in Hypoglycemia Sensing in the Ventromedial Hypothalamus. *Diabetes*, *53*(8), 1953–1958. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.8.1953

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

McCrimmon, R. J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M. C., Zhou, L., McNay, E. C., & Sherwin, R. S. (2008a). Key Role for AMP-Activated Protein Kinase in the Ventromedial Hypothalamus in Regulating Counterregulatory Hormone Responses to Acute Hypoglycemia. *Diabetes*, *57*(2), 444–450. https://doi.org/10.2337/db07-0837

McCrimmon, R. J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M. C., Zhou, L., McNay, E. C., & Sherwin, R. S. (2008b). Key Role for AMP-Activated Protein Kinase in the Ventromedial Hypothalamus in Regulating Counterregulatory Hormone Responses to Acute Hypoglycemia. *Diabetes*, *57*(2), 444–450. https://doi.org/10.2337/db07-0837

McGee, S. L., van Denderen, B. J. W., Howlett, K. F., Mollica, J., Schertzer, J. D., Kemp, B. E., & Hargreaves, M. (2008). AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. *Diabetes*, *57*(4), 860–867. https://doi.org/10.2337/db07-0843

Meek, T. H., Nelson, J. T., Matsen, M. E., Dorfman, M. D., Guyenet, S. J., Damian, V., Allison, M. B., Scarlett, J. M., Nguyen, H. T., Thaler, J. P., Olson, D. P., Myers, M. G., Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2016). Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(14). https://doi.org/10.1073/pnas.1521160113

Mendoza-Viveros, L., Marmolejo-Gutierrez, C., Cid-Castro, C., Escalante-Covarrubias, Q., Montellier, E., Carreño-Vázquez, E., Noriega, L. G., Velázquez-Villegas, L. A., Tovar, A. R., Sassone-Corsi, P., Aguilar-Arnal, L., & Orozco-Solis, R. (2023). Astrocytic circadian clock control of energy expenditure by transcriptional stress responses in the ventromedial hypothalamus. *Glia*, *71*(7), 1626–1647. https://doi.org/10.1002/glia.24360

Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., Morgan, P. J., & Trayhurn, P. (1996). Coexpression of Leptin Receptor and Preproneuropeptide Y mRNA in Arcuate Nucleus of Mouse Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, *8*(10), 733–735. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.05161.x

Merrill, G. F., Kurth, E. J., Hardie, D. G., & Winder, W. W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *273*(6), E1107–E1112. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.6.E1107

Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., & Fan, C.-M. (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH–PAS transcription factor SIM1. *Genes & Development*, *12*(20), 3264–3275. https://doi.org/10.1101/gad.12.20.3264

Mickelsen, L. E., Bolisetty, M., Chimileski, B. R., Fujita, A., Beltrami, E. J., Costanzo, J. T., Naparstek, J. R., Robson, P., & Jackson, A. C. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nature Neuroscience*, *22*(4), 642–656. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0349-8

Milbank, E., Dragano, N., Vidal-Gómez, X., Rivas-Limeres, V., Garrido-Gil, P., Wertheimer, M., Recoquillon, S., Pata, M. P., Labandeira-Garcia, J. L., Diéguez, C., Nogueiras, R., Martínez, M. C., Andriantsitohaina, R., & López, M. (2023). Small extracellular vesicle targeting of hypothalamic AMPKα1 promotes weight loss in leptin receptor deficient mice. *Metabolism*, *139*, 155350. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155350

Milbank, E., Dragano, N. R. V., González-García, I., Garcia, M. R., Rivas-Limeres, V., Perdomo, L., Hilairet, G., Ruiz-Pino, F., Mallegol, P., Morgan, D. A., Iglesias-Rey, R., Contreras, C., Vergori, L., Cuñarro, J., Porteiro, B., Gavaldà-Navarro, A., Oelkrug, R., Vidal, A., Roa, J., … López, M. (2021). Small extracellular vesicle-mediated targeting of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hypothalamic AMPKα1 corrects obesity through BAT activation. *Nature Metabolism*, *3*(10), 1415–1431. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00467-8

Ministerio de Sanidad. (2017). *Porcenajte de personas con obesidad, por sexo según comunidad autónoma*.

Ministerio de Sanidad. (2020). *Porcentaje de personas con obesidad, por sexo según comunidad autónoma*. Porcentaje de Personas Con Obesidad, Por Sexo Según Comunidad Autónoma.

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foufelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M. J., Stuck, B. J., & Kahn, B. B. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, *428*(6982), 569–574. https://doi.org/10.1038/nature02440

Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O. D., Fryer, L. G. D., Müller, C., Carling, D., & Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, *415*(6869), 339–343. https://doi.org/10.1038/415339a

Mochiki, E., Suzuki, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y., Kuwano, H., Mizumoto, A., & Itoh, Z. (1998). Mechanism of inhibitory effect of glucagon on gastrointestinal motility and cause of side effects of glucagon. *Journal of Gastroenterology*, *33*(6), 835–841. https://doi.org/10.1007/s005350050184

Momcilovic, M., Hong, S.-P., & Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(35), 25336–25343. https://doi.org/10.1074/jbc.M604399200

Morrison, S. F. (1999). RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *276*(4), R962–R973. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.4.R962

Morrison, S. F. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in Bioscience*, *16*(1), 74. https://doi.org/10.2741/3677

Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central Neural Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, *19*(5), 741–756. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.007

Morrison, S. F., & Nakamura, K. (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in Bioscience*, *16*(1), 74. https://doi.org/10.2741/3677

Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. In *Nature* (Vol. 443, Issue 7109). https://doi.org/10.1038/nature05026

Müller, T. D., Clemmensen, C., Finan, B., DiMarchi, R. D., & Tschöp, M. H. (2018). Anti-Obesity Therapy: from Rainbow Pills to Polyagonists. *Pharmacological Reviews*, *70*(4), 712–746. https://doi.org/10.1124/pr.117.014803

Müller, 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., … Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. In *Molecular Metabolism* (Vol. 4, Issue 6). https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005

Murphy, K. G., & Bloom, S. R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*, *444*(7121), 854–859. https://doi.org/10.1038/nature05484

Myers, M. G., & Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. In *Nature* (Vol. 491, Issue 7424). https://doi.org/10.1038/nature11705

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nectow, A. R., Schneeberger, M., Zhang, H., Field, B. C., Renier, N., Azevedo, E., Patel, B., Liang, Y., Mitra, S., Tessier-Lavigne, M., Han, M.-H., & Friedman, J. M. (2017). Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell*, *170*(3), 429-442.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.045

Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *293*(2), E444–E452. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2006

Nedergaard, J., & Cannon, B. (2013). UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(5), 943–949. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.009

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Shabalina, I., Ohba, K. -i., Ohlson, K., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). Life without UCP1: mitochondrial, cellular and organismal characteristics of the UCP1-ablated mice. *Biochemical Society Transactions*, *29*(6), 756. https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290756

Neumann, D. (2018). Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 2412. https://doi.org/10.3390/ijms19082412

Nicholls, D. G., & Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological Reviews*, *64*(1), 1–64. https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.1.1

Nieuwenhuizen, A. G., & Rutters, F. (2008). The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiology & Behavior*, *94*(2), 169–177. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.12.011

Niijima, A., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1984a). Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *247*(4), R650–R654. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.4.R650

Niijima, A., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1984b). Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *247*(4), R650–R654. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.4.R650

Nogueiras, R., Nauck, M. A., & Tschöp, M. H. (2023). Gut hormone co-agonists for the treatment of obesity: from bench to bedside. *Nature Metabolism*, *5*(6), 933–944. https://doi.org/10.1038/s42255-023-00812-z

Novelle, M., & Diéguez, C. (2018). Food Addiction and Binge Eating: Lessons Learned from Animal Models. *Nutrients*, *10*(1), 71. https://doi.org/10.3390/nu10010071

O. Hill, J., R. Wyatt, H., & C. Peters, J. (2012). Energy Balance and Obesity. *Circulation*, *126*(1), 126–132.

Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D. G., & Rossetti, L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neuroscience*, *5*(6), 566–572. https://doi.org/10.1038/nn0602-861

Obici, S., Feng, Z., Tan, J., Liu, L., Karkanias, G., & Rossetti, L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(7), 1079–1085. https://doi.org/10.1172/JCI12954

Obici, S., Zhang, B. B., Karkanias, G., & Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine*, *8*(12), 1376–1382. https://doi.org/10.1038/nm1202-798

Oesch, L. T., & Adamantidis, A. R. (2021). *Sleep and Metabolism: Implication of Lateral Hypothalamic Neurons* (pp. 75–90). https://doi.org/10.1159/000514966

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., & Kajimura, S. (2012). PPARγ agonists Induce a White-to-Brown Fat Conversion through Stabilization of PRDM16 Protein. *Cell Metabolism*, *15*(3), 395–404. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.019

Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., Murakami, M., Peruquetti, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2016). The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, *23*(3), 467–478. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.003

Orozco-Solis, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2015). SIRT1 Relays Nutritional Inputs to the Circadian Clock Through the Sf1 Neurons of the Ventromedial Hypothalamus. *Endocrinology*, *156*(6), 2174–2184. https://doi.org/10.1210/en.2014-1805

Owens, N. C., Ootsuka, Y., Kanosue, K., & McAllen, R. M. (2002). Thermoregulatory Control of Sympathetic Fibres Supplying the Rat's Tail. *The Journal of Physiology*, *543*(3), 849–858. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.023770

Pandit, R., Beerens, S., & Adan, R. A. H. (2017). Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *312*(6), R938–R947. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00045.2016

Patricia Seoane Collazo. (2018). *Nuevos mecanismos de regulación del balance energético. Papel de AMPK y del estrés del retículo endoplasmático hipotalámico*. Centro Internacional de Estudios de Doutoramento e Avanzados da USC (CIEDUS).

Pehmøller, C., Treebak, J. T., Birk, J. B., Chen, S., MacKintosh, C., Hardie, D. G., Richter, E. A., & Wojtaszewski, J. F. P. (2009). Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *297*(3), E665–E675. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00115.2009

Peirce, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2014). The different shades of fat. *Nature*, *510*(7503), 76–83. https://doi.org/10.1038/nature13477

Perkins, M. N., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Stone, T. W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature*, *289*(5796), 401–402. https://doi.org/10.1038/289401a0

Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7153–7164. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942

Pi-Sunyer, X. (2009). The Medical Risks of Obesity. *Postgraduate Medicine*, *121*(6), 21–33. https://doi.org/10.3810/pgm.2009.11.2074

Pocai, A., Carrington, P. E., Adams, J. R., Wright, M., Eiermann, G., Zhu, L., Du, X., Petrov, A., Lassman, M. E., Jiang, G., Liu, F., Miller, C., Tota, L. M., Zhou, G., Zhang, X., Sountis, M. M., Santoprete, A., Capito', E., Chicchi, G. G., … SinhaRoy, R. (2009). Glucagon-Like Peptide 1/Glucagon Receptor Dual Agonism Reverses Obesity in Mice. *Diabetes*, *58*(10), 2258–2266. https://doi.org/10.2337/db09-0278

Quarta, C., Claret, M., Zeltser, L. M., Williams, K. W., Yeo, G. S. H., Tschöp, M. H., Diano, S., Brüning, J. C., & Cota, D. (2021). POMC neuronal heterogeneity in energy balance and beyond: an integrated view. *Nature Metabolism*, *3*(3), 299–308. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00345-3

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Quenneville, S., Labouèbe, G., Basco, D., Metref, S., Viollet, B., Foretz, M., & Thorens, B. (2020). Hypoglycemia-Sensing Neurons of the Ventromedial Hypothalamus Require AMPK-Induced Txn2 Expression but Are Dispensable for Physiological Counterregulation. *Diabetes*, *69*(11), 2253–2266. https://doi.org/10.2337/db20-0577

Quentin, T., Kitz, J., Steinmetz, M., Poppe, A., Bär, K., & Krätzner, R. (2011). Different expression of the catalytic alpha subunits of the AMP activated protein kinase--an immunohistochemical study in human tissue. *Histology and Histopathology*, *26*(5), 589–596. https://doi.org/10.14670/HH-26.589

Quiñones, M., Al-Massadi, O., Gallego, R., Fernø, J., Diéguez, C., López, M., & Nogueiras, R. (2015). Hypothalamic CaMKKβ mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Molecular Metabolism*, *4*(12), 961–970. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.09.014

Ramadori, G., Fujikawa, T., Anderson, J., Berglund, E. D., Frazao, R., Michán, S., Vianna, C. R., Sinclair, D. A., Elias, C. F., & Coppari, R. (2011). SIRT1 Deacetylase in SF1 Neurons Protects against Metabolic Imbalance. *Cell Metabolism*, *14*(3), 301–312. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.014

Ramadori, G., Fujikawa, T., Fukuda, M., Anderson, J., Morgan, D. A., Mostoslavsky, R., Stuart, R. C., Perello, M., Vianna, C. R., Nillni, E. A., Rahmouni, K., & Coppari, R. (2010). SIRT1 Deacetylase in POMC Neurons Is Required for Homeostatic Defenses against Diet-Induced Obesity. *Cell Metabolism*, *12*(1), 78–87. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.010

Ramírez, S., Martins, L., Jacas, J., Carrasco, P., Pozo, M., Clotet, J., Serra, D., Hegardt, F. G., Diéguez, C., López, M., & Casals, N. (2013). Hypothalamic Ceramide Levels Regulated by CPT1C Mediate the Orexigenic Effect of Ghrelin. *Diabetes*, *62*(7), 2329–2337. https://doi.org/10.2337/db12-1451

Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, *381*(3), 561–579. https://doi.org/10.1042/BJ20040752

Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R. M., & Jaenisch, R. (2001). Conditional Deletion Of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Postnatal Brain Leads to Obesity and Hyperactivity. *Molecular Endocrinology*, *15*(10), 1748–1757. https://doi.org/10.1210/mend.15.10.0706

Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016a). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*(3), e219–e219. https://doi.org/10.1038/emm.2016.6

Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016b). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*(3), e219–e219. https://doi.org/10.1038/emm.2016.6

Rodgers, R. J., Tschöp, M. H., & Wilding, J. P. H. (2012). Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(5), 621–626. https://doi.org/10.1242/dmm.009621

Rosenstock, J., Wysham, C., Frías, J. P., Kaneko, S., Lee, C. J., Fernández Landó, L., Mao, H., Cui, X., Karanikas, C. A., & Thieu, V. T. (2021). Efficacy and safety of a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide in patients with type 2 diabetes (SURPASS-1): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, *398*(10295), 143–155. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01324-6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ross, F. A., Jensen, T. E., & Hardie, D. G. (2016). Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochemical Journal*, *473*(2), 189–199. https://doi.org/10.1042/BJ20150910

Ross, F. A., MacKintosh, C., & Hardie, D. G. (2016). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS Journal*, *283*(16), 2987–3001. https://doi.org/10.1111/febs.13698

Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018a). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. In *Cell Metabolism* (Vol. 27, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021

Rossi, M. A., & Stuber, G. D. (2018b). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metabolism*, *27*(1), 42–56. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.021

Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*, *89*(4), 683–694. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040

Rupp, A. C., Tomlinson, A. J., Affinati, A. H., Yacawych, W. T., Duensing, A. M., True, C., Lindsley, S. R., Kirigiti, M. A., MacKenzie, A., Polex-Wolf, J., Li, C., Knudsen, L. B., Seeley, R. J., Olson, D. P., Kievit, P., & Myers, M. G. (2023). Suppression of food intake by Glp1r/Lepr-coexpressing neurons prevents obesity in mouse models. *Journal of Clinical Investigation*, *133*(19). https://doi.org/10.1172/JCI157515

Rushing, P. A., Hagan, M. M., Seeley, R. J., Lutz, T. A., & Woods, S. C. (2000). Amylin: A Novel Action in the Brain to Reduce Body Weight*. *Endocrinology*, *141*(2), 850–850. https://doi.org/10.1210/endo.141.2.7378

Sakaguchi, T., & Bray, G. A. (1989). Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. *Brain Research*, *492*(1–2), 271–280. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90910-4

Sakurai, T. (1999). Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regulatory Peptides*, *85*(1), 25–30. https://doi.org/10.1016/S0167-0115(99)00076-2

Sakurai, T. (2014). The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(11), 719–731. https://doi.org/10.1038/nrn3837

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. S., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W.-S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., … Yanagisawa, M. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, *92*(4), 573–585. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6

Salt, I., Celler, J. W., Hawley, S. A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., & Hardie, D. G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the α2 isoform. *Biochemical Journal*, *334*(1), 177–187. https://doi.org/10.1042/bj3340177

Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799–806. https://doi.org/10.1038/414799a

Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature Communications*, *5*(1), 4099. https://doi.org/10.1038/ncomms5099

Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., & Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochemical Journal*, *403*(1), 139–148. https://doi.org/10.1042/BJ20061520

Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology*, *24*(23), R1111–R1116. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sawchenko, P. E., & Swanson, L. W. (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Research Reviews*, *4*(3), 275–325. https://doi.org/10.1016/0165-0173(82)90010-8

Scheja, L., & Heeren, J. (2019). The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(9), 507–524. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Schneeberger, M., & Claret, M. (2012). Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience*, *6*. https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00185

Schneeberger, M., Dietrich, M. O., Sebastián, D., Imbernón, M., Castaño, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodríguez, I. C., Bortolozzi, A., Garcia-Roves, P. M., Gomis, R., Nogueiras, R., Horvath, T. L., Zorzano, A., & Claret, M. (2013). Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. *Cell*, *155*(1), 172–187. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.003

Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014a). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*, *220*(2), T25–T46. https://doi.org/10.1530/JOE-13-0398

Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014b). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*, *220*(2), T25–T46. https://doi.org/10.1530/JOE-13-0398

Schneeberger, M., Parolari, L., Das Banerjee, T., Bhave, V., Wang, P., Patel, B., Topilko, T., Wu, Z., Choi, C. H. J., Yu, X., Pellegrino, K., Engel, E. A., Cohen, P., Renier, N., Friedman, J. M., & Nectow, A. R. (2019). Regulation of Energy Expenditure by Brainstem GABA Neurons. *Cell*, *178*(3), 672-685.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.048

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., & Zechner, R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, *26*(5), 753-763.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.004

Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R., Kuijper, J. L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D. E., Porte, D., Woods, S. C., Seeley, R. J., & Weigle, D. S. (1996). Specificity of Leptin Action on Elevated Blood Glucose Levels and Hypothalamic Neuropeptide Y Gene Expression in ob/ob Mice. *Diabetes*, *45*(4), 531–535. https://doi.org/10.2337/diab.45.4.531

Schwartz, M. W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J., & Porte, D. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine*, *2*(5), 589–593. https://doi.org/10.1038/nm0596-589

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation*, *98*(5), 1101–1106. https://doi.org/10.1172/JCI118891

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1997). Leptin Increases Hypothalamic Pro-opiomelanocortin mRNA

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Expression in the Rostral Arcuate Nucleus. *Diabetes*, *46*(12), 2119–2123. https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2119

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. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, *130*(6), 3608–3616. https://doi.org/10.1210/endo.130.6.1597158

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661–671. https://doi.org/10.1038/35007534

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, *454*(7207), 961–967. https://doi.org/10.1038/nature07182

Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., & Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(1), 96–105. https://doi.org/10.1172/JCI44271

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., & Friedman, J. M. (2005). Use of Laser-Capture Microdissection for the Identification of Marker Genes for the Ventromedial Hypothalamic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, *25*(16), 4181–4188. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0158-05.2005

Seidell, J. C., & Halberstadt, J. (2015). The Global Burden of Obesity and the Challenges of Prevention. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *66*(Suppl. 2), 7–12. https://doi.org/10.1159/000375143

Sellayah, D., Bharaj, P., & Sikder, D. (2011). Orexin Is Required for Brown Adipose Tissue Development, Differentiation, and Function. *Cell Metabolism*, *14*(4), 478–490. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.010

SEO, S., JU, S., CHUNG, H., LEE, D., & PARK, S. (2008). Acute Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Hypothalamic Neuropeptide and AMP Activated Kinase Expression in Fasted Rats. *Endocrine Journal*, *55*(5), 867–874. https://doi.org/10.1507/endocrj.K08E-091

Seoane-Collazo, P., de Morentin, P. B. M., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., & López, M. (2014). Nicotine Improves Obesity and Hepatic Steatosis and ER Stress in Diet-Induced Obese Male Rats. *Endocrinology*, *155*(5), 1679–1689. https://doi.org/10.1210/en.2013-1839

Seoane-Collazo, P., Fernø, J., Gonzalez, F., Diéguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & López, M. (2015a). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, *50*(2), 276–291. https://doi.org/10.1007/s12020-015-0658-y

Seoane-Collazo, P., Fernø, J., Gonzalez, F., Diéguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & López, M. (2015b). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, *50*(2), 276–291. https://doi.org/10.1007/s12020-015-0658-y

Seoane-Collazo, P., Martínez-Sánchez, N., Milbank, E., & Contreras, C. (2020). Incendiary Leptin. *Nutrients*, *12*(2), 472. https://doi.org/10.3390/nu12020472

Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., López-González, T., Morgan, D. A., Pardavila, J. Á., Sánchez-Tapia, M. J., Martínez-Sánchez, N., Contreras, C., Fidalgo, M., Diéguez, C., Coppari, R., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). SF1-Specific AMPKα1 Deletion

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, *67*(11), 2213–2226. https://doi.org/10.2337/db17-1538

Shabalina, I. G., Petrovic, N., de Jong, J. M. A., Kalinovich, A. V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2013). UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic. *Cell Reports*, *5*(5), 1196–1203. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.044

Shah, B. P., Vong, L., Olson, D. P., Koda, S., Krashes, M. J., Ye, C., Yang, Z., Fuller, P. M., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2014). MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(36), 13193–13198. https://doi.org/10.1073/pnas.1407843111

Shih, M.-F., & Taberner, P. V. (1995). Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by β3-adrenoceptor agonists. *Biochemical Pharmacology*, *50*(5), 601–608. https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00185-3

Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, *396*(6712), 670–674. https://doi.org/10.1038/25341

Shimazu, T., & Minokoshi, Y. (2017). Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *Journal of the Endocrine Society*, *1*(5), 449–459. https://doi.org/10.1210/js.2016-1104

Shimizu, H., Arima, H., Watanabe, M., Goto, M., Banno, R., Sato, I., Ozaki, N., Nagasaki, H., & Oiso, Y. (2008). Glucocorticoids Increase Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling in the Arcuate Nucleus of Rats. *Endocrinology*, *149*(9), 4544–4553. https://doi.org/10.1210/en.2008-0229

Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A. K. G., Jackson, R., Rumore, D., Xue, B., Shi, H., Gavrilova, O., & Yu, L. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metabolism*, *26*(5), 764-777.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.002

Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., Niwa, O., Morohashi, K.-I., & Li, E. (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Developmental Dynamics*, *204*(1), 22–29. https://doi.org/10.1002/aja.1002040104

Shinoda, K., Luijten, I. H. N., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S. B., Kim, M., Xue, R., Chondronikola, M., Cypess, A. M., Tseng, Y.-H., Nedergaard, J., Sidossis, L. S., & Kajimura, S. (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nature Medicine*, *21*(4), 389–394. https://doi.org/10.1038/nm.3819

Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., Kangawa, K., & Nakao, K. (2001). Ghrelin, an Endogenous Growth Hormone Secretagogue, Is a Novel Orexigenic Peptide That Antagonizes Leptin Action Through the Activation of Hypothalamic Neuropeptide Y/Y1 Receptor Pathway. *Diabetes*, *50*(2), 227–232. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2.227

Šidák, Z. (1967). Rectangular Confidence Regions for the Means of Multivariate Normal Distributions. *Journal of the American Statistical Association*, *62*(318), 626–633. https://doi.org/10.1080/01621459.1967.10482935

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Silva, B. A., Mattucci, C., Krzywkowski, P., Murana, E., Illarionova, A., Grinevich, V., Canteras, N. S., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2013). Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nature Neuroscience*, *16*(12), 1731–1733. https://doi.org/10.1038/nn.3573

Silva, J. E. (2006). Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, *86*(2), 435–464. https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2005

Sims, J. S., & Lorden, J. F. (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behavioural Brain Research*, *22*(3), 265–281. https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90071-9

Sipols, A. J., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1995). Effect of Intracerebroventricular Insulin Infusion on Diabetic Hyperphagia and Hypothalamic Neuropeptide Gene Expression. *Diabetes*, *44*(2), 147–151. https://doi.org/10.2337/diab.44.2.147

Sisley, S., Gutierrez-Aguilar, R., Scott, M., D'Alessio, D. A., Sandoval, D. A., & Seeley, R. J. (2014). Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(6), 2456–2463. https://doi.org/10.1172/JCI72434

Skibicka, K. P., Hansson, C., Egecioglu, E., & Dickson, S. L. (2012). Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addiction Biology*, *17*(1), 95–107. https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00294.x

Sohn, J.-W., Oh, Y., Kim, K. W., Lee, S., Williams, K. W., & Elmquist, J. K. (2016). Leptin and insulin engage specific PI3K subunits in hypothalamic SF1 neurons. *Molecular Metabolism*, *5*(8), 669–679. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.004

Song, C. K., Vaughan, C. H., Keen-Rhinehart, E., Harris, R. B. S., Richard, D., & Bartness, T. J. (2008). Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *295*(2), R417–R428. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00174.2008

Souza, S. C., Christoffolete, M. A., Ribeiro, M. O., Miyoshi, H., Strissel, K. J., Stancheva, Z. S., Rogers, N. H., D'Eon, T. M., Perfield, J. W., Imachi, H., Obin, M. S., Bianco, A. C., & Greenberg, A. S. (2007). Perilipin regulates the thermogenic actions of norepinephrine in brown adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, *48*(6), 1273–1279. https://doi.org/10.1194/jlr.M700047-JLR200

Spiegelman, B., Puigserver, P., & Wu, Z. (2000). Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARγ and PGC-1. *International Journal of Obesity*, *24*(S4), S8–S10. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801492

Steinberg, G. R., & Carling, D. (2019). AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(7), 527–551. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0019-2

Stephens, T. W., Basinski, M., Bristow, P. K., Bue-Valleskey, J. M., Burgett, S. G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H. M., Kriauciunas, A., MacKellar, W., Rosteck, P. R., Schoner, B., Smith, D., Tinsley, F. C., Zhang, X.-Y., & Heiman, M. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, *377*(6549), 530–532. https://doi.org/10.1038/377530a0

Sternson, S. M., Shepherd, G. M. G., & Friedman, J. M. (2005). Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience*, *8*(10), 1356–1363. https://doi.org/10.1038/nn1550

Strader, A. D., & Woods, S. C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology*, *128*(1). https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.10.043

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Stuber, G. D., & Wise, R. A. (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 198–205. https://doi.org/10.1038/nn.4220

Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, *6*(1), 1. https://doi.org/10.2307/2331554

Sugama, S., Takenouchi, T., Fujita, M., Kitani, H., & Hashimoto, M. (2011). Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1β expression in astroglial cells in rat brain. *Journal of Neuroimmunology*, *233*(1–2), 29–36. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.11.002

Sutton, A. K., Myers, M. G., & Olson, D. P. (2016). The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annual Review of Physiology*, *78*(1), 207–221. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105347

Sutton, A. K., Pei, H., Burnett, K. H., Myers, M. G., Rhodes, C. J., & Olson, D. P. (2014). Control of Food Intake and Energy Expenditure by Nos1 Neurons of the Paraventricular Hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, *34*(46), 15306–15318. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0226-14.2014

Swart, I., Jahng, J. W., Overton, J. M., & Houpt, T. A. (2002). Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *283*(5), R1020–R1026. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00501.2001

Takeda, J., Seino, Y., Tanaka, K., Fukumoto, H., Kayano, T., Takahashi, H., Mitani, T., Kurono, M., Suzuki, T., & Tobe, T. (1987). Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(20), 7005–7008. https://doi.org/10.1073/pnas.84.20.7005

Tanida, M., Yamamoto, N., Morgan, D. A., Kurata, Y., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2015). Leptin Receptor Signaling in the Hypothalamus Regulates Hepatic Autonomic Nerve Activity via Phosphatidylinositol 3-Kinase and AMP-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience*, *35*(2), 474–484. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015

Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013a). Involvement of Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation. *PLoS ONE*, *8*(2), e56660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056660

Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013b). Involvement of Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase in Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation. *PLoS ONE*, *8*(2), e56660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056660

Tattersall, G. J., Sinclair, B. J., Withers, P. C., Fields, P. A., Seebacher, F., Cooper, C. E., & Maloney, S. K. (2012). Coping with Thermal Challenges: Physiological Adaptations to Environmental Temperatures. In *Comprehensive Physiology* (pp. 2151–2202). Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c110055

Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., & Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(11), 4401–4406. https://doi.org/10.1073/pnas.0610615104

Timofeeva, E., Caron, A., & Richard, D. (2017). Energy Homeostasis: Paraventricular Nucleus System☆. In *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02753-X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Toda, C., Kim, J. D., Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S., Liu, Z.-W., & Diano, S. (2016). UCP2 Regulates Mitochondrial Fission and Ventromedial Nucleus Control of Glucose Responsiveness. *Cell*, *164*(5), 872–883. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.010

Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R. J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M. D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L. M., Lee, C. E., Choi, C. S., Zigman, J. M., Shulman, G. I., Sherwin, R. S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2007). Synaptic Glutamate Release by Ventromedial Hypothalamic Neurons Is Part of the Neurocircuitry that Prevents Hypoglycemia. *Cell Metabolism*, *5*(5), 383–393. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.04.001

Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Losón, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., & Shaw, R. J. (2016). AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, *351*(6270), 275–281. https://doi.org/10.1126/science.aab4138

Tran, L. T., Park, S., Kim, S. K., Lee, J. S., Kim, K. W., & Kwon, O. (2022). Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Experimental & Molecular Medicine*, *54*(4), 358–369. https://doi.org/10.1038/s12276-022-00741-z

Tran, P. V, Lee, M. B., Marín, O., Xu, B., Jones, K. R., Reichardt, L. F., Rubenstein, J. R., & Ingraham, H. A. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *22*(4), 441–453. https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00027-7

Trapp, C. M., & Censani, M. (2023). Setmelanotide: a promising advancement for pediatric patients with rare forms of genetic obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, *30*(2), 136–140. https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000798

Tschöp, M. H., Finan, B., Clemmensen, C., Gelfanov, V., Perez-Tilve, D., Müller, T. D., & DiMarchi, R. D. (2016). Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metabolism*, *24*(1), 51–62. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.021

Tschop, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, *407*(6806). https://doi.org/10.1038/35038090

Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P. A., Devanarayan, V., Ravussin, E., & Heiman, M. L. (2001). Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes*, *50*(4), 707–709. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.707

Tu, L., Fukuda, M., Tong, Q., & Xu, Y. (2022). The ventromedial hypothalamic nucleus: watchdog of whole-body glucose homeostasis. *Cell & Bioscience*, *12*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s13578-022-00799-2

Tukey, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, *5*(2), 99. https://doi.org/10.2307/3001913

Tupone, D., Madden, C. J., Cano, G., & Morrison, S. F. (2011). An Orexinergic Projection from Perifornical Hypothalamus to Raphe Pallidus Increases Rat Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *The Journal of Neuroscience*, *31*(44), 15944–15955. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3909-11.2011

Uno, T., & Shibata, M. (2001). Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *280*(2), R536–R546. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.2.R536

Urisarri, A., González-García, I., Estévez-Salguero, Á., Pata, M. P., Milbank, E., López, N., Mandiá, N., Grijota-Martinez, C., Salgado, C. A., Nogueiras, R., Diéguez, C., Villarroya, F., Fernández-Real, J.-M., Couce, M. L., & López, M. (2021). BMP8 and activated brown adipose tissue in human newborns. *Nature Communications*, *12*(1), 5274. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25456-z

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Usdin, T. B., Mezey, E., Button, D. C., Brownstein, M. J., & Bonner, T. I. (1993). Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*, *133*(6), 2861–2870. https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243312

van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M., & Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience*, *7*(5), 493–494. https://doi.org/10.1038/nn1226

van Marken Lichtenbelt, W. D., & Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *301*(2), R285–R296. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00652.2010

van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1500–1508. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718

van Veen, J. E., Kammel, L. G., Bunda, P. C., Shum, M., Reid, M. S., Massa, M. G., Arneson, D. V., Park, J. W., Zhang, Z., Joseph, A. M., Hrncir, H., Liesa, M., Arnold, A. P., Yang, X., & Correa, S. M. (2020). Hypothalamic oestrogen receptor alpha establishes a sexually dimorphic regulatory node of energy expenditure. *Nature Metabolism*, *2*(4), 351–363. https://doi.org/10.1038/s42255-020-0189-6

Vara-Ciruelos, D., Russell, F. M., & Hardie, D. G. (2019). The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Open Biology*, *9*(7). https://doi.org/10.1098/rsob.190099

Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Reports*, *13*(12), 1079–1086. https://doi.org/10.1038/embor.2012.174

Vázquez, M. J., González, C. R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., Williams, L. M., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., López, M., & Diéguez, C. (2008). Central Resistin Regulates Hypothalamic and Peripheral Lipid Metabolism in a Nutritional-Dependent Fashion. *Endocrinology*, *149*(9), 4534–4543. https://doi.org/10.1210/en.2007-1708

Vella, K. R., Ramadoss, P., Lam, F. S., Harris, J. C., Ye, F. D., Same, P. D., O'Neill, N. F., Maratos-Flier, E., & Hollenberg, A. N. (2011). NPY and MC4R Signaling Regulate Thyroid Hormone Levels during Fasting through Both Central and Peripheral Pathways. *Cell Metabolism*, *14*(6), 780–790. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.009

Villena, J. A., Viollet, B., Andreelli, F., Kahn, A., Vaulont, S., & Sul, H. S. (2004). Induced Adiposity and Adipocyte Hypertrophy in Mice Lacking the AMP-Activated Protein Kinase-α2 Subunit. *Diabetes*, *53*(9), 2242–2249. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2242

Viollet, B. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in Bioscience*, *Volume*(14), 19. https://doi.org/10.2741/3229

Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S. B., Perrin, C., Geloen, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., Gomas, E., Nicolas, G., Wojtaszewski, J. F. P., Kahn, A., Carling, D., Schuit, F. C., Birnbaum, M. J., Richter, E. A., Burcelin, R., & Vaulont, S. (2003). The AMP-activated protein kinase α2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(1), 91–98. https://doi.org/10.1172/JCI16567

Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.-J., Enerbäck, S., & Nuutila, P. (2009). Functional Brown Adipose

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1518–1525. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2021). GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nature Metabolism*, *3*(7), 883–886. https://doi.org/10.1038/s42255-021-00414-7

Viskaitis, P., Irvine, E. E., Smith, M. A., Choudhury, A. I., Alvarez-Curto, E., Glegola, J. A., Hardy, D. G., Pedroni, S. M. A., Paiva Pessoa, M. R., Fernando, A. B. P., Katsouri, L., Sardini, A., Ungless, M. A., Milligan, G., & Withers, D. J. (2017). Modulation of SF1 Neuron Activity Coordinately Regulates Both Feeding Behavior and Associated Emotional States. *Cell Reports*, *21*(12), 3559–3572. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.089

Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(12), 741–752. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130

Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., & Lowell, B. B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron*, *71*(1), 142–154. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.028

Wang, C., Bomberg, E., Levine, A., Billington, C., & Kotz, C. M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *293*(3), R1037–R1045. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00125.2007

Wang, L., Chen, I. Z., & Lin, D. (2015). Collateral Pathways from the Ventromedial Hypothalamus Mediate Defensive Behaviors. *Neuron*, *85*(6), 1344–1358. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.025

Wang, P., Loh, K. H., Wu, M., Morgan, D. A., Schneeberger, M., Yu, X., Chi, J., Kosse, C., Kim, D., Rahmouni, K., Cohen, P., & Friedman, J. (2020). A leptin–BDNF pathway regulating sympathetic innervation of adipose tissue. *Nature*, *583*(7818), 839–844. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2527-y

Wang, W., & Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(11), 691–702. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.96

Wang, Y., Kimura, K., Inokuma, K., Saito, M., Kontani, Y., Kobayashi, Y., Mori, N., & Yamashita, H. (2006). Potential contribution of vasoconstriction to suppression of heat loss and homeothermic regulation in UCP1-deficient mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *452*(3), 363–369. https://doi.org/10.1007/s00424-005-0036-3

Warner, A., Rahman, A., Solsjö, P., Gottschling, K., Davis, B., Vennström, B., Arner, A., & Mittag, J. (2013). Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor α1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(40), 16241–16246. https://doi.org/10.1073/pnas.1310300110

Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, *22*(6), 962–970. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026

Webber, E. S., Bonci, A., & Krashes, M. J. (2015). The elegance of energy balance: Insight from circuit-level manipulations. *Synapse*, *69*(9), 461–474. https://doi.org/10.1002/syn.21837

Wen, J.-P., Liu, C., Hu, Y.-T., Chen, G., & Lin, L. (2010). Globular adiponectin regulates energy homeostasis through AMP-activated protein kinase–acetyl-CoA carboxylase (AMPK/ACC) pathway in the hypothalamus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *344*(1–2), 109–115. https://doi.org/10.1007/s11010-010-0534-2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vázquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., López, M., & Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions. *Cell*, *149*(4), 871–885. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.066

Whittle, A. J., López, M., & Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity – the central issue. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(8), 405–411. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.04.001

WHO. (2023). *Obesity and overweigth*. World Health Organization.

Willesen, M. G., Kristensen, P., & Rømer, J. (1999). Co-Localization of Growth Hormone Secretagogue Receptor and NPY mRNA in the Arcuate Nucleus of the Rat. *Neuroendocrinology*, *70*(5), 306–316. https://doi.org/10.1159/000054491

Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. *Physiology & Behavior*, *74*(4–5), 683–701. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00612-6

Wolfgang, M. J., Cha, S. H., Sidhaye, A., Chohnan, S., Cline, G., Shulman, G. I., & Lane, M. D. (2007). Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19285–19290. https://doi.org/10.1073/pnas.0709778104

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., & Carling, D. (2005). Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, *2*(1), 21–33. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.005

Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D., & Porte, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, *282*(5738), 503–505. https://doi.org/10.1038/282503a0

Woodward, O. R. M., Gribble, F. M., Reimann, F., & Lewis, J. E. (2022). Gut peptide regulation of food intake – evidence for the modulation of hedonic feeding. *The Journal of Physiology*, *600*(5), 1053–1078. https://doi.org/10.1113/JP280581

World Health Organization. (2020). *Obesity and overweight World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight*. April 1.

Wren, A. M., Seal, L. J., Cohen, M. A., Brynes, A. E., Frost, G. S., Murphy, K. G., Dhillo, W. S., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2001). Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(12), 5992–5992. https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8111

Wu, J., Boström, 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., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*, *150*(2), 366–376. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016

Wu, J., Puppala, D., Feng, X., Monetti, M., Lapworth, A. L., & Geoghegan, K. F. (2013). Chemoproteomic Analysis of Intertissue and Interspecies Isoform Diversity of AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*, *288*(50), 35904–35912. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508747

Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., & Cantley, L. C. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, *49*(6), 1167–1175. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.035

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F. C., Leone, P., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L., Eccleston, J. F., Davis, C. T., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, *449*(7161), 496–500. https://doi.org/10.1038/nature06161

Xiao, B., Sanders, M. J., Carmena, D., Bright, N. J., Haire, L. F., Underwood, E., Patel, B. R., Heath, R. B., Walker, P. A., Hallen, S., Giordanetto, F., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2013). Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature Communications*, *4*(1), 3017. https://doi.org/10.1038/ncomms4017

Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Haire, L. F., Saiu, P., Howell, S. A., Aasland, R., Martin, S. R., Carling, D., & Gamblin, S. J. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, *472*(7342), 230–233. https://doi.org/10.1038/nature09932

Xie, M., Zhang, D., Dyck, J. R. B., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D. L., Taffet, G. E., Baldini, A., Khoury, D. S., & Schneider, M. D. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-β-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(46), 17378–17383. https://doi.org/10.1073/pnas.0604708103

Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H., & Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*, *6*(7), 736–742. https://doi.org/10.1038/nn1073

Xu, Y., Hill, J. W., Fukuda, M., Gautron, L., Sohn, J.-W., Kim, K.-W., Lee, C. E., Choi, M. J., Lauzon, D. A., Dhillon, H., Lowell, B. B., Zigman, J. M., Zhao, J. J., & Elmquist, J. K. (2010). PI3K Signaling in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus Is Required for Normal Energy Homeostasis. *Cell Metabolism*, *12*(1), 88–95. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.002

Xu, Y., Nedungadi, T. P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B. G., Davis, K. E., Zhang, X., Zou, F., Gent, L. M., Hahner, L. D., Khan, S. A., Elias, C. F., Elmquist, J. K., & Clegg, D. J. (2011). Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metabolism*, *14*(4), 453–465. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.009

Xu, Y., Wu, Z., Sun, H., Zhu, Y., Kim, E. R., Lowell, B. B., Arenkiel, B. R., Xu, Y., & Tong, Q. (2013). Glutamate Mediates the Function of Melanocortin Receptor 4 on Sim1 Neurons in Body Weight Regulation. *Cell Metabolism*, *18*(6), 860–870. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.003

Xue, B., Pulinilkunnil, T., Murano, I., Bence, K. K., He, H., Minokoshi, Y., Asakura, K., Lee, A., Haj, F., Furukawa, N., Catalano, K. J., Delibegovic, M., Balschi, J. A., Cinti, S., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2009a). Neuronal Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Results in Inhibition of Hypothalamic AMPK and Isoform-Specific Activation of AMPK in Peripheral Tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4563–4573. https://doi.org/10.1128/MCB.01914-08

Xue, B., Pulinilkunnil, T., Murano, I., Bence, K. K., He, H., Minokoshi, Y., Asakura, K., Lee, A., Haj, F., Furukawa, N., Catalano, K. J., Delibegovic, M., Balschi, J. A., Cinti, S., Neel, B. G., & Kahn, B. B. (2009b). Neuronal Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Results in Inhibition of Hypothalamic AMPK and Isoform-Specific Activation of AMPK in Peripheral Tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(16), 4563–4573. https://doi.org/10.1128/MCB.01914-08

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Yang, C. F., Chiang, M. C., Gray, D. C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S. A., Unger, E. K., Wells, J. A., & Shah, N. M. (2013). Sexually Dimorphic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus Govern Mating in Both Sexes and Aggression in Males. *Cell*, *153*(4), 896–909. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017

Yang, C. S., Lam, C. K. L., Chari, M., Cheung, G. W. C., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G. A., & Lam, T. K. T. (2010). Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase Regulates Glucose Production. *Diabetes*, *59*(10), 2435–2443. https://doi.org/10.2337/db10-0221

Yang, L., Scott, K. A., Hyun, J., Tamashiro, K. L., Tray, N., Moran, T. H., & Bi, S. (2009). Role of Dorsomedial Hypothalamic Neuropeptide Y in Modulating Food Intake and Energy Balance. *The Journal of Neuroscience*, *29*(1), 179–190. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009

Yavari, A., Bellahcene, M., Bucchi, A., Sirenko, S., Pinter, K., Herring, N., Jung, J. J., Tarasov, K. V., Sharpe, E. J., Wolfien, M., Czibik, G., Steeples, V., Ghaffari, S., Nguyen, C., Stockenhuber, A., Clair, J. R. St., Rimmbach, C., Okamoto, Y., Yang, D., … Ashrafian, H. (2017). Mammalian γ2 AMPK regulates intrinsic heart rate. *Nature Communications*, *8*(1), 1258. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01342-5

Yavari, A., Stocker, C. J., Ghaffari, S., Wargent, E. T., Steeples, V., Czibik, G., Pinter, K., Bellahcene, M., Woods, A., Martínez de Morentin, P. B., Cansell, C., Lam, B. Y. H., Chuster, A., Petkevicius, K., Nguyen-Tu, M.-S., Martinez-Sanchez, A., Pullen, T. J., Oliver, P. L., Stockenhuber, A., … Ashrafian, H. (2016). Chronic Activation of γ2 AMPK Induces Obesity and Reduces β Cell Function. *Cell Metabolism*, *23*(5), 821–836. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.003

Ye, H., Feng, B., Wang, C., Saito, K., Yang, Y., Ibrahimi, L., Schaul, S., Patel, N., Saenz, L., Luo, P., Lai, P., Torres, V., Kota, M., Dixit, D., Cai, X., Qu, N., Hyseni, I., Yu, K., Jiang, Y., … Xu, Y. (2022). An estrogen-sensitive hypothalamus-midbrain neural circuit controls thermogenesis and physical activity. *Science Advances*, *8*(3). https://doi.org/10.1126/sciadv.abk0185

Yeo, G. S. H., Farooqi, I. S., Aminian, S., Halsall, D. J., Stanhope, R. G., & O'Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetics*, *20*(2), 111–112. https://doi.org/10.1038/2404

Yeo, G. S. H., & Heisler, L. K. (2012). Unraveling the brain regulation of appetite: Lessons from genetics. In *Nature Neuroscience* (Vol. 15, Issue 10). https://doi.org/10.1038/nn.3211

Yokosuka, M., Xu, B., Pu, S., Kalra, P. S., & Kalra, S. P. (1998). Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiology & Behavior*, *64*(3), 331–338. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00065-1

Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., & Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(8), 3404–3408. https://doi.org/10.1172/JCI67803

Zeng, W., Pirzgalska, R. M., Pereira, M. M. A., Kubasova, N., Barateiro, A., Seixas, E., Lu, Y.-H., Kozlova, A., Voss, H., Martins, G. G., Friedman, J. M., & Domingos, A. I. (2015). Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. *Cell*, *163*(1), 84–94. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.055

Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J., Lin, S., Bao, J., Wu, P., & Luo, M. (2013). Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively. *The Journal of Neuroscience*, *33*(8), 3624–3632. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Zhang, C.-S., Hawley, S. A., Zong, Y., Li, M., Wang, Z., Gray, A., Ma, T., Cui, J., Feng, J.-W., Zhu, M., Wu, Y.-Q., Li, T. Y., Ye, Z., Lin, S.-Y., Yin, H., Piao, H.-L., Hardie, D. G., & Lin, S.-C. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*, *548*(7665), 112–116. https://doi.org/10.1038/nature23275

Zhang, J., Chen, D., Sweeney, P., & Yang, Y. (2020). An excitatory ventromedial hypothalamus to paraventricular thalamus circuit that suppresses food intake. *Nature Communications*, *11*(1), 6326. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20093-4

Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B. B., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2008). Selective Inactivation of Socs3 in SF1 Neurons Improves Glucose Homeostasis without Affecting Body Weight. *Endocrinology*, *149*(11), 5654–5661. https://doi.org/10.1210/en.2008-0805

Zhang, X., & van den Pol, A. N. (2016). Hypothalamic arcuate nucleus tyrosine hydroxylase neurons play orexigenic role in energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, *19*(10), 1341–1347. https://doi.org/10.1038/nn.4372

Zhang, Y., Kerman, I. A., Laque, A., Nguyen, P., Faouzi, M., Louis, G. W., Jones, J. C., Rhodes, C., & Münzberg, H. (2011). Leptin-Receptor-Expressing Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus and Median Preoptic Area Regulate Sympathetic Brown Adipose Tissue Circuits. *The Journal of Neuroscience*, *31*(5), 1873–1884. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3223-10.2011

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425–432. https://doi.org/10.1038/372425a0

Zhao, L., Kim, K. W., Ikeda, Y., Anderson, K. K., Beck, L., Chase, S., Tobet, S. A., & Parker, K. L. (2008). Central Nervous System-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 Results in Increased Anxiety-Like Behavior. *Molecular Endocrinology*, *22*(6), 1403–1415. https://doi.org/10.1210/me.2008-0034

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, *108*(8), 1167–1174. https://doi.org/10.1172/JCI13505

Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Peng Ng, C., Ponniah, S., Lin, S.-C., Hong, W., & Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nature Genetics*, *35*(1), 49–56. https://doi.org/10.1038/ng1225

Ziegler, D. R., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, *448*(3), 217–229. https://doi.org/10.1002/cne.10257

Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., & Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*, *23*(9), 3113–3120. https://doi.org/10.1096/fj.09-133546

Zou, L., Shen, M., Arad, M., He, H., Løfgren, B., Ingwall, J. S., Seidman, C. E., Seidman, J. G., & Tian, R. (2005). N488I Mutation of the γ2-Subunit Results in Bidirectional Changes in AMP-Activated Protein Kinase Activity. *Circulation Research*, *97*(4), 323–328. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000179035.20319.c2

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

Tabla 32. Lista de licencias de las imágenes procedentes de la introducción

Imagen	Nº de licencia
Figura 3. Esquema de los principales agonistas duales (GLP-1/glucagón y GLP-1/GIP) y el agonista triple (GLP-1/glucagón/GIP) y sus principales efectos metabólicos	*1402697-1*
Figura 4. Distribución de los principales depósitos de BAT en neonatos, humanos y ratón y algunos métodos indirectos para cuantificar su actividad	*5642950596518 (panel A); 5642960358904 (panel B); http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ (panel C) (Urisarri and González-García et al., 2021); 1403915-1 (panel D)*
Figura 7. Principales núcleos hipotalámicos y sus funciones	*http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ (Hajdarovic, et al., 2022)*
Figura 8. Señalización y efecto de las principales hormonas implicadas en la regulación del balance energético, sobre las distintas poblaciones del ARC	*5644771120085*
Figura 9. Proyecciones de las neuronas AgRP/NPY y POMC/CART y sus principales efectos sobre el balance energético	*5644921085778*
Figura 10. Dos modelos teóricos sobre las neuronas POMC. a) Diferentes neuronas regulando diferentes funciones. B) Diferentes neuronas convergen para modular la misma función y/o las diferentes neuronas actúan en múltiples funciones.	*5645330595525*
Figura 11. Principales poblaciones descritas en el VMH y su papel en sus diferentes funciones fisiológicas y comportamentales	*http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ (Khodai, et al., 2021)*
Figura 12. Circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la termogénesis en el BAT y el browning del WAT	*http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ (Contreras, et al., 2017).*
Figura 13. PVH poblaciones neuronales proyecciones y funciones metabólicas	*1408085-1*
Figura 14. SF1 en el VMH y su papel clave en la citoarquitectura del núcleo	*5655330613496*
Figura 16. Receptores de leptina e insulina y dianas moleculares relacionadas con la señalización de los mismos	*http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ (Fosch, et. al 2021)*
Figura 19. Principales dianas de AMPK en relación al metabolismo celular y principales rutas implicadas	*5659481171461*
Figura 20. AMPK en el hipotálamo como regulador central de la homeostasis energética	*5662620810194*
Figura 21. Esquema anatómico del VMH.	*https://alleninstitute.org/citation-policy/*
Figuras 1, 2, 5, 6, 17, 18, 15 y 32 (A)	*Creadas con biorrender.com*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565, fax.: 981 184 653
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

galicia

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2020/010
Data de inicio do expediente: 26.10.2020
Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa
Procedemento: resolución de autorización
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

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

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

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela
Persoa responsable do proxecto: Miguel Anotnio López Pérez
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I [ ] Tipo II [ ] Tipo III [X]

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

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

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

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Xacobeo 2021

CVE: atbFudgLD0
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sº de Gandaría
Edificio administrativo Monelos, 4º andar
Rúa Vicente Ferrer, Nº 2
15008 A Coruña
Tfno.: 981 184 565, fax.: 981 184 653
Correo electrónico: servizo.gandaria.a.coruna@xunta.gal

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

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

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1 Autorizar o proxecto solicitado.

2 O proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva cando este finalice.

3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

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

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

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

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

CVE: atbFudgLD0
Verificación: https://sede.xunta.gal/cve

Nesta Tese estudamos de forma paralela o resultado metabólico da eliminación de AMPKα2 y AMPKγ2 en neuronas SF1. O modelo SF1-Cre AMPKα2 non presenta alteracións metabólicas en condicións de dieta estándar, pero si un aumento da masa corporal e adiposidade en condiciones de HFD, mostrando un fenotipo oposto ao resultado da eliminación de AMPKα1 nas mesmas neuronas. A eliminación de AMPKγ2 nas neuronas SF1 provoca un aumento da masa corporal e adiposidade en ambos sexos en condicións estándar, pero só en machos en condicións de HFD. Estes datos amosan un papel clave de AMPK e as súas diferentes subunidades nas neuronas SF1 no control do balance enerxético. Palabras chave: AMPK, VMH, SF1, BAT, balance enerxético.