



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Iara
Fernández González

Tesis doctoral

Modulación central de la
homeostasis energética desde
las neuronas SF1 del núcleo
ventromedial del hipotálamo:
papel de JNK1 y SUCNR1.

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA DESDE LAS NEURONAS SF1 DEL NÚCLEO VENTROMEDIAL DEL HIPOTÁLAMO: PAPEL DE JNK1 Y SUCNR1

Autor

Iara Fernández González

Directores: D. Miguel Antonio López Pérez y D. Carlos Diéguez González

Tutor/a: D. Miguel Antonio López Pérez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLITO DE INTERÉS

**MODULACIÓN CENTRAL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA DESDE LAS NEURONAS SF1 DEL NÚCLEO VENTROMEDIAL DEL
HIPOTÁLAMO:**

PAPEL DE JNK1 Y SUCNR1

D./Dña. Iara Fernández González

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

A 14 de mayo-de 2024 en Santiago de Compostela

Resumo:

O hipotálamo xoga un papel fundamental na regulación do balance enerxético. Malia aos grandes avances no coñecemento dos mecanismos moleculares implicados, o papel das quinasas de estrés, como as c-Jun N-terminal kinasas e de metabolitos clave, como o succinato, non foi clarificado. Na presente Tese de Doutoramento estudouse o papel de c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1) e do succinate receptor 1 (SUCNR1) no hipotálamo, con especial atención nas neuronas do núcleo ventromedial (VMH) que expresan o factor esterodoxénico 1 (SF1).

Os resultados obtidos mostraron que os ratos *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}* sufriron unha diminución do peso corporal, unha mellor tolerancia á glicosa e unha redución dos niveis de lípidos hepáticos. Estudouse tamén a posible implicación de JNK1 nos efectos centrais das hormonas tiroideas. A administración central de T3 provocou unha perda de peso independente da alimentación tanto nos ratos salvaxes (*Jnk1^{fl/fl}*) como nos *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}*, e non promoveu a acumulación dos lípidos hepáticos nos ratos mutantes. Os nosos datos mostran por primeira vez que JNK1 nas neuronas SF1 é necesario para a regulación do metabolismo dos lípidos hepáticos e as accións centrais de T3.

Por outra banda, esta investigación tamén se centrou nunha área inexplorada na que o succinato exerce unha función fisiolóxica no hipotálamo regulando o equilibrio enerxético a través do seu receptor SUCNR1. A nosa hipótese viuse respaldada pola evidencia obtida ao administrar succinato de maneira intracerebroventricular en ratos, observando unha diminución do peso corporal unida a unha maior termoxénesis do BAT. Mentres que nas aproximacións viroxénicas para “*knockear*” o receptor SUCNR1 e nos ratos *SUCNR1SF1KO* apreciouse un aumento do peso corporal acompañado dunha menor termoxénesis do BAT, demostrando que as neuronas SF1 do núcleo ventromedial son as poboacións neuronais nas que SUCNR1 modula o balance enerxético.

En conclusión, estes datos no seu conxunto demostran que JNK1 e SUCNR1 no VMH xogan un importante papel fisiolóxico na regulación do balance enerxético.

Resumen:

El hipotálamo juega un papel fundamental en la regulación del balance energético. A pesar de los grandes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados, el papel de las quinasas de estrés, como las c-Jun N-terminal kinases y de metabolitos clave, como el succinato, no ha sido clarificado. En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el papel de c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1) y del succinate receptor 1 (SUCNR1) en el hipotálamo, con especial atención en las neuronas del núcleo ventromedial (VMH) que expresan el factor esteroidogénico 1 (SF1).

Los resultados obtenidos mostraron que los ratones *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}* sufrieron una disminución del peso corporal, una mejor tolerancia a la glucosa y una reducción de los niveles de lípidos hepáticos. Asimismo, se estudió la posible implicación de JNK1 en los efectos centrales de las hormonas tiroideas. La administración central de T3 provocó una pérdida de peso independiente de la alimentación tanto en los ratones salvajes (*Jnk1^{fl/fl}*) como en los *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}*, y no promovió la acumulación de los lípidos hepáticos en los ratones mutantes. Nuestros datos muestran por primera vez que JNK1 en las neuronas SF1 es necesario para la regulación del metabolismo de los lípidos hepáticos y las acciones centrales de T3.

Por otro lado, esta investigación se centró también en un área inexplorada, en la que el succinato ejerce una función fisiológica en el hipotálamo regulando el equilibrio energético a través de su receptor SUCNR1. Nuestra hipótesis se vio respaldada por la evidencia obtenida al administrar succinato de manera intracerebroventricular en ratones, observando una disminución del peso corporal unida a una mayor termogénesis del BAT. Mientras que en las aproximaciones virogenéticas para “*knockear*” el receptor SUCNR1 y en los ratones *SUCNR1SF1KO* se apreció un aumento del peso corporal acompañado de una menor termogénesis del BAT, demostrando que las neuronas SF1 del núcleo ventromedial es la población neuronal en las que SUCNR1 modula el balance energético.

En conclusión, estos datos en su conjunto demuestran que JNK1 y SUCNR1 en el VMH juegan un importante papel fisiológico en la regulación del balance energético.

Abstract:

The hypothalamus plays a fundamental role in regulating energy balance. Despite significant advances in understanding the molecular mechanisms involved, the role of stress kinases, such as c-Jun N-terminal kinases, and key metabolites, such as succinate, has not been fully elucidated. This doctoral thesis investigates the role of c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1) and succinate receptor 1 (SUCNR1) in the hypothalamus, with a focus on neurons in the ventromedial nucleus (VMH) expressing Steroidogenic Factor 1 (SF1).

The results show that *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}* mice experienced decreased body weight, improved glucose tolerance, and reduced hepatic lipid levels. Additionally, the possible involvement of JNK1 in the central effects of thyroid hormones was studied. Central administration of T3 resulted in weight loss independent of feeding in both wild-type mice (*Jnk1^{fl/fl}*) and *SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}* mice and did not promote hepatic lipid accumulation in mutant mice. Our data demonstrate for the first time that JNK1 in SF1 neurons is necessary for regulating hepatic lipid metabolism and central actions of T3.

Furthermore, this research also focused on an unexplored area, in which succinate plays a physiological role in the hypothalamus by regulating energy balance through its receptor SUCNR1. Our hypothesis was supported by evidence obtained from intracerebroventricular succinate administration in mice, which led to decreased body weight and increased brown adipose tissue thermogenesis. Virogenetic approaches to knock out the SUCNR1 receptor and *SUCNR1SF1KO* mice showed increased body weight accompanied by reduced brown adipose tissue thermogenesis, demonstrating that SF1 neurons in the ventromedial nucleus are the neuronal population where SUCNR1 modulates energy balance.

In conclusion, these collective data demonstrate that JNK1 and SUCNR1 in the VMH play an important physiological role in regulating energy balance.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV: adenovirus asociados, *adeno-associated virus*.

AC: adenilato ciclasa.

ACC: acetil-CoA carboxilasa.

ADP: adenosín difosfato.

AG: ácidos grasos.

AgRP: proteína relacionada con el agutí, *agouti-related protein*.

AMP: proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

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

ANCOVA: análisis de covarianza, *analysis of covariance*

ANOVA: análisis de varianza, *analysis of variance*.

AP: anteroposterior.

AP-1: factor de transcripción 1.

APS: amonio persulfato, *ammonium persulfate*.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

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

ATP: adenosín trifosfato.

AUC: área bajo la curva, *area under the curve*.

B3-AR: receptores β 3-adrenérgicos, *β 3-adrenergic receptors*.

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

BBB: barrera hematoencefálica, *blood brain barrier*.

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

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

CHC: carcinoma hepatocelular.

CESA: ácido cis-epoxy-succínico.

CKK: colecistoquinina, *cholecystokinin*.

CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1

CPT2: carnitina palmitoiltransferasa 2.

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

CRR: contrarregulación de la hipoglucemia.

D1: deiodinasa tipo 1.

D2: deiodinasa tipo 2.

DAG: diacilglicéridos.

DICs: transportadores mitocondriales dicarboxilados.

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

DV: dorso-ventral.

EE: gasto energético, *energy expenditure*.

EE_{PA}: actividad física.

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

E_{IN}: energía dentro.

Er α : receptor de estrógeno alfa.

E_{OUT}: energía gastada.

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

FFA: ácidos grasos libres, *Free Fatty Acids*

GDP: guanosín difosfato, *guanosine diphosphate*..

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

GLUT2: transportador de glucosa 2, *glucosa transporter 2*.

GPR91: receptor de proteína acoplado a proteína G 91, *G-protein-coupled receptor 91*.

GPCRs: receptor acoplado a proteína G, *G-protein-coupled receptors*.

GTT: test de tolerancia a glucosa, *glucose tolerance test*.

GTP: guanosín trifosfato, *guanosine triphosphate*.

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

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HFD: dieta alta en grasas, *high fat diet*.

HIF-1: factor de transcripción factor-1 α inducible por hipoxia, *hypoxia-inducible factor 1*.

HSL: lipasa sensible a hormona, *hormone sensitive lipase*.

ICV: cirugía intracerebroventricular, *intracerebroventricular injection*.

IKK β : inhibidor de la subunidad beta de la quinasa kappa-B del factor nuclear.

IL-1 β : interleucina-1- β .

IL-6: interleucina -6.

IMC: índice de masa corporal.

INSIG: proteína inducida por insulina, *insulin induced gene*

IP: intraperitoneal.

ITT: test de tolerancia a insulina, *insulin tolerance test*.

JNK1: quinasa 1 N-terminal c- Jun.

LA: actividad locomotora, *locomotor activity*.

LDN: lipogénesis de novo.

LEPR: receptor de la leptina, *leptin receptor*.

LHA: área lateral hipotalámica, *lateral hypothalamic area*.

LXR: receptor X hepático.

MAFLD: enfermedad metabólica del hígado graso, *Metabolic Associated Fatty Liver Disease*.

MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos p38, *p38 Mitogen-Activated Protein Kinases*.

MBH: región mediobasal hipotalámica, *mediobasal hypothalamus*.

MCH: hormona concentradora de melanina, *melanin concentrating-hormone*.

MCTs: transportadores monocarboxilatos.

MG: monoacilglicéridos.

MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.

mTOR: proteína diana de rapamicina en mamíferos, *mammalian Target of Rapamycin*.

NADCs: transportadores de dicarboxilatos dependientes de sodio.

NASH: esteatopatitis no alcohólica, *non alcoholic steatohepatitis*.

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico, *Non alcoholic Fatty Liver Disease*.

NEAT: termogénesis de actividades sin ejercicio, *non exercise activity thermogenesis*.

NGS: suero de cabra; *normal goat serum*.

NMR: resonancia magnética nuclear, *nuclear magnetic resonance*.

NOS1: óxido nítrico sintasa 1, *nitric oxide synthase 1*.

NOVA: factor de *splicing* de pre-ARNm de JNK.

NPY: neuropéptido Y.

O₂: radical superóxido.

OATs: transportadores de aniones orgánicos dicarboxilatos.

OH: radical hidroxilo.

OI: oliva inferior.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OX: orexina.

PACAP: péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, *polimerase chain reaction*.

PDH: piruvato deshidrogenasa.

PFA: paraformaldehído.

PGC1 α : proteína 1 alfa coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*.

PK: piruvato quinasa.

PKA: proteína quinasa A, *protein kinase A*.

PLC: fosfolipasa C, *phospholipase-C-IP₃*.

POMC: proopiomelanocortina..

PPAR γ : receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome proliferator-activated receptor γ* .

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

PTT: test de tolerancia a piruvato, *pyruvate tolerance test*.

PVDF: *Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*.

PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular nucleus*.

PYY: péptido YY3-36, *peptide YY (PYY)3–36*.

RAS: *renin angiotensin system*.

RE: retículo endoplasmático.

RER: tasa de intercambio respiratorio, *respiratory exchange ratio*.

RMR: tasa metabólica en basal, *resting metabolic rate*.

RT: temperatura ambiente, *room temperature*.

ROS: especies reactivas de oxígeno, *reactive oxygen species*.

S1P: proteasa del sitio 1

S2P: proteasa del sitio 2

SAPKs: kinasas activadas por estrés, *stress-activated protein kinases*.

SC: subcutáneo.

SCAP: proteína activada por clivaje de SREBP, *SREBP cleavage activating protein*.

SD: dieta estándar, *standard diet*.

SEM: desviación estándar de la media, *standard error of the mean*.

SDH: enzima succinato deshidrogenasa, *succinate dehydrogenase*.

SDS: dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate*.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SF1: factor esteroideogénico 1, *Steroidogenic factor 1*.

SNC: sistema nervioso central.

SNPS: sistema nervioso parasimpático.

SNS: sistema nervioso simpático.

SUCNR1: receptor del succinato 1, *succinate receptor 1*.

sWAT: tejido adiposo blanco subcutáneo, *subcutaneous white adipose tissue*.

T3: triyodotironina, *triiodothyronine*.

T4: tiroxina.

TEF: efecto térmico de los alimentos.

TEMED: *N,N,N,N-tetramethylethylenediamine*.

TG: triglicéridos.

THs: hormonas tiroideas, *thyroid hormones*.



TNF α : factor de necrosis tumoral, *tumor necrosis factor*.

TRH: hormona liberadora de tirotropina, *thyrotropin-releasing hormone*

TSH: hormona estimulante de tiroides, *thyroid-stimulating hormone*

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

UCP2: proteína desacoplante 2, *uncoupling protein 2*.

VCO₂: volumen de la producción de dióxido de carbono.

VDACs: canal de aniones dependiente de voltaje.

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

VO₂: volumen del consumo de oxígeno.

vWAT: tejido adiposo blanco visceral, *visceral white adipose tissue*.

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

ANGLICISMOS

Ad-libutum: acceso libre a comida

Antigen retrieval: desenmascaramiento de antígenos.

Brain infusion kit: kit de infusión al cerebro de la bomba osmótica.

Browning: pardeamiento del tejido adiposo.

Downregulation: “regulación a la baja” o “regulación descendente” (referido al procedo por el cual la expresión o actividad de un gen, proteína o receptor disminuye).

Downstream: “aguas abajo” (referido a una vía de señalización).

Ear punch: técnica que consiste en realizar un agujero en la oreja del animal con fines identificativos.

Feedback: retroalimentación.

Knockear o knockout: modificación genética en la cual se inactiva la expresión de un gen.

Overnight: durante la noche o de un día para otro.

Upregulation: “regulación al alza” o “regulación ascendente” (referido al procedo por el cual la expresión o actividad de un gen, proteína o receptor aumenta).

Upstream: “aguas arriba” (referido a una vía de señalización).

Wildtype: tipo salvaje.



ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS	7
ÍNDICE.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
1 OBESIDAD.....	23
1.1 PREVALENCIA DE LA OBESIDAD.....	23
2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	25
2.1 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS.....	27
2.1.1 Regulación térmica y tejido adiposo pardo.....	27
2.2 REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL HIPOTÁLAMO.....	31
3 PAPEL METABÓLICO DEL HÍGADO.....	34
3.1 METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO.....	34
3.1.1 Lipogénesis de novo hepática.....	34
3.1.2 Oxidación hepática de ácidos grasos.....	36
4 JNK, REGULADOR METABÓLICO.....	37
4.1 EL PAPEL DE LAS JNK EN TEJIDOS PERIFÉRICOS.....	
¡Error! Marcador no definido.	
4.2 EL PAPEL DE JNK EN EL HIPOTÁLAMO Y LA HIPÓFISIS.....	
¡Error! Marcador no definido.	
4.3 JNK HIPOTALÁMICA EN CÉLULAS NO NEURONALES.....	42
5 LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	42
5.1 EL PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.....	43
5.2 EL PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA TERMOGÉNESIS Y EL GASTO ENERGÉTICO.....	43
5.3 ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS.....	45
6 SUCCINATO.....	45
6.1 EL SUCCINATO UN SUBPRODUCTO COMÚN DE LA MICROBIOTA.....	45
6.2 EL SUCCINATO COMO SUSTRATO ENERGÉTICO.....	46
6.3 EL SUCCINATO COMO MOLÉCULA DE SEÑALIZACIÓN.....	47
7 SUCNR1.....	48
7.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN.....	49
7.2 NUEVAS FUNCIONES METABÓLICAS ATRIBUIDAS A SUCNR1.....	50
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
8 MODELOS ANIMALES.....	65



8.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES <i>IN VIVO</i>.....	65
8.1.1 Consideraciones legales y éticas.....	65
8.2 MODELOS ANIMALES.....	65
8.2.1 Generación de ratones knockout.....	66
8.2.2 Cría e identificación individual de los animales.....	67
8.2.3 Estabulación.....	67
8.3 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS.....	67
8.3.1 Administración de sustancias.....	67
8.3.1.1 Vía intraperitoneal (IP).....	67
8.3.1.2 Vía subcutánea (SC).....	67
8.3.1.3 Vía intracerebroventricular (ICV).....	67
8.3.1.4 Vía hipotalámica núcleo-específica.....	67
8.3.2 Monitorización de la ingesta y de la masa corporal.....	69
8.3.3 Manipulación del estado nutricional: ayuno.....	70
8.3.4 Medición de la temperatura corporal.....	70
8.3.5 Medición de la temperatura del BAT.....	70
8.3.6 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)	70
8.3.7 Test de tolerancia a la insulina (ITT)	70
8.3.8 Fenotipado metabólico: monitorización del gasto energético, tasa de intercambio respiratorio y actividad locomotora.....	71
8.3.9 Determinación de la composición corporal.....	71
8.4 ANESTESIA Y ANALGESIA.....	71
8.5 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	72
8.5.1 Estereotaxia núcleo-específica.....	72
8.5.2 Canulación ICV.....	74
8.5.3 ICV mediante bomba osmótica.....	75
8.5.4 Perfusión intracardiaca.....	75
8.5.5 Disección y extracción de tejidos.....	75
8.5.6 Diseños experimentales.....	76
8.5.6.1 Tratamiento ICV crónico con T3.....	76
8.5.6.2 Tratamiento ICV con succinato mediante bombas osmóticas.....	76
8.5.6.3 Inoculación de adenoasociados CRE-GFP en la región mediobasal hipotalámica de ratones SUCNR1 ^{flox/flox}	76
8.5.6.4 Inoculación de adenovirus SF1-CRE en el VMH de ratones SUCNR1 ^{flox/flox}	76
8.5.6.5 Generación de ratones Knockout para JNK1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico y su fenotipado metabólico	76
8.5.6.6 Generación de ratones Knockout para SUCNR1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico en SD y su fenotipado metabólico	81
8.5.6.7 Generación de ratones Knockout para SUCNR1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico en HFD y su fenotipado metabólico.	81
8.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	82

8.6.1 Western Blot.....	82
8.6.1.1 Extracción de proteína.....	82
8.6.1.2 Cuantificación de proteína.....	83
8.6.1.3 Preparación de las muestras.....	83
8.6.1.4 Preparación de los geles.....	84
8.6.1.5 Electroforesis.....	85
8.6.1.6 Transferencia del gel a una membrana	86
8.6.1.8 Revelado.....	87
8.6.1.9 Cuantificación.....	87
8.6.2 PCR para genotipado.....	88
8.6.2.1 Extracción de ADN	88
8.6.2.2 Amplificación por PCR convencional	88
8.6.2.3 Electroforesis de agarosa	88
8.6.3 Inmunofluorescencia.....	89
8.6.4 Determinaciones séricas.....	90
8.6.5 Análisis de metabolitos.....	90
8.6.6 Análisis histológico de los tejidos.....	91
8.6.6.1 Inmunohistoquímica	91
8.6.6.2 Adquisición y análisis de imágenes.....	91
8.6.7 Estadística.....	92
8.6.7.1 t-test.....	92
8.6.7.2 Anova.....	92
8.6.7.3 Ancova.....	92
RESULTADOS.....	95
1 CARACTERIZACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH.....	95
2 LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH EN HEMBRAS DISMINUYE EL PESO CORPORAL SIN AFECTAR AL GASTO ENERGÉTICO EN HEMBRA.....	97
3 LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH EN HEMBRAS NO AFECTA A LA ACTIVACIÓN NI A LA TERMOGÉNESIS DEL BAT.....	98
4 LOS RATONES HEMBRA DEFICIENTES EN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH MUESTRAN UNA MEJORA EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.....	100
5 LOS RATONES HEMBRA DEFICIENTES EN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH MUESTRAN UNA DISMINUCIÓN EN EL CONTENIDO LIPÍDICO EN EL HÍGADO.....	101
6 LA ELIMINACIÓN DEL GEN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 ALTERA LA RESPUESTA HEPÁTICA A LA T3 CENTRAL...	102
7 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE T3 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO.....	104
8 LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE SUCCINATO EN RATONES INDUCE LA TERMOGÉNESIS EN EL BAT.....	105
9 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE SUCCINATO EN RATONES OBESOS NO TIENE EFECTO SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO.....	106

10	LA DELECIÓN VIROGENÉTICA DE SUCNR1 EN MBH Y EN NEURONAS SF1 INCREMENTA LA MASA CORPORAL ASOCIADA A UNA DISMINUCIÓN DE LA TERMOGÉNESIS EN RATONES MACHO.....	107
11	LA DELECIÓN VIROGENÉTICA DE SUCNR1 NO REGULA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA.....	109
12	LA DELECIÓN GENÉTICA DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 AUMENTA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES MACHO SD.....	111
13	LA DELECIÓN GENÉTICA DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO MODULA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA SD.....	113
14	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 DISMINUYE EL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES MACHO SD...	115
15	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA SD.....	116
16	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES MACHO SD.....	117
17	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES HEMBRA SD.....	118
18	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES MACHO HFD.	119
19	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO ALTERA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA HFD.....	121
20	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES MACHO HFD	123
21	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA HFD	124
22	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATON MACHO HFD.....	125
23	LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES HEMBRA HFD.....	126
	DISCUSIÓN.....	127
	CONCLUSIONES.....	137
	BIBLIOGRAFÍA.....	141
	AGRADECIMIENTOS.....	163
	ANEXOS.....	169



INTRODUCCIÓN

1 OBESIDAD

1.1 PREVALENCIA DE LA OBESIDAD

Una de las mayores incongruencias del mundo actual en el que vivimos es que mientras millones de personas están muriendo de hambre por todo el mundo, la patogenia de la obesidad se ha convertido en una importante epidemia de salud pública la cual ha empeorado progresivamente en los últimos 50 años, llegando a ser la segunda causa más común de muerte evitable, después del tabaquismo (Panuganti et al., 2023). Esta enfermedad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un desorden que se caracteriza por un incremento desmesurado o anormal de la grasa corporal que representa un riesgo para la salud, y que se produce como resultado de una descompensación entre el gasto y el aporte energético, a favor de este último. El aumento de los niveles de lípidos y adiposidad en tejidos que no están preparados para manejar esas cantidades altas de grasas, así como las alteraciones endocrinas y a la inflamación intrínsecas a la patología de la obesidad, pueden derivar en enfermedades inflamatorias, resistencia a insulina, eventos cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Panuganti et al., 2023). La obesidad también es considerada como el principal factor de riesgo de la diabetes tipo 2 (Hinnouho et al., 2013; Mendis et al., 2015). A mayores, complica el tratamiento de múltiples patologías, aumentando la posibilidad de resultados desfavorables, como se ha observado de forma destacada en la reciente pandemia de COVID-19 (Fosch et al., 2021). En general la obesidad se asocia con una disminución de la esperanza de vida de 5 a 20 años dependiendo de su duración, la magnitud del exceso de peso y la aparición de enfermedades comórbidas asociadas (Müller et al., 2022).

El índice de masa corporal (IMC) es una herramienta estándar que se utiliza para definir y diagnosticar la obesidad de acuerdo con las pautas de la OMS. En adultos se obtiene dividiendo el peso corporal de un individuo por el cuadrado de su altura (kg/m^2); de tal manera que un IMC igual o superior a 25 es considerado como sobrepeso y un IMC igual o superior a 30 es obesidad (Lin & Li, 2021). Las personas con un IMC de 30 a 34,9 tienen un índice de riesgo de mortalidad general elevado en más del 40% y las que tienen un IMC mayor a 40, la tasa relativa aumenta al 100% (Berrington de Gonzalez et al., 2010). El IMC es la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, ya que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, existen otros indicadores antropométricos representativos como son la circunferencia abdominal y la índice cintura/cadera, ambos propuestos como predictores de enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (Cao et al., 2018; Iwao et al., 2001; Lin & Li, 2021).

Datos de la OMS indican que desde el año 1975 a 2016 se ha triplicado a nivel mundial la incidencia de la obesidad y el sobrepeso (ver Figura 1), lo que no solamente desemboca en grandes complicaciones de salud como se ha mencionado anteriormente, sino que también da lugar a problemas de índole económica en todos los países, especialmente en los desarrollados, en donde afecta a individuos de ambos sexos y de todas las edades (Mendis et al., 2015; Ritchie H & Roser M, 2017). En España, uno de cada dos adultos pesa más de lo recomendado, siendo esta enfermedad más frecuente en mujeres (15,7%) que en hombres (13,4%). También se ha observado que la prevalencia de la obesidad aumenta con la edad, alcanzando cifras del 21,6% y 33,9 % en varones y mujeres, respectivamente (Panuganti et al., 2023). En el contexto mundial, se estima que en el año 2030 el sobrepeso y la obesidad alcanzarán los niveles de 89% en hombres y 85% en mujeres, lo que resulta en un incremento del 97% en enfermedades coronarias, del 61% en ciertos tipos de cáncer y del 21% en la diabetes tipo II (Mendis et al., 2015).

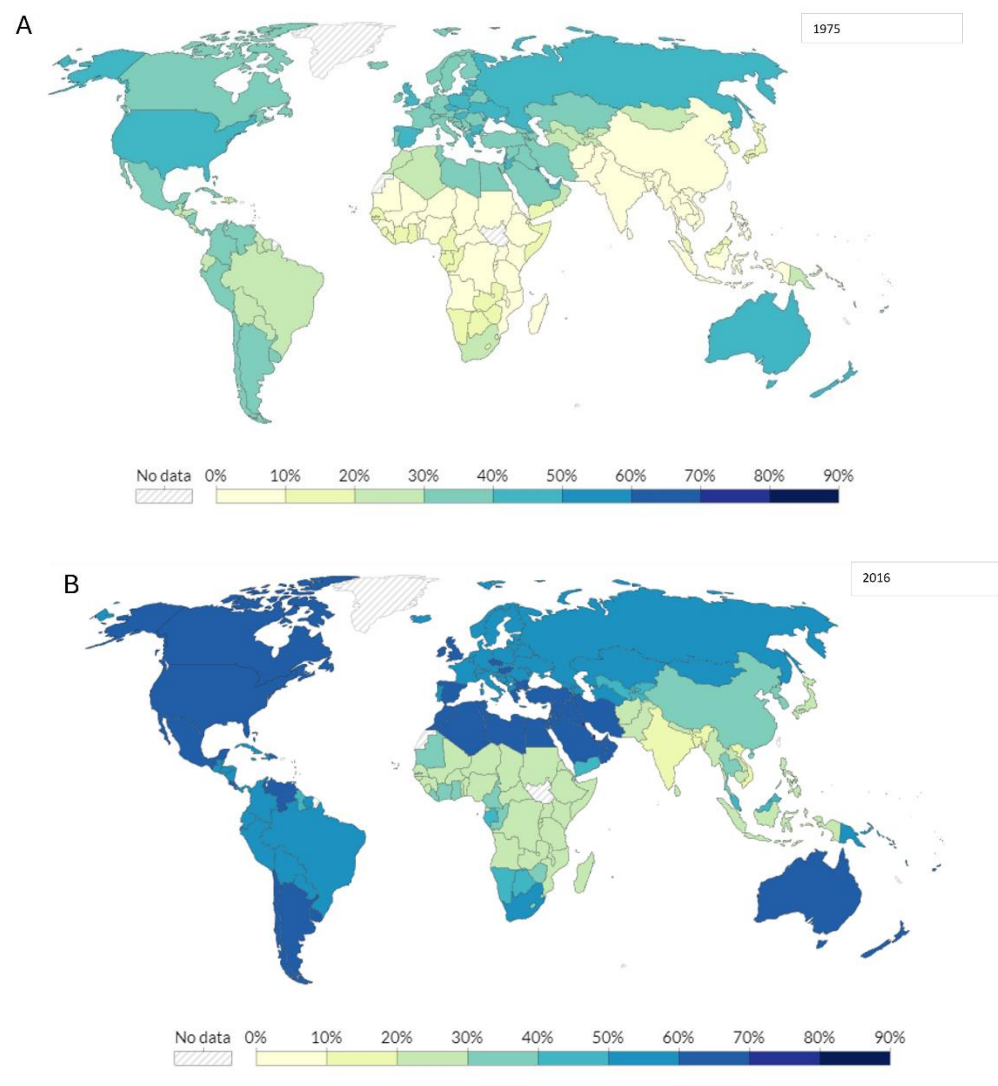


Figura 1. Mapamundi de la incidencia del sobrepeso y la obesidad. (A) Representación mundial de las personas adultas con obesidad o sobrepeso en 1975. (B) Representación mundial de las personas adultas con obesidad o sobrepeso en 2016. En el mapa vemos la proporción de adultos con sobrepeso u obesidad en distintos países. Como se puede observar la proporción de personas con sobrepeso tiende a ser mayor en los países más ricos y menor en los más pobres. En 2016, alrededor de dos quintas partes de los adultos tenían sobrepeso u obesidad (Basada en: <https://ourworldindata.org/obesity>).

A pesar de que en el último siglo se han logrado enormes avances en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el exceso de peso corporal, el tratamiento de la obesidad en sí ha demostrado ser en gran medida resistente a terapia, y los medicamentos contra la obesidad, a menudo, ofrecen una eficacia insuficiente y una seguridad dudosa (Müller et al., 2022). Sin embargo, ensayos recientes con candidatos terapéuticos avanzados, como por ejemplo incretinas, están promoviendo la creencia de que puede ser posible un tratamiento innovador de la obesidad basado en fármacos (Müller et al., 2022). En este punto, los modelos de roedores siguen siendo de importancia fundamental, pero de valor variable para la selección de fármacos candidatos (Müller et al., 2022).

2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Aunque el consumo de alimentos es un mecanismo fundamental para la supervivencia, así como uno de los mayores placeres humanos, en la sociedad moderna el exceso de alimentación está provocando la epidemia de la obesidad ya mencionada anteriormente. Con frecuencia se considera que la obesidad es el resultado de una ingesta excesiva de alimentos o de una actividad física insuficiente, sin embargo, es más apropiado considerar a la obesidad en términos de homeostasis energética (Cakir & Nillni, 2019; Hill et al., 2012). El concepto de homeostasis es empleado de manera habitual en el ámbito de la fisiología, y sus orígenes se remontan al siglo XIX, en los trabajos desarrollados por Claude Bernard sobre el “*milieu intérieur*” o medio interno. El término homeostasis fue acuñado por Walter Bradford Cannon como resultado de la combinación de dos términos griegos “*hómoios*” y “*stásis*”, que significan “igual” y “estabilidad” respectivamente. Lo definió como la capacidad de autorregulación de los sistemas fisiológicos internos para mantener un estado de equilibrio constante, a pesar de los cambios sufridos dentro de dichos sistemas (Leibel et al., 1995).

De acuerdo con las leyes de la termodinámica y de la preservación de la energía, los animales se encuentran en un estado de equilibrio energético cuando la entrada de energía (nutrientes) iguala continuamente la producción de energía (gasto y desperdicio de energía), lo que permite mantener la masa corporal. Por lo tanto, la homeostasis energética es definida como un proceso mediante el cual existe un equilibrio entre la energía ingerida y la energía consumida. La masa corporal sólo puede cambiar cuando la ingesta de energía no es igual al gasto de energía durante un periodo de tiempo determinado. Es decir, alteraciones en este balance provocan una variación en la masa corporal, de tal manera que cuando el balance entre la ingesta y el gasto energético es negativo provoca delgadez; sin embargo, cuando es positivo deriva en sobrepeso u obesidad, ya que el número de calorías ingeridas es superior, de manera continuada, al de calorías consumidas y estas se almacenan, mayormente, en forma de grasa (ver Figura 2) (Hill et al., 2012; Ravussin et al., 2014).

Los componentes básicos del balance energético son: la ingesta de energía, el gasto de energía y el almacenamiento de energía. Los seres humanos ingieren energía en forma de proteínas, carbohidratos, grasas y alcohol [energía dentro (E_{IN})] y gastan energía [energía gastada (E_{OUT})] o energía que el organismo consume) a través de la tasa metabólica en reposo (RMR), el efecto térmico de los alimentos (TEF), la actividad física (EE_{PA}) y la termogénesis adaptativa. La RMR, es la cantidad de energía necesaria para alimentar el cuerpo en reposo, es decir, la necesaria para el mantenimiento de las funciones vitales. El TEF representa el costo energético de absorber y metabolizar los alimentos consumidos. Por último, el EE_{PA} es el componente más variable del gasto energético que consiste en la cantidad de actividad física realizada multiplicada por el coste energético de esa actividad (Hill et al., 2012). La actividad física es llevada a cabo por el aparato músculo esquelético y comprende el ejercicio locomotor tanto voluntario como involuntario/postural de un organismo (Guyton & Hall, 2016).

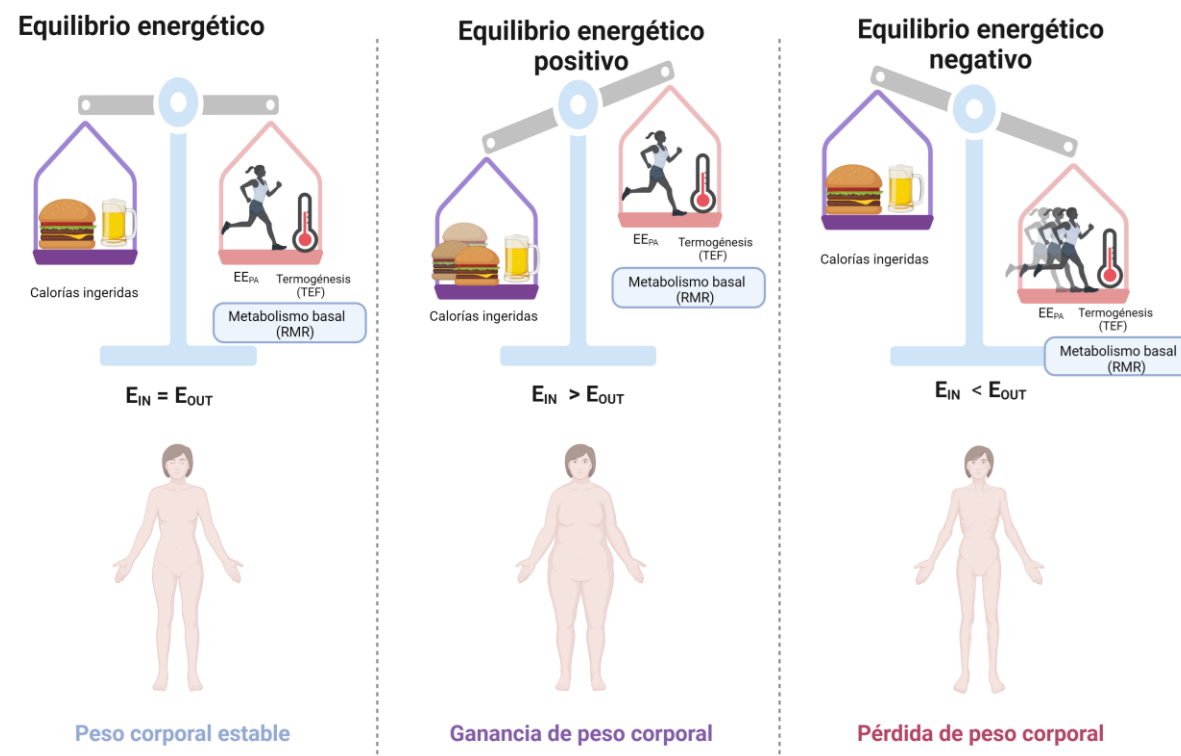


Figura 2. Equilibrio energético. La masa corporal depende del equilibrio energético: Cuando la cantidad de energía consumida es igual a la energía gastada, es decir cuando hay un equilibrio energético, el peso se mantiene estable. Cambios en la ingesta o en el gasto energético pueden provocar variaciones en el peso corporal. Un balance energético positivo, donde la ingesta calórica excede el consumo, lleva a un incremento de peso, lo que puede resultar en sobrepeso u obesidad. En contraste, un balance energético negativo, donde la ingesta calórica es menor que el gasto, ocasiona una reducción de peso (elaboración propia mediante BioRender.com).

La regulación de la homeostasis energética es llevada a cabo por el sistema nervioso central (SNC) que integra señales aferentes y eferentes, produciendo modificaciones en la ingesta y el gasto energético (Seoane-Collazo et al., 2015). Una de las regiones fundamentales en el equilibrio energético es el hipotálamo, el cual es capaz de integrar y responder a señales centrales, endocrinas y metabólicas; dando lugar a una respuesta conductual, autónoma y/o endocrina. De esta manera el hipotálamo es capaz de regular la absorción y la utilización de nutrientes, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo lipídico periférico (González-García et al., 2017a). Aunque el hipotálamo juega un papel preponderante, otras zonas del encéfalo como son la corteza cerebral, las áreas olfativas y algunas áreas del tronco encéfalo también están implicadas en el control del apetito y el balance energético (López et al., 2023). Ante la ingesta de alimentos se originan señales de saciedad a nivel gastrointestinal, como por ejemplo la colecistoquinina (CKK, *cholecystokinin*) (Akieda-Asai et al., 2014), el péptido YY3-36 (PYY, *Peptide YY (PYY)3-36*) o el péptido análogo de glucagón 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) (Müller et al., 2019). También se originan otras señales periféricas, que atraviesan la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro (BBB, del inglés *blood brain barrier*) procedentes del tejido adiposo, como por ejemplo la leptina (una hormona anorexigénica que reduce el apetito) (Friedman, 2019); señales originadas en el estómago como el caso de la ghrelina (péptido orexigénico, es decir que estimula la ingesta) y también la insulina producida por las células β del páncreas (Saltiel & Kahn, 2001). La integración de toda esta información, junto con los niveles de metabolitos circulantes y señales de distensión gastrointestinal y química (composición de los alimentos) permite al hipotálamo elaborar las respuestas homeostáticas apropiadas en cada momento.

2.1 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

Se denomina termogénesis al mecanismo mediante el cual los animales homeotermos mantienen constante su temperatura corporal (entre los 36,5-37°C) mediante la producción de calor, frente a las variaciones del medio ambiente (Himms-Hagen, 1989). Existen diversos tipos de termogénesis:

- La termogénesis obligatoria o tasa metabólica basal, se refiere a la energía consumida por un individuo en reposo, en ayunas y en condiciones de termoneutralidad (unos 28 °C). Constituye sobre un 60-70% de la termogénesis total o gasto energético diario. El metabolismo basal es más alto en hombres que en mujeres, se correlaciona con la masa magra del individuo y parece tener cierto componente genético de tipo familiar (Cannon & Nedergaard, 2004).
- En segundo lugar, tenemos al TEF. Tal y como se ha descrito previamente hace referencia a la termogénesis que acompaña a la digestión, absorción, distribución y almacenamiento de los nutrientes, regulado por el sistema parasimpático. Tiene un componente adaptativo que depende de la dieta y está regulado por el sistema simpático. El TEF varía en función de los alimentos, por ejemplo, es mayor el de los hidratos de carbono y proteína que el de las grasas. En un estudio se ha demostrado que el TEF de un exceso de comida es menor en los pacientes obesos que en sujetos controles, contribuyendo a una mayor deposición de grasa (Hill et al., 2012).
- La termogénesis asociada a la actividad física aumenta el metabolismo basal y la oxidación de grasas, pero varía mucho según el estilo de vida. En un individuo sedentario constituye el 10% del gasto total, mientras que en un deportista puede llegar hasta un 50%. Existe además un componente no voluntario en la actividad física que se denomina NEAT (*Non Exercise Activity Thermogenesis*) que incluye la contracción muscular espontánea, el mantenimiento de la postura y la agitación o inquietud. El NEAT es un índice que predice la resistencia individual a ganar peso (Hill et al., 2012).
- Finalmente, tenemos la termogénesis facultativa o adaptativa que se desencadena cuando el organismo se expone a una temperatura por debajo de la zona de termoneutralidad. Cuando esto ocurre en primer lugar se activan los mecanismos termorreguladores que tratan de disminuir esa pérdida de calor y generarlo. Si estos mecanismos no son suficientes para mantener la temperatura corporal tiene lugar la termogénesis facultativa o adaptativa. Esta se regula por el sistema nervioso simpático y tiene lugar bien en el músculo, mediante la tiritona o contracciones musculares involuntarias con el objetivo de producir calor. También ocurre en el tejido adiposo marrón, pero sin tiritar, sino que consumiendo las reservas energéticas para la producción de calor. En los mamíferos, el órgano responsable de este tipo de termogénesis es el tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) (Cannon & Nedergaard, 2004; Chouchani et al., 2019; Villarroya et al., 2017).

2.1.1 REGULACIÓN TÉRMICA Y TEJIDO ADIPOSO PARDO

El tejido adiposo conforma el principal órgano de reserva del organismo. Está compuesto en su mayoría por adipocitos, que son células especializadas cuya función es captar ácidos grasos que le llegan de la circulación, provenientes de la ingesta, y que son re-esterificados para poder ser almacenados en forma de triglicéridos (TG). En mamíferos este tejido se distribuye a lo largo de diferentes localizaciones conocidas como depósitos de tejido adiposo, las cuales tienen algunas peculiaridades que los permiten distinguir por sus características y funcionalidades; sin embargo, debido a relevante función metabólica, endocrina y reguladora se hace referencia a él, en su conjunto, como órgano adiposo (Cinti, 2005).

A nivel histológico se distinguen tres tipos de tejido adiposo: tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés: *white adipose tissue*), tejido adiposo marrón o pardo (BAT, por sus siglas en inglés: *brown adipose tissue*) y tejido adiposo Beige o Brite (del inglés, *brown in white*); los cuales presentan diferentes características funcionales, de localización y de origen (Giralt & Villarroya, 2013; Wang & Seale, 2016).

El BAT fue considerado durante muchos años como un tejido característico de los animales hibernantes, pero también está presente en roedores y pequeños mamíferos, especialmente aquellos adaptados al frío y en mamíferos recién nacidos, incluido el ser humano. Durante mucho tiempo se pensó que solamente estaba presente en la etapa neonatal humana y que posteriormente sufría atrofia hasta llegar a ser indetectable en adultos. Hoy en día, gracias a la técnica de tomografía de emisión de positrones-tomografía computerizada (PET-CT), se sabe que el BAT metabólicamente activo está presente en humanos adultos y que existen áreas definidas de este tejido en la región cervical, supraclavicular, perirrenal, intercostal y periaórtica (Cypess et al., 2009; Nedergaard et al., 2007; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009) (ver Figura 3); es decir, se encuentra recubriendo zonas vitales y esto es debido a su función primigenia en animales hibernantes, que era calentar la sangre para regular la temperatura corporal. Por ejemplo, en pequeños mamíferos como los roedores, este se localiza de forma muy evidente en la región interescapular, pero también en estas zonas previamente mencionadas: periaórtica, perirrenal e intercostal (Cannon & Nedergaard, 2004).

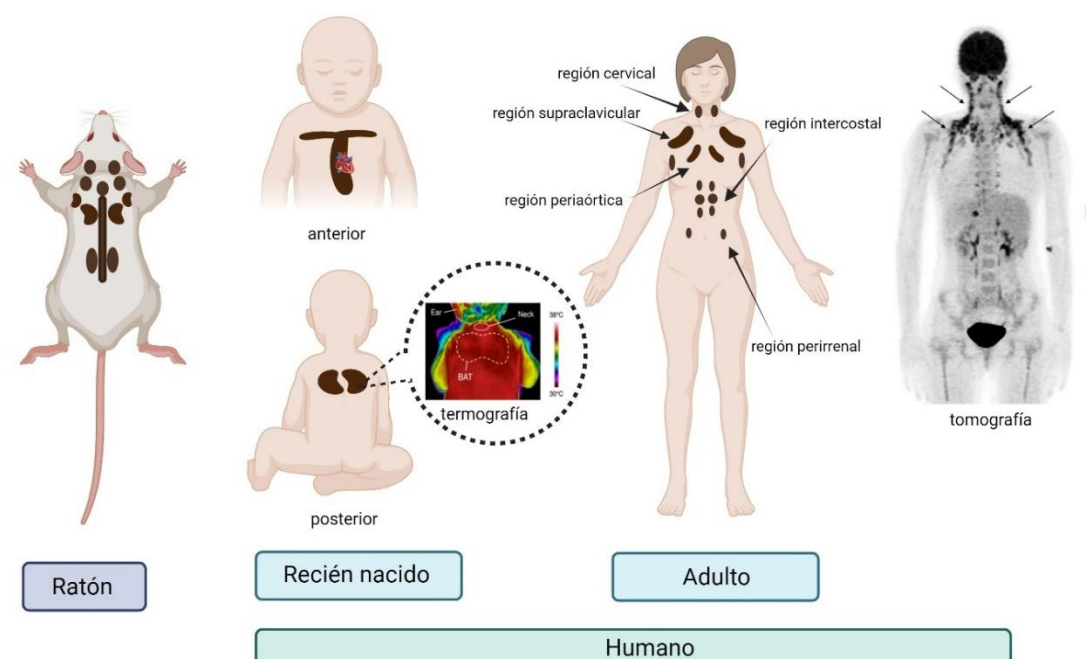


Figura 3. Localización del tejido adiposo marrón en ratones, recién nacidos y humanos adultos. Se muestran las áreas específicas donde se encuentra el tejido adiposo marrón en dos especies: ratones y humanos. En ratones el BAT se localiza principalmente en la región interescapular. En humanos recién nacidos se observa una presencia destacada del BAT en la región interescapular (plano posterior) y en las zonas periaórtica, perirrenal e intercostal (plano anterior). En humanos adultos, el tejido adiposo marrón se encuentra en áreas específicas como la región cervical, región supraclavicular, región periaórtica, región intercostal, región perirrenal. En la imagen se representan algunos métodos indirectos para cuantificar la actividad del BAT, como termografías y tomografías (Basada en Fenzl and Kiefer, 2014; Urisarri et al., 2021, elaboración mediante BioRender.com).

El BAT se compone de adipocitos marrones que se diferencian de los adipocitos del WAT (contienen una única gota lipídica para almacenar el exceso de energía metabólica, y pocas mitocondrias), ya que se caracterizan por presentar gotas lipídicas multiloculares rodeadas por una gran cantidad de mitocondrias que contienen citocromos pigmentados con hierro y que le proporcionan su coloración marrón (ver Figura 4). En las mitocondrias del resto de tejidos corporales la energía resultante del movimiento de los electrones es utilizada por la ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP. En el BAT el transporte de electrones está desacoplado de la producción de ATP y el exceso de energía se libera en forma de calor, elevando la temperatura. El BAT está extensamente innervado por parte del sistema nervioso simpático (de ahora en adelante, SNS), siendo el principal modulador de su actividad; y posee una densa vascularización que facilita la disipación del calor producido (Cannon & Nedergaard, 2004; Cypess et al., 2009; Lidell et al., 2014; van Marken Lichtenbelt et al., 2009).

Los adipocitos marrones y los blancos no sólo se distinguen morfológicamente, sino que provienen de distintas células precursoras (Sánchez-Gurmaches & Guertin, 2014; Shan et al., 2013; Timmons et al., 2007). Por otra parte, existe un fenómeno denominado *browning* del WAT, que da lugar a un segundo tipo de adipocitos marrones denominados adipocitos beige o brite, que poseen características intermedias entre los adipocitos blancos y marrones (Harms & Seale, 2013; Shabalina et al., 2013) (ver Figura 4). Su origen tiene lugar en los depósitos de WAT tras la estimulación por frío, por el SNS o por agonistas adrenérgicos (Kajimura et al., 2015; Petrovic et al., 2010; Seale et al., 2008). Se necesitan distintos factores fundamentales para inducir el *browning* o pardeamiento, tales como el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor γ*), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16, *PR domain containing 16*), la proteína 1 alfa coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α , *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*). Todos estos factores junto con UCP1 (del inglés: *uncoupling protein 1*), molécula responsable de la generación de calor mediante termogénesis no asociada a temblor, son empleados como marcadores termogénicos del *browning* del WAT, así como del BAT (Contreras et al., 2015).

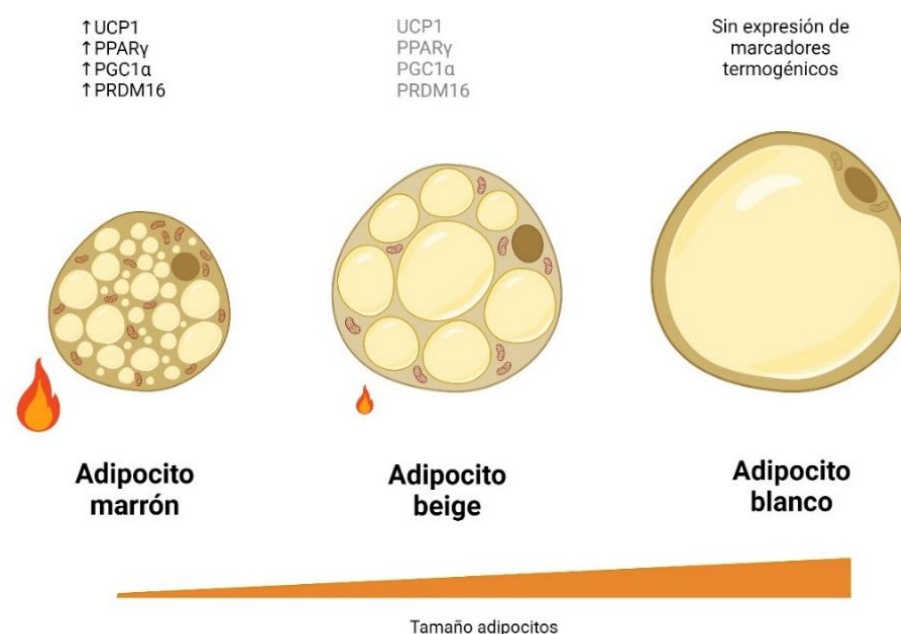


Figura 4. Representación gráfica del proceso de *browning* o pardeamiento. Mediante este proceso los adipocitos blancos se transforman en adipocitos beige, adquiriendo características intermedias entre los adipocitos blancos y los marrones (Basado en Contreras et al., 2015, elaboración propia mediante BioRender.com).

El BAT, del mismo modo que el WAT, posee una serie de funciones de almacenamiento de lípidos, pero difiere de este en su capacidad termogénica. La respuesta termogénica tiene lugar cuando la producción basal de calor es insuficiente para cubrir los requerimientos termogénicos, ocurre por ejemplo por el frío o por una dieta hipercalórica. Cuando esto ocurre, se libera norepinefrina en las terminaciones sinápticas que inervan el BAT, esta interacciona con los receptores $\beta 3$ adrenérgicos ($\beta 3$ -AR) (receptores acoplados a proteínas G) de los adipocitos marrones y los activan. Esto hace que se estimule el adenilato ciclasa (AC), con la consiguiente conversión de ATP en adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que activa la proteína quinasa A (PKA). La activación de la PKA promueve tanto el programa termogénico agudo como el crónico, mecanismos que ocurren al mismo tiempo y de manera independiente (Cannon & Nedergaard, 2004). El proceso termogénico agudo consiste en la generación inmediata de calor, siendo la molécula responsable de este fenómeno UCP1. Es capaz de desacoplar el flujo de protones de la fosforilación oxidativa, produciendo calor en vez de ATP, de la siguiente manera: UCP1 forma un dímero en la membrana interna de la mitocondria que funciona como un canal iónico que en su ciclo activo desacopla el ciclo de producción de ATP disipándose la energía como calor

(Cannon & Nedergaard, 2004; Nicholls & Locke, 1984; Silva, 2006). Los principales activadores de este proceso son los ácidos grasos que funcionan como combustible energético en forma de ácidos grasos libres (FFAs, del inglés: *Free Fatty Acids*) que provienen del almacenamiento local de triglicéridos (TGs). De hecho, el estímulo adrenérgico, así como la estimulación de PKA aumentan la actividad lipolítica a través de la activación de la triglicérido lipasa adiposa (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la monoacilglicerol lipasa (MGL), que hidrolizan de manera secuencial los TG para liberar ácidos grasos libres (González-García et al., 2020) (ver Figura 5). Sin embargo, el proceso termogénico también puede producirse en ausencia de lipólisis, apoyado por vías alternativas de alimentación, como nutrientes circulantes, ácidos grasos libres derivados de gotas lipídicas circundantes, etc. (Shin et al., 2017).

También puede tener lugar una estimulación simpática prolongada, y la activación sostenida de la PKA desencadena el programa termogénico crónico, que consiste en un programa a largo plazo que implica la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK), la cual promueve los efectos mitogénicos, la transcripción de genes y la síntesis de proteínas, estimulando la expresión de UCP1 y la proliferación y diferenciación de los adipocitos marrones (Cannon & Nedergaard, 2004) (ver Figura 5).

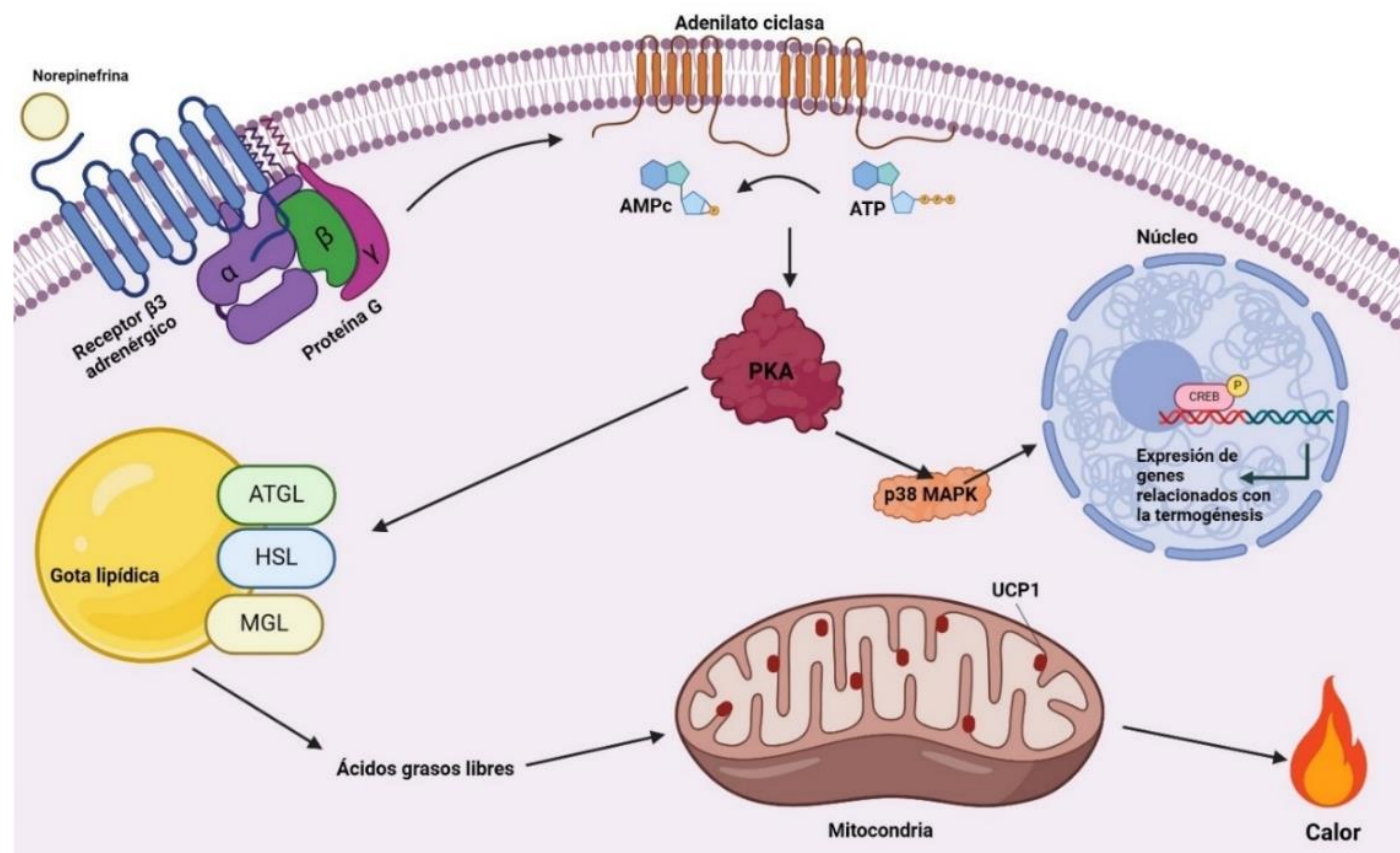


Figura 5. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. La respuesta termogénica se activa cuando la producción de calor basal es insuficiente, como en condiciones de frío o una dieta hipercalórica, liberando norepinefrina que activa los receptores β3 adrenérgicos en el BAT. Esto desencadena una cascada que culmina en la activación de la proteína quinasa A (PKA), promoviendo la generación inmediata de calor a través de UCP1 y la activación crónica de vías de transcripción y síntesis de proteínas, estimulando la expresión de UCP1 y la proliferación de adipocitos marrones. Los ácidos grasos libres, liberados por lipólisis o provenientes de otras fuentes, son los principales combustibles de este proceso (elaboración propia mediante BioRender.com).

Estudios sobre el promotor de UCP1 demuestran que las hormonas tiroideas tienen un papel clave en la regulación termogénica, ya que son capaces de activar la respiración desacoplada mediante la inducción de la expresión de UCP1, la activación de la lipólisis y, consecuentemente,

generar calor. Además, aumentan el potencial termogénico del BAT induciendo la β -oxidación de ácidos grasos, la lipogénesis, la captación de glucosa, la biogénesis mitocondrial y la autofagia (Townsend & Tseng, 2014).

2.2 REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR EL HIPOTÁLAMO

El principal centro regulador de la homeostasis energética es el sistema nervioso central (SNC), y de todas sus regiones, el hipotálamo es el principal centro de control. Este es una de las zonas del encéfalo más implicada en el control central de la alimentación y el metabolismo (Le Thuc et al., 2017). Realiza su papel a través de una vía de señales aferentes recibidas desde la periferia, las cuales dependen del estado nutricional y de vías eferentes como son el SNS el cual promueve el gasto de energía y el parasimpático (SNPS) que promueve el almacenamiento de esta (Brooks, 1988). El hipotálamo se encuentra ubicado bajo el tálamo y está formado por grupos neuronales llamados núcleos, los cuales forman circuitos neuronales altamente conservados que son sensibles a nutrientes y hormonas. Además, modifican la expresión, secreción y actividad tanto de neurotransmisores como de neuromoduladores específicos, que dan lugar a cambios en el metabolismo energético, control metabólico y gasto de la energía, balance hídrico y electrolítico, termorregulación, ciclos de vigilia-sueño, respuestas al estrés y la reproducción, entre otros (López et al., 2007; Morton et al., 2006; Saper & Lowell, 2014). Hay doce núcleos hipotalámicos, pero en la presente tesis doctoral se hará referencia solamente a cuatro de ellos, junto con el área hipotalámica lateral (LHA), por ser los más relevantes en el control del balance energético. Cada uno de estos núcleos está formado por poblaciones de neuronas distintas que los dotarán de funcionalidades diferentes, estos son: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular (PVH) (ver Figura 6).

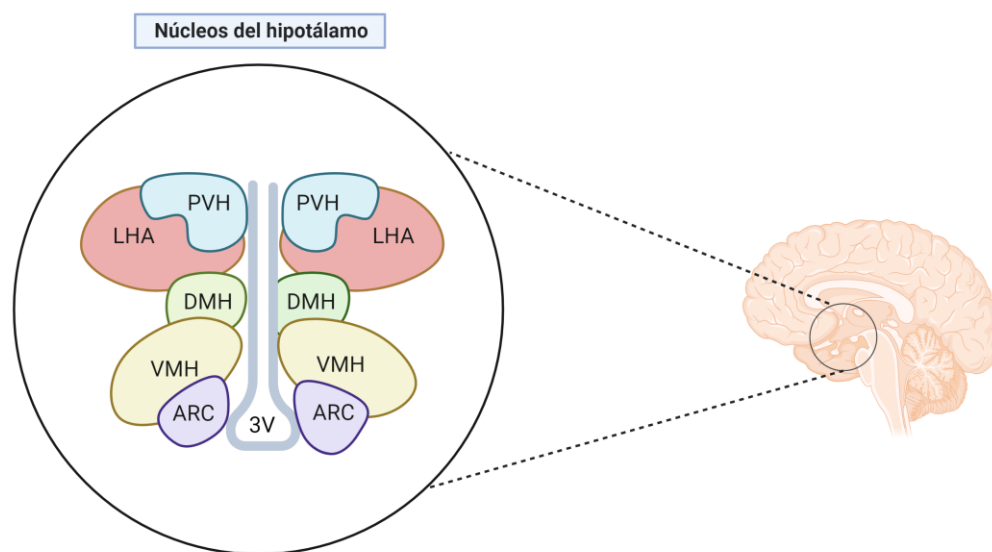


Figura 6. Distribución de los distintos núcleos hipotalámicos. Se representan el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular (PVH), junto con el área hipotalámica lateral (LHA), ya que son los más importantes en el control del balance energético (elaboración propia mediante BioRender.com).

El ARC se localiza en el hipotálamo medio-basal, a ambos lados de la base del tercer ventrículo y adyacente a la eminencia media. Es una región del cerebro que permite el paso de señales circulantes, porque la barrera hematoencefálica (BBB) es semipermeable en ese punto, dando respuesta a las fluctuaciones hormonales y nutricionales del organismo (López et al., 2007; Simpson et al., 2009). Se compone de poblaciones neuronales muy heterogéneas, aunque se pueden distinguir dos poblaciones principales, las cuales realizan funciones antagónicas en cuanto a la regulación del balance energético. Se trata de las neuronas AgRP (por su nombre en inglés agouti-related protein o proteína relacionada con el agutí

en castellano) y las neuronas POMC (proopiomelanocortina). Las primeras son neuronas que co-expresan el neuropéptido Y (NPY) y su función es orexigénica, es decir estimulan la ingesta de alimentos y por lo tanto incrementan la masa corporal promoviendo un balance energético positivo (Ollmann et al., 1997). Sin embargo, el otro grupo neuronal, las POMC/CART, realizan el efecto opuesto porque son neuronas anorexigénicas, esto significa que disminuyen la ingesta de alimentos y por lo tanto la masa corporal favoreciendo el balance energético negativo (Quarta et al., 2021; Yaswen et al., 1999). Mayoritariamente las neuronas de este núcleo expresan receptores de leptina e insulina (Tartaglia et al., 1995; Werther et al., 1990). Estas hormonas inhiben las neuronas NPY/AgRP y activan POMC/CART (Elias et al., 1999). Sin embargo, la hormona ghrelina realiza la acción contraria, estimulando la actividad de NPY/AgRP y disminuyendo la de POMC/CART (Kojima et al., 1999; Shintani et al., 2001).

El VMH tiene forma elíptica y se encuentra situado en la región tuberal del hipotálamo justo por encima del ARC y adyacente al tercer ventrículo. Junto con el ARC constituye la región mediobasal hipotalámica (MBH). Aunque hoy en día su papel en la regulación del apetito y el peso corporal está firmemente establecido, llegar a esta conclusión fue un largo camino. Las primeras informaciones acerca de su posible rol se remontan a comienzos del siglo XX y provienen de observaciones clínicas de pacientes con daño hipotalámico (Erdheim J, 1904). Más tarde, se confirmaron dichos hallazgos tras realizar experimentos en ratas a las que se les causaban lesiones electrolíticas dirigidas que desembocaban en hiperfagia y en obesidad (Hetherington & Ranson, 1940); por ello este núcleo en los años cuarenta se describió como “centro de saciedad” (Hetherington & Ranson, 1940). Actualmente se sabe que está implicado también en funciones homeostáticas y conductuales, tales como el comportamiento sexual femenino, alimentación, balance energético y la función cardiovascular (McClellan et al., 2006; Shimogawa et al., 2014). Alberga una mezcla heterogénea de células que se diferencian por la expresión de diferentes marcadores, tales como: el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisis (PACAP), óxido nítrico sintasa 1 (NOS1), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), receptor de estrógenos alfa (ER α), receptor de la leptina (LepR) y factor esteroideogénico 1 (SF1) (ver Figura 7) (Borg et al., 1995; Fosch et al., 2021; Kim, 2008; Segal et al., 2005). SF1 está codificado por gen Nr5a1 y se considera un marcador exclusivo del VMH, aunque se puede detectar su expresión fuera del SNC en zonas como las glándulas suprarrenales y las gónadas. Su función es actuar como regulador transcripcional crucial para el correcto desarrollo de las regiones previamente mencionadas (Davis et al., 2013; Fosch et al., 2021; Parker, 2002).

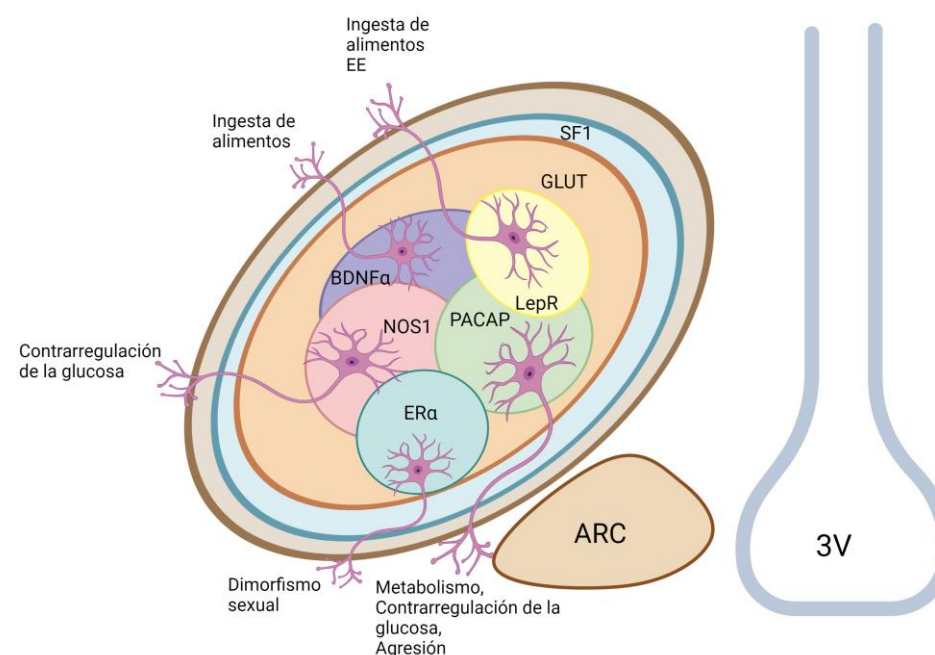


Figura 7. Representación de las poblaciones neuronales del VMH involucradas en diferentes respuestas homeostáticas y conductuales. La mayoría de las células del VMH expresan el receptor SF1 y la mayoría son glutamatérgicas. Además, expresan distintos marcadores como el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), la sintasa de óxido nítrico 1 (NOS1), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el receptor de estrógeno alfa (ER α) y el receptor de leptina (LepR) (elaboración propia mediante BioRender.com).

El núcleo ventromedial recibe numerosas proyecciones de otros núcleos hipotalámicos, por ejemplo, de las neuronas NPY, AgRP y POMC desde el ARC, por este motivo se considera un elemento integrador de señales periféricas (Simpson et al., 2009). Contiene receptores que responden a dopamina, serotonina, GABA, histamina e incluso posee una gran población neuronal que es capaz de responder a la glucosa, mediando efectos de la leptina, insulina y ghrelina (Shimogawa et al., 2014).

La primera implicación de este núcleo en la regulación del metabolismo de la glucosa, se obtuvo de estudios clásicos que midieron cambios en la actividad eléctrica del VMH de conejos después de la infusión intravenosa de glucosa; estos experimentos demostraron que la estimulación eléctrica del VMH conduce a una mayor producción de glucosa mediante la degradación del glucógeno hepático y a una mayor absorción de la glucosa por parte de los tejidos periféricos, tales como tejido adiposo pardo, corazón y el músculo esquelético, a través de la activación simpática. Estudios posteriores mostraron que el VMH juega un papel crítico en la contra-regulación de la hipoglucemia (CRR), que consiste en una respuesta neuroendocrina a los niveles bajos de glucosa disminuyendo los niveles de insulina y aumentando los niveles de glucagón, noradrenalina, glucocorticoides y hormona de crecimiento (W. P. Borg et al., 1994). Lesiones químicas en el VMH suprimieron la CRR endocrina después de la hipoglucemia en ratas.

El VMH también participa en comportamientos sociales como el conducta agresiva y sexual. El comportamiento agresivo se conserva en todas las especies y está implicado en la autoconservación, como por ejemplo mediante la adaptación de la búsqueda de alimentos y el dominio territorial. Diversas investigaciones observaron que la inhibición química u optogenética de las neuronas $Er\alpha$ en el VMH de roedores muestran una reducción en el comportamiento de ataque agresivo; por lo tanto, está bien establecido que la destrucción del VMH reduce la agresión/miedo y aumenta el peso corporal (Fosch et al., 2021). En cuanto al comportamiento sexual, ya se observó en los primeros estudios de lesiones que este núcleo participa en la modulación del comportamiento sexual en ratas hembra (Mathews & Edwards, 1977), observándose que el VMH es crucial en la modulación del reflejo de lordosis femenina que requiere un apareamiento exitoso (Goy & Phoenix, 1963). También se ha observado que la desactivación de las neuronas SF1 afectó tanto a la fertilidad como al comportamiento reproductivo en ratones hembra, bloqueando la acción del estrógeno y la progesterona para impulsar el comportamiento sexual (Powers, 1970). En los machos se observó que el VMH era crucial para comportamientos del tipo socio-sexual como el marcado de olores y las preferencias de pareja (Harding & McGinnis, 2005).

Además, el VMH ejerce un papel en la regulación del gasto energético. La primera evidencia de ello se obtuvo mediante estímulos eléctricos en este núcleo, los cuales activaban la temperatura en el BAT interescapular, efecto que era silenciado al bloquear los receptores β - adrenérgicos (Perkins et al., 1981). Hoy en día se sabe que el VMH integra señales periféricas con la finalidad de coordinar la respuesta termogénica, lo hace modulando el tono simpático al BAT y WAT mediante la conexión anatómica existente con estos tejidos (Cano et al., 2003; Uno & Shibata, 2001). Señales periféricas, como las hormonas tiroideas (TH, thyroid hormone) actúan sobre su receptor α ($TR\alpha$) en el VMH para inducir la lipogénesis hepática (a través del sistema nervioso parasimpático) y activar la termogénesis del tejido adiposo pardo (a través del sistema nervioso simpático) (Khodai & Luckman, 2021). Efectos similares se producen al eliminar la isoforma de proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMP), $AMPK\alpha1$, en las neuronas SF1 (Martínez-Sánchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018).

El LHA se encuentra situado adyacente al VMH rodeando la zona situada enfrente del tercer ventrículo. Es considerado como “el centro de la ingesta” por su papel esencial en la regulación de la masa corporal y la ingesta. Participa en la regulación de los ejes hipotálamo-hipofisario, homeostasis de la glucosa, regulación de la sed, en los ciclos de sueño vigilia e incluso en funciones como el aprendizaje, emoción y memoria (Fernø et al., 2015). Está formado principalmente por dos poblaciones neuronales, las neuronas de orexina (OX) y las neuronas MCH (MCH, melanin-concentrating hormone), ambos son neuropéptidos orexigénicos que estimulan la ingesta. Las neuronas de este núcleo proyectan a otros núcleos hipotalámicos y al sistema mesolímbico que modula la parte hedónica de la ingesta (Brown et al., 2015; Gao & Horvath, 2014; López, Varela, et al., 2010; Sakurai, 2014).

El núcleo dorsomedial (DMH) se encuentra a ambos lados del tercer ventrículo, de forma dorsal al VMH y ventral al núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH). El DMH presenta dos regiones distintas, una zona difusa y otra compacta; y participa en numerosos procesos fisiológicos, tales como la termorregulación, la modulación de los ritmos circadianos, la regulación del apetito y el estrés. Recibe proyecciones neuronales del ARC y envía proyecciones al PVH y al VMH (Fekete et al., 2002).

El PVH está situado en la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. Presenta dos poblaciones neuronales de gran importancia, unas expresan la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la cual regula eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo, además de poseer una acción anorexigénica (López et al., 2013). La otra población expresa la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que tiene un efecto anorexigénico, además de regular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Krahn et al., 1988; Mönnikes et al., 1992). Todo esto, hace que el PVH tenga un rol importante en la integración de la ingesta de alimentos y en la función neuroendocrina.

3 PAPEL METABÓLICO DEL HÍGADO

La ingesta de alimentos y el gasto de energía están estrechamente regulados por mecanismos homeostáticos que implican una interacción entre el cerebro y los tejidos periféricos. En concreto el hígado tiene un papel esencial en los procesos metabólicos implicados en la homeostasis energética, porque se encarga del procesamiento inicial de los nutrientes para que puedan ser distribuidos al resto del organismo (Bruinstroop et al., 2014). Participa en el metabolismo de aminoácidos y lípidos, como una glándula exocrina responsable de la producción de ácidos biliares. Además, es órgano central de procesos como el principal órgano en el que ocurre la lipogénesis, gluconeogénesis y en el metabolismo del colesterol; y es el principal lugar de síntesis, metabolismo, almacenamiento y redistribución de carbohidratos, proteínas y lípidos (Bechmann et al., 2012).

Las funciones del hígado se regulan, a nivel central, mediante el nervio vago del SNPS y su balance metabólico es regulado por insulina y glucagón que actúan de manera directa sobre él para conseguir un control de la actividad de las rutas metabólicas de los hidratos de carbono y de los lípidos. Además, el hígado se comunica con otros tejidos, incluido el SNC, mediante la secreción de un grupo de señales proteicas llamadas hepatokinas. Estas sustancias tienen como misión informar al organismo del estado metabólico del hígado y provocar la respuesta homeostática para corregir alteraciones en su función (Bechmann et al., 2012).

3.1 METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

Como se ha mencionado con anterioridad existen diferentes formas de almacenaje de energía, pero en mamíferos la principal manera de almacenaje es la grasa. Una gran variedad de órganos y tejidos están implicados en su metabolismo, tales como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado (Bechmann et al., 2012).

El metabolismo lipídico comienza con la ingesta de grasas, que son lípidos en forma de triglicéridos (TG), es decir están formados por tres ácidos grasos esterificados en un esqueleto de glicerol. Los TG se digieren a lo largo del tracto digestivo o bien por acción de diferentes lipasas y de las sales biliares se emulsionan dando lugar a diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MG) y ácidos grasos libres (AG libres). Posteriormente, en los enterocitos intestinales, son nuevamente esterificados dando lugar a TG y que, junto con el colesterol de la dieta, los fosfolípidos y ciertas apoproteínas, forman quilomicrones. Estos se desplazan desde la mucosa intestinal hacia el sistema linfático, allí son drenados a la circulación sanguínea y se asocian con apolipoproteínas. Esta unión produce la digestión de los TG de los quilomicrones descomponiéndolos en AG y glicerol, los cuales se capturan y almacenan en los adipocitos o son oxidados en el músculo (Iqbal & Hussain, 2009).

En estado de demanda energética, los TG que se encuentran almacenados en el tejido adiposo se liberan en forma de ácidos grasos, gracias al proceso de lipólisis, y se transportan a la circulación como AG libres unidos a la albúmina. Todos los AG liberados al torrente sanguíneo se incorporan al hígado a través de la vena porta. En el hígado se re-esterifican con glicerol-3-fosfato para generar de nuevo TG y se almacenan en gotas lipídicas en el hepatocito o son metabolizados y procesados. La elasticidad hepática en cuanto a la capacidad de almacenar TG permite neutralizar la toxicidad que generan los AG libres, en condiciones normales, pero cuando existen alteraciones metabólicas pueden dar lugar o predisponer a patologías como diabetes mellitus tipo 2 o resistencia insulina (Frayn et al., 2006; Gibbons, 1990).

3.1.1 LIPOGÉNESIS DE NOVO HEPÁTICA

El mecanismo de producción de hepática de lípidos se denomina lipogénesis de novo (LDN), en ella participan numerosas enzimas, hormonas, receptores nucleares, vías de señalización intracelulares y factores de transcripción. Las dos enzimas principales de este mecanismo son: la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y el ácido graso sintetasa (FAS). El acetil-CoA producido de un derivado de la glucosa o carbohidratos,

se transforma en malonil-CoA por acción de la enzima ACC. El malonil-CoA se transforma en palmitato tras una serie de reacción llevadas a cabo por FAS (Li et al., 2010)

Los niveles de glucosa e insulina son claves en la regulación de la LDN, ya que activan factores de transcripción esenciales para el proceso. La glucosa en los hepatocitos promueve la lipogénesis y regula de forma positiva la expresión de múltiples genes involucradas en la síntesis de AG como son ACC y FAS. Del mismo modo, también incrementa la expresión de genes que participan en la glucólisis: piruvato quinasa (PK) y piruvato deshidrogenasa (PDH). La insulina se activa a través de la vía de señalización de AKT que promueve la liberación de un factor de transcripción, llamado SREBP1c de la membrana del aparato de Golgi. Este en su forma inmadura se encuentra unido a dos proteínas de membrana del retículo endoplasmático: SCAP (proteína activada por clivaje de SREBP) e INSIG (proteína inducida por insulina). Debido a la unión de esteroides o como resultado de eventos de fosforilación, SCAP cambia de conformación provocando que INSIG se disocie del complejo SCAP-SREBP1c y expone una secuencia de aminoácidos que facilita el traslado del complejo SCAP-SREBP1c al Golgi. En él, SREBP1c experimenta un clivaje en dos pasos por la proteasa del sitio 1 (S1P) y la proteasa del sitio 2 (S2P) las cuales son necesarias para la maduración de SREBP1c. La activación de SREBP1c ocurre de dos formas distintas, por una fosforilación de este o por la activación del receptor X hepático (LXR). Al activarse se transloca al núcleo donde se promueve la transcripción de genes lipolíticos tales como FAS y ACC (Sanders & Griffin, 2016) (ver Figura 8).

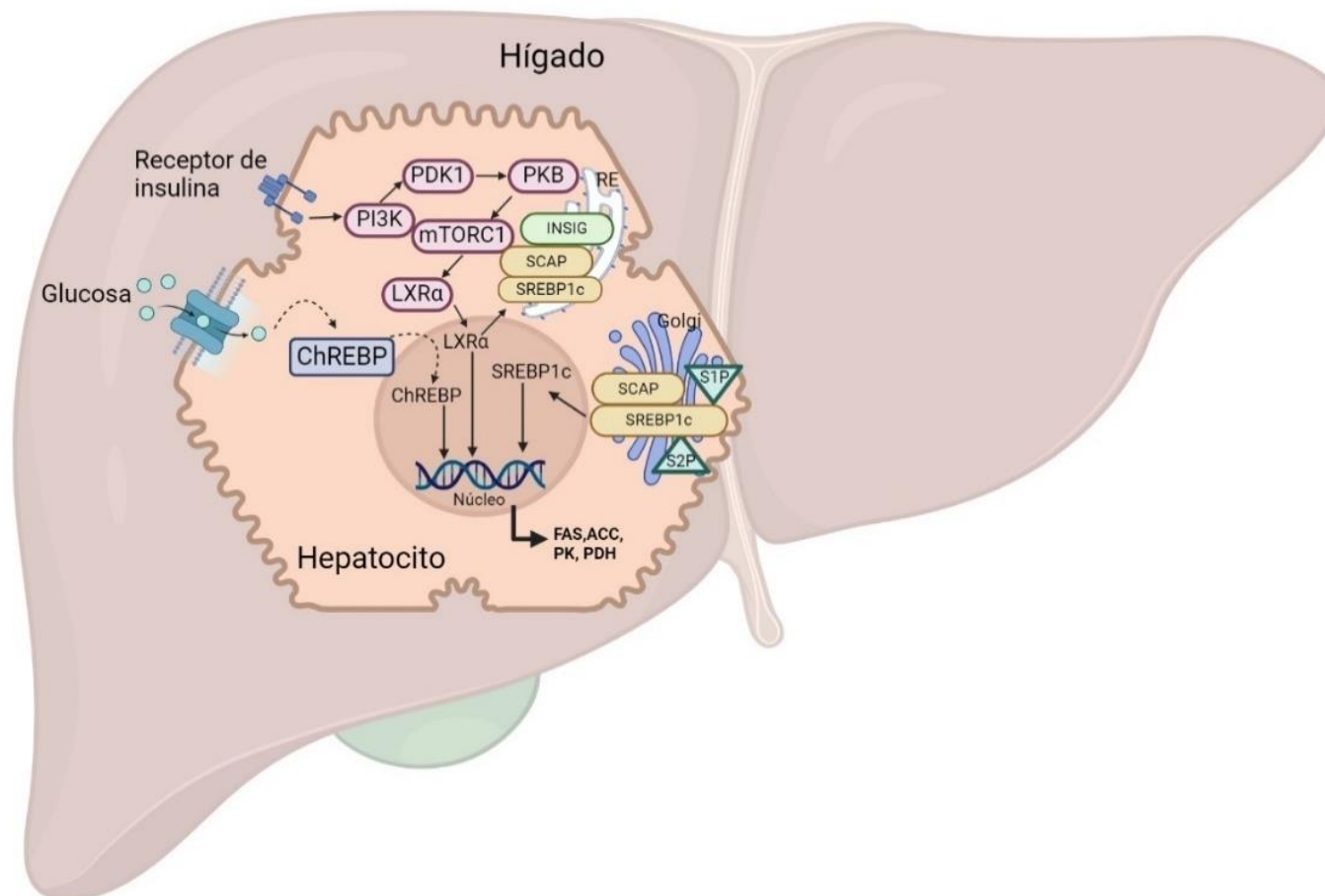


Figura 8. Lipogénesis de novo hepática. Está regulada por glucosa e insulina e implica la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA por ACC y luego en palmitato por FAS. La glucosa activa la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y glucólisis, mientras que la insulina activa la vía AKT, liberando el factor de transcripción SREBP1c, que promueve la transcripción de genes lipolíticos como FAS y ACC. (elaboración propia mediante BioRender.com).

3.1.2 OXIDACIÓN HEPÁTICA DE ÁCIDOS GRASOS

Los AG, bien los derivados de la hidrólisis de los depósitos de TG hepáticos provenientes de la LDN o de los lípidos circulantes, se oxidan por múltiples vías para generar energía. Ocurre principalmente en la mitocondria, aunque también puede tener lugar en los peroxisomas y el RE. En la oxidación mitocondrial los ácidos grasos se descomponen en ácidos grasos de cadenas más cortas por una serie de deshidrogenasas en un proceso que se denomina β -oxidación. Los ácidos grasos de cadena muy larga (C20-C26) y ramificada deben sufrir una primera oxidación en los peroxisomas antes de entrar en la mitocondria (Cherkaoui-Malki et al., 2012). En ella dos enzimas denominadas carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2 (CPT1 y CPT2) ayudan a los ácidos grasos a entrar en la mitocondria. La CPT1 se encuentra en la membrana mitocondrial externa y agrega un aminoácido llamado carnitina a los ácidos grasos para transportarlos hacia el interior de las mitocondrias. En la membrana interna la CPT2 elimina la carnitina, translocando el ácido graso (Ramsay et al., 2001). La expresión de CPT1 es un mecanismo muy regulado, ya que es la encargada de controlar el flujo de ácidos grasos hacia la mitocondria. El receptor activado por el proliferador de peroxisomas α (PPAR α) induce la expresión de CPT1 y de otros genes implicados en la oxidación de AG, mientras el manolil-CoA, es un inhibidor alostérico de CPT1 (McGarry & Brown, 1997). El proceso de oxidación termina cuando el acetil-CoA es liberado y puede entrar en el ciclo del ácido cítrico que tiene lugar en la mitocondria, en el cual se oxida en agua y dióxido de carbono o se condensa en cuerpos cetónicos, los cuales funcionan de sustratos energéticos oxidables para tejidos extrahepáticos (McGarry & Brown, 1997) (ver Figura 9).

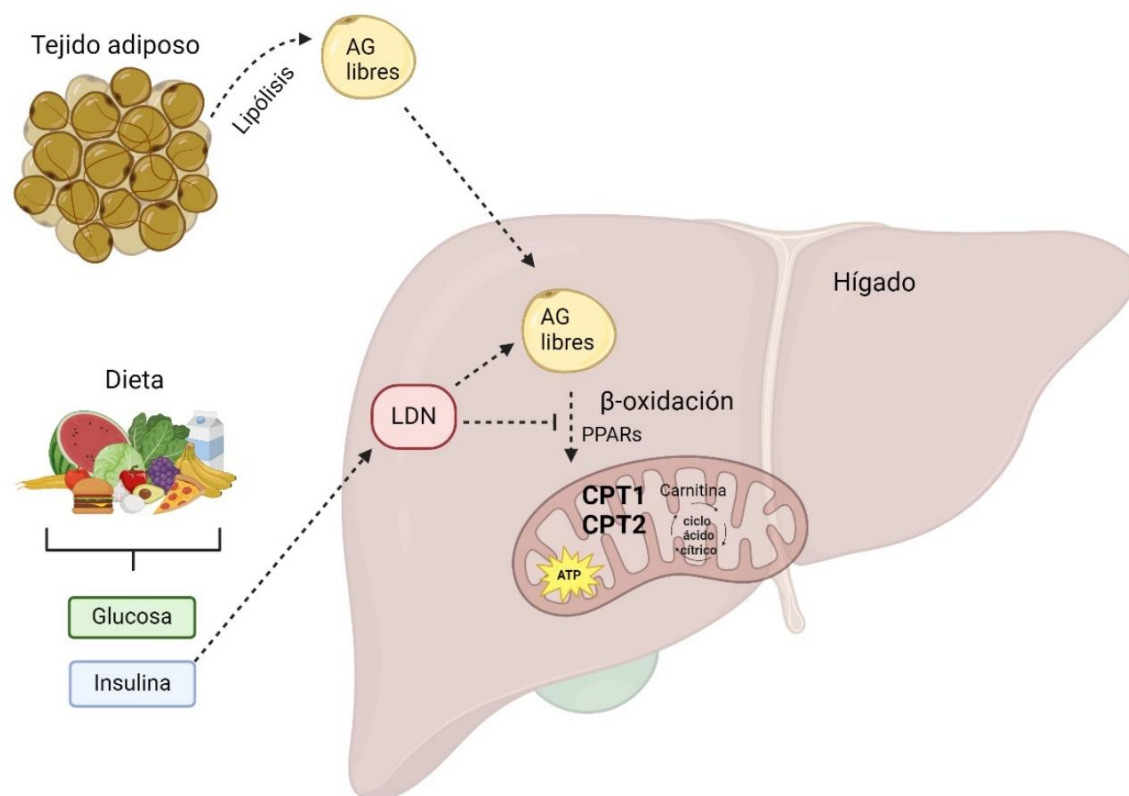


Figura 9. Oxidación hepática de ácidos grasos. Los ácidos grasos, provenientes de la hidrólisis de triglicéridos hepáticos o lípidos circulantes, se oxidan principalmente en la mitocondria a través de la β -oxidación para generar energía, con la ayuda de las enzimas CPT1 y CPT2. Los ácidos grasos de cadena muy larga se oxidan primero en los peroxisomas antes de ingresar a la mitocondria. La oxidación culmina con la conversión de acetil-CoA en energía a través del ciclo del ácido cítrico o en cuerpos cetónicos para uso en tejidos extrahepáticos (elaboración propia mediante BioRender.com).

4 JNK, REGULADOR METABÓLICO

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, la patogenia de la obesidad plantea un desafío importante para el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo. Hoy en día, hay una enorme cantidad de evidencias experimentales que demuestran que la inflamación crónica está ligada a la homeostasis metabólica alterada en la obesidad (Costanzo-Garvey et al., 2009; Hotamisligil, 2006; Osborn & Olefsky, 2012). En este sentido cobran gran relevancia las proteínas kinasas c-JUN amino terminales (JNKs), también conocidas como kinasas activadas por estrés (SAPKs, del inglés: *stress-activated protein kinases*) constituyen una de las vías de señalización que se activa en obesidad y contribuye a la homeostasis metabólica alterada (Pal et al., 2016).

Las JNKs son serinas/treonina kinasas que reciben su nombre por su capacidad para fosforilar y activar la proteína cJun, la cual, tras combinarse con la proteína c-Fos, conforma el factor de transcripción AP-1, que controla la expresión de numerosos genes, incluidas las citocinas proinflamatorias (Pal et al., 2016). Son miembros de la familia de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen activated protein kinase*) y se activan mediante una amplia variedad de estímulos que inducen estrés (como factores de crecimiento, citocinas, radiación ultravioleta, especies reactivas de oxígeno, etc.). Estos factores regulan a una serie de kinasas MAP3Ks que activan a dos kinasas MAP2Ks, (MKK4 y MKK7), que a su vez activan JNKs mediante fosforilación en un residuo de tirosina y otro de treonina. Una vez activadas las JNKs median la adaptación celular al estrés mediante la fosforilación de varios sustratos, incluidas otras quinasas, factores de transcripción, proteínas andamio y factores de elongación e iniciación (c-FOS, c-JUN, ELK1, JUND, AP-1) (Ver figura 10) (Sabio & Davis, 2014).

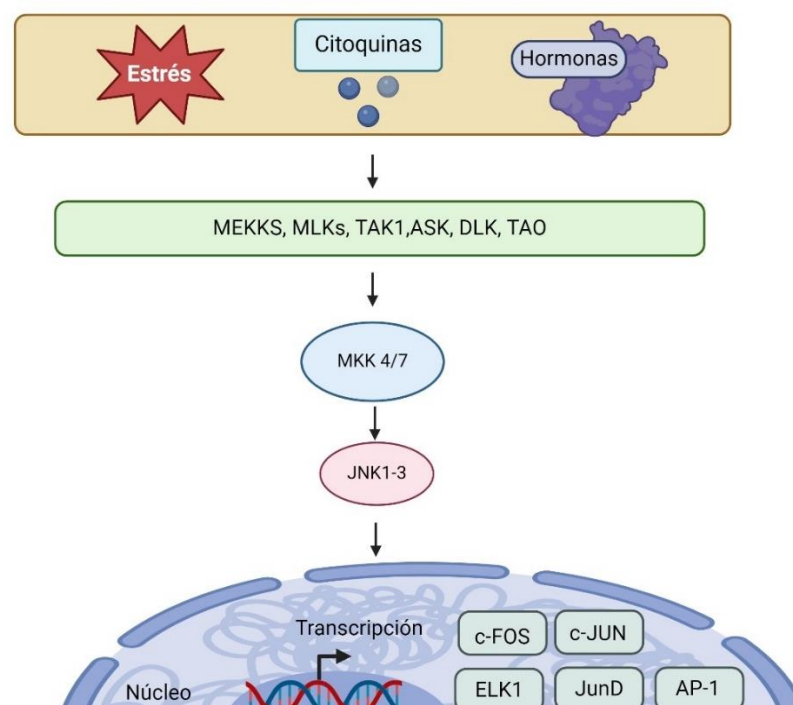


Figura 10. Cascada de señalización JNK. Se trata de una cascada canónica que consiste en una quinasa de quinasa de MAPK (MAP3K), una quinasa de MAPK (MAP2K) y una MAPK. Se activa ante una amplia variedad de estímulos que inducen estrés. Las quinasas MAP pueden fosforilar objetivos aguas abajo, incluidos quinasas de proteínas, sustratos citosólicos y factores de transcripción (elaboración propia mediante BioRender.com).

Las proteínas JNK constan de 3 isoformas que a su vez están codificadas por tres genes diferentes: JNK1 (Mapk8), JNK2 (Mapk9) y JNK3 (Mapk10); los dos primeros se expresan de forma ubicua, pero JNK3 tiene su expresión restringida al cerebro, los testículos, corazón y las células β pancreáticas (Davis, 2000; Seki et al., 2012). Aumentando la complejidad estos genes se empalman alternativamente para generar diez isoformas de JNK (Nikolic et al., 2020).

4.1 EL PAPEL DE LAS JNK EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

El papel de las JNK en la regulación del equilibrio energético de todo el cuerpo y las enfermedades relacionadas con la obesidad se ha estudiado ampliamente en relación con los tejidos metabólicos periféricos, la activación de las JNK se asocia con la obesidad crónica (Nogueiras & Sabio, 2021).

En el tejido adiposo, JNK1 controla la expresión de IL-6 (*interleucina -6*) y esto hace que en condiciones de obesidad aumente el contenido de lípidos en el hígado, desarrollando esteatosis hepática y resistencia a insulina (Sabio et al., 2008). También es importante destacar que JNK1 en el tejido adiposo inhibe la secreción de adiponectina, lo que a su vez afecta a la incidencia de cáncer de hígado y contribuye a la interacción entre el tejido adiposo y el hígado (Manieri et al., 2019). Por ejemplo, la falta de JNK1 en el tejido adiposo en ratones resulta en concentraciones aumentadas de adiponectina en sangre (Manieri et al., 2019). Sin embargo, JNK en los adipocitos se activa por la testosterona, y por lo tanto se activa de manera diferente en hombres y mujeres. Esta activación diferencial de JNK1 en el tejido adiposo podría subyacer al dimorfismo sexual observado en los niveles de adiponectina en sangre, donde los ratones hembra tienen una mayor activación de JNK en los adipocitos y niveles más altos de adiponectina en sangre que los ratones macho (Manieri et al., 2019). Niveles más altos de adiponectina en ratones macho que carecen de JNK1 en los adipocitos están asociados con una menor incidencia de carcinoma hepatocelular (CHC) en comparación con ratones macho control que expresan JNK1 (Manieri et al., 2019). En un estudio de 2016 se obtuvieron datos muy intrigantes sobre el papel diferencial del “*splicing*” alternativo de JNK en el control del “*browning*” del tejido adiposo. La expresión de NOVA (un factor de “*splicing*” de pre-ARNm de JNK) aumenta la expresión de JNK1 β y JNK2 α , conduce a obesidad. Esto se debe a que NOVA del tejido adiposo disminuye la termogénesis y el “*browning*” del WAT, lo que se traduce en un menor gasto energético e intolerancia aumentada a la glucosa. Estos resultados sugirieron que la proporción entre las variantes de “*splicing*” JNK1 y JNK2 α Y β es un determinante crucial de la actividad total de JNK en tejidos como el adiposo y el hepático (Vernia et al., 2016).

En el músculo, se ha documentado una actividad de JNK más alta en biopsias de músculo esquelético obtenidas de individuos con resistencia a la insulina y obesidad que aquellas obtenidas de individuos que son más delgados y sensibles a la insulina (Carvalho et al., 2013). Estos datos humanos fueron confirmados con modelos de ratón, se encontró que la resistencia a la insulina en el músculo esquelético durante la obesidad es desencadenada por la inflamación y TNF. La acción de TNF activa la IKK β , JNK y p38 lo que desencadena en la fosforilación del receptor de insulina, provocando una señalización de insulina deteriorada y una reducción en la captación de glucosa inducida por la insulina (Aguirre et al., 2000; de Alvaro et al., 2004). Además, la eliminación de JNK1 en el músculo en ratones reduce la resistencia a la insulina inducida por la dieta en el músculo esquelético, sin embargo, estos ratones también tienen un aumento en la esteatosis hepática e inflamación en el tejido adiposo. La sobreexpresión de JNK activa constitutivamente en el músculo esquelético en ratones reduce el aclaramiento de glucosa estimulado por insulina y la acción de la insulina, disminuye la fosforilación inducida por insulina del receptor de insulina (Henstridge et al., 2012). Sin embargo, otro estudio encontró que ni la expresión constitutivamente activa de JNK1, ni la interrupción específica de JNK1 en el músculo esquelético alteran la composición corporal, el gasto energético o el metabolismo de la glucosa y la insulina, lo que sugiere que JNK1 no es necesario para la resistencia a la insulina inducida por la dieta en el músculo esquelético (Pal et al., 2013). Se necesitan más estudios para descubrir el papel de la familia de las JNK en el metabolismo muscular.

En el páncreas, JNK1 y JNK2 poseen funciones proapoptóticas en los islotes pancreáticos. En contraste JNK3 tiene una acción beneficiosa y de supervivencia en las células secretoras de insulina, especialmente durante el trasplante de islotes (Abdelli et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que JNK2 de las células T contribuye al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 (Jaeschke et al., 2005).

En el hígado, como en la mayoría de los tejidos los miembros de la familia JNK expresados son JNK1 y JNK2 y existe una redundancia funcional entre ellos. Con el objetivo de definir los roles de estas proteínas, durante la última década se han realizado varios estudios empleando modelos con eliminación específica de hepatocitos. Por ejemplo, los ratones carentes de JNK1 en hepatocitos desarrollan esteatosis y resistencia a insulina cuando se alimentan con una dieta estándar (Sabio et al., 2009). Sin embargo, la eliminación de JNK1 en los hepatocitos en animales alimentados

con una dieta alta en grasas no tiene un efecto preventivo en la acumulación de lípidos en el hígado o en la resistencia a la insulina, ya que los ratones con eliminación específica de JNK1 en hepatocitos desarrollan esteatosis y resistencia insulina en la misma medida que los ratones de tipo salvaje alimentados con HFD (Sabio et al., 2009). Por el contrario, la eliminación simultánea de JNK1 y JNK2 en hepatocitos protege contra la esteatosis inducida por una dieta rica en grasas y la intolerancia a la glucosa e insulina, sugiriendo un papel crítico en el metabolismo hepático para JNK2 (Vernia et al., 2014). Sin embargo, la eliminación específica de JNK2 en el hígado solo mejora modestamente la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Curiosamente la eliminación combinada de JNK1 y JNK2 aumenta la vía PPAR, lo que lleva a un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos y una disminución de la esteatosis hepática inducida por una dieta rica en grasas. Todo ello indica que la activación de JNK1 en hepatocitos no es necesaria para el desarrollo de la esteatosis inducida por la obesidad. Sin embargo, las funciones coordinadas de JNK1 y JNK2 tienen un papel fundamental en las consecuencias metabólicas hepáticas de una dieta rica en grasas (Vernia et al., 2014). Además, las acciones combinadas de JNK1 y JNK2 también son críticas para proteger contra la lesión hepático-tóxica (Cubero et al., 2016). Se demostró el importante papel de las JNK hepáticas en modelos de ratones que carecen de sus quinasas de activación. Por ejemplo, los ratones que carecen de la quinasa de linaje mixto 3 (MLK3) tienen una baja activación de JNK en el hígado y están protegidos contra la obesidad y esteatosis inducidas por la dieta (Ibrahim et al., 2014).

La esteatopatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) es la forma más grave de enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés). Se caracteriza por esteatosis, inflamación hepática y degeneración de los hepatocitos (Nikolic et al., 2020). Se conoce que la fosforilación de JNK en el hígado aumenta la progresión de NAFLD a NASH en humanos y esta activación se asocia con la inducción de estrés oxidativo, resistencia a la insulina hepática e inflamación en los pacientes. Varios estudios indican que la inhibición de JNK podría proteger contra la esteatohepatitis. Por ejemplo, la eliminación de JNK1 en las células estrelladas hepáticas activadas (son críticas para la fibrosis hepática durante la NASH) primarias de ratón previene la transdiferenciación y aumenta la apoptosis, destacando así el papel profibrótico de JNK1 (Zhao et al., 2014).

El cáncer de hígado es la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer (Tomás-Loba et al., 2019). La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de hígado, probablemente porque puede resultar en NAFLD, inflamación y cirrosis (Font-Burgada et al., 2016), todos ellos involucran la actividad de JNK (Tomás-Loba et al., 2019). Los ratones knockout globales para JNK1 están protegidos contra el carcinoma hepatocelular inducido químicamente y esta protección podría depender de la falta de JNK1 en el compartimento mieloide, porque la eliminación específica de JNK1 y JNK2 en estas células protege contra este tipo de cáncer en ratones (Hui et al., 2008). Por el contrario, la eliminación de JNK1 y JNK2 en hepatocitos resulta de una mayor carga de la enfermedad (Han et al., 2016).

4.2 EL PAPEL DE JNK EN EL HIPOTÁLAMO Y LA HIPÓFISIS

En mamíferos se ha observado que la expresión de JNK es mayor en el cerebro que en cualquier otro tejido, sugiriendo que estas kinasas son claves en el SNC (Kuan et al., 2003). Sin embargo, las funciones de las JNKs en el cerebro están menos estudiadas que en el resto de los tejidos periféricos (Nogueiras & Sabio, 2021), pero a pesar de ello se ha demostrado la activación de las JNKs en el hipotálamo bajo condiciones de estrés nutricional en varios modelos animales. Un ejemplo de ello, son los estudios realizados en ratones en los que se alimentaron a las madres con HFD durante la gestación y la lactancia, lo que conllevó un aumento de JNK hipotalámica e inflamación de la descendencia el día 21 después del nacimiento; hecho que aceleró el aumento de peso y la grasa corporal, así como una alteración en la tolerancia a la glucosa (Rother et al., 2012). Experimentos realizados en ratas adultas alimentadas con HFD, aumentaron la actividad hipotalámica total de las JNKs, y el tratamiento intracerebroventricular con un inhibidor específico de JNK (SP600125) restableció la señalización de la insulina, redujo la ingesta de energía y la pérdida de peso (De Souza et al., 2005). Se obtuvieron resultados similares con otro inhibidor SR3306 de pa-JNK (JNK1/2/3), el cual es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica; su administración de forma periférica disminuyó la ingesta de alimentos y la obesidad en ratones alimentados con HFD (Gao et al., 2017).

- JNK1

La isoforma JNK1, se encuentra constitutivamente activada y localizada en axones y dendritas donde regula la morfología de estos (Nogueiras & Sabio, 2021). Fue en el año 2010 cuando se dio a conocer el papel de las JNKs en el hipotálamo e hipófisis. En ese momento, dos grupos de investigación, de manera independiente, generaron dos modelos JNK1 *knock out* condicionales en áreas específicas del cerebro, usando un sistema Nestin-cre (el cual permite abolir el gen de interés en neuronas y astrocitos de SC) (Belgardt et al., 2010; Sabio & Davis, 2010). En ambos estudios se demostraba que los ratones estaban protegidos contra la obesidad inducida por dieta alta en grasa, resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa a nivel central y periférico. Además, presentaban una reducida acumulación de lípidos en el BAT y elevados niveles plasmáticos de T3 y T4, correlacionado con los altos niveles TRH en el hipotálamo. En ese momento todo parecía indicar que JNK1 en el sistema nervioso central controlaba la homeostasis corporal mediante la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Sin embargo, ratones carentes de JNK1 neuronal no presentaban cambio en la masa respecto a los controles, es por eso que no quedaba claro si están protegidos contra la obesidad. Para intentar resolver esta cuestión, se realizó un trabajo en otro modelo de ratón, el cual sobreexpresaba JNK1 en neuronas AgRP, alimentándolo con dieta alta en grasa y produciendo resistencia a leptina a nivel neuronal y sistémico (Tsaousidou et al., 2014). Todo lo mencionado anteriormente, clarificó que JNK, en concreto JNK1 desempeña un rol fundamental en el control de la obesidad a nivel del SNC (Belgardt et al., 2010; Sabio & Davis, 2010; Tronche et al., 1999), demostrando que las JNKs se activan en el hipotálamo e hipófisis en condiciones de obesidad y que su isoforma JNK1 es la principal implicada en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina (ver Figura 11).

y T4, correlacionado con los altos niveles TRH en el hipotálamo. En ese momento todo parecía indicar que JNK1 en el sistema nervioso central controlaba la homeostasis corporal mediante la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Sin embargo, ratones carentes de JNK1 neuronal no presentaban cambio en la masa respecto a los controles, es por eso que no quedaba claro si están protegidos contra la obesidad. Para intentar resolver esta cuestión, se realizó un trabajo en otro modelo de ratón, el cual sobreexpresaba JNK1 en neuronas AgRP, alimentándolo con dieta alta en grasa y produciendo resistencia a leptina a nivel neuronal y sistémico (Tsaousidou et al., 2014). Todo lo mencionado anteriormente, clarificó que JNK, en concreto JNK1 desempeña un rol fundamental en el control de la obesidad a nivel del SNC (Belgardt et al., 2010; Sabio & Davis, 2010; Tronche et al., 1999), demostrando que las JNKs se activan en el hipotálamo e hipófisis en condiciones de obesidad y que su isoforma JNK1 es la principal implicada en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina (ver Figura 11).

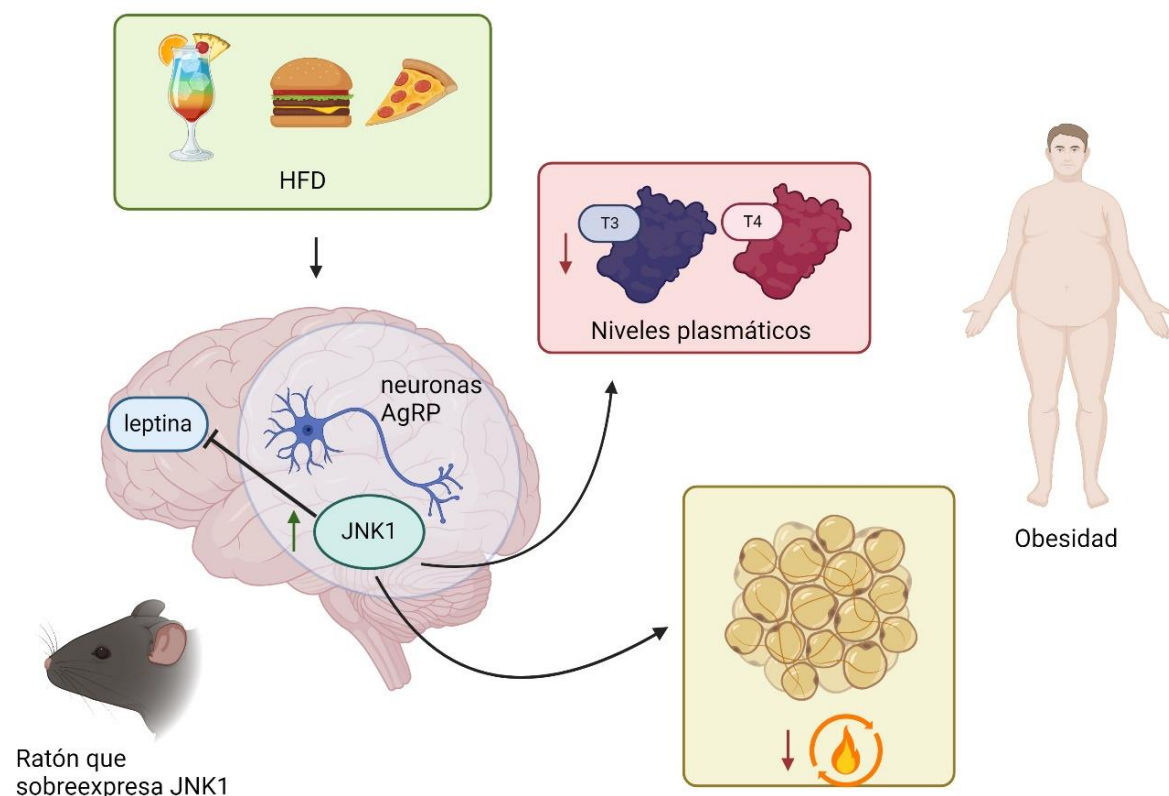


Figura 11. Funciones de JNK1 hipotalámica. La activación de JNK1 contribuye a la obesidad inducida por la dieta al afectar al eje de las hormonas tiroideas (T3 y T4) disminuyendo sus niveles plasmáticos, inhibiendo a la leptina y disminuyendo la termogénesis en el BAT (elaboración propia mediante BioRender.com).

Otra función de JNK1 en las neuronas AgRP es regular las acciones metabólicas de la p53 hipotalámica. La carencia de p53 en estas neuronas aumenta la sensibilidad a la obesidad inducida por dieta, logrando altos niveles de JNK fosforilada en el VMH de ratones. Al tratar centralmente a estos ratones que carecen de p53 en las neuronas AgRP con el inhibidor c-Jun SP-600125 redujo el peso corporal y, en concordancia con este resultado, el aumento de la sensibilidad a la HFD fue abolida al eliminar p53 en el hipotálamo mediobasal (Quiñones et al., 2018).

Además de su papel en las neuronas AgRP, JNK1 es capaz de mediar los efectos de las hormonas tiroideas a través de sus acciones dentro del VMH (Martínez-Sánchez et al., 2017). Nosotros vimos que las ratas hipertiroideas tienen niveles elevados de JNK fosforilada en el VMH. Una de las acciones de las hormonas tiroideas es promover la lipogénesis de novo en el hígado; además el tratamiento con SP600125 puede revertir las acciones centrales de las hormonas tiroideas en el hígado, provocando una disminución del contenido de lípidos hepáticos. En concordancia con este hallazgo la administración central de hormonas tiroideas no alteró el metabolismo de los lípidos en el hígado de ratones con deficiencia de JNK1, demostrando que JNK1 modula las acciones de las hormonas tiroideas a nivel central (Martínez-Sánchez et al., 2017). En este mismo trabajo vimos que los niveles de pJNK1 elevados se revertían cuando sobreexpresábamos AMPK (proteína quinasa activada por AMP, tanto en ratas hipertiroideas como tratadas centralmente con T3, lo que nos llevó a postular que AMPK está *upstream* de JNK (Martínez-Sánchez et al., 2017).

▪ JNK3

Esta isoforma se expresa selectivamente en el cerebro, posee baja actividad basal y se activa en los núcleos de las neuronas en respuesta al estrés, siendo necesario para el estrés inducido. Su primera función identificada fue la apoptosis en respuesta al estrés neuronal, lo que derivó

enconvertirla en objetivo potencial para el tratamiento de síntomas de enfermedades degenerativas de la enfermedad de Alzheimer (Yarza et al., 2016).

La implicación de JNK3 cerebral en la regulación del equilibrio energético fue abordada en un estudio en los que se emplearon ratones con deficiencia global de JNK3 o ratones con delección condicional de *jnk3* en neuronas hipotalámicas POMC o AgRP (Pinto et al., 2004), todos ellos alimentados con HFD. Se vio que la HFD inducía la activación de JNK3 en el hipotálamo, sin embargo, la deficiencia de JNK3 en las neuronas AgRP resultó en hiperfagia. Se demostró que JNK3 es activado por leptina y que regula la transmisión excitadora en neuronas AgRP, por lo que esta función de JNK3 podría mediar las acciones de la leptina en las neuronas AgRP de ratones alimentados con HFD. Es decir, JNK1 y JNK3 tienen acciones opuestas en el SNC, mientras que la activación de JNK1 en el SNC promueve el sobrepeso, la activación de JNK3 protege contra la obesidad (Vernia, Morel, et al., 2016).

4.3 JNK HIPOTALÁMICA EN CÉLULAS NO NEURONALES

Debido a la expresión casi ubicua de JNK1, no se pueden excluir los papeles de las JNK en células no neuronales como astrocitos, microglía y tanicitos que desempeñan funciones esenciales en el control del metabolismo energético sistémico, en respuesta a señales metabólicas (García-Cáceres et al., 2019). Se descubrió un posible papel de JNK en los tanicitos, células gliales especializadas que controlan la secreción de neuropéptidos por las neuronas hipotalámicas. Además, los tanicitos regulan los intercambios sangre-cerebro y sangre-líquido cefaloraquídeo, desempeñando así un papel activo en el transporte de señales metabólicas circulantes a las neuronas hipotalámicas que controlan la ingesta de alimentos (Prevot et al., 2018). Los tanicitos cultivados responden a la estimulación inflamatoria con lipopolisacáridos bacterianos cultivados aumentando los niveles de proteína JNK1 fosforilada (de Vries et al., 2014), lo que sugiere que JNK1 puede desempeñar un papel en la respuesta al estrés celular en diferentes tipos de células cerebrales. También se conoce que los ratones knockout globales para *jnk1* están protegidos contra el deterioro cognitivo del hipocampo inducido por HFD y la reducción de la reactividad microglial y de astrocitos (Busquets et al., 2019). Se han encontrado muchas otras acciones no metabólicas para las isoformas de JNK en el cerebro, incluida la neurogénesis del hipocampo, la depresión (Castro-Torres et al., 2019) y la ansiedad (Hollo et al., 2018).

5 LAS HORMONAS TIROIDEAS

Desde hace más de un siglo se conoce el papel regulador de las hormonas tiroideas (THs, del inglés *Thyroid Hormones*) en la tasa metabólica basal y se sabe que controlan gran cantidad de procesos fisiológicos, tales como el crecimiento, el desarrollo y la tasa metabólica (Brent, 2012; Cheng et al., 2010; Hollenberg & Forrest, 2008). Las THs son producidas en la glándula tiroides, un órgano con forma de mariposa situado en la parte anterior del cuello, encima de la tráquea (Laios et al., 2015). Está formada por dos lóbulos cubiertos por una cápsula de tejido conjuntivo denso de la que parten septos de colágeno, dividiendo la cápsula en lobulillos. Aquí es donde se encuentran los folículos tiroideos, que constituyen la unidad funcional y están compuestos por una estructura esférica con una cavidad central rellena de sustancia coloide (una glucoproteína, llamada tiroglobulina) y rodeada de una monocapa de células epiteliales, los tirocitos. En la tiroides también encontramos células aisladas llamadas células parafoliculares o células “C” (Armstrong et al., 2023). La función principal de la tiroides es, por lo tanto, la síntesis de hormonas tiroideas: principalmente tiroxina (3,3',5,5'-tetrayodotironina, T4) que tiene una actividad biológica baja, pero es la forma que se localiza mayoritariamente en sangre y es precursora de la forma activa, la triyodotironina (3,5,3'-triyotironina, T3) (Brent, 2012; Cheng et al., 2010). El paso de T4 a T3 está mediado por un grupo de enzimas conocidas como deiodinasas, en concreto tipo 1 y tipo 2 (D1 y D2) que eliminan una molécula de yodo del anillo exterior de la T4, incrementando su actividad y convirtiéndola en T3. Esta regula la producción de energía, la tasa metabólica, lo que provoca efectos profundos en la función cardíaca, hepática y neuromuscular, así como el crecimiento natal, postnatal y el desarrollo. T3 y T4 se producen por la yodación de los residuos de tirosina de la tiroglobulina en los folículos tiroideos, pero la mayor parte de la T3 circulante se genera de manera periférica por acción de las deiodinasas intracelulares. Existe otro tipo de

deiodinasa el tipo 3 cuya acción es inactivar a la T4 y T3, convirtiéndolas en 3,3'-5'-triyodotironina (rT3 o reverse T3) y en 3,5-diiodo-L-tironina (T2), respectivamente (Brent, 2012; Cheng et al., 2010; Gereben et al., 2008).

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides controla los niveles de T4 y T3 mediante un feedback negativo, es decir incrementando o descendiendo la demanda metabólica, ocurre de la siguiente manera: en respuesta a estímulos externos como son las enfermedades, estrés, demanda metabólica y bajos niveles de T3, se produce en el núcleo PVH la TRH. Esta tiene como función estimular a la hipófisis para liberar la hormona estimulante de tiroides (TSH, *thyroid-stimulating hormone*), esta a su vez actúa sobre el receptor TSH expresado en las células foliculares de la tiroides y produce la secreción de T4 y en menor medida T3. Altos niveles de T3 y T4 conducen al cese de la liberación de TSH y bajos niveles producen la situación contraria, es decir la incrementan (Brent, 2012).

Las deiodinasas y los receptores de hormonas tiroideas se encuentran intracelularmente, por lo que son necesarios transportadores de membrana debido al carácter no lipídico de las hormonas tiroideas. Una vez dentro de la célula las TH se unen a sus receptores nucleares que actúan como factores transcripcionales ligando-dependientes y modulan la bioactividad de las TH. Existen tres receptores funcionales con similar afinidad por unión a la T3 y que se encuentran codificados por dos genes: TR α y TR β , estos a su vez codifican a siete receptores identificados mediante un proceso de splicing alternativo o por el sitio de iniciación de la transcripción, son: TR β 1, TR β 2, TR β 3 (proteínas de unión a ligando con una región C-terminal conservada pero con diferentes porciones N-terminal) en el caso de TR β ; y TR α 1, TR α 2, TR α 3 y TR α 4 productos de TR α (Brent, 2012; López et al., 2013). TR α 1 da lugar a un receptor-ligando y los otros 3 no se unen al ligando, pero tienen capacidades de unión a DNA. Los TR están ampliamente distribuidos en todo el cerebro incluyendo la expresión de la mayoría de las isoformas, en el ARC, VMH y PVH, en donde se localizan las neuronas TRH (Herwig et al., 2008).

5.1 EL PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Como ya se ha mencionado previamente, el papel de las hormonas tiroideas en la regulación del balance energético es bien conocido, de hecho, resulta evidente en aquellos pacientes que sufren desórdenes tiroideos. El hipertiroidismo es una patología caracterizada por la sobreactivación de la glándula tiroidea, lo que conlleva a una sobreproducción de T3 y T4, esto a su vez a un exceso de hormonas tiroideas circulantes. Esta situación produce un aumento en el consumo de oxígeno y producción de calor, dando lugar a un incremento en la tasa metabólica, pérdida de peso, incremento de la ingesta calórica y taquicardias (López et al., 2010). Por ello el 85% de los pacientes con este síndrome muestran una pérdida de peso, a pesar de que muchos de ellos tienen hiperfagia (Brent, 2012).

Por otro lado, el hipotiroidismo presenta niveles de T3 reducidos, elevada sensibilidad al frío, descenso del gasto energético, ganancia de masa a pesar de un descenso en la ingesta y bradicardia. Varios estudios epidemiológicos demuestran que existe una incidencia del 20% de hipotiroidismo en pacientes obesos, resaltando el importante papel de las THs en el desarrollo de la obesidad. Muchos de estos efectos han sido conectados a acciones directas de las THs en los tejidos metabólicamente activos, como son el hígado, el WAT, el BAT (Warner & Mittag, 2012).

5.2 EL PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA TERMOGÉNESIS Y EL GASTO ENERGÉTICO

Las especies homeotermas o de sangre caliente generan más calor que las especies poiquilothermas (de sangre fría) debido a un metabolismo más activo y a una menor eficiencia termodinámica. Estas diferencias dependen en gran medida de las TH; el efecto es doble: promueve la generación de energía y reduce la eficiencia termodinámica, lo que conduce a la producción de calor y al aumento de temperatura corporal. Por lo tanto, los TH son críticos para la termogénesis obligatoria, es decir, la producción de calor causada automáticamente por la tasa metabólica. Las TH también modulan la termogénesis facultativa, es decir la producción de calor bajo demanda, cuando la temperatura ambiental desciende por debajo de la termoneutralidad. En los mamíferos incluyendo a los humanos, ocurre principalmente en el BAT (Cannon & Nedergaard, 2004; Silva, 2006). Este tejido actúa como diana para las TH y posee un gran número de TR α 1 y TR β 1, el primero es necesario para mantener la capacidad de respuesta de los adipocitos marrones y el segundo regula la expresión de UCP1 inducida por T3 (Martínez de Mena et al., 2010; Ribeiro et al., 2010).

La deficiencia en TR α en ratones los vuelve intolerantes al frío, además de una incapacidad en la termogénesis del BAT. De hecho, una deficiencia global de TR α 1 y TR α 1/ β así como la delección de todas las isoformas de TR α provoca hipotermia e intolerancia al frío asociada a una termogénesis reducida en el BAT, a pesar de que la morfología y desarrollo del BAT son normales. Los modelos de los animales knockout en deiodinasas mostraron que D2 es esencial para mediar la respuesta termogénica del BAT a la estimulación adrenérgica debido al incremento de la conversión de T4 en T3 dentro del tejido (Castillo et al., 2011). Al igual que ocurre en los animales hipotiroideos, en estos modelos se observa una disfunción en el BAT, que conlleva a una

termogénesis adaptativa más demandante energéticamente, induciendo resistencia a la obesidad (Liu et al., 2003; Sjögren et al., 2007).

Investigaciones de varios grupos, incluido el nuestro, has demostrado que la acción de TH en la termogénesis del BAT también puede ser mediada centralmente, a la vez que periféricamente, es decir los efectos metabólicos a nivel de todo el cuerpo que se observan en el hipertiroidismo pueden ser relacionados con una acción central, en lugar de un efecto directo de dichas hormonas sobre los adipocitos del BAT. La primera evidencia existente fue en un estudio de Vennström y colaboradores en el que emplearon un ratón heterocigoto para un mutante de TR α 1 con baja afinidad por la T3 (Sjögren et al., 2007). Dicho animal era hipermetabólico ya que poseía un incremento en el consumo de oxígeno, menor cantidad de masa grasa, incremento de la ingesta y resistencia a la obesidad inducida por dieta; el hipermetabolismo de este ratón se ha explicado por una elevada actividad del BAT, es decir, incremento en la termogénesis y el gasto energético, aunque no presentaba incremento en la temperatura corporal debido a la alteración de la función vascular en la cola que conllevaba a una inapropiada disipación del calor. Estas alteraciones metabólicas se corrigieron tras la denervación funcional de la señal simpática hacia el BAT, indicando que el SNS controlaba el metabolismo de estos ratones a través del sistema nervioso autónomo. Nosotros hemos unido la actividad de AMPK con la termogénesis inducida por TH a través de la modulación del SNS (López et al., 2010). El hipertiroidismo y la T3 conllevan a un incremento en la lipogénesis *de novo* lo que a su vez produce un incremento en la actividad del BAT a través del SNS, dando lugar a una pérdida de peso. A su vez mediante el PSNS produce un incremento en la lipogénesis *de novo* en el hígado incrementando los niveles de TG en dicho tejido. Las acciones centrales de T3 y AMPK sobre el BAT están mediadas por los bajos niveles de ceramidas y esto a su vez lleva a bajos niveles de ER estrés, estas acciones hacia el hígado van a estar mediadas por JNK1. Todo ello está mediado por AMPK en el VMH (ver Figura 12). Nuestros datos revelaron que después de la administración de T3 se produce un incremento en la producción de lípidos que se dirigen hacia el BAT, en donde sirve de combustible para la maquinaria termogénica debido a que está incrementada por las acciones de T3 (Martínez-Sánchez et al., 2017).

En resumen, las hormonas tiroideas actuando en el VMH representan un nuevo circuito que modula el metabolismo lipídico a nivel periférico a través de dos vías distintas: simpático y parasimpático (Martínez-Sánchez et al., 2017).

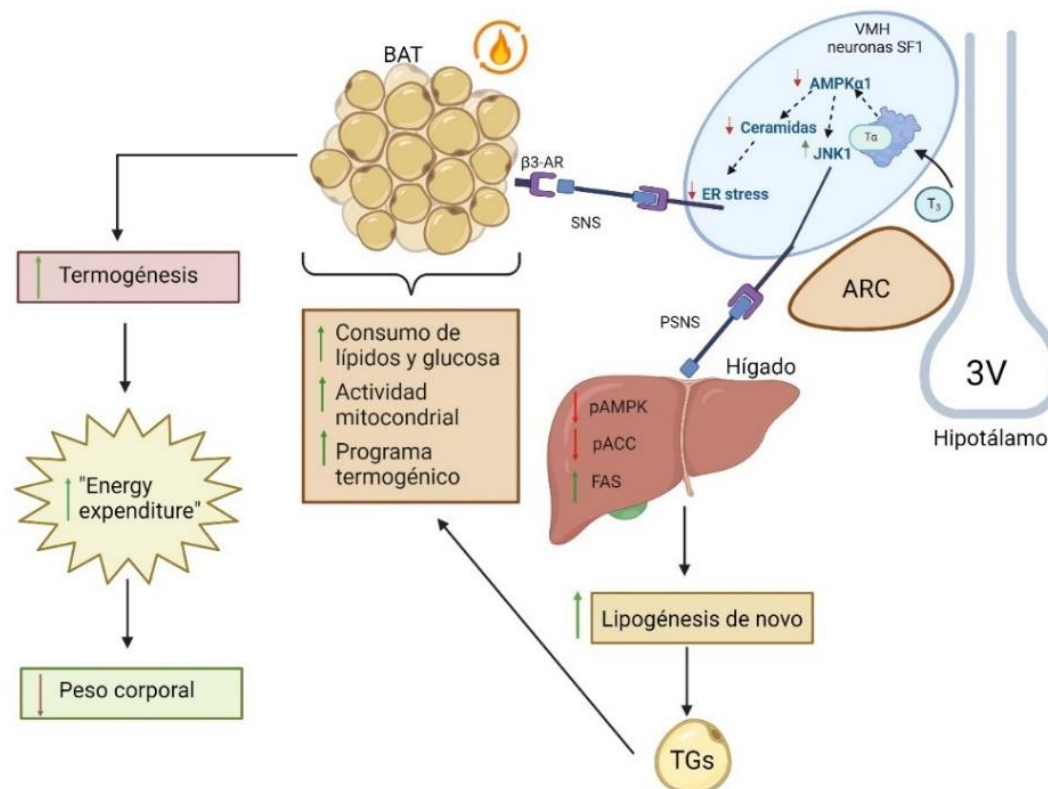


Figura 12. Vías mediante las que el VMH modula el metabolismo lipídico a nivel periférico: la JNK1 hipotalámica y ER estrés median las acciones de la T3 sobre el hígado y el BAT. La administración de T3 produce un incremento en la lipogénesis *de novo* hepática, estos triglicéridos (TG) sirven como combustible para la termogénesis que también está incrementada por las acciones de T3, lo que conlleva a un mayor gasto energético y a una pérdida de peso corporal (elaboración propia mediante BioRender.com, basado en (Martínez-Sánchez et al., 2017).

5.3 ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA INGESTA DE ALIMENTOS

Está bien establecido hoy en día que alteraciones en el estado tiroideo están asociadas con cambios en la alimentación tanto en humanos como en roedores (López et al., 2010). En el 85% de los pacientes con hipertiroidismo se observa hiperfagia, a pesar de la pérdida de peso asociada y de manera similar las ratas hipertiroideas muestran un fenotipo hiperfágico y delgadez. Numerosos estudios han demostrado que dicha hiperfagia proviene de una desregulación de los sistemas neuropéptidos hipotalámicos: existe una up-regulation de AgRP y NPY y downregulation de POMC. La acción de TH ha sido vinculada con otras dianas en el mismo núcleo como son la deiodinasa tipo 2 (D2), UCP2 y mTOR, una serina-treonina kinasa que regula la progresión tanto del ciclo celular como del crecimiento celular mediante la detección de cambios que se producen en el balance energético, factores de crecimiento, nutrientes u oxígeno (Martínez de Morentin et al., 2014). La ruta de mTOR se expresa en núcleos hipotalámicos como el ARC donde se colocaliza con NPY, AgRP y POMC (Varela et al., 2012). A este nivel, la señalización de mTOR juega un papel crucial en las redes hipotalámicas que responden a la disponibilidad de nutrientes y el entorno hormonal (Martínez de Morentin et al., 2014).

Además, nosotros hemos demostrado que la hiperfagia inducida por la administración aguda de T3 o por el hipertiroidismo crónico está mediado por la activación específica de la ruta de mTOR en el núcleo ARC en donde colocaliza con TR α . En consecuencia, el tratamiento central con rapamicina (inhibidor de mTOR) revierte totalmente la hiperfagia inducida por el hipertiroidismo, como resultado de una normalización de la expresión de AgRP y NPY en el ARC (Varela et al., 2012).

Estas evidencias indican que las acciones de T3 en varios de los sensores metabólicos son diferentes, es decir la regulación de la ingesta es mediada a través de mTOR en el ARC, mientras que la modulación del balance energético ocurre vía AMPK en el VMH (Varela et al., 2012).

6 SUCCINATO

El succinato, también llamado ácido succínico o ácido butanodioico, es un metabolito tradicionalmente conocido por su participación en la señalización de peligro a través de su receptor SUCNR1, en el contexto de la obesidad. Sin embargo, hallazgos recientes sugieren su participación en la resolución de la inflamación (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019; Krzak et al., 2021). El succinato se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto en organismos unicelulares como en sistemas más complejos, por ejemplo, plantas y animales (Rutter et al., 2010). En humanos tiene dos orígenes principales: la microbiota intestinal y las mitocondrias (Fernández-Veledo et al., 2021).

6.1 EL SUCCINATO UN SUBPRODUCTO COMÚN DE LA MICROBIOTA

La microbiota intestinal se encarga de metabolizar diferentes nutrientes que provienen de la dieta y del huésped para producir productos finales que el huésped pueda absorber, como son los ácidos grasos de cadena corta y aniones orgánicos, en donde se incluye el succinato (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019). Este es un producto final metabólico de algunas bacterias, pero que hasta hace poco había sido considerado como un intermediario de la síntesis del propionato microbiano. Hoy en día, se sabe que el succinato no sólo es precursor del propionato (un ácido comúnmente producido por fermentadores primarios como *Bacteroides*), sino que también es consumido por fermentadores secundarios (Cummings et al., 1987). Probablemente debido a la conversión del succinato a propionato, se detecta en una concentración relativamente baja en el lumen intestinal. Esto se ha comprobado en estudios que compararon ratones libres de gérmenes con ratones control, los niveles de succinato fecal fueron casi indetectables en los primeros, apuntando a la microbiota intestinal como fuente predominante de succinato luminal (Faith et al., 2014). La evidencia disponible sugiere un vínculo entre la disbiosis (desequilibrio en el equilibrio de la microbiota normal) inducida por antibióticos, el succinato y la inflamación (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019). Un ejemplo de ello es un estudio en el que la colonización de ratones libres de gérmenes con bacterias productoras de succinato de pacientes con EII (Enfermedad Inflamatoria Intestinal) empeora la inflamación intestinal

en un modelo de ratón con colitis inducida por sulfato de dextrano sódico, que se asocia con niveles más altos de succinato fecal (Setoyama et al., 2003). Además, por analogía con los ácidos grasos de cadena corta, no es descabellado pensar que los niveles de succinato dependan de la dieta, así como de la composición de la microbiota. Recientemente se ha informado de una fuerte asociación entre la flora intestinal microbiana y el succinato circulante en humanos (Serena et al., 2018). Además, se estableció que la modificación de la microbiota intestinal mediante una intervención dietética para perder peso, pero también la evolución espontánea de la microbiota independiente del peso corporal, impulsa cambios en los niveles de succinato circulante (Serena et al., 2018). Toda esta evidencia apunta al succinato como un nuevo actor en la fisiopatología de las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad.

6.2 EL SUCCINATO COMO SUSTRATO ENERGÉTICO

El succinato también es un intermediario del ciclo de Krebs, también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de tricarboxílicos, el cual tiene lugar en las mitocondrias de las células eucariotas y resulta fundamental para la producción de energía en forma de ATP. En este ciclo el succinato actúa como sustrato energético de la fosforilación oxidativa, un proceso llevado a cabo en la membrana de la mitocondria; se origina a partir del succinil-CoA y se oxida a fumarato por acción de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) (ver Figura 13) (Rutter et al., 2010).

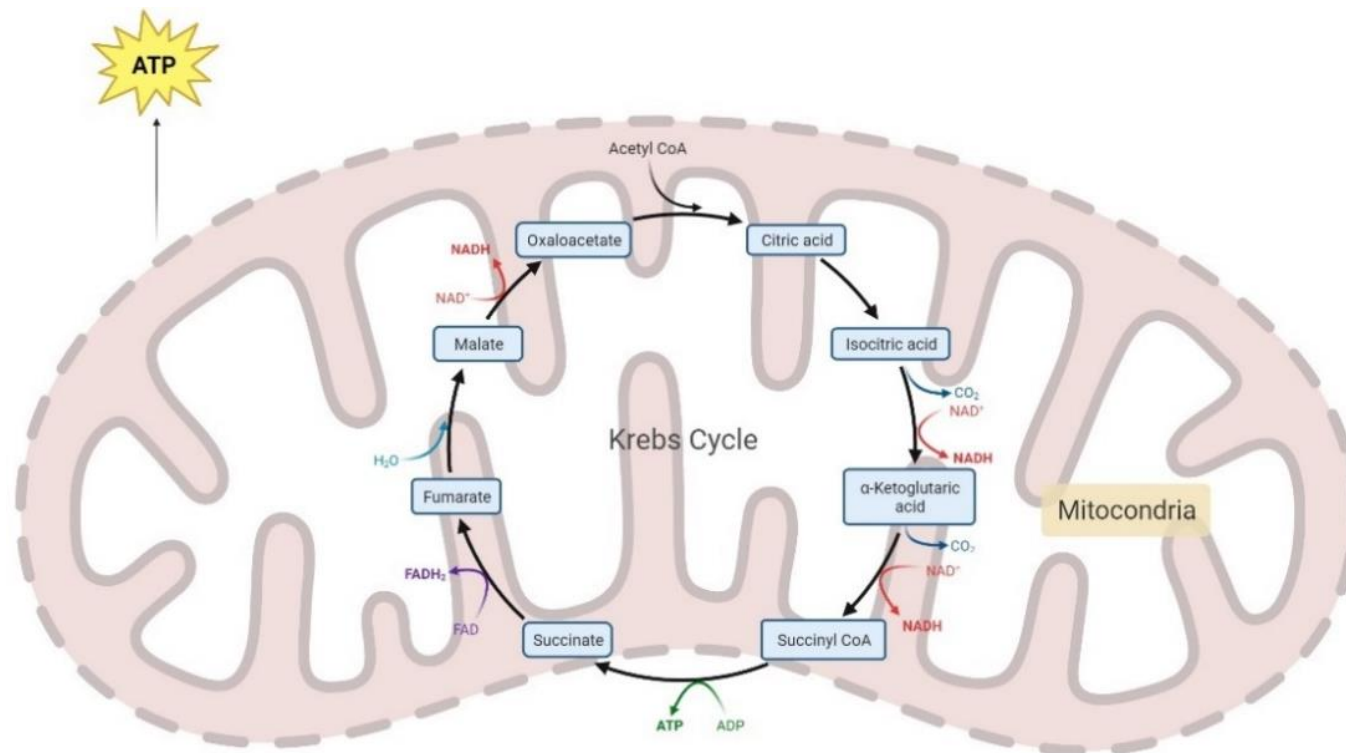


Figura 13. Generación del succinato por el ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial. El succinato generado en la mitocondria se origina a partir del succinil CoA y da lugar mediante oxidación al fumarato (elaboración propia mediante BioRender.com).

6.3 EL SUCCINATO COMO MOLÉCULA DE SEÑALIZACIÓN

Además de su papel en el ciclo de Krebs, el succinato ha emergido como un importante intermediario en la señalización celular, es capaz de actuar tanto a nivel específico como a nivel sistémico, en situaciones fisiopatológicas como los procesos de inflamación y de estrés metabólico. Cuando el organismo se encuentra en condiciones normóxicas el succinato intermediario del ciclo de Krebs es clave para la producción de ATP. Sin embargo, en condiciones de hipoxia fisiológica o condiciones anaeróbicas la actividad de la SDH está reducida, lo que da lugar a que se acumule succinato en la mitocondria. La acumulación de succinato mitocondrial induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Se trata de compuestos prooxidantes derivados del O₂ (como el radical superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH[•])), originados principalmente en la cadena respiratoria de la mitocondria a partir de un proceso de reducción incompleta del O₂, aunque también pueden provenir de fuentes externas como contaminantes (Islam, 2017). Los ROS generan radicales libres al oxidar macromoléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que incrementan el daño, el envejecimiento y la muerte celular. Se demuestra, por tanto, la diversidad de funciones que cumple el succinato en el metabolismo celular, más allá de su contribución directa a la producción de energía (Fernández-Veledo et al., 2021).

El succinato puede ser liberado al citosol a través de los transportadores mitocondriales de dicarboxilatos (DICs), en concreto SLC25, en la membrana interna y del canal de aniones dependientes de voltaje (VDACs) en la membrana externa. Una vez en el citosol puede inducir la succinilación de proteínas, la estabilización del factor de transcripción factor-1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) y la inhibición de las dioxigenasas involucradas en la regulación epigenética, el programa proinflamatorio y la producción de ROS por parte de la célula (Chouchani et al., 2014; Fernández-Veledo et al., 2021; K. G. Murphy & Bloom, 2006b) (ver Figura 14 A).

El succinato puede ser liberado al medio extracelular a través de transportadores de aniones orgánicos dicarboxilatos (OATs) y los transportadores monocarboxilatos (MCTs). El succinato extracelular también puede ser absorbido por transportadores de dicarboxilatos dependientes de sodio (NaDCs). Otra fuente de succinato circulante podría ser el del eflujo intestinal por parte de la microbiota específica (ver Figura 14 B). El succinato extracelular puede ser detectado por su receptor SUCNR1 (de sus siglas en inglés: *succinate receptor 1*), presente en la membrana celular de una amplia variedad de tipos celulares (He et al., 2004a) (ver Figura 14 C), activando diversas vías de señalización de manera dependiente de la célula y del tejido, actuando de manera similar a hormonas y citoquinas clásicas con efectos a nivel autocrino, paracrino y endocrino (Fernández-Veledo et al., 2021). Los niveles elevados de succinato se reconocen como una señal de alarma producida como una señal de estrés metabólico, como sería en el contexto de la patología de la obesidad (Sadagopan Nalini et al., 2007; Serena et al., 2018).

Estudios recientes apuntan a la participación del succinato y su receptor SUCNR1 en la resolución de la inflamación (Fernández-Veledo et al., 2021). De hecho, se ha demostrado su implicación en el desarrollo del programa antiinflamatorio en macrófagos, sin embargo, se cree que podría estar implicado en el mantenimiento de la inflamación crónica asociada con la obesidad, a través de un estado de resistencia a la acción antiinflamatoria del succinato, es decir actúa a la vez como alarmina y resolvina. (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019).

Se encuentra elevado en muchas patologías inflamatorias crónicas, incluyendo las enfermedades metabólicas, como la obesidad (Aguiar et al., 2014; Serena et al., 2018; van Diepen et al., 2017). Generalmente se considera que SUCNR1 está inactivo en condiciones basales, pero algunos estudios han reportado niveles elevados de succinato en estados fisiológicos como el ejercicio (Hochachka & Dressendorfer, 1976) y la ingesta de alimentos (Astiarraga et al., 2020), reflejando funciones metabólicas adicionales para el succinato similar a hormonas. Además, se ha demostrado el succinato circulante tiene una respuesta relacionada con las comidas que a su vez está influenciada por el estado metabólico de los sujetos y es dependiente de la percepción de la glucosa por parte del tracto gastrointestinal. Es decir, actúa de manera similar a las hormonas incretinas, que son producidas por el intestino en respuesta a los nutrientes y estimulan la secreción de insulina a través de GPCRs específicos. Se piensa que, en respuesta a la ingestión de alimentos, el succinato derivado del intestino llega a la circulación y, de manera similar a otros metabolitos de la microbiota, controla el metabolismo del huésped. Por todo lo dicho con anterioridad el succinato podría considerarse como un metabolito de doble función que vincula el sistema inmunitario y el metabolismo (Fernández-Veledo et al., 2021).

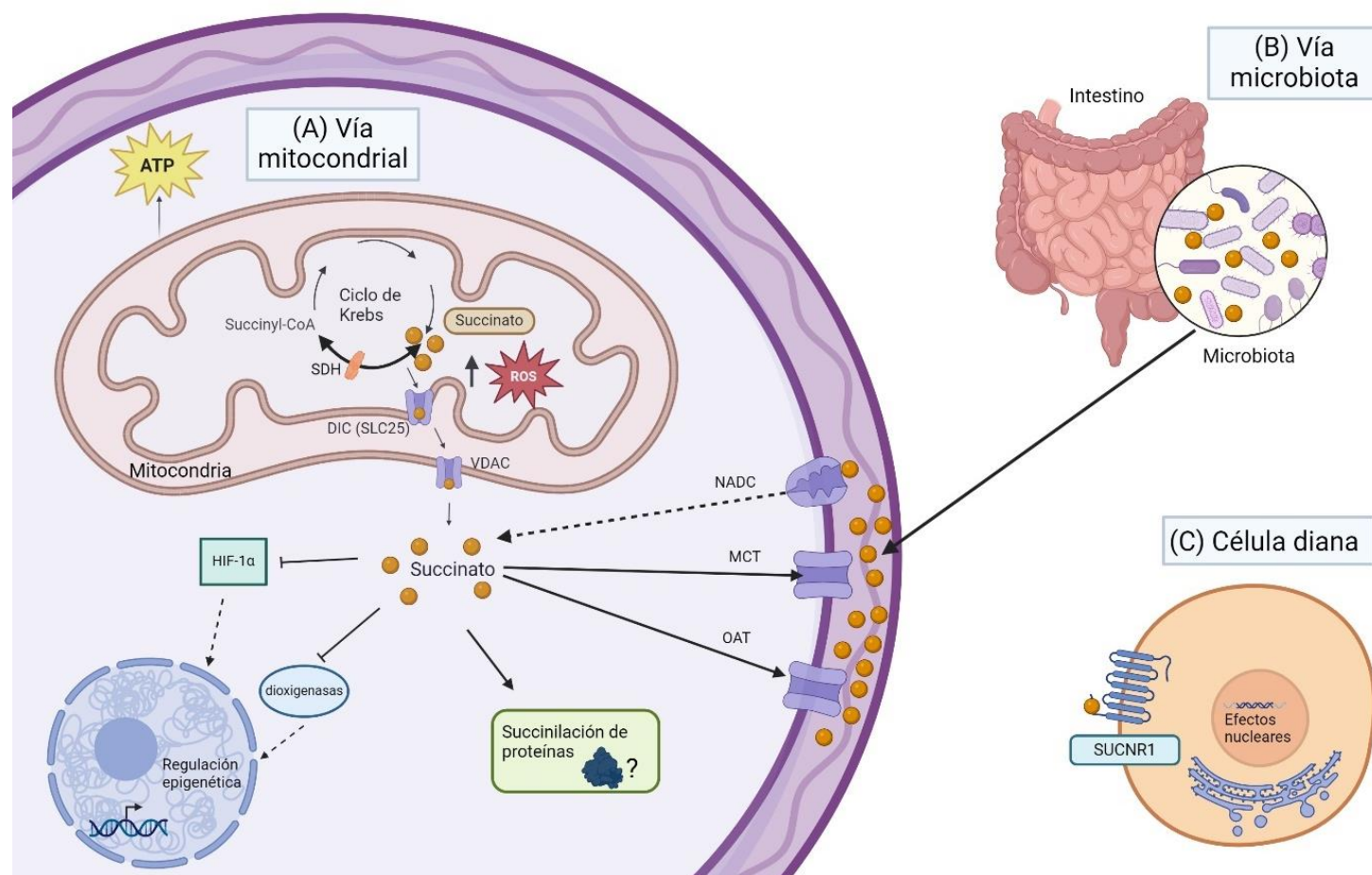


Figura 14. Metabolismo del succinato. (A) Vía mitocondrial: el succinato se libera al citosol a través de los transportadores mitocondriales de dicarboxilatos (DICs) y el canal de aniones dependientes de voltaje (VDACs). En el citosol, induce la succinilación de proteínas, estabiliza el factor HIF-1α e inhibe las dioxigenasas involucradas en la regulación epigenética. (B) Vía microbiota: el succinato se libera al medio extracelular mediante transportadores de aniones orgánicos dicarboxilatos (OATs) y monocarboxilatos (MCTs). También puede ser absorbido por transportadores de dicarboxilatos dependientes de sodio (NaDCs). Además, la microbiota intestinal específica puede contribuir al succinato circulante mediante su eflujo. (c) Célula diana: El succinato extracelular es detectado por el receptor SUCNR1 en la membrana de diversos tipos celulares. Basado en Fernández-Veledo & Vendrell, 2019 (elaboración propia mediante BioRender.com).

7 SUCNR1

Este receptor, también llamado GPR91 (del inglés *G-protein-coupled receptor 91*) forma parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-protein-coupled receptors*), receptores formados por siete dominios transmembrana que se componen de hélices α , por una porción intracelular que se encarga de la transducción de señal a otras proteínas intracelulares efectoras y por una región extracelular que contiene tres bucles extracelulares y un extremo amino N- terminal, los cuales contribuyen principalmente a dar lugar a dos conformaciones activa o inactiva (ver Figura 15). Su función se encuentra mediada por una gran variedad de estímulos extracelulares como fotones, hormonas y neurotransmisores (Gilissen et al., 2016; Lückmann et al., 2020).

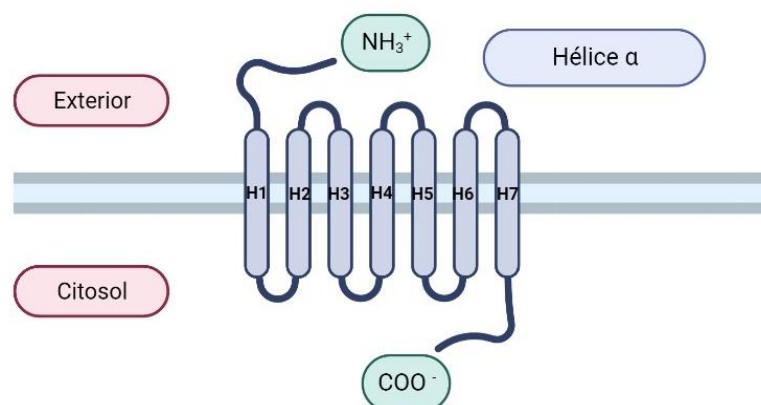


Figura 15. Estructura de un GPCR: se representan los siete segmentos transmembrana, el extremo extracelular NH_3^+ (amino N terminal) y el extremo carboxilo (COO^-) en el citosol (elaboración propia mediante BioRender.com).

Fue descubierto en 1995 en una línea celular de megacariocitos humanos y durante mucho tiempo fue clasificado como receptor huérfano, hasta que en 2004 se identificó por primera vez el succinato como su ligando específico (He et al., 2004a). El receptor SUCNR1 se expresa principalmente en las células de la mácula densa del riñón, las células hepáticas estrelladas, las células ganglionares de la retina, los cardiomiocitos, los adipocitos, las células hematopoyéticas de la sangre y del sistema inmunitario como son las células dendríticas y los macrófagos (de Castro Fonseca et al., 2016; Krzak et al., 2021; X. Li et al., 2020).

En cuanto a su regulación, a pesar de que se han identificado sitios de glicosilación y fosforilación en residuos específicos, se desconoce actualmente el impacto de estas modificaciones postraduccionales sobre la funcionalidad de dicho receptor (Li et al., 2020). Por lo que aún queda mucho por investigar en cuanto a la regulación de este receptor y el impacto en su funcionamiento.

7.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

Tal y como se ha mencionado anteriormente, SUCNR1 pertenece a la familia de los GPCRs por lo que la transducción de señal depende de una proteína G heterotrimérica, la cual está constituida por una subunidad de tipo $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$. La subunidad $G\alpha$ puede unir e hidrolizar GTP (del inglés *guanosine triphosphate*) en GDP (del inglés *guanosine diphosphate*) permitiendo el ciclo de inactivación-activación de la proteína G. En estado inactivo GDP se une a la subunidad $G\alpha$ y se asocia al dímero $G\beta\gamma$, cuando el receptor es activado, GTP desplaza a GDP y la subunidad $G\alpha$ se disocia del dímero $G\beta\gamma$ (Katritch et al., 2013). Las diferentes subunidades α , β , γ , así como sus combinaciones son quienes conforman los múltiples y selectivos mecanismos de señalización, por ejemplo $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$ son capaces de inducir vías de señalización entre las cuales se encuentra la vía de la adenilato ciclasa (AC)-AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y la de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase-C-IP3*). Por lo tanto, la interacción succinato-SUCNR1 parece estar desencadenando diferentes mecanismos de señalización que involucran a multitud de tipos celulares y tejidos y que resultan en una gran variedad de funciones (Gilissen et al., 2016; Krzak et al., 2021; X. Li et al., 2020; Lückmann et al., 2020).

7.2 NUEVAS FUNCIONES METABÓLICAS ATRIBUIDAS A SUCNR1

Es bien conocido el papel de SUCNR1 en el desarrollo de diversas enfermedades como la hipertrofia de los cardiomiocitos, la artritis reumatoide, la fibrosis hepática, la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad metabólica del hígado graso (MAFLD), la retinopatía diabética y algunos tipos de cáncer (Aguiar et al., 2014; Cho, 2018; Lei et al., 2018; Littlewood-Evans et al., 2016). También se ha investigado sobre su función en procesos como el papel antipolítico en el tejido adiposo y la inducción de la hematopoyesis, así como el efecto antiinflamatorio en células madre del SNC. En estas circunstancias, se ha observado un aumento del succinato desde unos niveles considerados basales, que en humanos se encuentran en el rango de 2-3 μM en suero y 2-20 μM en plasma, hasta los niveles de activación de su receptor, concentración media en humanos $56 \pm 8 \mu\text{M}$ (He et al., 2004a; Murphy & O'Neill, 2018).

Hasta ahora la activación del receptor SUCNR1 se ha relacionado exclusivamente con condiciones patológicas, con excepción de su papel en la vascularización de la retina durante el desarrollo, tampoco parecía guardar relación con las funciones de tipo fisiopatológicas del organismo. Sin embargo, estudios recientes demuestran que en condiciones de ejercicio y en estados postprandiales tiene lugar un incremento de los niveles de succinato, que podría funcionar de manera similar a las hormonas (Astiarraga et al., 2020; Sapieha et al., 2008; Starling, 2020). De hecho, se cree que el succinato, a partir de la evidencia actual, puede estar cumpliendo funciones como factor metabólico en la regulación de la homeostasis energética, de una forma específica en tejidos.

7.2.1 SUCCINATO / SUCNR1 Y SU IMPACTO EN EL METABOLISMO

Entre las localizaciones en las que se ha descrito que succinato y/o SUCNR1 actúan como reguladores potenciales de procesos metabólicos figuran:

- Intestino:

En 2016 Mithieux y colaboradores demostraron que el succinato derivado de la microbiota mejora el metabolismo de la glucosa en el intestino de manera similar a como lo hace el butirato o propionato (DeVadder et al., 2014). En este estudio se determinó que los fructo-oligosacáridos dietéticos, que ejercen beneficios metabólicos de manera dependiente de la gluconeogénesis intestinal, aumentan los niveles de succinato en el ciego. Además, vieron que el succinato dietético mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones controles, pero no en ratones con una eliminación específica del intestino de la glucosa-6-fosfatasa, la enzima clave en la producción endógena de glucosa, indicando que la mejora mediada por el succinato es dependiente de la gluconeogénesis intestinal (DeVadder et al., 2014). En otro estudio se empleó glucosa marcada y se demostró que el intestino transforma el succinato en glucosa produciendo un efecto negativo en la gluconeogénesis hepática (DeVadder et al., 2016). En concordancia con estos resultados, la colonización de ratones con microorganismos productores de succinato aumenta el succinato del ciego e inhibe la producción de glucosa hepática (DeVadder et al., 2016; K. Wang et al., 2019). Por eso se ha propuesto que el succinato derivado de la microbiota podría actuar en la regulación de algunas enzimas de la gluconeogénesis intestinal. En conjunto, estos estudios evidencian por primera vez un efecto beneficioso del succinato de la microbiota a nivel de metabolismo (DeVadder et al., 2016).

- WAT:

Hace más de una década que se ha identificado a SUCNR1 en el tejido adiposo en ratones. Regard y colaboradores (Regard et al., 2008) demostraron en su estudio que el succinato inhibe la lipólisis de manera dependiente de la toxina *pertussis*, una exotoxina formada a base de proteínas tipo AB producida por la bacteria *Bordetella pertussis*. Todo ello sugiere que los efectos antipolíticos del succinato dependen de la señalización acoplada a proteína G y estudios posteriores en explantes de tejido adiposo en ratones *knockout* para *Sucnr1* global, confirmaron estas acciones anti-lipolíticas del succinato mediadas por SUCNR1 (McCreath et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado que el succinato se eleva durante la transición de ayuno a alimentación y esto es consistente con su acción anti-lipolítica confirmada por otro estudio empleando explantes de tejido adiposo de ratones SUCNR1 totales. Es decir, en una situación posprandial la actividad lipolítica del WAT es mínima gracias

a la acción anti-lipolítica que ejerce la insulina y el aumento de los niveles de succinato observados tras la ingesta indica que podría ejercer un papel semejante a la insulina (Chakrabarti et al., 2013).

- BAT:

Se desconoce la función que puede ejercer SUCNR1 en este tejido, aunque su expresión podría encontrarse reducida con relación al WAT (McCreath et al., 2015; Regard et al., 2008). El succinato fue identificado como agente termogénico por Chouchani y colaboradores (Mills et al., 2018) demostrando que la exposición al frío aumenta los niveles sistémicos de succinato y que es rápidamente metabolizado por los adipocitos marrones que impulsan la termogénesis a través de la producción de ROS. Recientemente un estudio de los mismos autores revela que los adipocitos marrones controlan los niveles de succinato extracelular del hígado en un entorno obesogénico a través de UCP1, un mecanismo novedoso que podría emplearse para mejorar la inflamación del hígado a través de SUCNR1 (Mills et al., 2021). También se ha descrito el succinato como un inductor de la adipogénesis *beige* en progenitores de adipocitos blancos, y de acuerdo con esta última función, la suplementación dietética con succinato aumenta el gasto de energía y protege contra la obesidad inducida por dieta (Liu et al., 2020; Mills et al., 2018). Sin embargo, el succinato dietético no sería eficaz para revertir las consecuencias metabólicas de la obesidad una vez establecida (Ives et al., 2020).

- Páncreas

En el páncreas el succinato es capaz de mediar la secreción de insulina, existen evidencias en la literatura de que los ésteres metílicos de succinato son capaces de hidrolizarse de forma intracelular a succinato, y promueven la exocitosis de la insulina (Fahien & MacDonald, 2002). De hecho, estos compuestos se utilizan con frecuencia experimentalmente para energizar a las mitocondrias e inducir la liberación de insulina. Además, se conoce que la activación de la liberación de insulina se acompaña del aumento de la biosíntesis de proinsulina para reponer las reservas de dicha hormona. En este sentido, el succinato se ha revelado como el único metabolito del ciclo de Krebs que es capaz de estimular la biosíntesis de proinsulina de manera independiente a la secreción de insulina (Alarcon et al., 2002; Leibowitz et al., 2005). Estudios recientes han demostrado que el succinato estimula la secreción de insulina a través de un mecanismo dependiente de SUCNR1-Gq-PKC en las células β (Sabadell-Basallote et al., 2024).

- Riñón:

SUCNR1 se expresa en el riñón, en concreto en el lumen vascular del aparato yuxtamedular glomerular y en los túbulos renales (Deen & Robben, 2011; Robben et al., 2009). En un estudio trascendental publicado sobre la señalización de SUCNR1 en la que se identificó el succinato como ligando natural de SUCNR1, también se proporcionó la primera evidencia de la función del succinato como estimulador de la presión arterial a través de la activación del sistema renina-angiotensina (RAS, del inglés *renin angiotensin system*) (He et al., 2004). En otro estudio se demostró que el succinato circulante se encontraba elevado en ratas hipertensas, estos resultados no pudieron replicarse en estudios humanos de pacientes con enfermedades crónicas no asociadas con la diabetes (Sadagopan Nalini et al., 2007). La diabetes induce un aumento robusto en el contenido de prorenina en ratones control, un efecto que se atenúa en ratones con eliminación global de SUCNR1, lo que respalda la hipótesis de que el succinato podría ser una señal de estrés en la nefropatía diabética. Sin embargo, la detección de niveles reducidos de renina en el riñón de ratones nulos SUCNR1^{-/-} no diabético, sugiere que la señalización de succinato-SUCNR1 podría suponer también un mecanismo fisiológico en el control de la actividad del sistema RAS (Toma et al., 2008).

- Músculo esquelético:

Se sabe que el ejercicio anaeróbico produce aumento de los niveles de succinato circulante (Hochachka & Dressendorfer, 1976) y recientemente se ha demostrado que tanto el succinato como su receptor SUCNR1 son componentes clave en la remodelación de la fibra muscular esquelética. Recientes hallazgos observaron que el succinato en el músculo esquelético es capaz de restaurar el consumo de oxígeno en un entorno patológico asociado con disfunción mitocondrial (Protti et al., 2007). También se ha demostrado que el ejercicio induce un patrón de secreción de metabolitos específico en el músculo esquelético, que se caracteriza por un aumento de succinato relacionado con una mejora en la sensibilidad a la insulina (Huffman et al., 2014). Otro estudio observó que al suministrarles succinato en la dieta de ratones no obesos aumenta la capacidad de resistencia al ejercicio mediante la biosíntesis mitocondrial por un mecanismo dependiente de SUCNR1 (Wang et al., 2019). Además, se ha

demostrado que el músculo secreta succinato durante el ejercicio mediante un mecanismo dependiente del transportador MCT-1, que a su vez es sensible a los cambios de pH. En este mismo estudio se estipula que el succinato liberado durante el ejercicio media la adaptación muscular a través de SUCNR1, pero al contrario que el estudio anterior, estas adaptaciones se atribuyen a otras células del tejido como las células endoteliales y satélites (Reddy et al., 2020). Se ha visto que este aumento de la actividad muscular va seguido de la acumulación de grandes cantidades de succinato en la sangre arterial, junto con un aumento del flujo hepatoesplácnico. Estos resultados sugieren que el succinato podría actuar como un agente regulador de la respuesta hepática al ejercicio, adaptándose a las demandas de energía a través de la producción hepática de glucosa y la oxidación de grasas (Hu et al., 2020).

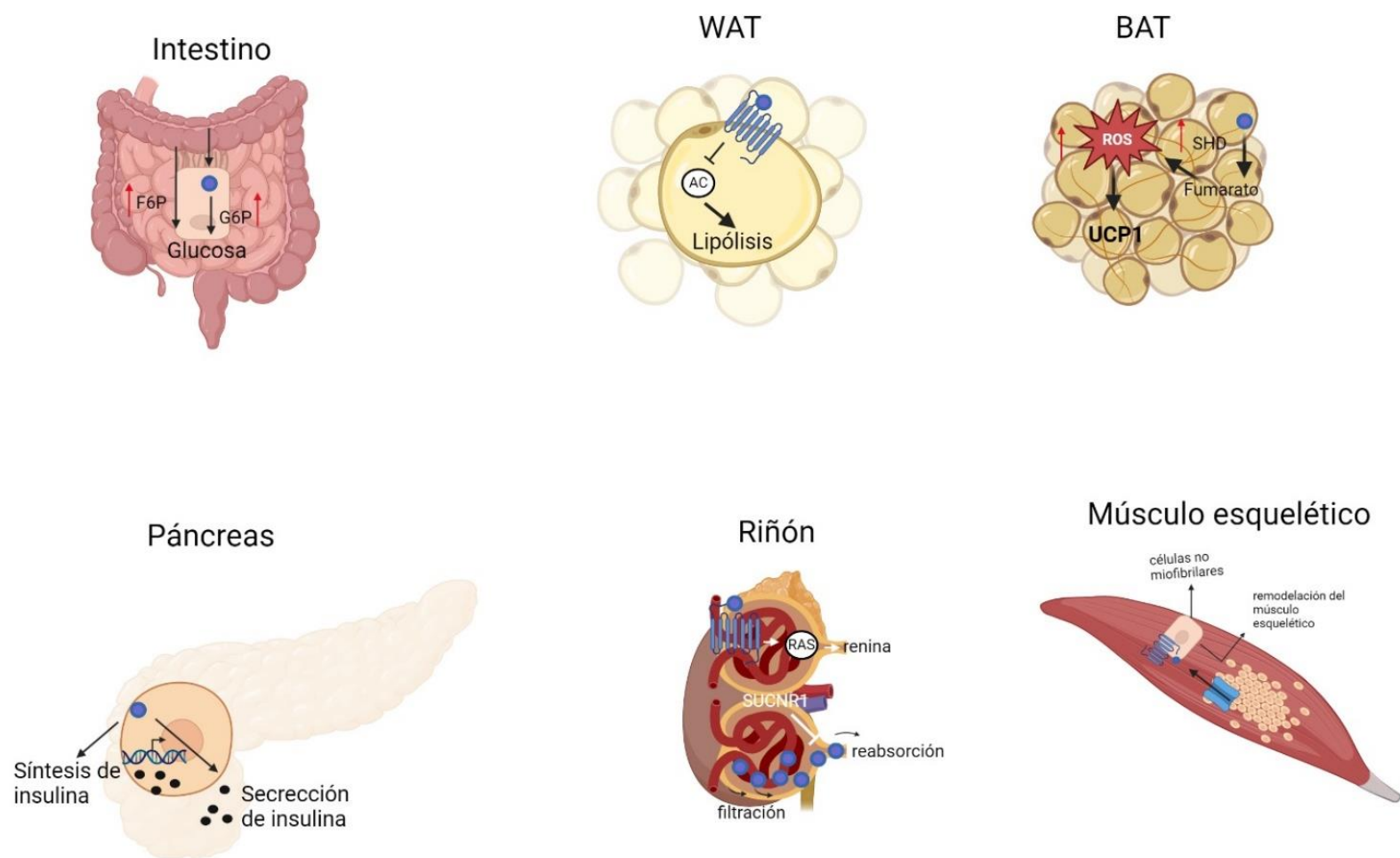


Figura 16. Funciones metabólicas del succinato citosólico (intracelular) y succinato extracelular a través de la vía SUCNR1. En el intestino el succinato derivado de la microbiota podría actuar en la regulación de algunas enzimas de la gluconeogénesis intestinal, en el WAT inhibe la lipólisis durante la transición de ayuno a alimentación, en el BAT podría funcionar como un agente termogénico, en el páncreas el succinato vía SUCNR1 es capaz de mediar la secreción de insulina, en el riñón el succinato vía SUCNR1 estimula la presión arterial activando el sistema renina-angiotensina (RAS) y por último en el músculo esquelético el succinato y su receptor son cruciales para la remodelación de la fibra muscular esquelética (elaboración propia mediante BioRender.com).

7.2.2 EJE SUCCINATO-SUCNR1 EN EL HIPOTÁLAMO

Dado el papel del succinato como sensor de O_2 en la mitocondria involucrado con la producción de ROS, se ha propuesto que el succinato podría jugar un papel clave en la respuesta hipotalámica a la adaptación metabólica durante el proceso de envejecimiento (McCreath et al., 2015).

Un estudio ha demostrado que la administración de succinato en esta localización aumenta la expresión de HIF y suprime la ingesta de alimentos. En ratones deficientes en SUCNR1 globales se ha observado un incremento en la ingesta de alimentos, aunque está por determinar si esto es debido a una acción indirecta de la deficiencia del receptor en otros tejidos, o de un papel intrínseco como sensor de nutrientes a nivel de hipotálamo (Zhang et al., 2011).

7.2.3 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE SUCNR1 COMO POTENCIAL TERAPÉUTICO

En 2004 se descubrió la estructura cristalizada de SUCNR1 y desde entonces se ha incrementado el interés en el estudio de moléculas con potencial de afinidad para el estudio de este receptor, con el fin de poder establecer en un futuro estrategias de intervención terapéutica para combatir patologías en las que se ha visto involucrado a este receptor. A partir de análogos con estructura semejante al succinato se han descubierto agonistas de SUCNR1 como son el ácido cis-cyclopropano-1,2-dicarboxílico y el ácido cis-epoxy-succínico (CESA). En cuanto a antagonistas, antes de publicarse la estructura del receptor se habían descrito algunos que no presentaban relación estructural con el succinato, pero tras el descubrimiento de su estructura surgió el NF-56-EJ40 como molécula antagonista selectiva del receptor humano. En la interacción de estas moléculas con el receptor hay que tener en cuenta la presencia de ligeras variaciones, ya que a pesar de que los sitios específicos de unión a ligando se localizan en el mismo dominio proteico, en ocasiones no comparten exactamente los mismos sitios de unión que se corresponden con los de su ligando natural (Geubelle et al., 2017; Haffke et al., 2019).

HIPÓTESIS

Dado que trabajos previos de otros y de nuestro grupo muestran indicios para pensar que la enzima JNK1 ejerce sus funciones metabólicas en el eje-hipotálamo-hipófisis-tiroides (Belgardt et al., 2010) y en las acciones centrales de las hormonas tiroideas (Martínez-Sánchez et al., 2017), decidimos seguir investigando esta vía y ver que implicaciones podía tener la eliminación de JNK1 en las neuronas SF1. Postulamos que:

- **JNK1 en las neuronas SF1 podría ejercer un papel fundamental en la regulación de los lípidos hepáticos y las acciones centrales de T3.**

De manera adicional y basándonos en la literatura actual, se conoce que el eje succinato/SUCNR1 está emergiendo como un regulador versátil de la patología de la obesidad, ya que se le atribuyen a SUCNR1 funciones antiinflamatorias y resulta clave para la resolución de la inflamación aguda, de forma similar a lo que ocurre con otras hormonas como la leptina (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019). Por ello, se propuso la siguiente hipótesis:

- **SUCNR1 hipotalámico, y en concreto en neuronas SF1, podría tener un papel fundamental en el control de la homeostasis energética.**

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es investigar el papel de JNK1 y SUCNR1 en las neuronas SF1 sobre el balance energético. Con la finalidad de abordar este propósito, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Generación de ratones *knockout* para *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH.
2. Investigar el efecto de la eliminación del gen *Jnk1* en las neuronas SF1 en la regulación del balance energético.
3. Analizar el impacto de la eliminación del gen *Jnk1* en las neuronas SF1 en la respuesta central a T3 sobre la termogénesis del BAT.
4. Determinar el significado fisiológico de SUCNR1 en el hipotálamo en términos de comportamiento alimenticio y equilibrio energético.
5. Estudiar el efecto de la administración central de succinato en el balance energético y en el contexto de la obesidad.
6. Generación de ratones *knockout* para SUCNR1 en las neuronas SF1 del VMH para investigar el efecto en la homeostasis energética.
7. Realizar el fenotipado metabólico completo en ratones SUCNR1 SF1 en SD y HFD.

MATERIAL Y MÉTODOS

8 MODELOS ANIMALES

8.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

En la realización de la presente tesis doctoral fue necesaria la utilización de animales vivos, porque en una patología como es la obesidad son de gran importancia las interacciones entre las distintas rutas metabólicas que se producen en los diferentes órganos del organismo vivo. Los experimentos realizados con animales no pueden ser reemplazados por otros métodos alternativos tales como las aproximaciones informáticas o los cultivos celulares, ya que pretenden encontrar dianas terapéuticas a ciertas enfermedades humanas y es necesario el estudio de un organismo completo. Por lo tanto, los métodos alternativos a los animales no aportarían resultados concluyentes en los aspectos de interés.

El diseño experimental se ha ajustado minimizando el número de animales empleados a los estrictamente imprescindibles. Los animales no fueron sometidos a ningún tipo de dolor o estrés, y de ser el caso se empleó anestesia y analgesia y, ante cualquier signo de morbilidad fueron humanamente sacrificados.

8.1.1 CONSIDERACIONES LEGALES Y ÉTICAS

Los experimentos se llevaron a cabo bajo el número de procedimiento ID 15012/2020/010, cuyo responsable es el Dr. Miguel Antonio López Pérez, y contando la supervisión del Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela. El proyecto fue previamente aprobado por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de A Coruña. Siempre se ha actuado conforme a 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.

Todos los trabajos con animales han sido realizados por personal del laboratorio acreditado con la capacitación para el trabajo con animales de experimentación. Las instalaciones del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de Santiago (CIMUS) fueron las empleadas para la realización del proyecto.

8.2 MODELOS ANIMALES

Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado como animal de experimentación la especie “Ratón” (*Mus musculus*), en concreto:



1. Ratones SF1^{cre} Td-Tomato que se generaron al cruzar un ratón que expresa td-Tomato fluorescente con ratones Sf1-Cre.
2. Ratones hembra knock-out para JNK1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico de 20 semanas de edad, generados específicamente para esta tesis y suministrados por el Centro de Biomedicina Experimental de la USC (CEBEGA).
3. Ratones macho y hembra SUCNR1^{flox flox} (proporcionados por la doctora Sonia Fernández Veleo y procedentes del Centro nacional de Investigaciones científicas de Nueva Orleans).
4. Ratones macho y hembra *knock-out* de 20 semanas de edad para el receptor de succinato SUCNR1 de las neuronas SF1, también generados específicamente para esta tesis y suministrados por el CEBEGA.

Los animales fueron estabulados en condiciones estables de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (55%), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas - 20:00 horas). Previo a cualquier experimento, se realizaron períodos de aclimatación a las instalaciones de 7 días aproximadamente. En todo momento, los animales se mantuvieron en condiciones de acceso libre (*ad libitum*) a agua y a dieta estándar (SD, standard diet) (SD, SAFE A04: 3.1% grasa, 59.9% carbohidratos, 16.1% proteínas, 2791 kcal/g; Scientific Animal Food & Engineering; Nantes, Francia), a excepción de aquellos experimentos en los que se especifique. Además, con la finalidad de verificar el bienestar animal se monitorizaron periódicamente distintos parámetros como son el peso corporal e ingesta, la valoración del aspecto físico y se acostumbraron al manejo por el personal técnico del laboratorio para minimizar el estrés ocasionado durante los experimentos. En lo referente a las condiciones de estabulación, en la mayoría de los procedimientos los ratones se alojaron de manera colectiva, y aunque en algunos experimentos se requirió la estabulación individual siempre se tuvo en cuenta el comportamiento social de estos animales.

8.2.1 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT

▪ Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}:

Con la finalidad de generar el modelo del ratón knockout (KO) de JNK1 específico de las neuronas SF1 del núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), se cruzaron ratones JNK1 K:B6.129S1-Mapk8tm1Flv/J, proporcionados por el doctor Roger J. Davis (Howard Hughes Medical Institute) y la doctora Guadalupe Sabio (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO) con los ratones SF1 Cre (Tg(Nr5a1-cre)Lowl/J, número de stock 012462;The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) ambos con un fondo genético.

C57BL/6J; estableciendo una colonia estable para la cepa genéticamente modificada Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl} (nombre completo: JNK1;SF1 , Flox - JNK1 ; SF1 – Cre), mediante cruces SF1-Cre JNK1 flox/flox y JNK1flox/flox en el área de cría del CEBEGA.

Los ratones SF1Cre expresan Cre recombinasa bajo el promotor del receptor nuclear subfamilia 5, grupo A, miembro 1 (Nr5a1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1). El patrón de actividad de Cre recombinasa, en estos ratones, imitaba el patrón endógeno de expresión génica (mRNA) y era detectada en neuronas positivas para SF1 en el núcleo VMH.

En los experimentos de la presente tesis doctoral se emplearon ratones KO hembra y como controles se usaron las hermanas de camada que poseen el fondo genético pero negativos para Cre, las cuales a partir de ahora se denominarán animales Wildtype o control. El genotipado de los animales se lleva a cabo mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction) (ver el apartado “PCR para genotipado” en la sección “Material y métodos”).

▪ SUCNR1SF1KO

Para generar un ratón SUCNR1 knockout específico de las neuronas SF1 del núcleo ventromedial, se cruzaron ratones SUCNR1 flox flox (proporcionados por la doctora Sonia Fernández Veleo y procedentes del Centro nacional de Investigaciones científicas de Nueva Orleans) con los ratones SF1 Cre (Tg(Nr5a1-cre)Lowl/J, número de stock 012462;The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) ambos con un fondo genético C57BL/6J; estableciendo una colonia estable para la cepa genéticamente modificada SUCNR1SF1KO (nombre completo (Sucnr1;SF1 , Sucnr1 flox/flox ; SF1 Cre +/-). Para los estudios de esta tesis doctoral se emplearon los ratones SUCNR1SF1KO machos y hembras. Como los controles se emplearon los hermanos de camada con el mismo fondo genético, pero negativos para Cre. De igual manera que en el caso de los

Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}, el genotipado de estos animales se llevó a cabo mediante el método de reacción de cadena de polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) (ver el apartado “PCR para genotipado” en la sección “Material y métodos”).

8.2.2 CRÍA E IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL DE LOS ANIMALES

Tras el destete de las crías a los 21 días de edad procede a la identificación de cada animal y a su genotipado. Como método de identificación individual se empleó el “*ear punch*”, que consiste en la realización de una pequeña muesca u orificio en la oreja del roedor mediante un dispositivo de perforación usado para tal fin, causando únicamente una molestia momentánea al ratón. Por otro lado, la caracterización genética o genotipado de estos animales se llevó a cabo mediante la biopsia del extremo de la cola, procedimiento que no supone más que un leve estrés para el animal. Mediante esta prueba se obtiene dos grupos experimentales, un grupo “*Wild-type*” (controles) o ratones genéticamente modificados, pero en los que no se ha alterado la función de ningún gen (en este caso de la proteína kinasa JNK1 del núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) o el receptor SUCNR1 del VMH), y ratones “*knock-out*” (mutantes o transgénicos), en los cuales se ha eliminado la proteína kinasa JNK1 en el VMH o el receptor SUCNR1 de este núcleo hipotalámico.

8.2.3 ESTABULACIÓN

Los animales fueron estabulados tras su traslado, desde el área de cría hasta el área de experimentación del Cebega, de manera colectiva o individual dependiendo de las necesidades y siempre teniendo en cuenta que los ratones son animales sociales. De manera que, únicamente en los experimentos donde fue necesario un seguimiento de la masa corporal y/o ingesta, se estabularon individualmente.

La estabulación de los roedores se realizó en condiciones controladas de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas-20:00 horas), temperatura constante de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad entre el 40-50 %; acceso libre a agua y comida (periodo de aclimatación) hasta el comienzo de los experimentos, y con enriquecimiento ambiental para asegurar el bienestar de los animales mediante el suministro de material de nidificación.

Durante el período de aclimatación (mínimo 7 días) para verificar el bienestar de los animales, a estos se les monitorizó periódicamente masa corporal e ingesta (mediante una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*; RADWAG; Radom, Polonia) y se les valoró su aspecto físico, además de acostumarlos al manejo por parte del personal del laboratorio para reducir en la medida de lo posible el estrés generado en futuros experimentos.

8.3 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

8.3.1 ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

8.3.1.1 VÍA INTRAPERITONEAL (IP)

La inoculación intraperitoneal (IP) se realiza en la parte ventro-caudal del ratón por debajo del peritoneo, sin necesidad de anestesia. Es necesario inmovilizar al animal previamente agarrándole la piel de la región posterior con ayuda de los dedos índice y pulgar, utilizando los demás dedos para agarrar la cola, de tal manera que el animal quedaría extendido por su parte anterior e inmovilizado. Se inserta una aguja de 25G (*BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16mm*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey; EEUU) acoplada a una jeringa (*1ml BD slip-tip syringe, bulck, non-sterile*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU), en el extremo inferior derecho del ratón, de forma lateral a la línea media (1 cm aproximadamente) con el fin de evitar pinchar la vejiga urinaria y de forma caudal a la última costilla (2 cm), para así evitar inyectar en el hígado o en el estómago (ver Figura 17). Además, es recomendable inclinar ligeramente la cabeza del animal hacia abajo, con el fin de evitar una inyección en dentro de un asa intestinal o un órgano.



Figura 17. Administración intraperitoneal en ratón (elaboración propia mediante BioRender.com).

8.3.1.2 VÍA SUBCUTÁNEA (SC)

La inyección subcutánea se realiza creando un pequeño pliegue de la piel con los dedos índice y pulgar levantando un poco la piel e introduciendo la aguja de 25G (*BD Microlance, 25G 5/8" 0.5x16mm*, BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU) acoplada a una jeringa (*1ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile*; BD Medical Surgical Systems; Nueva Jersey, EEUU) de manera paralela a la superficie del cuerpo. La inyección del líquido puede notarse a través de los dedos y al formarse un ligero abultamiento de la zona que se conoce con el nombre de habón. Por lo general se escoge la zona dorsal (justo detrás del cuello), la zona lumbar del animal o la zona lateral, para llevar a cabo este tipo de administraciones. Este procedimiento no requiere anestesia y se emplea para la administración de los agentes analgésicos (ver Figura 18).

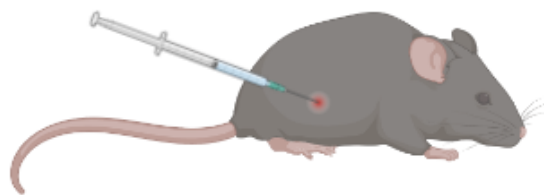


Figura 18. Administración subcutánea en ratón (elaboración propia mediante BioRender.com).

8.3.1.3 VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Previamente se inmovilizará el animal para abrir la cánula anteriormente sellada e implantada (ver apartado procedimientos quirúrgicos) por medio de una tijera. A continuación, se introduce una jeringa Hamilton (Model 7001KH 25s, *Hamilton*) y tras su correcta inserción se produce el vaciado de la misma (ver Figura 19). La aguja de la jeringuilla se retira cuidadosamente para evitar el desplazamiento de la cánula del lugar de inserción, posteriormente se vuelve a sellar la cánula mediante cianoacrilato (SuperGlue-3, Loctite). Este procedimiento se repite en cada animal durante 5 días consecutivos.

Este método de inyección se ha empleado en la presente tesis doctoral para la administración aguda de la hormona triyodotironina (T3). Los animales control, recibieron la sustancia en la que la hormona T3 se disolvió. Los volúmenes administrados se encuentran dentro de límites apropiados para el tamaño y la especie del animal. Tras el procedimiento se realizó un seguimiento diario de los animales, monitorizando su peso corporal mediante su pesaje en una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*; RADWAG; Radom, Polonia) y verificando el estado de bienestar de estos.



Figura 19. Administración intracerebroventricular en ratón (elaboración propia mediante BioRender.com).

8.3.1.4 VÍA HIPOTALÁMICA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta vía es empleada para la administración de virus de manera bilateral en diferentes núcleos del hipotálamo mediante el uso de coordenadas específicas para cada núcleo y especie, las cuales se pueden consultar en el Atlas de coordenadas estereotáxicas para cerebro de ratón. Para la inyección se establecen 3 coordenadas estereotáxicas: antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV) que en el caso del núcleo ventromedial de ratón son: -1.7 mm AP; ± 0.5 mm L; -5.5 mm DV y para la región mediobasal hipotalámica (MBH) de ratón son: -1,5 mm AP; ± 0.4 mm L; -5,8 mm DV. Se utiliza como punto de referencia la inserción de la sutura coronal con la sutura sagital.

Tras anestesiarse al animal, se inocula la sustancia de interés empleando un aparato de esterotaxia (*David Kopf Instruments*; Tujunga, CA, EEUU) (ver en más detalle en el apartado “Procedimientos quirúrgicos”) y jeringuillas de microinyección (*NeuroHamilton Modelo 7001KH Neuros Syringe*; Hamilton Company; NV, EEUU), con un flujo de inyección de 200 nl/min durante 10-15 minutos.

8.3.2 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y DE LA MASA CORPORAL

Para determinar la masa corporal y la ingesta se realizaron mediciones mediante una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*; RADWAG; Radom, Polonia). En el caso de la masa corporal los animales fueron pesados semanalmente, tras su destete, durante 20 semanas y siempre el mismo día de la semana; los ratones se mantuvieron en grupos para asegurar su bienestar y su comportamiento social. Por otro lado, para el control de la ingesta los ratones se estabularon individualmente en la vigésima semana, midiendo la ingesta diaria durante 7 días. Tanto las mediciones de los pesos corporal como las de comida, se realizaron a la misma hora en cada experimento (cercana a la hora de inicio de la fase oscura).

En el caso de los ratones *SUCNR1SF1KO*, las mediciones de ingesta también se llevaron a cabo en dos momentos durante 4 días, uno a las 8:00 horas justo después de que se encienden las luces y otro a las 20:00 horas, el momento en que se apagan. De tal manera que se pudo distinguir, la cantidad de alimento consumido por cada animal durante la fase de luz y fase de oscuridad.

8.3.3 MANIPULACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL: AYUNO

Por norma general, tanto para el mantenimiento como para la cría de ratones, los animales se alimentaron de manera “*ad libitum*”, es decir con acceso libre, con un pienso sólido comercial (*Standard Diet*, SD) (SD, 18,4% proteína, 6,2% grasa, 44,2% carbohidratos, 3,1 kcal/g; Teklad Global Rodent Diets ·2198; *ENVIGO*; Barcelona España), el cual constituye la dieta estándar de estos. En aquellos animales sometidos a dieta alta en grasa se empleó: (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).

En ciertos experimentos, tales como Test de Tolerancia a la Glucosa (GTT) y Test de Tolerancia al Piruvato (PTT), se realizó una retirada del alimento antes de la fase nocturna durante un periodo de 12 horas.

8.3.4 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

Para llevar a cabo este procedimiento, los animales se estabularon de manera individual y se midió la temperatura corporal mediante una sonda rectal conectada a un termómetro (BAT-12 Microprobe-Thermometer; Physitemp; Clifton, NJ). Los ratones se encontraban despiertos y parcialmente inmovilizados.

8.3.5 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL BAT

Un día antes de la realización de las fotografías térmicas del BAT, es necesario afeitar la zona interescapular del animal. La temperatura de la piel de la zona del BAT se midió con una cámara infrarroja (B335: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido) y se analizó empleando un software específico (FLIR-Tools-Software, FLIR; West Malling, Kent, Reino Unido), delimitando el área del BAT. Para el cálculo de la temperatura media se utilizó el promedio de tres imágenes por ratón.

8.3.6 TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA (GTT)

Para valorar el grado de tolerancia a glucosa se llevó a cabo un test de tolerancia a glucosa (GTT, *glucose tolerance test*). Los ratones se mantuvieron en ayuno durante las 12 horas previas al inicio del experimento. En primer lugar se toman los valores basales de los niveles de glucosa en sangre mediante una muestra de sangre de la cola empleando una tira reactiva conectada a un glucómetro (Glucocard sensor; A.Menarini diagnostics; España). A continuación, se inyecta en función del peso corporal de cada animal, D-glucosa (D-glucose; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) vía IP a una dosis de 2 g/kg. Los niveles de glucosa circulante se miden a los 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos tras la inyección, a través de sangre de la cola del mismo modo que se midieron los valores basales. Finalmente, los datos obtenidos se representaron en una curva a partir de la cual se calculó el Área bajo la Curva (AUC) del grupo control y del grupo experimental.

8.3.7 TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA (ITT)

También se realizaron tests de tolerancia a insulina (ITT, *insulin tolerance test*) para valorar la sensibilidad a insulina de los animales. Tras la medición de los niveles basales de glucosa circulante en sangre de la cola, se procedió a la inyección por vía IP de insulina (*Actrapid*; Novo

Nordisk; Dinamarca) a una dosis de 0.25 U/kg. Posteriormente, se registraron los niveles de glucosa a los 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Los datos obtenidos se representaron en una curva a partir de la cual se calculó el Área bajo la Curva (AUC) del grupo control y del grupo experimental.

8.3.8 FENOTIPADO METABÓLICO: MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, TASA DE INTERCAMBIO RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Para llevar a cabo el fenotipado metabólico se empleó un sistema de calorimetría indirecto (PhenoMaster, TSE System) que contiene 12 cajas individuales con un circuito de ventilación cerrado y sensores que registran cada 30 minutos mediciones del volumen del consumo de oxígeno (vO_2), del volumen de la producción de dióxido de carbono (vCO_2), de la actividad locomotora e ingesta de alimentos, entre otros. A partir de estos parámetros se puede determinar: el gasto energético resultante (EE, *Energy Expenditure*) el cual se normaliza por la masa corporal de cada individuo, la actividad locomotora (LA, *Locomotor Activity*) la cual se registra mediante unos sensores de luz infraroja que detectan el movimiento del animal en sentido horizontal y vertical, la ingesta y la tasa de intercambio respiratorio (RER, *Respiratory Exchange Ratio*) que se obtiene dividiendo el vCO_2 producido entre el vO_2 consumido y nos permite calcular la utilización de los recursos energéticos, tales como grasas y proteínas. Si la tasa del RER es 1.0 la energía proviene principalmente de los carbohidratos y si se encuentra entre 0.7-0.8 deriva de las grasas; de esta manera sabemos cuál es el principal combustible oxidado en el organismo. Un RER de 0.85 indica un reparto adecuado de los nutrientes energéticos.

Los ratones, tanto *wild-type* como KO, se sometieron a adaptación antes de introducirlos en las jaulas metabólicas. La temperatura estuvo controlada en todo momento (24°C) durante los 3 días que duró el procedimiento, las primeras 24 horas son de adaptación y en las 48 horas siguientes se midió la tasa metabólica.

8.3.9 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de la composición corporal se realizó mediante un sistema de resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (*Whole Body Composition Analyzer*; EchoMRI; Houston, TX, EEUU). Dicho sistema mide la masa grasa, la masa magra y el volumen de fluidos con tiempos de escaneo cortos para asegurar el bienestar animal. Para realizar cada medición, los animales se introdujeron en un adaptador adecuado al tamaño del ratón, sin necesidad de anestesia previa. Se tomaron dos mediciones por animal, empleándose el promedio de ambas mediciones para el cálculo del porcentaje de masa grasa, masa magra y volumen de fluidos por peso total del animal.

8.4 ANESTESIA Y ANALGESIA

Para la realización de los procedimientos quirúrgicos que se describen a continuación, se necesita una sedación previa del animal. La anestesia general de los animales consistió en un líquido inyectable formado por una combinación de ketamina y xilacina que se administró mediante una inyección IP. La dosis administrada para ratones fue 100 μ l/100g de peso corporal, con una composición de 13.8% de ketamina (*Ketamidol 100 mg/ml*; Richter Pharma; Wels, Austria) 3.45% de hidrocloreto de xilacina (*Rompun 20 mg/ml*; Bayer Health Care; Berlin, Alemania) y 82.75% de suero salino fisiológico (*Suero fisiológico isotónico 0.9%*; Braun; Lugo, España). Antes de realizar cualquier procedimiento, se comprueba la sedación de los animales evaluando el reflejo podal y palpebral. La pérdida de estos indica un estado profundo de anestesia en el cual se pueden llevar a cabo los procedimientos quirúrgicos.

La analgesia se administró por vía subcutánea (SC) en una dosis de 5 mg/kg de masa corporal de meloxicam (*Metacam 5 mg/ml*; Boehringer Ingelheim; Ingelheim am Rhein, Alemania) justo antes del procedimiento y una dosis de 0.05 mg/kg de masa corporal de buprenorfina (*Bupaq 0.3 mg/ml*; Richter Pharma; Wels, Austria) una vez finalizada la cirugía.

8.5 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

8.5.1 ESTEREOTAXIA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta técnica consiste en la inoculación de sustancias a animales en núcleos específicos del hipotálamo. En la presente tesis doctoral se emplearon dos virus distintos:

- **AVV-Synapsin-Cre (AAV Serotipo 2)**

Se trata de un virus adeno-asociado y aunque pertenece a la familia de los parvovirus es un virus no patógeno que no causa enfermedades significativas en los humanos. Es empleado ampliamente en la investigación biológica y la terapia génica por su capacidad de transferir material genético de manera eficiente y segura a las células huésped. Este virus sobreexpresa la Cre recombinasa bajo el promotor de sinapsina humana (proteína sintetizada en la sinapsis neuronal) para de este modo lograr una expresión neuronal exclusiva. Se emplea el sistema Cre-lox como herramienta genética, en el que la proteína Cre puede cortar y recombinar segmentos de ADN y cuando se coloca bajo el control de un promotor específico, como el promotor de sinapsina (Synapsin en inglés) la enzima Cre se expresará selectivamente en las células que normalmente expresen ese promotor, en este caso, las neuronas. Los AAV se dividen en varios serotipos que tienen diferentes propiedades de infectividad y tropismo celular, en este caso es el serotipo 2.

El virus fue elaborado por la compañía SynaGen y su mapa vectorial es el siguiente:

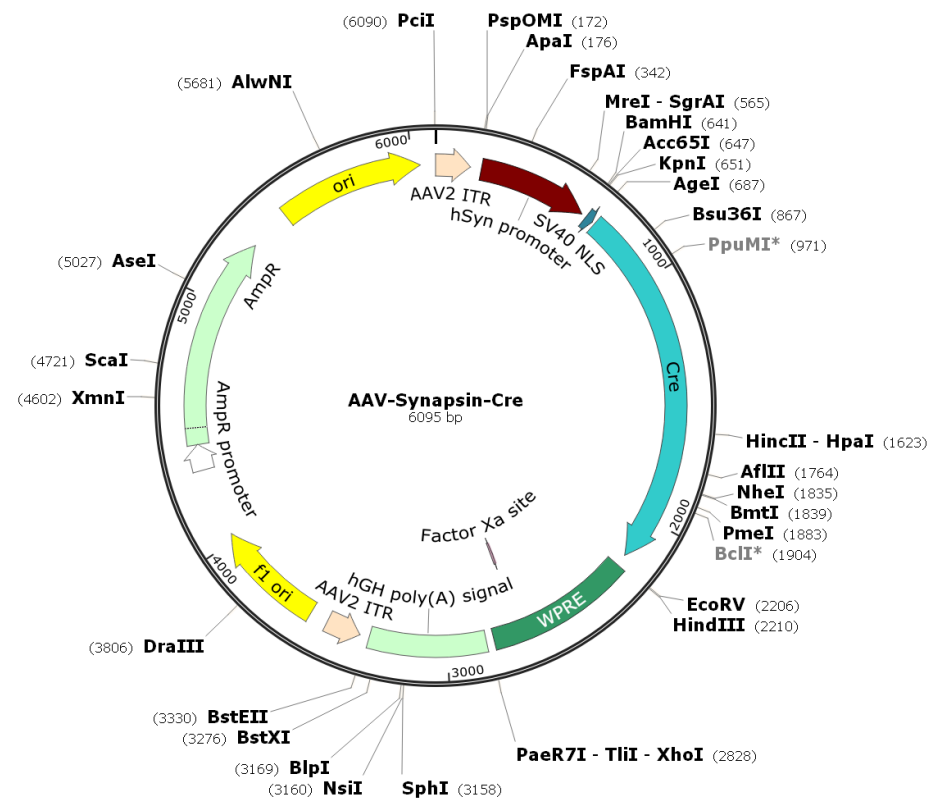


Figura 20. Mapa vectorial del virus AAV2CRE de SynaGen. Extraído de: <https://signagen.com/Pre-made-AAVs/AAV-Synapsin-Cre-AAV-Serotype-2>.

▪ Ad- Sf1 Cre

Un adenovirus es un virus de doble cadena que puede causar una variedad de enfermedades en humanos, incluyendo enfermedades respiratorias, conjuntivitis y gastroenteritis. Se pueden transmitir de persona a persona a través del contacto cercano, por gotas respiratorias u objetos contaminados. A pesar de su potencial patogénico, estos virus son empleados en investigaciones médicas y terapia génica debido a su capacidad para infectar una amplia variedad de células humanas y su relativa facilidad de manipulación en el laboratorio (Lynch & Kajon, 2016). El adenovirus Sf1 Cre está basado en el adenovirus humano tipo 5 que es uno de los serotipos más comunes de adenovirus. El Ad Sf1 Cre fue diseñado por Viraquest para expresar el gen Cre recombinada en las células que expresan SF1. A continuación se muestra un mapa del plásmido de transporte que se empleó para construir dicho virus:

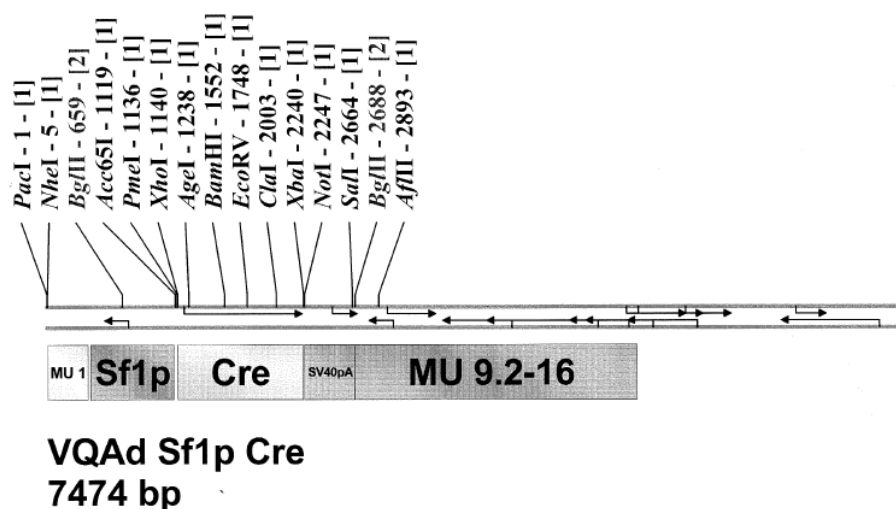


Figura 21. Mapa del plásmido de transporte empleado para la construcción del Ad-SF1CRE.

Volviendo a la estereotaxia núcleo específica: tras anestesiarse a los ratones, comprobar su estado y rasurar el pelo del área en cuestión (la cabeza en este caso) se metieron en un equipo estereotáxico (David Kopf Instruments; Tujunga, CA, EEUU). Para ello se inmoviliza la cabeza del animal y a continuación se realiza un corte transversal en el área de la cabeza libre de pelo, perpendicular a la sutura sagital entre los ojos y las orejas, dejando accesible el bregma. Este es el punto de referencia para calcular las coordenadas estereotáxicas en función del núcleo de interés, en la presente tesis doctoral se emplearon las coordenadas del MBH y del VMH.

Tras establecer las coordenadas, se realizó una perforación en cada punto por medio de una broca quirúrgica en cada hemisferio cerebral y se inyectaron 0.5 µl de la sustancia de interés con una jeringa de microinyección (NeuroHamilton Modelo 7001KH Neuros Syringe; Hamilton Company; NV; EEUU) durante 10-15 minutos, con una velocidad de administración de 200 nl/min (ver Figura 22). Tras la inoculación, se cerró el corte por medio de una seda quirúrgica (Ethicon Mersilk, Special 4-0; Johnson and Johnson Company; Alemania) y cuando los animales se despertaron se estabularon de manera individual.

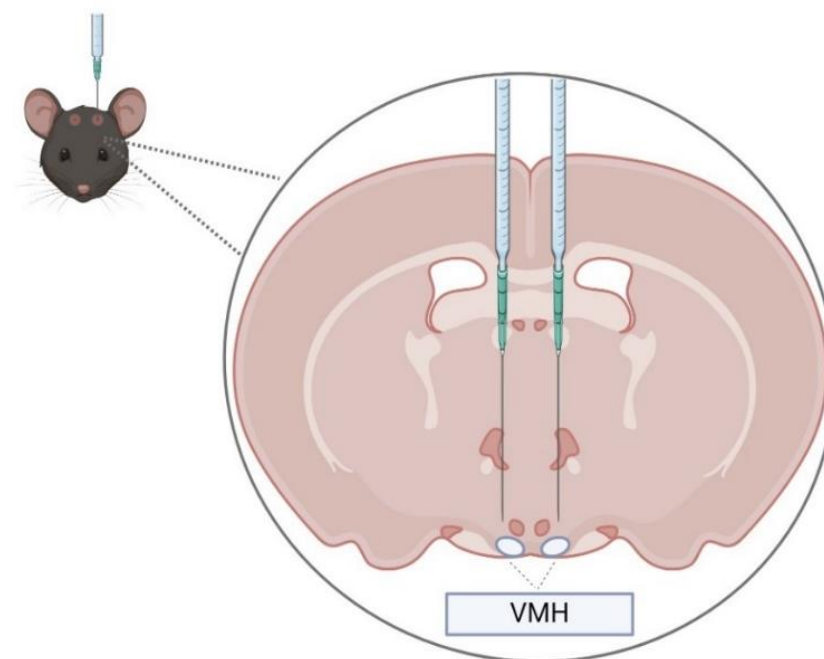


Figura 22. Representación esquemática de la localización de las inyecciones estereotáxicas en el VMH de ratón (elaboración propia mediante BioRender.com).

8.5.2 CANULACIÓN ICV

Se llevó a cabo este procedimiento para aquellos experimentos que requieren la administración de sustancias a nivel central, directamente en el cerebro en concreto en el ventrículo lateral. El primer paso consiste en anestesiarse al animal con ketamina/xilacina, tal y como se ha descrito previamente, y rasurar el pelo de la cabeza del animal desde entre las orejas hasta los ojos. Posteriormente una vez comprobado el estado de anestesia de los animales, se realizó un corte en la piel de la cabeza, justo en la zona rasurada. Se separó el tejido subcutáneo del cráneo hasta visualizar de manera correcta el bregma y se procedió a la perforación del cráneo por medio de una broca quirúrgica, en el mismo hemisferio en todos los animales a una distancia 1,2 mm lateral al bregma, 0,6 mm posterior y 2,5 mm de profundidad por ser ratón. Se implantó la cánula, que consistió en un tubo de polietileno (BD Intradermic® Polyethylene tubing (Non-Sterile), Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (PE-50) con 0,65 de diámetro exterior y 0,58 de diámetro interior para ratón; y con un bisel con un ángulo 45° al que a 2,5 mm de este se le insertó un tope. El otro extremo de la cánula permaneció cerrada hasta el inicio del tratamiento.

La cánula se insertó de manera paralela al eje dorso-ventral del animal y se fijó al cráneo del animal por medio de un adhesivo cianocrilato (Surgibond, adhesivo tisular, Gewebekleber), el cual se usó también para cerrar la sutura del cráneo del ratón. Tras la recuperación de los animales se estabularon de forma individual y se dejó un periodo de dos días antes de iniciar el tratamiento, que en este caso consistió en una administración diaria durante 5 días de 8 ng/día de T3.

8.5.3 ICV MEDIANTE BOMBA OSMÓTICA

Este tratamiento se llevó a cabo en ratones en los que necesitamos una liberación continua de la solución problema durante largos periodos de tiempo. En primer lugar, fue necesario una preparación de los componentes de la bomba osmótica o *Brain infusion kit*, el cual está compuesto por una bomba osmótica, un tubo o catéter y una cánula de infusión al cerebro. La profundidad de la cánula tiene que ser aproximadamente 2-3 mm para proceder a una correcta infusión en el tercer ventrículo y para conseguirlo se adhieren con cianocrilato un número determinado de espaciadores dependiendo del tamaño del animal, espesor del cráneo. A continuación, se unirá el catéter a la cánula y el otro extremo se unirá a la bomba, por lo tanto, la longitud del catéter depende del sitio de implantación de la bomba que en este caso fue en un costillar para dejar libre la zona del BAT. Las bombas se rellenaron de las sustancias de interés que en este trabajo fueron succinato y CESA (ácido cis-epoxy-succínico), además del control de salino; y para su activación se incubaron en salino estéril (0,9%) a 37 °C *overnight* antes de su implantación.

Al día siguiente se procedió a anestesiarse a los animales mediante ketamina/xilacina y a rasurar las zonas de la operación, cabeza y zona del cuello del ratón. Se realiza una incisión sagital en la línea media de unos 2,5 cm de largo con la finalidad de exponer el cráneo. Con el bisturí se raspó ligeramente la zona del cráneo expuesta para eliminar el tejido perióstico que se adhiere al cráneo y se secó la superficie craneal. A continuación, se identificaron las suturas óseas bregma y lambda para determinar la colocación de la cánula mediante las siguientes coordenadas estereotáxicas en ratón: 1,2 mm lateral al bregma, 0,6 mm posterior y 2,5 mm de profundidad. En el lugar marcado se perforó un agujero mediante una broca para ubicar la cánula. Se insertó la cánula que tiene forma de L (*infusion kit*), de tal manera que el brazo externo de la cánula quedó paralelo a la superficie del cráneo, pegándola al cráneo con pegamento quirúrgico (*Surgibond, adhesivo tisular, Gewebekleber*). Posteriormente se realizó un corte a la altura del cuello creando una especie de bolsillo subcutáneo hacia la zona de las costillas por medio de una pinza quirúrgica para insertar la bomba osmótica, la cual debe estar activada. Se unió la cánula empataada a la bomba con el *infusion kit* por el otro extremo. Se empleó el pegamento quirúrgico para cerrar las incisiones en el animal. Al finalizar el recuperación de los animales y estos despertarse, se estabularon individualmente.

8.5.4 PERFUSIÓN INTRACARDÍACA

El cerebro de los ratones se fija mediante perfusión intracardiaca como paso previo a su estudio con técnicas de inmunofluorescencia. Tras la anestesia general del animal, se introdujo en una cabina de perfusión homologada (Hoods division; Flores Valles; Madrid, España) en posición decúbito-dorsal y se realizó una incisión de 5-6 cm a través de la pared abdominal justo debajo de la caja torácica. Con cuidado se separó el hígado del diafragma y se llevó a cabo una incisión en el diafragma a lo largo de toda la caja torácica para exponer la cavidad pleural. A continuación, se cortó la caja torácica hasta la clavícula. Levantando y sujetando el esternón, se realizó una incisión en la aurícula derecha del animal para crear una salida de sangre. Posteriormente, se llevó a cabo una pequeña incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo, a través de la que se pasó una aguja palometa quirúrgica (Aguja epicraneal palometa Venoflix 21G 0.8x20 mm; Braun; Lugo, España), conectada a una jeringa (Syringe 20 ml; BD Plastipak; Becton Dickinson; Nueva Jersey, EEUU), hasta llegar a la raíz de la aorta. A través de la vía, se bombeó una solución de suero salino 0.9% NaCl, con el fin de eliminar la sangre del sistema circulatorio. Cuando se observó el aclaramiento del hígado, que es indicador de una buena perfusión, se procedió al bombeo de paraformaldehído (PFA) al 4% a través de la misma vía. Los temblores de fijación se observaron en cuestión de segundos. La eficacia de la perfusión pudo constatarse por la rigidez absoluta del animal. Finalmente, se diseccionaron los tejidos de interés, los cuales se mantuvieron en la solución de fijado durante un máximo de 24 horas a 4°C. A continuación, se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% y se congelaron a -80°C.

8.5.5 DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Al término de cada procedimiento experimental, se llevó a cabo la eutanasia y disección de tejidos de los animales mediante luxación cervical y posterior decapitación, según lo establecido en las leyes y normas en experimentación animal. Los tejidos extraídos fueron los siguientes:

hipotálamo (microdisseccionando el VMH o la zona mediobasal hipotalámica), BAT, tejido adiposo subcutáneo (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*), tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*), hígado y músculo esquelético. Los tejidos se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis. Para análisis histológicos e inmunohistoquímicos, las muestras fueron fijadas en formalina al 10% (*Formalina 10% neutra tamponada*; Bio-Optica; Italia) y posteriormente parafinadas.

8.5.6 DISEÑOS EXPERIMENTALES

8.5.6.1 TRATAMIENTO ICV CRÓNICO CON T3

En este procedimiento, se insertó una cánula ICV a los ratones, después de una semana de adaptación tras el traslado de los animales. Tras la cirugía los animales fueron estabulados individualmente con acceso libre a agua y comida estándar (SD, standard diet) (SD, SAFE A04: 3.1% grasa, 59.9% carbohidratos, 16.1% proteínas, 2791 kcal/g; Scientific Animal Food & Engineering; Nantes, Francia). Posteriormente, se establecieron 4 grupos: $\text{Jnk1}^{\text{fl/fl}}$ vehículo, $\text{Jnk1}^{\text{fl/fl}}$ T3, $\text{Sf1}^{\text{Cre/Jnk1}^{\text{fl/fl}}}$ vehículo y $\text{Sf1}^{\text{Cre/Jnk1}^{\text{fl/fl}}}$ T3. Se procedió a la inoculación de T3 (8 ng/ratón/día) y de su control (salino) una vez al día y a la misma hora aproximadamente, durante cinco días consecutivos. Durante este tiempo se midió la masa corporal y la ingesta del animal. El quinto o último día, 2 horas después de la inyección de T3 se tomaron imágenes termográficas de la zona del BAT y finalmente se finalizó el experimento sacrificando a los animales para la extracción de tejidos (ver Figura 23).

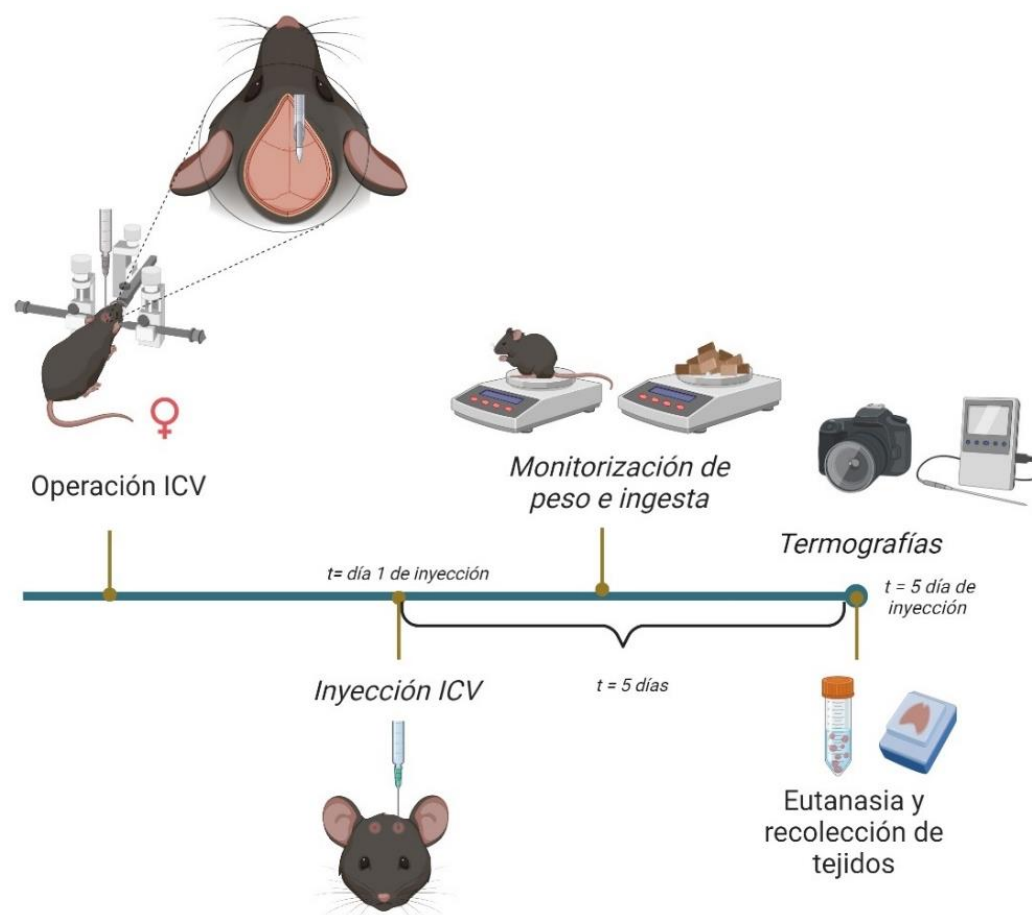


Figura 23. Tratamiento ICV crónico con T3 en ratones $\text{Sf1}^{\text{Cre/JNk1}^{\text{fl/fl}}}$ hembra (elaboración propia mediante BioRender.com)

8.5.6.2 TRATAMIENTO ICV CON SUCCINATO MEDIANTE BOMBAS OSMÓTICAS

Tras la semana pertinente de adaptación después del traslado de animales se realizó el tratamiento en el caso de los ratones en SD, ya que en el caso de los ratones alimentados con dieta alta en grasas (HFD) hubo que esperar a que alcanzasen el estado de obesidad o 40 gramos de peso. El procedimiento consistió en una cirugía intracerebroventricular (ICV) mediante cánulas de infusión al cerebro conectadas a minibombas osmóticas insertadas subcutáneamente (dejando libre la zona del BAT) que portaban succinato o su agonista (con flujo de 0,5 μ l por hora durante 7 días). Una vez realizada la cirugía los ratones fueron estabulados de forma individual y se procedió al pesado del animal y de la ingesta una vez al día y siempre a la misma hora. A partir del día 4 al último, se tomaron fotografías térmicas de la zona interescapular, así como mediciones de la temperatura corporal. Finalmente, el séptimo día se sacrificaron los animales y se realizó la recolección de los tejidos de interés (ver Figura 24).

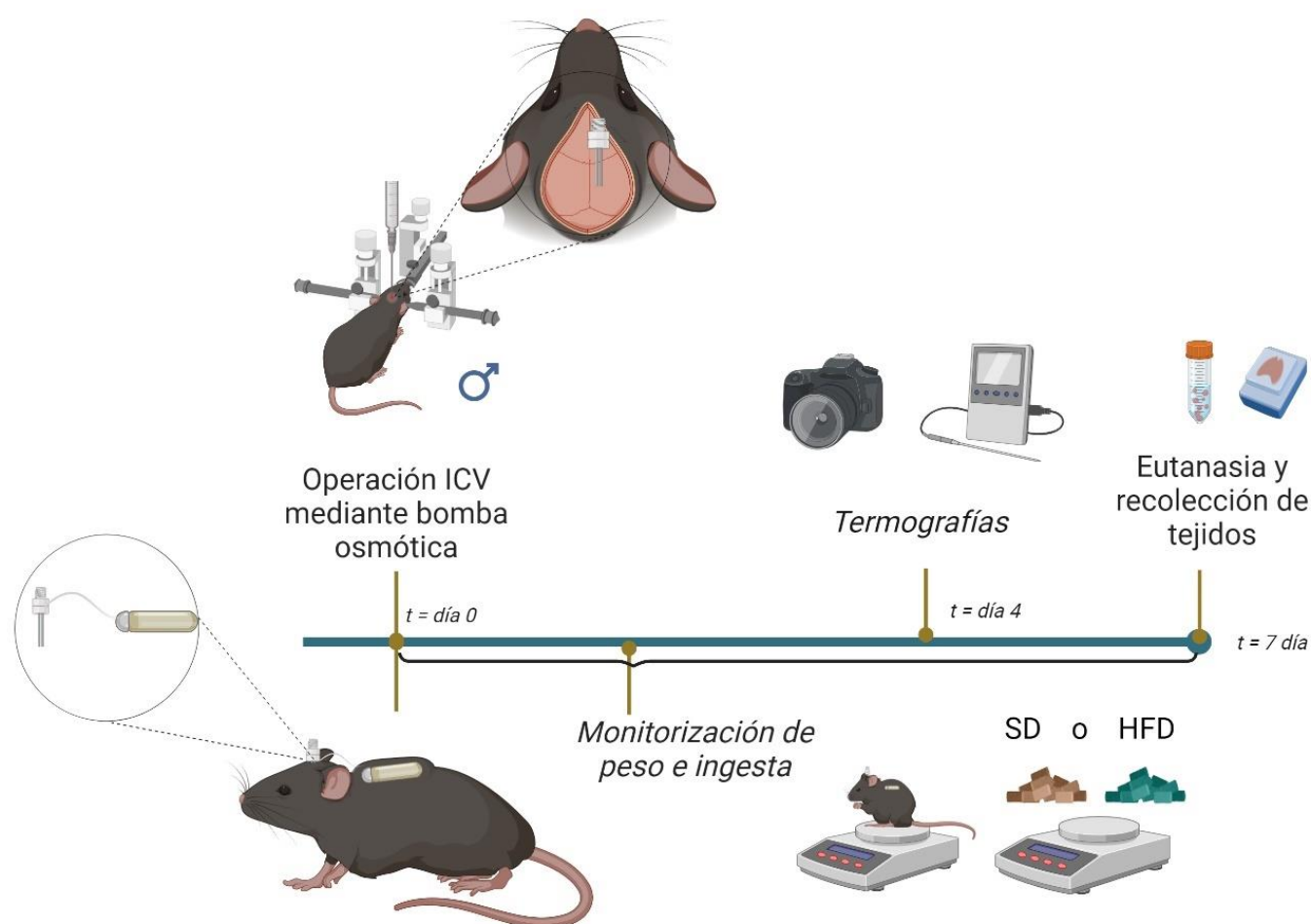


Figura 24. Tratamiento ICV con succinato mediante bombas osmóticas en ratones SUCNR1 flox flox machos en SD y HFD (elaboración propia mediante BioRender.com)

8.5.6.3 INOCULACIÓN DE ADENOASOCIADOS CRE-GFP EN LA REGIÓN MEDIOBASAL HIPOTALÁMICA DE RATONES *SUCNR1*^{flox flox}

Se llevó a cabo una cirugía estereotáxica de adenoasociados AVV2-CRE-GFP (de signagen) en la región mediobasal hipotalámica inyectando 200 nl a 2×10^{13} VG/ml durante 10-15 minutos; al finalizar el procedimiento los ratones se estabularon de manera individual. Al comienzo de la fase luminosa, se procedió al pesado del animal y de la ingesta tres veces por semana durante seis semanas. Antes de la eutanasia y recolección de los tejidos de interés se realizaron termografías de la zona del BAT y medición de la temperatura corporal (ver Figura 25).

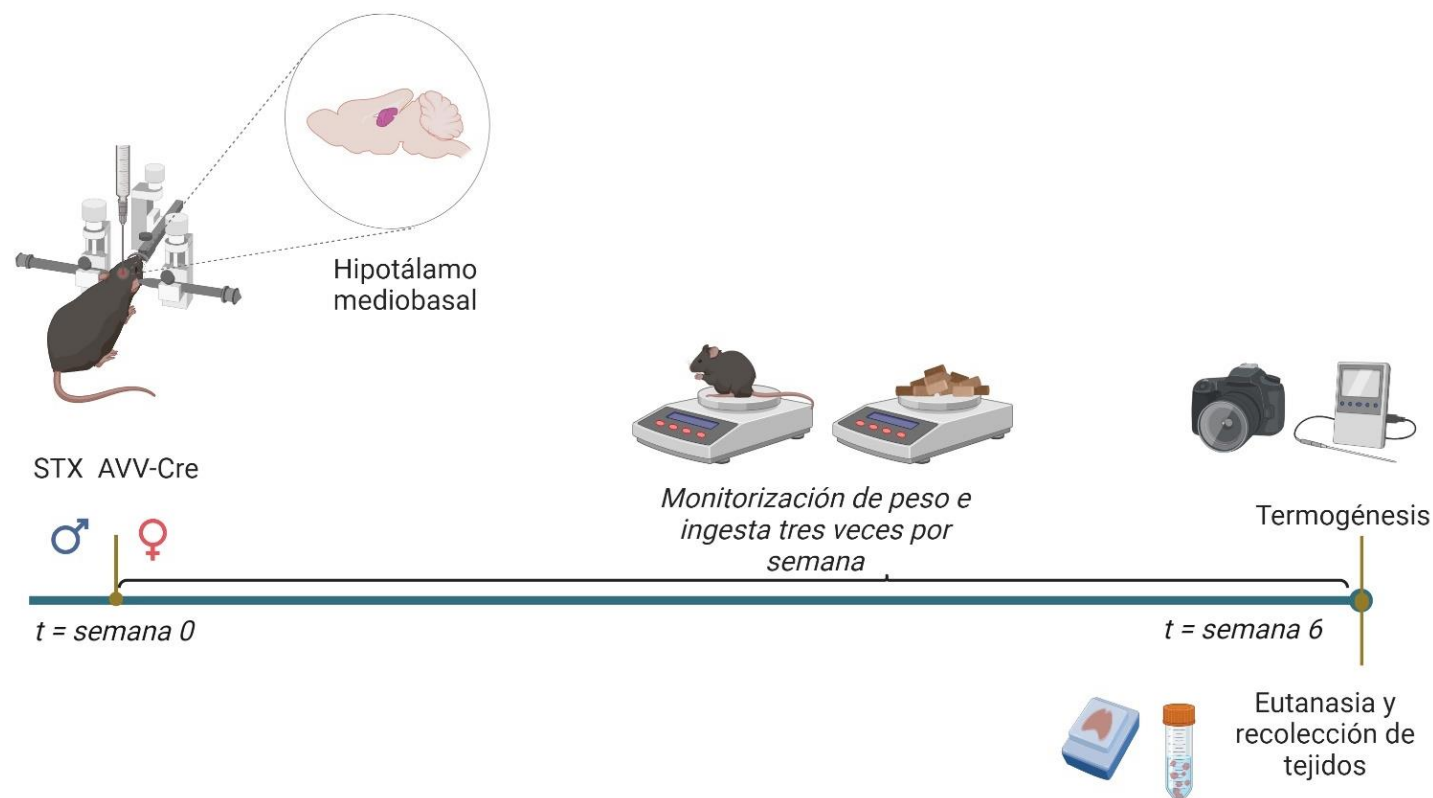


Figura 25. Inoculación de adenoasociados Cre-GFP en la región mediobasal hipotalámica de ratones *SUCNR1*^{flox flox} (elaboración propia mediante BioRender.com).

8.5.6.4 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS SF1-CRE EN EL VMH DE RATONES *SUCNR1*^{flox flox}

Se procedió a la inoculación por estereotaxia de adenovirus SF1-CRE (se inyectaron 2×10^{12} partículas virales) en el núcleo ventromedial de ratones *SUCNR1*^{flox flox}. Tras el procedimiento los animales se estabularon individualmente. Durante 12 días se pesaron los animales y la ingesta de estos diariamente al comienzo de la fase luminosa. El día de máxima expresión del virus, día 11 se tomaron fotografías térmicas y mediciones de la temperatura corporal de los ratones. Al día siguiente, se eutanasiaron los animales y se extrajeron los tejidos de nuestro interés (ver Figura 26).

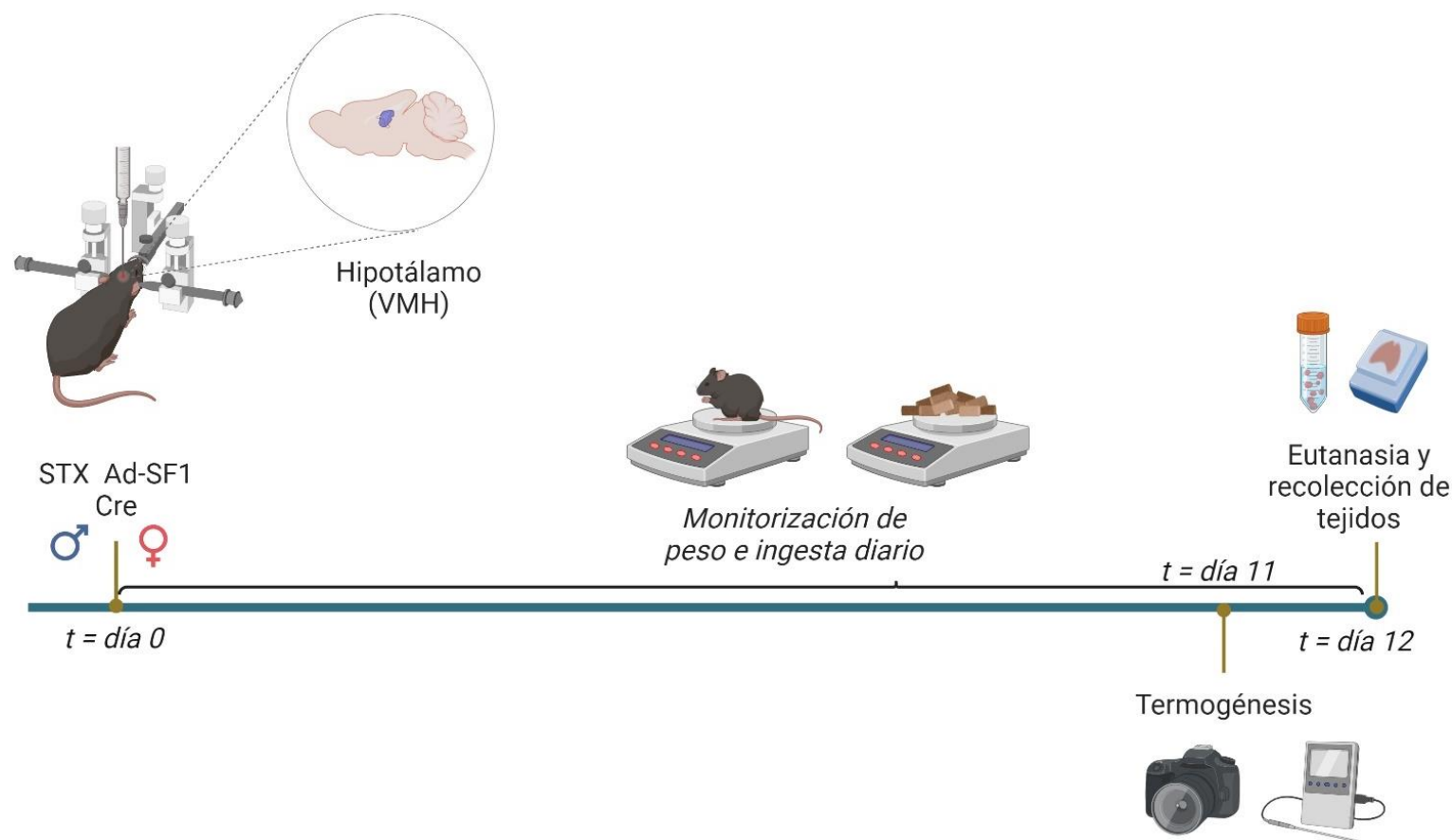


Figura 26. Inoculación de adenovirus SF1-Cre en el VMH de ratones *SUCNR1^{flox flox}* (elaboración propia mediante BioRender.com)

8.5.6.5 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT PARA JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL NÚCLEO VENTROMEDIAL HIPOTALÁMICO Y SU FENOTIPADO METABÓLICO

Para estudiar la importancia de JNK1 de las neuronas SF1 en el control del balance energético y del metabolismo periférico, se generó un modelo de ratón *knockout* para JNK1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico (*Sf1^{cre}/Jnk^{fl/fl}*). Los ratones del grupo control fueron sus hermanos de camada (*Jnk^{fl/fl}*). Desde las 4 semanas de edad hasta las 20, se realizó el seguimiento de la masa corporal. A partir de esta semana se monitorizó la ingesta y se realizaron las distintas pruebas del fenotipado metabólico (ver Figura 27 y Tabla 1).

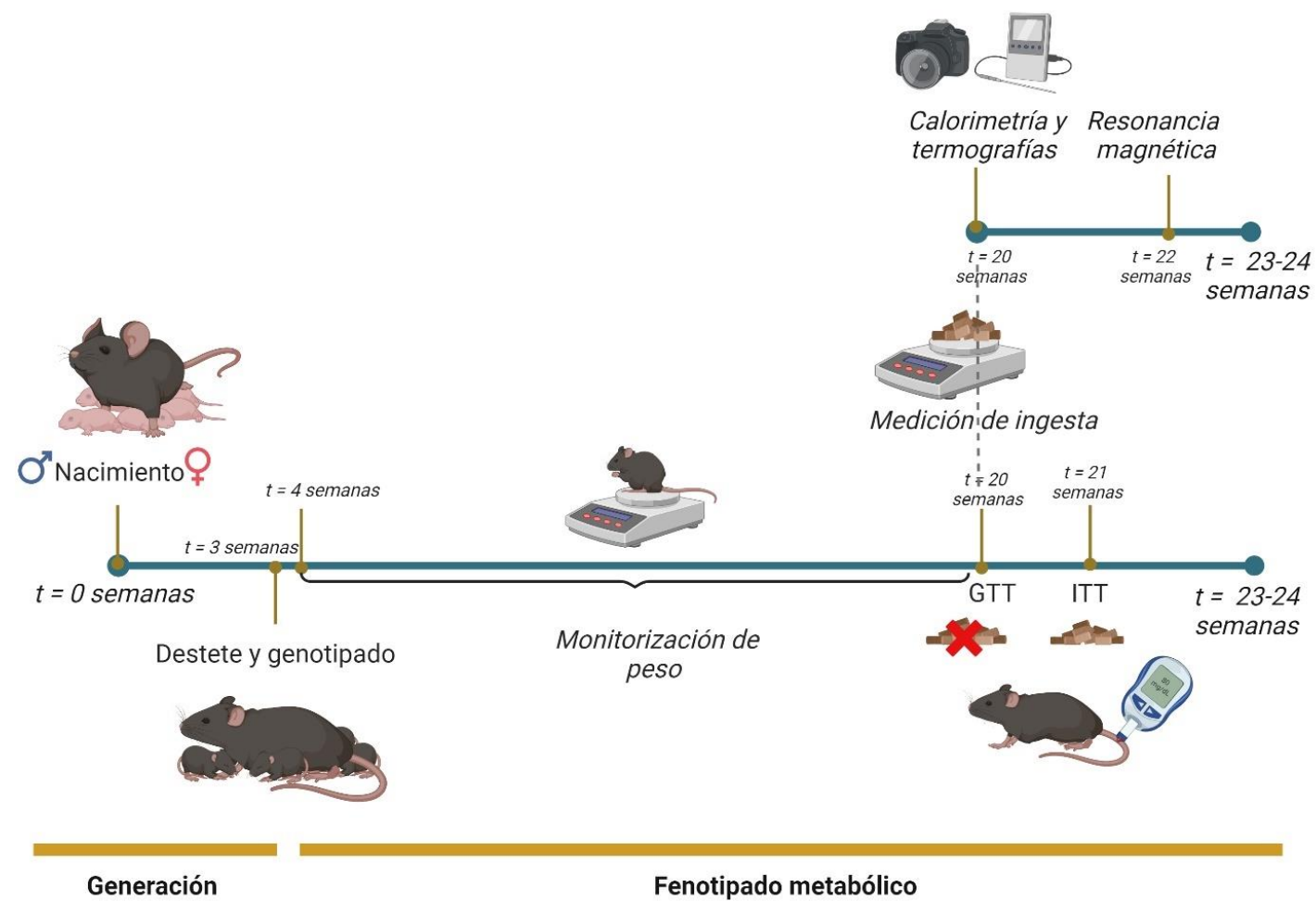


Figura 27. Generación y fenotipado metabólico de ratones $Sf1^{cre}/Jnk^{fl/fl}$ y $SUCNR1SF1KO$ (elaboración propia mediante BioRender.com)

Tabla 1. Edad de realización de los procedimientos del fenotipado metabólico en ratones macho y hembra.

Fenotipado metabólico	
Procedimientos	Edad ratones
Peso corporal	Semana 4 - semana 23-24
Ingesta diaria total (e ingesta diaria luz oscuridad en $SUCNR1SF1KO$)	Semana 20-21
GTT	Semana 20
ITT	Semana 21
Calorimetría/ Termografías	Semana 20-21
Resonancia magnética	Semana 22
Eutanasia y recolección de tejidos	Semana 23-24

8.5.6.6 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT PARA SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL NÚCLEO VENTROMEDIAL HIPOTALÁMICO EN SD Y SU FENOTIPADO METABÓLICO

Con la finalidad de identificar de manera más precisa las poblaciones neuronales específicas en las que SUCNR1 puede estar modulando el equilibrio energético, se generó un modelo de ratón *knockout* para SUCNR1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico (*SUCNR1 flox flox SF1 Cre⁺*). Los ratones del grupo control fueron sus hermanos de camada (*SUCNR1 flox flox SF1 Cre⁻*). Desde las 4 semanas de edad hasta las 20, se realizó el seguimiento del peso corporal. A partir de esta semana se monitorizó la ingesta y se realizaron las distintas pruebas del fenotipado metabólico (ver Figura 27 y Tabla 1).

8.5.6.7 GENERACIÓN DE RATONES KNOCKOUT PARA SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL NÚCLEO VENTROMEDIAL HIPOTALÁMICO EN HFD Y SU FENOTIPADO METABÓLICO

Se realizó el fenotipado metabólico del modelo del ratón *knockout* para SUCNR1 en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico con dieta alta en grasas. Desde las 4 semanas de edad hasta las 12 semanas, se realizó el seguimiento del peso corporal. A partir de esta semana se monitorizó la ingesta y se realizaron las distintas pruebas del fenotipado metabólico (Figura 28 y Tabla 2).

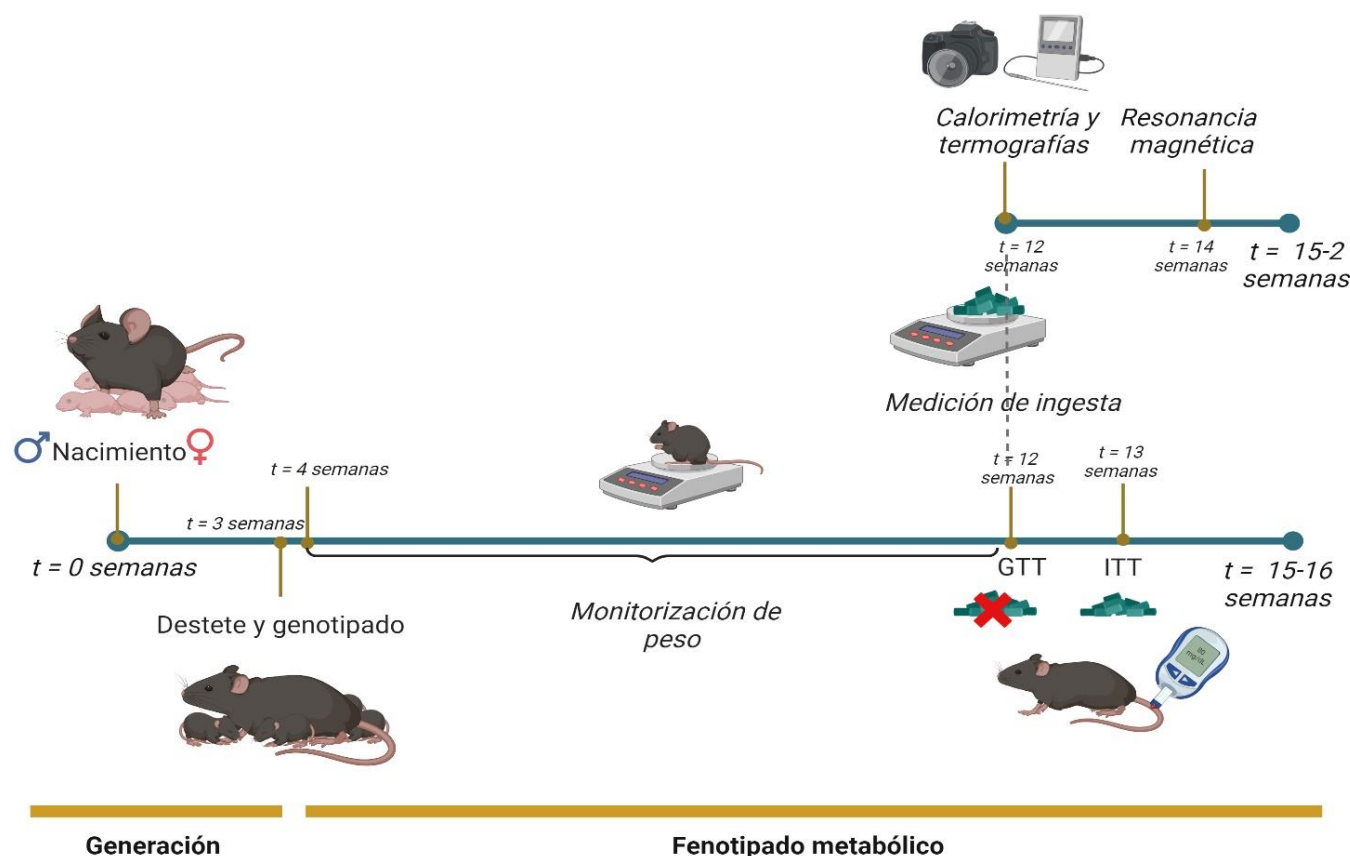


Figura 28. Generación y fenotipado metabólico de ratones SUCNR1SF1KO en HFD (elaboración propia mediante BioRender.com)

Tabla 2. Edad de realización de los procedimientos del fenotipado metabólico en ratones SUCNR1SF1KO HFD machos y hembras.

Fenotipado metabólico	
Procedimientos	Edad ratones
Peso corporal	Semana 4 - semana 12
Ingesta diaria total/ Ingesta diaria luz- oscuridad	Semana 12
GTT	Semana 12
ITT	Semana 13
Calorimetría/ Termografías	Semana 12-13
Resonancia magnética	Semana 14
Eutanasia y recolección de tejidos	Semana 15-16

8.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

8.6.1 WESTERN BLOT

8.6.1.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Para la extracción de proteína se emplean muestras de tejido guardado a -80 °C, por ello durante su manipulación se mantuvieron siempre en hielo seco. Se cortó un fragmento de tejido a analizar del tamaño de una lenteja y se introdujo en un tubo eppendorf de 2 ml (*Safe-Lock Tubes 2.0 ml*; Eppendorf; Hamburgo, Alemania) que contenía una bolita de acero y la cantidad apropiada de tampón de lisis (entre 100 µl y 1000 µl) con inhibidor de proteasas (*Complete TM*; Roche; Mannheim, Alemania). Los eppendorf con las muestras se introdujeron en un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II*; Quiagen; Germantown, MD, USA) con la finalidad de disgregar y romper de manera mecánica las células. El tiempo y la frecuencia de la disgregación mecánica dependieron del tipo de tejido a estudiar. Tras la homogenización, se centrifugó el tejido a 13200 rpm durante 30 minutos y se extrajo el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml (*Safe-Lock Tubes 1.5 ml*; Eppendorf; Hamburgo, Alemania), descartando el precipitado. Dos centrifugaciones de 5 minutos se realizaron a mayores en el caso del hígado y del BAT, para asegurarnos la eliminación completa de la grasa.

Tabla 3. Cantidad de tampón de lisis en función del tejido de ratón.

Tejido de ratón	Cantidad/Volumen
VMH	90 µl
BAT	1 ml
Hígado	1 ml

Tabla 4. Composición del tampón de lisis.

Tampón de lisis (pH 7.5)	
Reactivo	Cantidad/Volumen
Tris-HCL pH 7.5	2.5 ml
EGTA 0.2 M (pH 8)	2.5 ml
EDTA 0.2 M (pH 8)	2.5 ml
Tritón X-100	5 ml
Ortavanadato sódico 0.1 M	5 ml
Fluoruro sódico	1 g
Pirofosfato sódico	1.1 g
Sacarosa	46 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml
Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE)	1 pastilla por cada 50 ml



8.6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas a partir de los extractos proteicos se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford, empleando el kit Bio-Rad Protein Assay (*Protein Assay Dye Reagent*; Bio-Rad; Hercules, CA, USA). Todo el proceso de llevó a cabo en hielo a 4°C para evitar la degradación de la proteína.

Se prepararon alícuotas de las muestras en tubos eppendorf de 1 ml, diluyéndolas 1:26 en H₂O destilada. Se preparó una placa de lectura de 96 pocillos para el espectofotómetro (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer*; Thermo Scientific; Rockford, IL, USA), cargando 10 µl de cada muestra y, posteriormente, 250 µl de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:4 en H₂O destilada y a una temperatura de 37°C. En la placa se cargó también una recta de calibrado, mediante una dilución seriada de albúmina de suero bovino (BSA, *Albumin from bovine serum*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EUU) con siete puntos duplicados de concentración conocida (Tabla 5). Se incubó la placa en el lector de placa durante 5 minutos a 37°C y se midió la colorimetría en densidad óptica en cada pocillo a una longitud de onda de λ=595 nm. Extrapolando los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra.

Tabla 5. Concentraciones de BSA de la recta patrón.

Concentraciones de BSA de la recta patrón	
Punto	Concentración
Punto 1	0.03125 mg/ml
Punto 2	0.0625 mg/ml
Punto 3	0.125 mg/ml
Punto 4	0.25 mg/ml
Punto 5	0.5 mg/ml
Punto 6	0.7 mg/ml
Punto 7	1 mg/ml

8.6.1.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamida Gel Electrophoresis*). Consiste en la separación de las proteínas en función de su masa molecular, para ello hay que eliminar la estructura cuaternaria de la proteína y lograr así la migración en el gel. También resulta necesario eliminar la carga intrínseca de los polipéptidos, desnaturalizarlos y proporcionales el mismo signo de carga, porque las proteínas están sometidas a un campo eléctrico. Con esta finalidad se prepararon alícuotas de cada muestra, manteniendo la misma concentración de proteína total (10-20 µg) en tampón de lisis con inhibidor de proteasas, a las que se les añadió se añadió un tampón de carga 5X para asegurar la eliminación de la estructura cuaternaria de las proteínas (β-mercaptoetanol; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EE. UU.), uniformizar la carga eléctrica de manera proporcional a su longitud (SDS, sulfato de dodecilo de sodio; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EE. UU.) e incrementar su densidad para facilitar su carga en el gel. Finalmente, se incorporó el colorante azul de bromofenol (Azul de bromofenol; Merck; Darmstadt, Alemania) (Tabla 6). Se utilizó la cantidad de proteína más adecuada para los análisis de Western Blot en cada tejido (Tabla 7).

Tabla 6. Composición del tampón de carga 5X.

Tampón de carga 5X (pH 6.8)	
Reactivo	Cantidad/Volumen
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
β-mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml
Ajustar a pH 6.8 y enrasar con H ₂ O miliQ hasta 1L.	



Tabla 7. Concentración de proteína de los distintos tejidos.

Concentración de proteína de los tejidos	
Tejido	Concentración
BAT	8 µg
Hígado	10-20 µg
Hipotálamo	10 µg
Medio basal	10 µg
VMH	10 µg

8.6.1.4 PREPARACIÓN DE LOS GELES

Para la separación de las proteínas se emplearon geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Estos geles forman una especie de malla tridimensional que proviene de la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N, N-metilenobisacrilamida), proceso que es catalizado por por amonio persulfato (APS) (*Ammonium persulfate*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) y TEMED (*N,N,N,N-tetramethyletlenediamina*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU). La red tridimensional que forma el gel contiene unos poros, cuyo tamaño es determinado por la concentración de acrilamida y bis-acrilamida (30% *Acrylamide/Bis Solution* 29:1; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) y esto así vez determina la migración de las proteínas en función de su tamaño. Los geles están compuestos por dos partes, una separadora y otra concentradora. En la separadora se separan las proteínas es por ello que presenta un porcentaje de acrilamida diferente (6%, 8%, 10%, 12% o 15%) en función del peso molecular de la proteína de interés (Tabla 8). La otra fracción, la concentradora, posee un porcentaje fijo de acrilamida/bis-acrilamida (4%) y tiene como función agrupar las proteínas produciendo la separación de las muestras de una manera simultánea (Tabla 9).

Mediante un soporte para los geles, estos se hacen mezclando una serie de reactivos dentro de unos cristales. En primer lugar, se agrega la parte separadora del gel y se añade isopropanol 2-Propanol; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU) al 60% para nivelar el borde superior del gel y eliminar las burbujas de la superficie. Una vez polimerizada la parte separadora, se retiró el isopropanol y se lavó tres veces con H₂O destilada. Para finalizar, se secó el exceso de agua con papel de filtro, pero sin tocar el gel y se añadió la parte concentradora colocando los peines de inmediato para formar los pocillos.

Tabla 8. Composición de los geles separadores de electroforesis.

Gel separador	Gel 6%	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%	Gel 15%
Reactivo	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen	Volumen
H ₂ O destilada	5.3 ml	4.6 ml	4.0 ml	3.2 ml	2.3 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	2 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
APS 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	4 µl

Tabla 9. Composición del gel concentrador de electroforesis.

Gel concentrador 4%	
Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada	3.4 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	630 µl
SDS 10%	50 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	4 µl

8.6.1.5 ELECTROFORESIS

Una vez polimerizados por completo, los geles se colocaron en la carcasa de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra Cell*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) e inmediatamente se les agregó tampón de electroforesis 1X (Tabla 10) cubriendo bien los geles y evitando que estos se sequen. Se retiró el peine del gel y previamente a la carga de las muestras en los pocillos del gel, se calentaron a 95°C durante 5-10 minutos en agitación suave. Se cargaron 16 µl de muestra en cada pocillo del gel, excepto en el primer pocillo, en el que se añadieron 3-5 µl de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein, cat 161-0374*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Cabe resaltar que, en todos los geles se cargaron muestras de todos los grupos para que las condiciones fuesen las mismas. La carcasa de electroforesis se conectó a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU), sometiendo las muestras a un campo eléctrico (voltaje constante de 100-120V y amperaje de 180 mA), induciendo así la migración de las proteínas desde el ánodo hacia el cátodo. La electroforesis se paró al llegar el frente de migración a una distancia aproximada de 1 cm del borde inferior del gel.

Tabla 10. Composición del tampón de electroforesis.

Tampón de electroforesis 1X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Glicina	72 g
Trizima base	15 g
SDS	5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

8.6.1.6 TRANSFERENCIA DEL GEL A UNA MEMBRANA

Tras finalizar la electroforesis, el siguiente paso consistió en transferir las proteínas del gel a un medio sólido, como una membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*; Millipore; Burlington, MA, EEUU) para analizar la expresión de cada proteína. Para ello, las proteínas se sometieron a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana en la cual quedan absorbidas, empleando un sistema de transferencia de tipo semi-seca Trans-Blot Semy-dry Transference (*Extra thick BloT Paper*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). Se prepararon las membranas, cortándolas con unas dimensiones similares a las del gel (8.5 cm x 6.5 cm), se activaron previamente con metanol, H₂O destilada y tampón de transferencia al 1X, 5 minutos en cada (Tablas 12 y 13). Posteriormente, se prepararon los papeles absorbentes (*Extra Thick Blot Paper*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU) entre los que se van a situar la membrana y el gel durante la transferencia, se cortaron con las mismas dimensiones que la membrana y se sumergieron en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para que se produjese la transferencia.

Una vez activadas las membranas, se colocaron el gel y la membrana entre los papeles absrobentes húmedos en el sistema Trans-Blot Semy-dry Transference, siempre evitando la formación de burbujas entre ellos con un rodillo para que la transferencia se realice de manera correcta, durante 2 horas a un voltaje de 25V y un amperaje constante de 250 mA conectando el sistema de transferencia a una fuente de energía (*PowerPac HC Hight Current Power Supply*; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU).

Tras realizar la transferencia, se comprobó el correcto funcionamiento de la misma mediante el empleo del colorante Rojo de Ponceau (*Ponceau S Red*; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU). Dicha tinción se eliminó fácilmente lavando la membrana con tampón de lavado.

Tabla 12. Composición del tampón de transferencia 25X.

Tampón de transferencia 25X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Glicina	36.5 g
Trizima base	72.5 g
SDS	4.5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml

Tabla 13. Composición del tampón de transferencia 1X.

Tampón de transferencia 1X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Tampón de transferencia 25X	40 ml
Metanol	200 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 l

8.6.1.7 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez lavada la tinción Ponceau, se procedió a incubar las membranas con tampón de bloqueo BSA 3% (3g de BSA en 100ml de TBS-TWEEN) (Tabla 13) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este paso se realiza con la finalidad de eliminar las uniones inespecíficas que presenta la membrana. Tras la incubación se cortó la membrana usando como referencia el marcador de peso molecular y de esta manera aislar las diferentes proteínas a analizar. Cada fragmento de membrana se incubó con un anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (Tabla 14) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en función de las especificaciones de cada anticuerpo. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario (Tabla 15), este se retiró y se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado (Tablas 17 y 18) a temperatura ambiente. A continuación, los fragmentos de la membrana se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 16) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado.

Tabla 14. Composición del tampón de bloqueo.

Tampón de bloqueo	
Reactivo	Volumen/cantidad
BSA	3 g
Tampón de lavado	100 ml

Tabla 15. Relación de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Mouse Anti-α-tubulin	Sigma-Aldrich (T5168)	1:5000
Mouse Anti-β-actin	Sigma-Aldrich (A5316)	1:5000
Rabbit Anti-ACC	Cell Signaling (3662S)	1:1000
Rabbit Anti-AMPKα	Cell Signaling (2532)	1:1000
Rabbit Anti-AMPKα1	Millipore (07-350)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-ACC (Ser79)	Cell Signaling (3661L)	1:1000
Rabbit Anti-Phospho-AMPKα (Thr172) (40H9)	Cell Signaling (2535L)	1:1000
Rabbit Anti-UCP1	Abcam (ab10983)	1:5000



Tabla 16. Relación de anticuerpos secundarios utilizados y sus diluciones.

Anticuerpo	Casa comercial (Referencia)	Dilución
Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling (7076S)	1:5000
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling (7074S)	1.5000

Tabla 17. Composición del tampón de lavado 10X.

Tampón de lavado 10X (pH 7.6)	
Reactivo	Volumen/cantidad
Trizma base	24.2 g
NaCl	80 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

Tabla 18. Composición del tampón de lavado 1X.

Tampón de lavado 1X	
Reactivo	Volumen/cantidad
Tampón de lavado 10X	100 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1l

8.6.1.8 REVELADO

Para proceder al revelado de la membrana, se incubó 3 minutos en oscuridad en el sustrato de revelado que detecta el Horseradish Peroxidase (*Pierce ECL Western Blotting substrate*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU) en una dilución 1:1 de cada uno de los reactivos. Inmediatamente después, las membranas se colocaron en un casete de revelado (*Hypercassette*; Amersham Biosciences GE Healthcare Life Sciences; Buckinghamshire, Reino Unido) entre dos papeles de acetato, asegurándonos de que no quedasen burbujas. El revelado, se llevó a cabo en una cámara oscura en la que se introdujo una película de revelado sensible a la luz en el interior del casete (*Fuji Medical X-Ray Film*; Fujifilm Corporation; Tokio, Japón). El tiempo de exposición cambió en función de la proteína de estudio. A continuación, se sacó la película del casete y se sumergió en una solución de revelado (dilución 1:10) (*Developer/Replenisher G150*; Agfa-Gevaert Group; Dubendorf, Suiza) hasta que se visualizó la señal. Seguidamente, se sumergió en un líquido fijador (dilución 1:5) (*Manual fixing bath G354*; Agfa-Gevaert Group; Dubendorf, Suiza) durante unos segundos para fijar la señal. Por último, se lavó en abundante agua para eliminar los restos de los líquidos y se dejó secar. Una vez secas las películas, se marcaron los pesos moleculares del marcador para identificar las proteínas según su peso molecular. Los fragmentos de la membrana se guardaron en papel Whatman (*3MM Chromatography paper*; GE Healthcare; Chicago, EEUU).

8.6.1.9 CUANTIFICACIÓN

Para la cuantificación de las imágenes, se escanearon las películas autorradiografiadas obteniendo imágenes escaneadas (resolución 600 ppp, *HP Scanjet G2710*; Hewlett-Packard; CA, EEUU). A partir de ellas se midió la densidad óptica de la señal de cada muestra, con el software informático ImageJ (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU). Para ello se seleccionó un área fija rectangular del tamaño adecuado para todas las señales de cada una de las muestras, midiéndose la densidad óptica de cada una de las señales, así como una zona adyacente que fue considerada como fondo. Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica del fondo para obtener la señal real. Finalmente, la señal de cada una de las muestras fue representada en función de la señal obtenida para el control (β -actina o α -tubulina) de esa misma muestra.



8.6.2 PCR PARA GENOTIPADO

8.6.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Se empleó una pequeña sección de cola del ratón de unos 2-3 mm que se introdujo en un eppendorf al que se le añadieron 600 µl de NaOH a 0.6 M y se calentaron a 100°C durante 15 minutos para conseguir la degradación del tejido. Después, las muestras se mantuvieron a RT (del inglés *room temperature*, o temperatura ambiente) durante diez minutos y posteriormente se le añadieron 100 µl de Tris-HCl.

8.6.2.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR CONVENCIONAL

Con la finalidad de llevar a cabo el genotipado de las distintas colonias de ratones se realiza el método de PCR estándar. En este proceso, la región de ADN de interés se amplifica utilizando un conjunto particular de cebadores (ver en Tabla 19 para JNK1 y Tabla 21 para SUCNR1) y se aplican unas condiciones específicas de temperatura y un número determinado de ciclos para el alelo bajo investigación.

Tabla 19. Set de cebadores para el genotipado de JNK1

Alelo	Secuencia
MD-F2 flox	5´ - AGGATTATGCCCTCTGCTTGTC-3´
MD-R2 flox	5´ -GAG GCA CTT GGC TAG GCT CTG AGG A-3´

Las condiciones de la PCR para JNK1 se detallan en la siguiente tabla (Tabla 20):

Tabla 20. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones JNK1SF1.

Paso	Temperatura	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	93 °C	30 s	35
Alineamiento	58°C	45 s	
Extensión	72°C	10 min	1
Extensión final	4°C	1 min/kb	

Tabla 21. Set de cebadores para el genotipado de SUCNR1.

Alelo	Secuencia
Flp2	5´ - AGACAAGTTATGACTATATGCTGAGAC-3´
Flp3	5´ -TTCACATCATAATATAGCACCCTGTA-3´

Las condiciones de la PCR para JNK1 se detallan en la siguiente tabla (Tabla 22):

Tabla 22. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones SUCNR1SF1.

Paso	Temperatura	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	10-15 s	25-40
Alineamiento	60°C	10-15 s	
Extensión	72°C	1-15 s/kb	1
Extensión final	72°C	1 min/kb	

8.6.2.3 ELECTROFORESIS DE AGAROSA

La separación de los fragmentos de ADN amplificados se realizó en geles de agarosa (Agarose; Sigma-Aldrich; San Luis, MI, EEUU), cuya concentración depende del tamaño de los fragmentos amplificados. Para los alelos estudiados de JNK1 se empleó una concentración de 2% de agarosa y 1,5% para los SUCNR1 disuelta en un tampón de electroforesis TAE (TRIS 40 mM pH 7.6; Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM). Tras disolverlo, se aplicó una tinción de ácidos nucleicos (Red Safe; iNtRON biotechnology; Corea del Sur), para visualizar el ADN. Todo ello se vertió en un molde para genes de agarosa en el que se colocó un peine para formar los pocillos del gel. Una vez gelificado, se cargó 5 µl de marcador de peso molecular (DNA Ladder; Invitrogen; Carlsbad, CA, EEUU) y las muestras; se aplicó un voltaje de 100 V durante 1 hora, sumergido en TAE. Para la visualización de los fragmentos de ADN se empleó un transiluminador de luz ultravioleta (Gel Doc 1000; Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU).

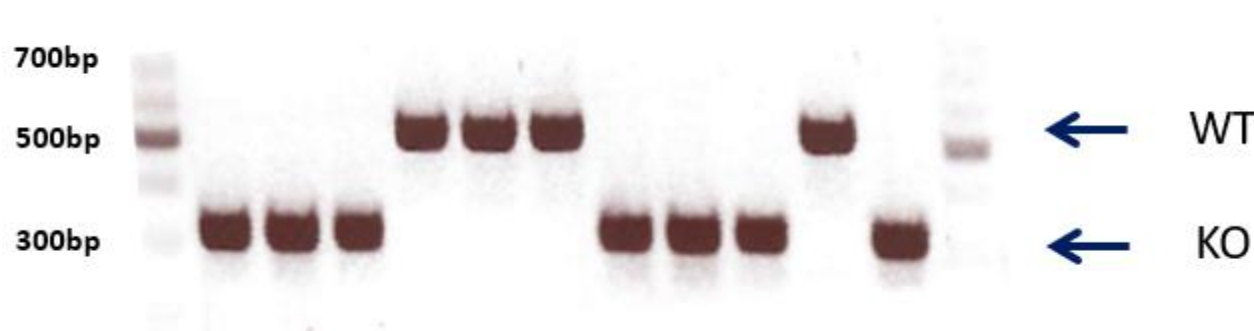


Figura 29. Bandas obtenidas en la PCR de JNK1. En el WT sale una banda de 540 pares de bases y el KO una a 330 pares de bases

En el caso de los SUCNR1 a 300 pares de bases sale el WT y el KO a 500 pb.

8.6.3 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de esta técnica los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina (150 mg/kg, 10 mg/kg) para la posterior perfusión intracardiaca de los ratones con suero fisiológico y paraformaldehído 4% (PFA 4%) (ver Tabla 23). Los cerebros, tras 24 horas en PFA 4% se cambiaron a una solución de sacarosa al 30%. Posteriormente se congelaron a -80°C y se cortaron en secciones de 30 µm de ancho en el criostato (*Leica CM1860 cryostat*; Leica biosystems; Barcelona, España), escogiendo la región del hipotálamo mediobasal (entre -1.34 mm y -1.94 mm respecto al bregma).

Los cortes de cerebro se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos y se realizó el desenmascaramiento de antígenos o *antigen retrieval* incubándolos en 1X tampón de citrato (1:10) 10 mM pH6 a 95°C durante 10 minutos (Tabla 24). A continuación se enfriaron a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBS durante 10 minutos, finalmente se permeabilizaron con PBS 1X-Triton X-100 al 0.3% durante 10 minutos. Tras ello, se realizaron dos lavados en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% y se bloquearon con solución de bloqueo (suero de cabra (NGS, *normal goat serum*) al 5% en PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-JNK1 (1:200, Sc-1648, Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente, los cortes fueron lavados cuatro veces durante 10 minutos con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1%, e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con Goat Anti-Rabbit Alexa-488 (1:1000). Después se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X-Triton X-100 al 0.1% y otro lavado de 10 minutos con PBS 1X, para a continuación incubarlos con solución Hoechst (*Hoeschst solution*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU) 1:300 diluido en PBS 1X. Finalmente se lavó con PBS 1X durante 10 minutos, se montaron los cortes con solución de montaje (*Prolong Gold*; Thermo Scientific; Rockford, IL, EEUU). Se repitió el mismo proceso, pero sin el anticuerpo primario para los controles negativos para asegurar que no existe señal de los anticuerpos secundarios. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal (*Leica TCS SP-5-X*; Leica

biosystems; Barcelona, España). Para la cuantificación y el análisis de las imágenes se empleó el software LAS X (*Leica Application Suite X*; Leica biosystems; Barcelona, España).

Tabla 23. Composición del paraformaldehído 4%.

Paraformaldehído 4% pH 7.2	
Reactivo	Volumen/cantidad
PFA	40 g
NaOH 2N	1 gota/ml
PBS 10X	100 ml
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 l

Tabla 24. Composición del tampón citrato sódico 10 mM.

Tampón de citrato sódico 10mM pH 6.0	
Reactivo	Volumen/cantidad
Citrato trisódico dihidrato	1.47 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml

8.6.4 DETERMINACIONES SÉRICAS

Se midieron los niveles de triglicéridos y colesterol en suero se midieron utilizando los kits Spinreact (Triglicéridos. GPO-POD. Enzimático colorimétrico y Colesterol. CHOD-POD. Enzimático colorimétrico; Spinreact SA, San Esteve de Bas, España).

8.6.5 ANÁLISIS DE METABOLITOS

▪ *Extracción de grasa hepática*

Esta técnica consiste en cuantificar la cantidad de lípidos presentes en el hígado. Se realizó un protocolo de extracción de grasa homogeneizando 0,5-1 gramo de hígado de ratón en una solución 2:1 de cloroformo-metanol y el tejido se sometió a disgregación mecánica de igual manera que para la extracción de proteína. Una vez realizado este paso, se sometieron las muestras a rotación orbital durante 3 horas para su homogeneización y facilitar la disolución de la gras en disolvente orgánico. Para la separación de fases, se añadieron 0,3 ml de agua destilada y se centrifugaron los tubos 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se descartó la fase orgánica superior dejando la inferior evaporarse toda la noche en la campana de extracción de gases, y así obtener el precipitado.

▪ *Determinación de extractos grasos de tejido*

Se empleó un kit especial para TAG y colesterol (Triglicéridos. GPO-POD. Enzimático colorimétrico y Colesterol. CHOD-POD. Enzimático colorimétrico; Spinreact SA, San Esteve de Bas, España). A partir del precipitado obtenido anteriormente, se echó en cada muestra cloroformo y se mezcló hasta su completa disolución. Después se transfirieron 15 µl de esta mezcla a otro eppendorf y se dejaron evaporar, a continuación, se mezclaron con el reactivo indicado en el kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras esto, se cargaron por duplicado las muestras y la recta patrón en una placa para posteriormente leerlo en el espectofotómetro. El resultado obtenido se corrigió por el peso del fragmento usado en la extracción.

8.6.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TEJIDOS

El análisis histológico de los distintos tejidos, fue diferente en función de la técnica empleada: Inmunohistoquímica para UCP-1 (BAT), tinción hematoxilina-eosina (hígado y BAT) y tinción Oil red (hígado).

8.6.6.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

- UCP-1

En el momento de la eutanasia de los animales, se fijaron las muestras de BAT en formalina 10 % y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol (100°, 95°, 70°) para su estudio histológico, montaje en xileno e inmersión en parafina. Se prepararon secciones de 4 µm que se desparafinaron en xileno, se rehidrataron y enjuagaron en H₂O destilada. La detección de UCP1 en BAT se realizó utilizando un anticuerpo anti-UCP1 (1:500; ab10983; Abcam), se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario ENVISION (una mezcla de anti-*Rabbit* y anti-*Mouse*; Dako; Glostrup, Dinamarca).

- Hematoxilina-eosina

Esta técnica se empleó para estudiar estructuras celulares. Para realizarla se emplearon las muestras parafinadas y se trataron con xilol para eliminar cualquier exceso de parafina. A continuación, de igual modo que en el caso anterior se sometieron a concentraciones de alcoholes decrecientes. Se lavaron con H₂O destilada, se sumergieron en hematoxilina durante 10 minutos, se volvieron a lavar e inmediatamente se pasaron por un alcohol ácido. Después, las muestras se sumergieron 30 segundos en eosina y se deshidrataron los cortes pasándolos por los mismos alcoholes en graduación creciente. Finalmente, se sumergieron en xilol 10 minutos y se procedió al montaje.

- Tinción Oil-Red

La tinción con Oil. Red O se llevó a cabo con fragmentos de hígado congelado, en los cuales se realizaron cortes de 10 micras de grosor utilizando un criostato. Las muestras se fijaron en formalina neutra tamponada al 10% durante toda la noche. Posteriormente, se tiñeron con Solución Oil Red (Merck) durante 20 minutos y después se lavaron con agua destilada. A continuación, se aplicó otro colorante y se contratiñeron con Hematoxilina de Harris (Bio-óptica) durante 10 minutos. Después, las muestras se lavaron nuevamente y se montaron en un medio de montaje acuoso. Se tomaron fotografías con un microscopio óptico conectado a una cámara Olympus con aumento 40x. Finalmente, las imágenes se analizaron utilizando el programa Image J (Image J 1.40 g, Wayne Rasband NIH, USA).

8.6.6.2 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes de las histologías una vez fijadas se tomaron con un microscopio óptico conectado a una cámara Olympus XC50 (Olympus Corporation; Tokio, Japón) a 40X. Se tomaron de 3-4 fotografías que se procesaron con el software ImageJ (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU). Para UCP-1 y hematoxilina-eosina las imágenes se analizaron separándolas en canales de color, ajustando los límites al comprobar las imágenes de todas las muestras y tras ello se analizaron las partículas. Para la tinción Oil red O, se contaron el número de células por imagen para calcular la cantidad de lípidos acumulados (*ImageJ-1.40g software*; Wayne Rasband; NIH, EEUU).

8.6.7 ESTADÍSTICA

La representación gráfica de los resultados obtenidos se ha expresado como la media de cada grupo y el error como la desviación estándar de la media (SEM). En los análisis moleculares los grupos experimentales se han expresado como porcentaje respecto al grupo control, mientras que para otros parámetros y experimentos in vivo (por ejemplo, monitorización de ingesta de alimento y masa corporal), como normal general, se han empleado los valores crudos. El número de muestras o animales empleados en cada figura de los resultados se refleja en los pies de estas.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante *Microsoft Excel* (Microsoft Office 2021) y el software estadístico *GraphPad Instad* (GraphPad Instad® Software. V8), este último también se empleó para elaborar las figuras de esta tesis doctoral. De forma previa al análisis de resultados mediante el software *GraphPad Software Outlier Calculator*, que presenta una funcionalidad en la que emplea la prueba Grubbs para ello. Esta determina valores atípicos significativos del resto. También, fueron excluidos de los resultados aquellos animales que presentaban estereotipias, dolor o mal aspecto externo.

8.6.7.1 T-TEST

Esta técnica estadística permite la comparación dos poblaciones que tienen medias desapareadas, cuanto mayor es el tamaño de la muestra, el test se vuelve más robusto ($n \geq 5$). En un contraste de hipótesis bilateral, es decir de dos colas, se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico tanto la cola inferior como superior de la distribución. En un contraste unilateral, es decir de una cola, la desigualdad de la hipótesis se señala en una dirección.

8.6.7.2 ANOVA

Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA, *analysis of variance*), para establecer si había diferencias significativas entre las medias de tres o más grupos que son independientes entre sí y siguen una distribución normal. Se concluyó que había diferencias significativas entre las medias de los grupos cuando el valor de p asociado con el estadístico F es menor que el nivel de significancia (se consideró 0.05) y se rechazó la hipótesis nula. Tras realizar el ANOVA, si los grupos presentaban un comportamiento distinto, se realizó un test de Tukey (para comparaciones múltiples test recomendado por el software de análisis de datos), y así saber entre que grupos hay diferencias de forma individual.

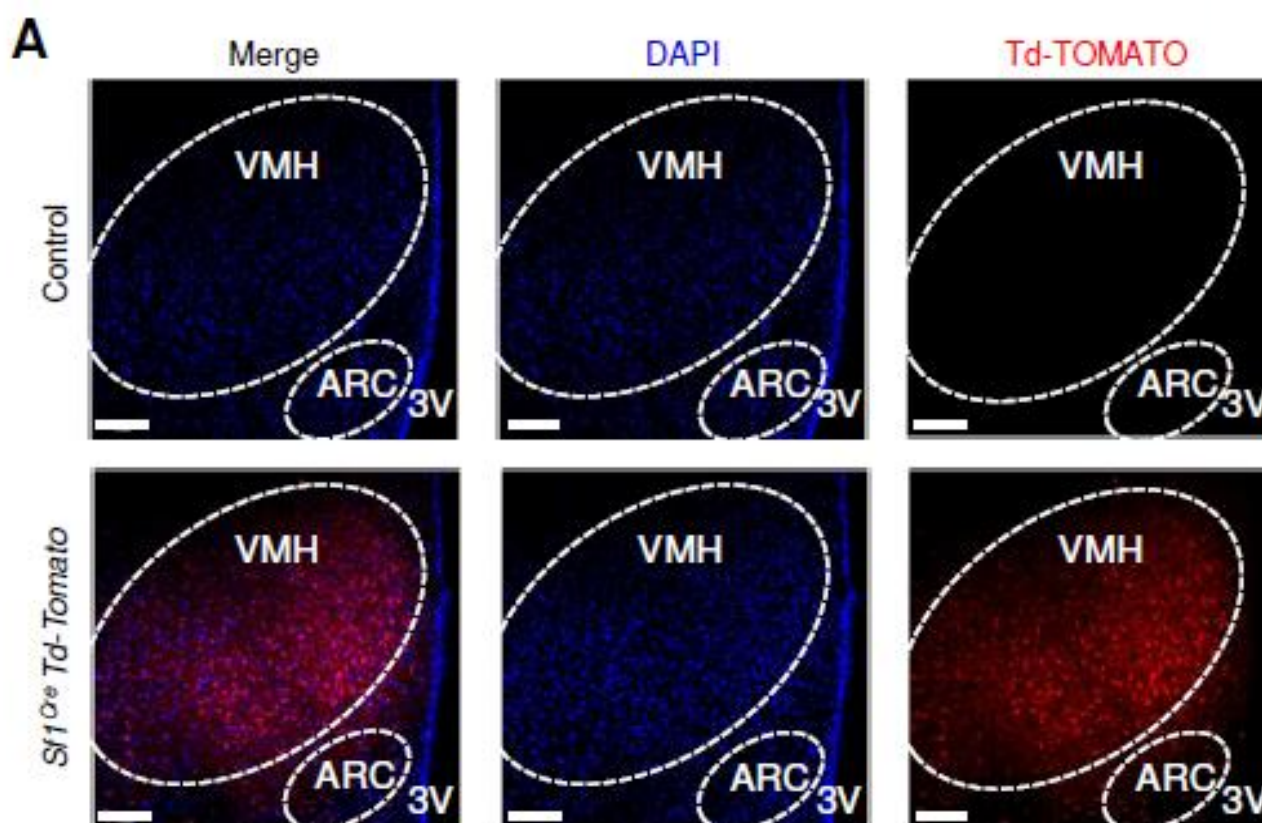
8.6.7.3 ANCOVA

El análisis de covarianza (ANCOVA, por sus siglas en inglés) es una técnica estadística que combina elementos del análisis de varianza (ANOVA) y la regresión lineal. Se emplea para evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de diferentes grupos, controlando el efecto de una o más covariables (variables continuas) que puedan influir en la variable dependiente. En la presente tesis doctoral se empleó el análisis ANCOVA para los análisis de “*energy expenditure*” usando la masa corporal como covariante. Se consideraron significativos todos los resultados con una $P < 0.05$.

RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH

Con la finalidad de examinar el papel de JNK1 en el VMH, se llevó a cabo un modelo de ratón que permitiese la eliminación controlada del gen *jnk1* en las neuronas SF1 del VMH (*Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}*). Para lograr este objetivo, se empleó un sistema Cre/lox y así eliminar de forma selectiva *Jnk1* en las neuronas SF1 de dicho núcleo. Se generó de esta manera un ratón deficiente en JNK1, mediante el cruce de ratones *floxeados* para JNK1 (*Jnk1^{fl/fl}*; Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, España) con ratones *Sf1^{Cre}*, los cuales expresan Cre recombinada bajo el promotor SF1, lo que lo hace específico para este subconjunto de neuronas del VMH en todo el SNC. Para visualizar la actividad de Cre se empleó un ratón que expresa td-Tomato fluorescente y se cruzaron con ratones *Sf1^{Cre}*, confirmando la especificidad de la recombinación dentro del VMH (Figura 30A). De acuerdo con estos resultados, los niveles de proteína de JNK1 (Figura B y 1C), número de células positivas para JNK1 (Figura 30B y 30D) y niveles de ARNm de *Jnk1* (Figura 30E) se encontraban significativamente reducidos en el VMH de los ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* al compararlos con sus compañeros de camada controles.



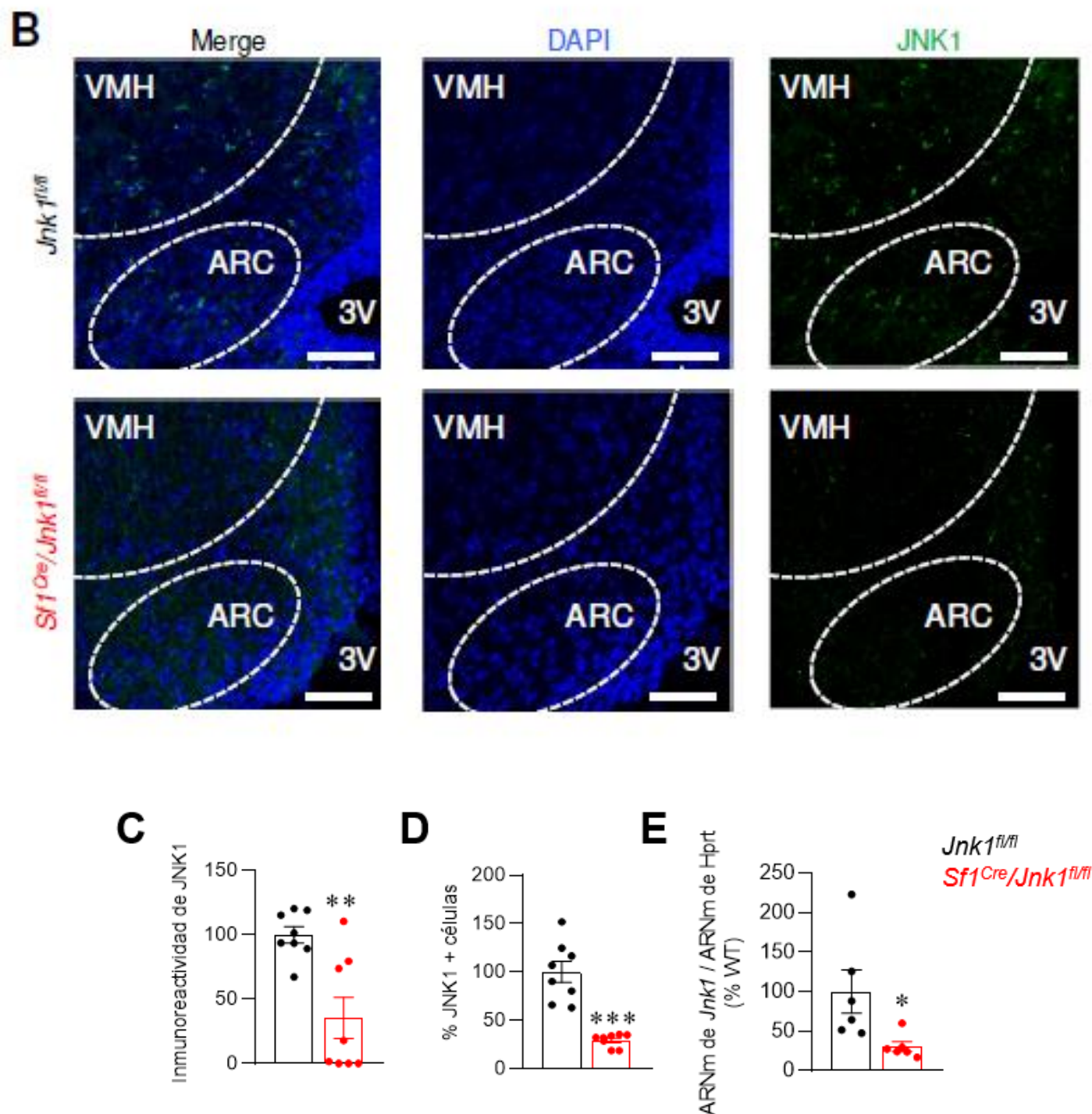


Figura 30. Validación y especificidad de la delección del gen *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de ratones td-Tomato fluorescente con ratones *Sf1^{Cre}* (la demostración de la actividad Cre recombinasa se muestra como presencia de Td-TOMATO fluorescente en el VMH de ratones reporteros *Sf1^{Cre}* Td-Tomato y ausencia en los animales control) (40x; Escala: 100 μ m). (B) Imágenes representativas de confocal de JNK1 en el VMH de ratones control (*Jnk1^{fl/fl}*) y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (40x; Escala: 100 μ m). (C) Inmunofluorescencia de JNK1 en el VMH de ratones control (*Jnk1^{fl/fl}*) y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* cuantificada por intensidad (n=7-8 animales por grupo experimental). (D) Inmunofluorescencia de JNK1 en el VMH de ratones control (*Jnk1^{fl/fl}*) y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* cuantificada por número de células (n=8 por animales por grupo experimental). (E) RT-PCR de *jnk1* en el VMH de ratones hembra control (*Jnk1^{fl/fl}*) y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}*. (n=6 ratones por grupo experimental). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM. La significación estadística fue determinada por el test t-Student; * p<0,05, ** p<0,01 y ***p<0,001 vs *Jnk1^{fl/fl}* 3V: tercer ventrículo.

2 LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH EN HEMBRAS DISMINUYE EL PESO CORPORAL SIN AFECTAR AL GASTO ENERGÉTICO

Con la finalidad de observar el impacto que produce la inhibición de *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH en la homeostasis energética, se evaluó el peso corporal de ratones WT (o *Jnk1^{fl/fl}*) y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* en una dieta SD (del inglés *standard diet*) desde el destete (4 semanas) hasta las 20 semanas de vida. Nuestros resultados indican que los ratones hembra *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* presentan un menor peso corporal estadísticamente significativo que sus hermanas de camada *wildtype* (Figura 31 A). La ingesta alimentaria se evaluó a las 20 semanas de edad durante 7 días con el objetivo de saber si existían diferencias entre los ratones hembra WT y mutantes (*Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}*), pero no se detectaron diferencias significativas en los *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* con sus compañeras de camada (Figura 31 B). En cuanto a la adiposidad, se observó que las hembras *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* presentaban una mayor cantidad de grasa gonadal y visceral que los WT (Figura 31 C), sin embargo, al estudiar la cantidad de masa grasa y masa magra no se observaron diferencias significativas entre los mutantes y los WT (Figura 31 D).

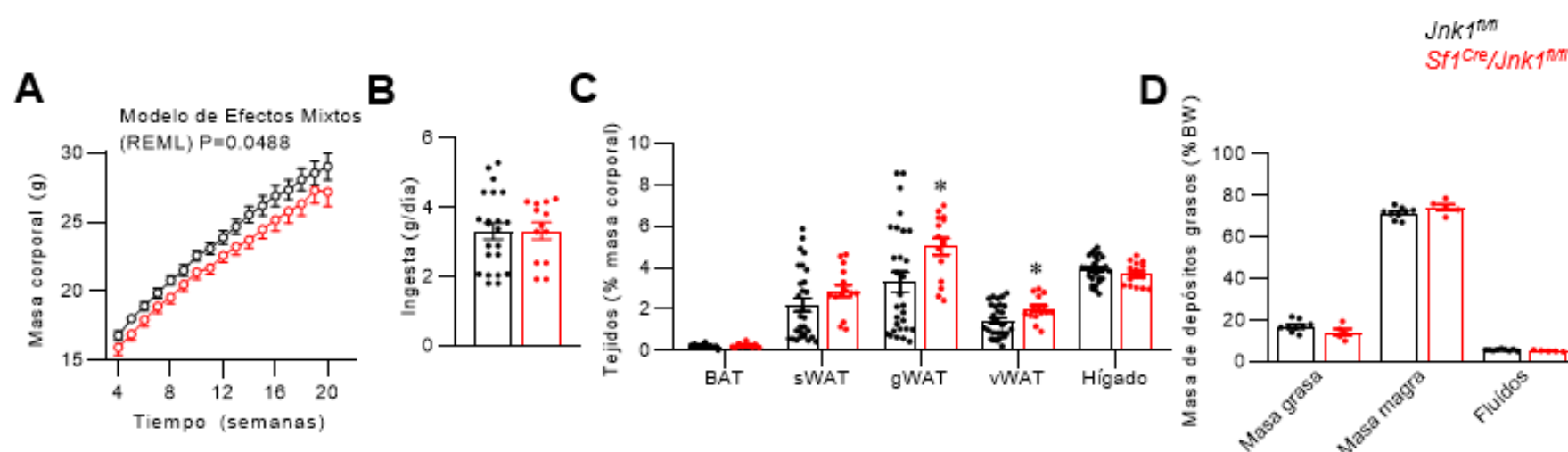


Figura 31. Efecto de la eliminación de *Jnk1* en el VMH y el balance energético en hembras. (A) Peso corporal en ratones (n=27-39 ratones por grupo experimental). (B) Ingesta diaria (n=13-22 ratones por grupo experimental). (C) Peso de tejidos corregido por masa corporal (n=15-29 animales por grupo). (D) Masa de depósitos grasos de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM. La significación estadística fue determinada por el modelo de efectos mixtos (Figura 2 A) o por el test t-Student; (Figuras 2B, 2C y 2D); * P<0,05 vs *Jnk1^{fl/fl}*.

Posteriormente, se investigó el gasto energético (Figura 32A, 32B, 32C), el cociente de intercambio respiratorio (RER) (Figura 32D-E) y la actividad locomotora espontánea (Figura 32F) a las 20 semanas de vida. Los datos obtenidos no muestran diferencias entre los ratones hembra WT y los *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* en ninguna de las variables estudiadas, aunque si se observó una disminución no significativa del RER, lo que indica una tendencia a una mayor elevada oxidación lipídica.

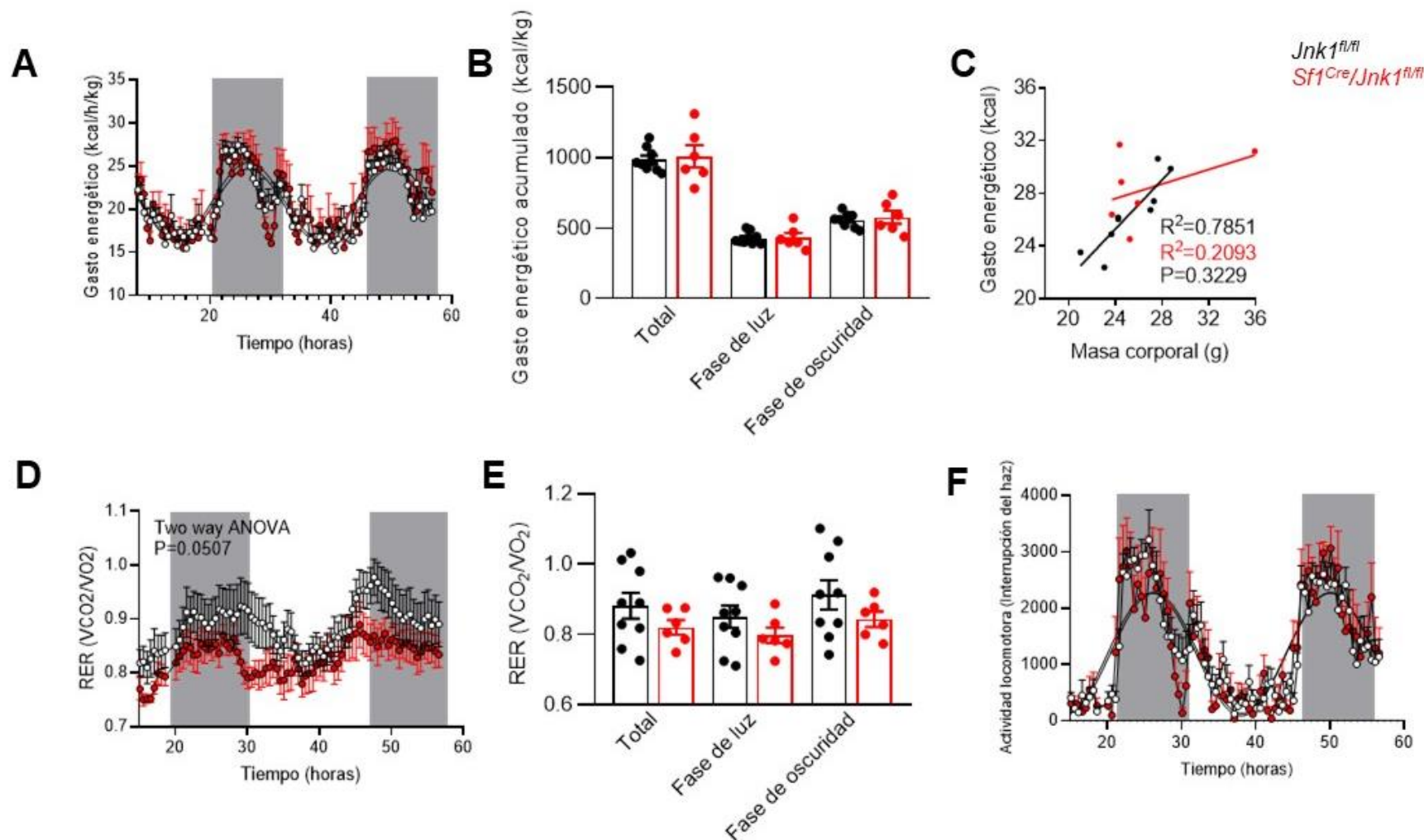


Figura 32. Efecto de la eliminación de *Jnk1* en el VMH en el gasto energético en hembras. (A) Gasto energético de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental) durante la fase de luz y oscuridad. (B) Gasto energético acumulado de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental). (C) Gasto energético en relación a la masa corporal de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental). (D) Tasa de intercambio respiratorio de hembras (RER) de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental) durante la fase de luz y oscuridad. (E) RER promedio de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental) (F) Actividad locomotora de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-9 animales por grupo experimental). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y en las Figuras A,D,F se ajustaron con el modelo cosinor. La significación estadística fue determinada mediante two-way ANOVA (Figura 3A, 3D y 3F), ANCOVA (Figura 3C) o el test t-Student (Figuras 3B y 3E).

3 LA ELIMINACIÓN DE JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH EN HEMBRAS NO AFECTA A LA ACTIVACIÓN NI A LA TERMOGÉNESIS DEL BAT

Debido al importante papel de las neuronas SF1 en la regulación de la termogénesis del BAT, se investigó el impacto de la eliminación de *Jnk1* en las neuronas SF1 del núcleo VMH sobre la función del BAT en ratones hembra de 20 semanas de edad. El análisis termográfico infrarrojo de los ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* mostró que la delección de *Jnk1* en dichas neuronas del VMH no provoca cambios significativos en la temperatura del BAT en hembras (Figuras 33A y 33B) consistente con una temperatura corporal normal (Figura 33C). En consecuencia, el análisis molecular del BAT mediante Western Blot no mostró cambios en la expresión de UCP1, marcador clave en la termogénesis (Figuras 33D y 33E); ni tampoco en el *browning* del BAT (Figura 33F), ya que no se encontraron diferencias en la inmunoreactividad de UCP1 entre los

WT y los mutantes ($Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$) (Figura 33G), ni tampoco en el área de los adipocitos (Figura 33H). Por lo tanto, esta evidencia demuestra que la ablación de *Jnk1* en neuronas SF1 no influye en la termogénesis del BAT.

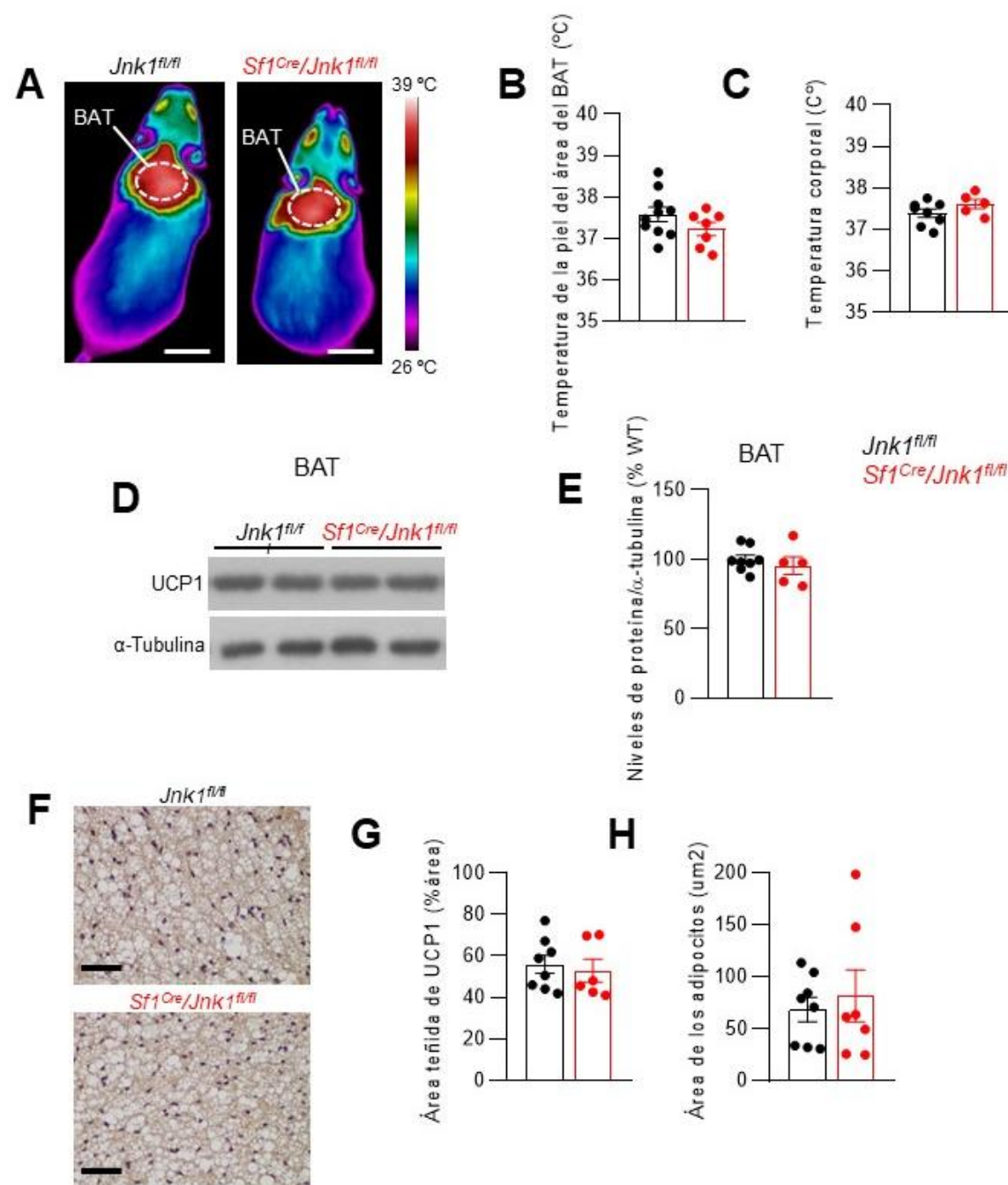


Figura 33. Efecto de la eliminación de *Jnk1* en el VMH de hembras en la activación y termogénesis del BAT. (A) Imágenes térmicas representativas del BAT de ratones WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$. (B) Temperatura del área del BAT de hembras WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$ (7-10 animales por grupo experimental). (C) Temperatura corporal de hembras WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$ (5-8 animales por grupo experimental). (D) Imagen representativa del WB de UCP1 y su control α tubulina. (E) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de ratones hembra WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$. (F) Inmunohistoquímica de UCP1 (40X). (G) Área inmunorreactiva de UCP1 en BAT de ratones WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$. (6-8 animales por grupo). (H) Área de adipocitos del BAT de ratones WT y $Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}$. (7-8 animales por grupo). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM.

4 LOS RATONES HEMBRA DEFICIENTES EN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH MUESTRAN UNA MEJORA EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Las neuronas SF1 del VMH son las principales reguladoras de la homeostasis de la glucosa (Fosch et al., 2021; B. Kim, 2008; King, 2006a; López, 2018a) y JNK1 hipotalámica desempeña un papel en la regulación de la homeostasis de la glucosa, en concreto en las neuronas de la proteína relacionada con el agutí (AgRP) (Belgardt et al., 2010; Tsaousidou et al., 2014). Por todo ello, se evaluó la repercusión de la ablación de *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH en la regulación de la glucosa periférica, en la respuesta a la insulina y en la capacidad gluconeogénica, mediante los test de GTT, de ITT y de PTT. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en ratones alimentados *ad libitum* y en estado de ayuno a las 20 semanas de edad, ya que los ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* en condiciones de ayuno mostraban un descenso de los niveles circulantes de glucosa (Figura 34A). También se vio que estos ratones mutantes mostraron una mayor tolerancia a la glucosa (Figuras 34B y 34C), a pesar de un empeoramiento de la sensibilidad a la insulina (Figuras 4D y 4E), pero no presentan cambios en la tolerancia al piruvato (Figuras 34F y 34G), ya que los ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* mostraron una glucemia normal después de la PTT en comparación con los salvajes. En conjunto, estos datos demuestran que, de manera similar a las neuronas AgRP, JNK1 en las neuronas SF1 desempeña un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa.

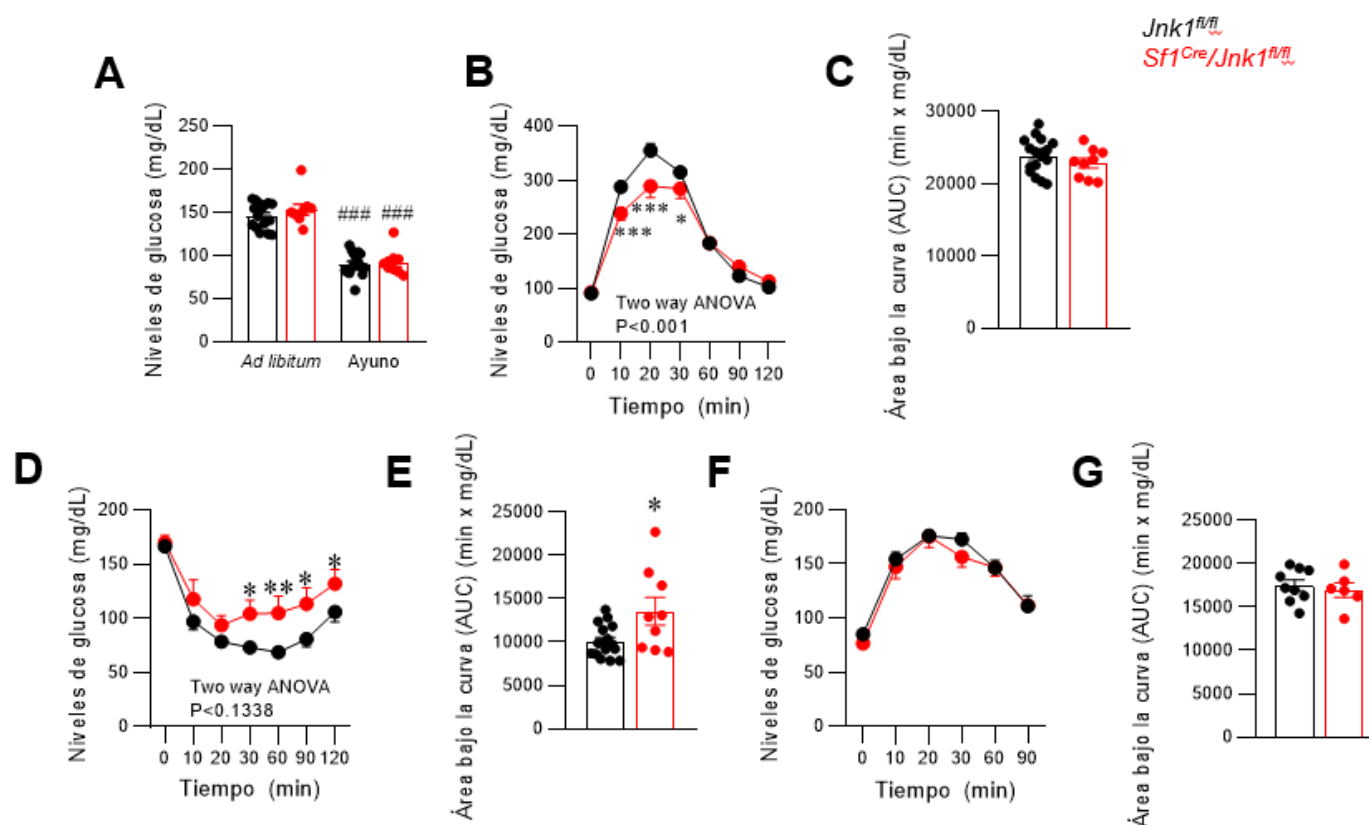


Figura 34. Efecto de la eliminación de *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH de hembras en la homeostasis de la glucosa. (A) Niveles de glucosa en condiciones de alimentación *ad libitum* y en ayuno en hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (n=9-17 animales por grupo). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM (One-way ANOVA, ####p<0.0001 vs ayuno). (B) Test de tolerancia a glucosa (GTT, glucosa tolerance test) (n=9-17 animales por grupo). (C) Área bajo la curva de la GTT (9-17 animales por grupo). (D) Test de tolerancia a la insulina (ITT, insulin tolerance test) (9-17 animales por grupo) (E) Área bajo la curva de la ITT (9-16 animales por grupo). (F) test de tolerancia al piruvato (6-9 animales por grupo). (G) Área bajo la curva de la PTT (6-9 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (Two-way ANOVA, * p<0,05 y ***p<0,001 en B, D y F; y test t-Student * p<0,05 vs WT(*Jnk1^{fl/fl}*) en C, E, G).

5 LOS RATONES HEMBRA DEFICIENTES EN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH MUESTRAN UNA DISMINUCIÓN EN EL CONTENIDO LIPÍDICO EN EL HÍGADO.

La activación de JNK1 dentro del VMH modula el metabolismo de los lípidos hepáticos a través de PSNS (Martínez-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, el mecanismo molecular de la población neuronal implicada en este efecto sigue sin abordarse. Por lo tanto, se investigó el metabolismo de los lípidos en los ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* y se analizaron los niveles de colesterol y triglicéridos en suero (Figuras 35A y 35B, respectivamente) y triglicéridos en hígado (mediante ELISA (Figura 35C) y por tinción de Oil Red (Figura 35D y 35E). Los datos mostraron que en los animales mutantes existe una disminución de los niveles circulantes de colesterol y triglicéridos en suero, asociados a una disminución de los triglicéridos hepáticos y del contenido total de lípidos en comparación con los WT, llegando a ser significativas las diferencias en el hígado. En colaboración con el laboratorio de Dra. Ángela Valverde (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM), CSIC-UAM, Madrid, España; CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, España) se llevó a cabo la técnica TBARS para analizar los niveles de malondialdehído (MDA), resultando no haber diferencias significativas de MDA entre los ratones WT y mutantes, lo que indica que la eliminación de JNK1 en las neuronas SF1 no induce estrés oxidativo hepático (Figura 35F).

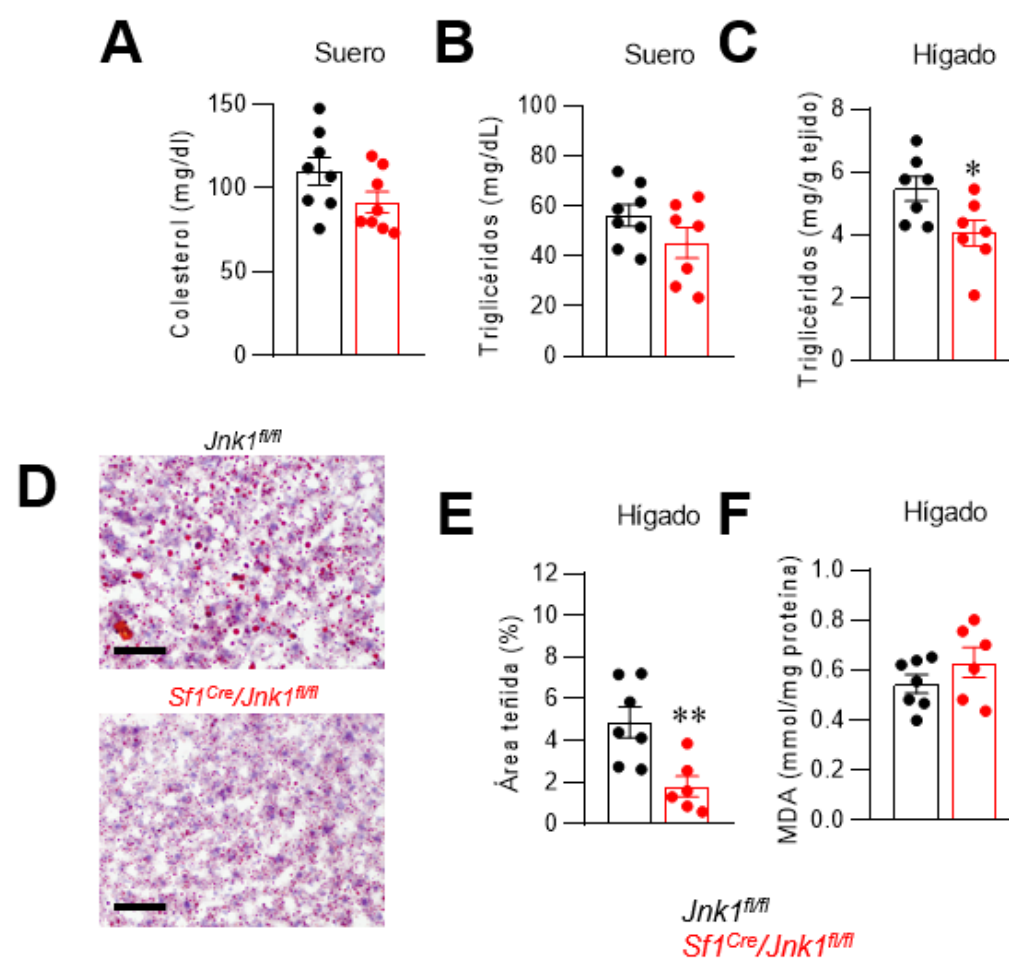


Figura 35. Efecto de la eliminación de *Jnk1* en las neuronas SF1 del VMH de hembras en el contenido lipídico. (A) Niveles de colesterol en suero en mg/dl de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (n= 8 animales por grupo). (B) Niveles de triglicéridos en suero en mg/dl de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (7-8 animales por grupo). (C) Niveles de triglicéridos hepáticos en mg/g de tejido de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (n=7 animales por grupo). (D) Imágenes representativas de Oil Red O de secciones de hígado (40X, barra de escala 50μm) de ratones hembra WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}*. (E) Análisis del área teñida con Oil Red O en % (n=6-7 animales por grupo). (F) Niveles de MDA hepáticos en nmol/ mg proteína de de hembras WT y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* (6-7 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM (test t-Student * p<0,05 y **p<0,01 vs WT (*Jnk1^{fl/fl}*)).

6 LA ELIMINACIÓN DEL GEN JNK1 EN LAS NEURONAS SF1 ALTERA LA RESPUESTA HEPÁTICA A LA T3 CENTRAL

La T3 a nivel central regula la ruta de la lipogénesis de novo en hígado y la oxidación de lípidos en BAT a través del PSNS y SNS, respectivamente (López, Varela, et al., 2010; Martínez-Sánchez et al., 2017). Esto quiere decir que la T3 central promueve la lipogénesis hepática con estimulación paralela del programa termogénico en BAT, lo que lleva a una pérdida de peso independiente de la alimentación. La acción de la T3 depende de la regulación inducida por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) de dos vías de señalización en el VMH: disminución del estrés del retículo endoplasmático (RE) inducido por ceramida, que promueve la termogénesis del BAT y aumento de la activación de JNK1, la cual controla el metabolismo de los lípidos hepáticos (Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2018). Aunque el papel de las neuronas SF1 en el eje SNS-BAT-AMPK-ER está bien establecido, no se ha abordado si JNK1 actúa en esa población neuronal para mediar el papel central de la T3 en el hígado. Para llevar a cabo nuestro objetivo se trataron centralmente ratones *Jnk1^{fl/fl}* y *Sf1^{Cre}/Jnk^{fl/fl}* con vehículo o T3 y se investigó tanto la respuesta hepática como del BAT. Los datos obtenidos mostraron que la T3 central provocó una pérdida de peso independiente de la ingesta de alimentos en ratones *Jnk1^{fl/fl}* (Figura 36A y 36B) y *Sf1^{Cre}/Jnk^{fl/fl}* (Figura 36C y 36D). A continuación, se estudió el efecto de la administración central de T3 sobre el programa termogénico y se observó en los ratones tratados presentaban mayor activación del BAT (Figuras 36E, 36F, 36G, 36H), coincidiendo con una mayor expresión del marcador termogénico UCP1 respecto a sus controles (Figuras 36I, 36J, 36K y 36L); por lo que se asoció la pérdida de peso con este efecto.

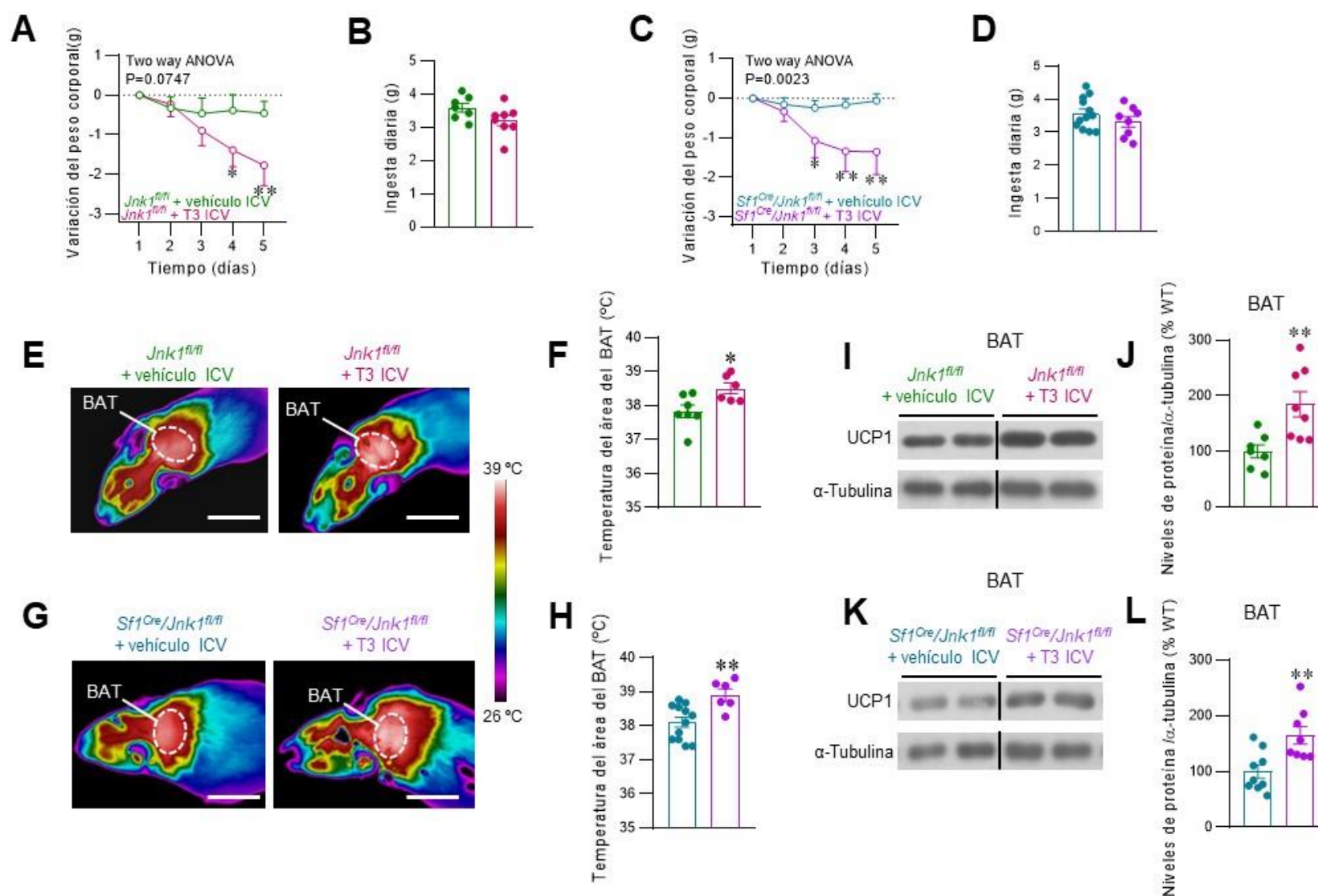


Figura 36. Efecto de la delección del gen *Jnk1* en neuronas SF1 sobre la acción central de T3 sobre la masa corporal y la termogénesis del BAT. (A) Cambios en la masa corporal en animales *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (B) Ingesta de alimento en animales *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (C) Cambios en la masa corporal en animales *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8-12 animales por grupo). (D) Ingesta de alimento en animales *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8-12 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de la activación del BAT de animales *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (F) Temperatura del área del BAT de ratones *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (I) Imagen representativa del WB de UCP1 y su control α tubulina de ratones hembra *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3. (J) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de ratones *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (G) Imágenes representativas de BAT de animales *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (H) Temperatura del área del BAT de ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=6-12 animales por grupo). (K) Imagen representativa del WB de UCP1 y su control α tubulina de ratones hembra *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3. (L) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8-9 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (test t-Student * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ vs. *Jnk1^{fl/fl}*).

7 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE T3 SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO.

Tras analizar el hígado en experimento de administración de T3 en estos animales, es de destacar que, aunque la T3 central aumentó los niveles de triglicéridos hepáticos y el contenido de lípidos en ratones salvajes (Figuras 37A, 37C, 37D), no lo hizo en los mutantes (37B, 37E, 37F). Esta evidencia demuestra que JNK1 en las neuronas SF1 es fundamental para el efecto de los TH centrales sobre el metabolismo de los lípidos hepáticos.

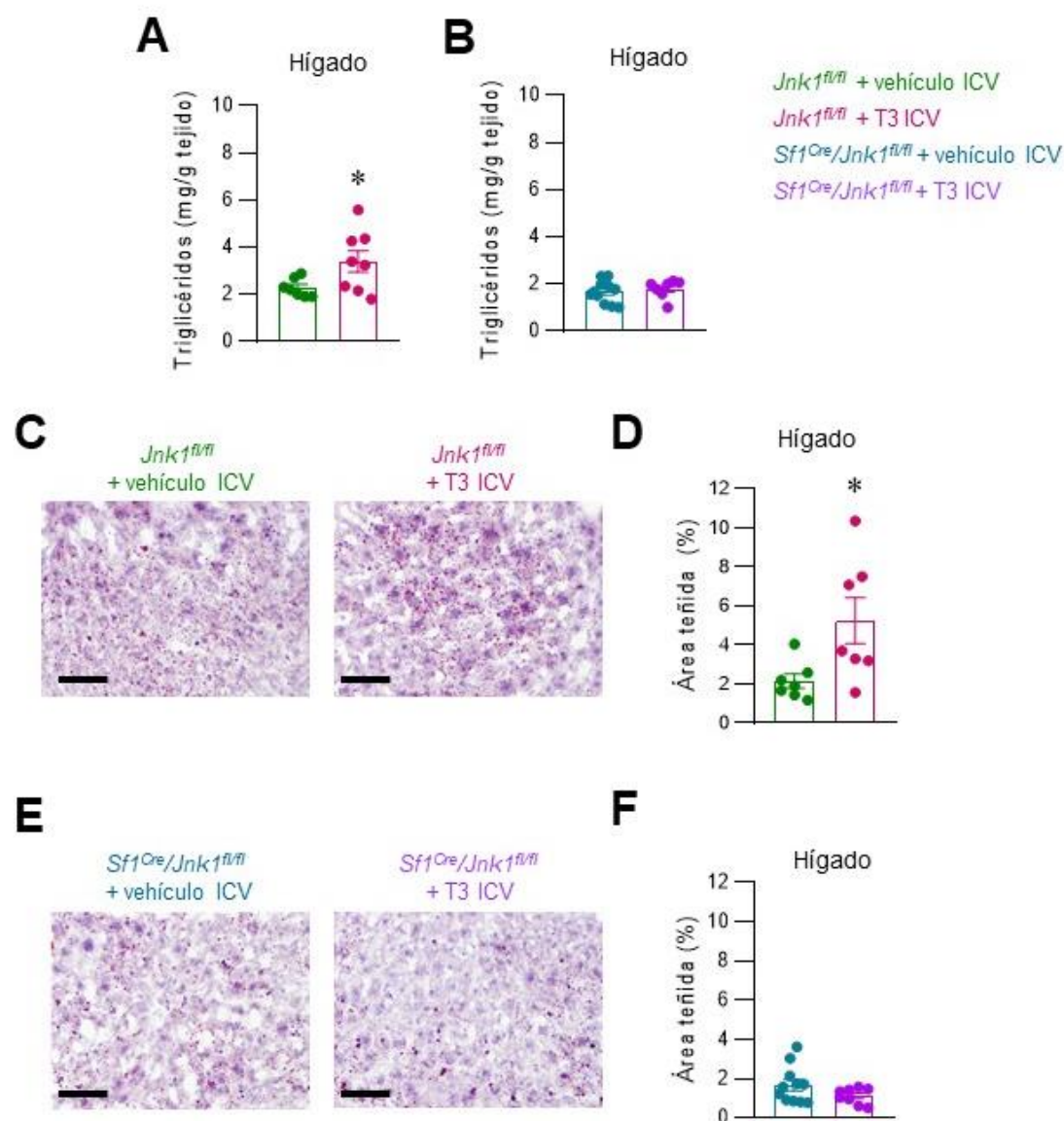


Figura 37. Efecto de la administración central de T3 en ratones *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* hembra sobre el metabolismo lipídico periférico. (A) Niveles de triglicéridos en suero en mg/dl de hembras *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=7-8 animales por grupo). (B) Niveles de triglicéridos en suero en mg/dl de hembras *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8-11 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de secciones de hígado sometidas a tinción Oil Red O (40X, barra de escala 50µm) de hembras *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3. (D) Análisis del área teñida con Oil Red O en % de animales *Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de secciones de hígado sometidas a tinción Oil Red O (40X, barra de escala 50µm) de hembras *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3. (F) Análisis del área teñida con Oil Red O en % de animales *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* vehículo y *Sf1^{Cre}/Jnk1^{fl/fl}* T3 (n=8-11 por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM (test t-Student * p<0,05 vs. *Jnk1^{fl/fl}*).

8 LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE SUCCINATO EN RATONES INDUCE LA TERMOGÉNESIS EN EL BAT

En estudios previos se ha demostrado que la acumulación de succinato es suficiente para elevar la actividad termogénica de los adipocitos marrones *in vivo* (Fernández-Veledo et al., 2021). En ratones la termogénesis dependiente de tejido adiposo marrón puede iniciarse mediante la administración sistémica de succinato. Nosotros queríamos saber si ocurría lo mismo a nivel central, por lo que para comprobar nuestra hipótesis se llevó a cabo una administración de ICV mediante bombas osmóticas durante 7 días, tanto de succinato como del agonista de SUNCR1, CESA, en ratones macho alimentados con dieta estándar. En ambos grupos se observó una marcada disminución del peso corporal en comparación con los ratones control (Figura 38A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la ingesta en ninguno de los grupos (Figura 38B). Además, se observó un incremento en la temperatura del BAT del grupo tratado con succinato o su agonista (Figuras 38C y 38D). Por lo que concluimos que la administración de succinato a nivel central estimulaba la termogénesis *in vivo*.

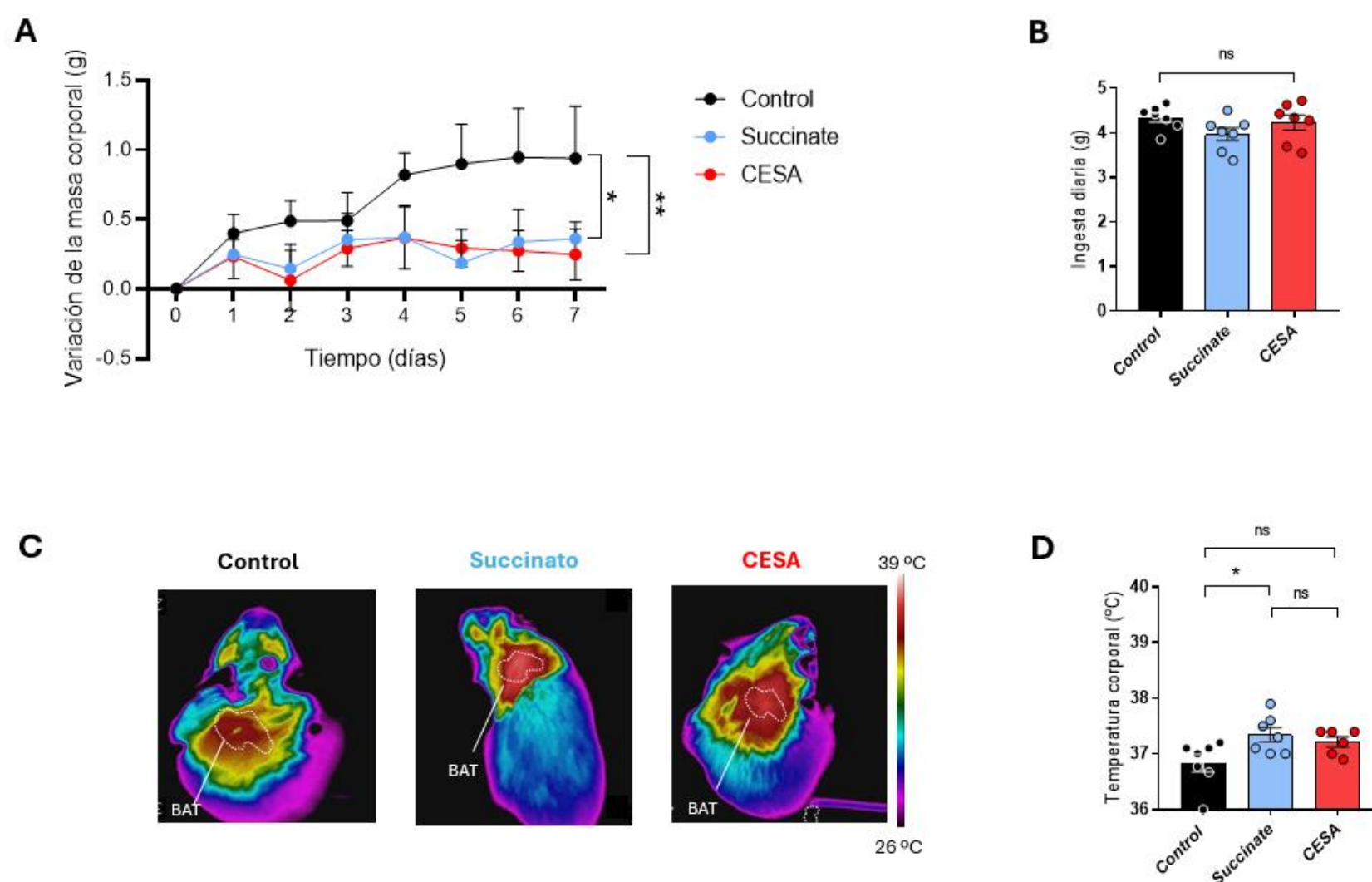


Figura 38. Efecto de la administración central de succinato mediante bombas osmóticas sobre la termogénesis del tejido adiposo marrón en ratones macho *SUCNR1 flox flox* en SD. (A) Cambios en la masa corporal (8-10 animales por grupo experimental) (B) Ingesta diaria (8-10 animales por grupo experimental). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT. (D) Temperatura del área del BAT (8-10 animales por grupo experimental). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (One-way ANOVA* p<0,05 y ** p<0,01 vs Control).

9 LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE SUCCINATO EN RATONES OBESOS NO TIENE EFECTO SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO

Posteriormente investigamos si la administración central de succinato era capaz de impulsar la termogénesis *in vivo*, en un contexto de obesidad inducida por la dieta. Se alimentaron ratones con una dieta rica en grasas *ad libitum* durante 8 semanas o hasta que alcanzasen el fenotipo obeso (fijado en 40 gramos de peso). Se administró succinato y su agonista CESA mediante ICV con bomba osmótica durante 7 días; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la variación de la masa corporal de los dos grupos tratados respecto al control (Figura 39A), ni en la ingesta (Figura 39B), ni tampoco en la temperatura del BAT (Figura 39C-y 39D).

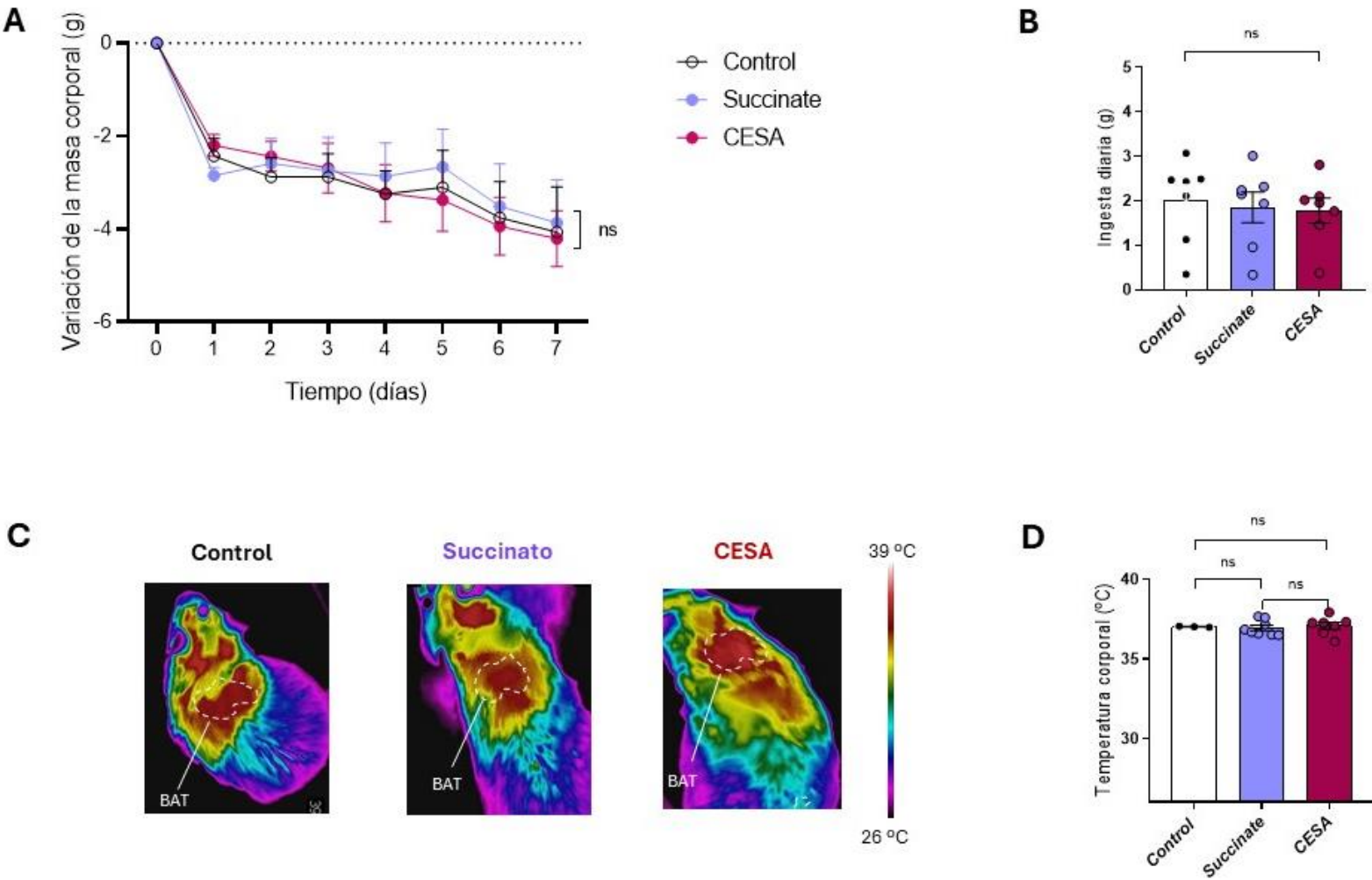


Figura 39. Efecto de la administración central de succinato mediante bombas osmóticas sobre la termogénesis del tejido adiposo marrón en ratones macho *SUCNR1^{flox/flox}* en HFD. (A) Cambios en la masa corporal (CTL= 5, Succinato= 9, CESA=9) (B) Ingesta diaria (CTL= 5, Succinato= 9, CESA=9). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT. (D) Temperatura del área del BAT (CTL= 4, Succinato= 9, CESA=8). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante One-way ANOVA.

10 LA DELECCIÓN VIROGENÉTICA DE SUCNR1 EN MBH Y EN NEURONAS SF1 INCREMENTA LA MASA CORPORAL ASOCIADA A UNA DISMINUCIÓN DE LA TERMOGÉNESIS EN RATONES MACHO

Para investigar el papel de SUCNR1 en el balance energético a nivel central, primeramente, se inyectaron bilateralmente mediante cirugía estereotáxica virus adenoasociados que contienen el enzima Cre (AAV-Cre (2×10^{13} partículas virales)) en el MBH de ratones *SUCNR1^{flx/flx}*. Nuestros resultados indicaron que los ratones macho tratados con AAV-Cre experimentaron un aumento de peso corporal en comparación con los ratones control (Figura 40A), independiente de la ingesta (Figura 40B). También se analizó, el impacto de la eliminación de SUCNR1 en el MBH sobre la función del BAT. Nuestros resultados revelaron un descenso significativo en la temperatura del BAT de los ratones macho tratados con el virus (Figura 40C) y esto se correspondía con una disminución de los niveles proteicos de UCP1 en el BAT (Figura 40D), determinado por Western Blot, en comparación con los controles.

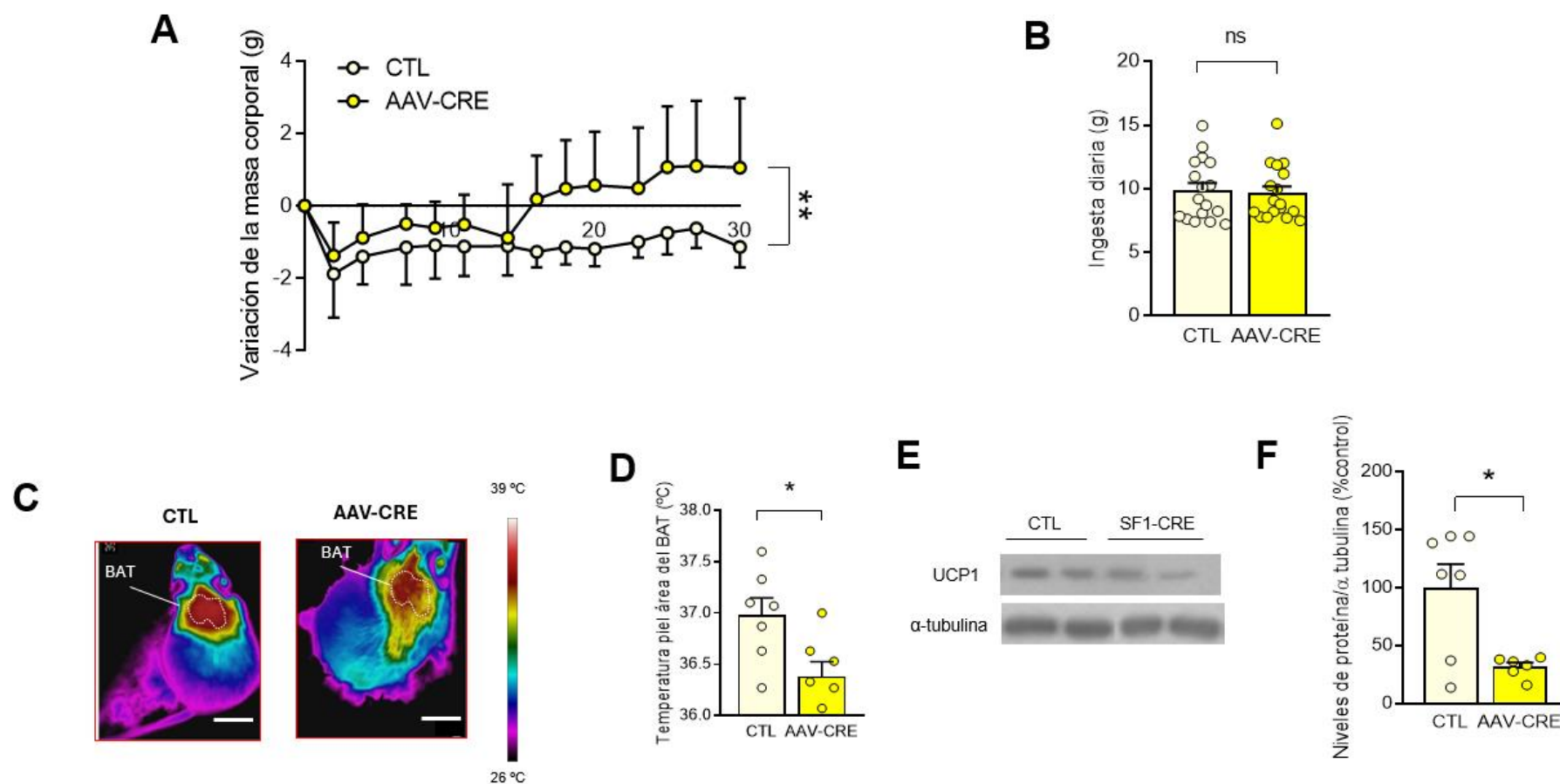


Figura 40. Efecto de la eliminación de SUCNR1 del MBH en el balance energético en machos (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo) (B) Cambios en la ingesta de los animales control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT. (D) Temperatura del área del BAT control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo). (E-F) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de animales control y tratados con adenoasociados en el MBH (n=7-8 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two way ANOVA (Figura A) y test t-Student (Figuras B, D y F).

A continuación, se quiso estudiar, la inhibición de SUCNR1 de una manera más específica, y se realizó una cirugía estereotáxica dirigida al VMH en concreto en las neuronas SF1. Para ello se empleó de nuevo el sistema Cre/Lox mediante un adenovirus SF1- Cre, inyectando de manera bilateral 2×10^{12} partículas virales, para eliminar el receptor en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial de ratones *SUCNR1^{flox/flox}*. En concordancia con los datos anteriores, se observó una ganancia de peso corporal de los ratones tratados (SF1-Cre) en comparación con sus controles (Figura 41A) y sin cambios en la ingesta (Figura 41B). De igual manera los ratones tratados presentaron una menor temperatura del BAT (Figura 41C) que coincidía con unos menores niveles de la proteína UCP1 en este tejido (Figura 41D).

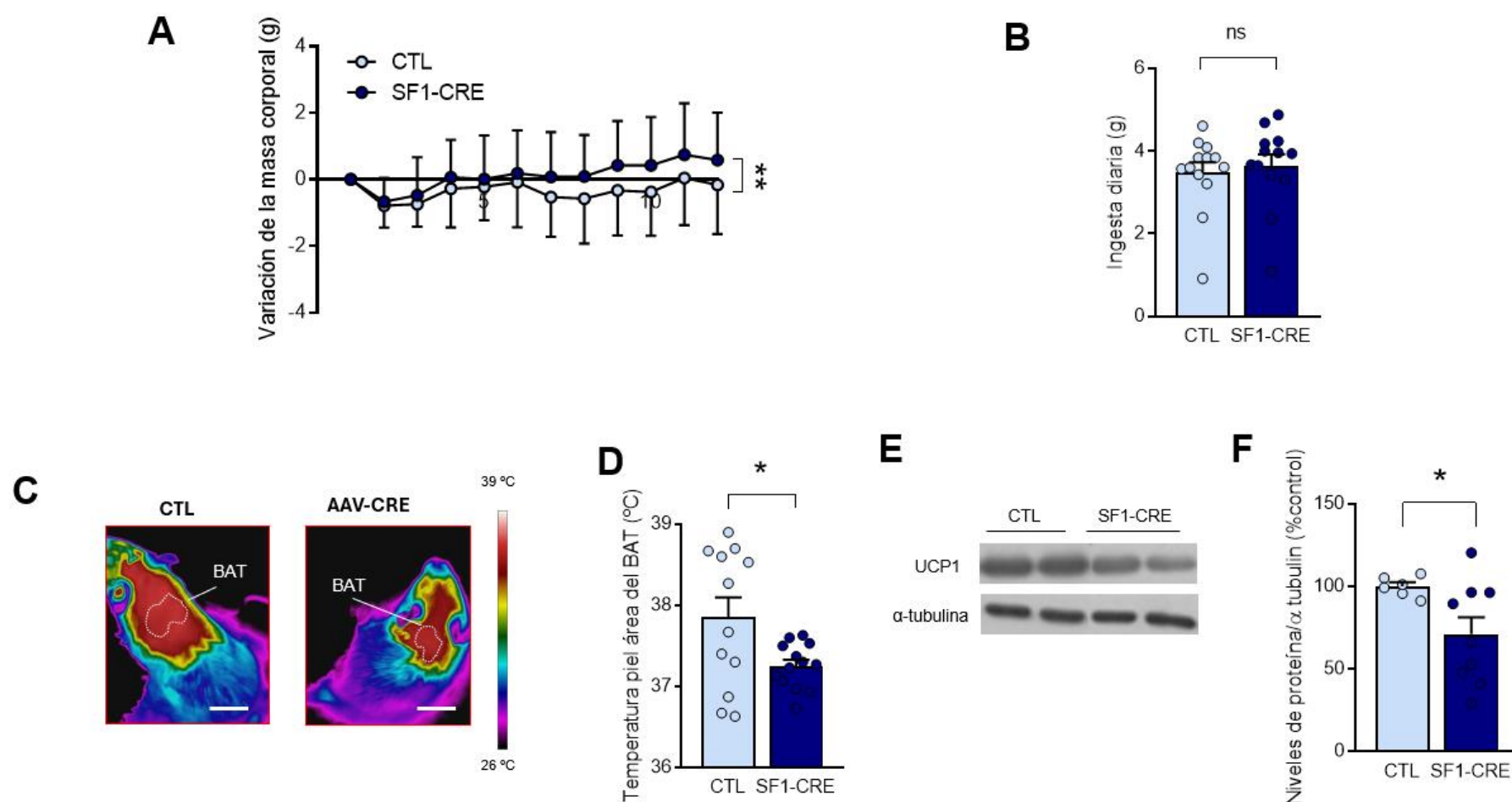


Figura 41. Efecto de la eliminación de SUCNR1 del VMH en el balance energético en machos (A) Cambios en la masa corporal durante 12 días de los animales control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). (B) Ingesta diaria de los ratones control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT de ratones control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (D) Temperatura del área del BAT control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). (E-F) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT de animales control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (n=7-8 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two way ANOVA (Figura A) y test t-Student (Figuras B,D y F).

11 LA DELECCIÓN VIROGENÉTICA DE SUCNR1 NO REGULA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA

A continuación, nos planteamos investigar si al silenciar SUCNR1 en hembras sucedía lo mismo que en machos. Por lo que de igual manera que en el caso anterior se inyectaron dos tipos virus mediante una cirugía estereotáxica a ratones *SUCNR1^{fllox fllox}*. En primer lugar, se administró el virus adenoasociado Cre en el MBH, sin embargo, no se observaron diferencias en el peso corporal (Figura 42A) ni en la ingesta (Figura 42B), ni tampoco en la temperatura del BAT (Figura 42C y 42D) entre los ratones tratados y sus controles, en ninguno de los experimentos.

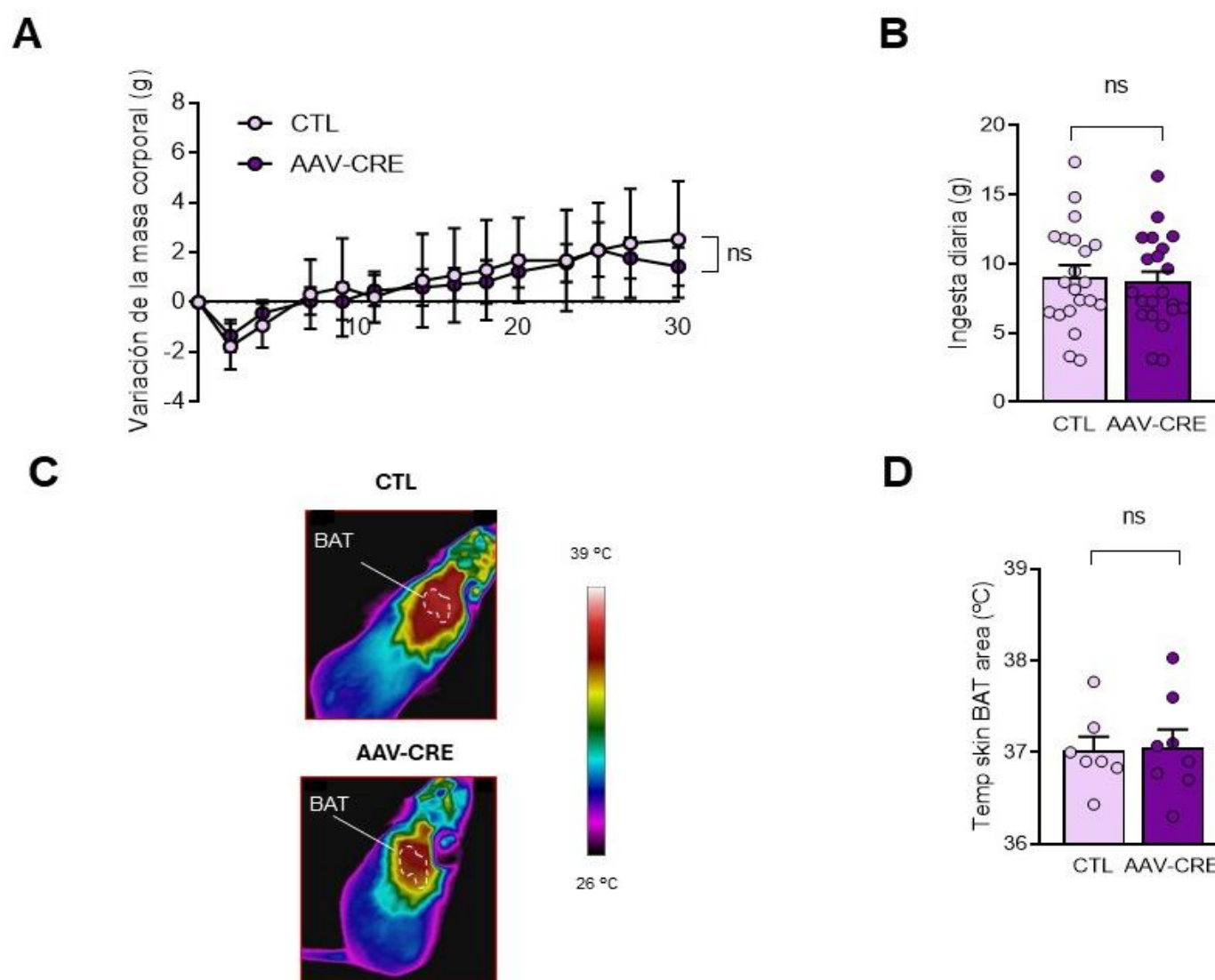


Figura 42. Efecto de la eliminación de SUCNR1 del MBH en el balance energético en hembras (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo) (B) Cambios en la ingesta de los animales control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT. (D) Temperatura del área del BAT control y tratados con adenoasociados en el MBH (7-8 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two way ANOVA (Figura A) y test t-Student (Figuras B y D).

Posteriormente se inyectó en ratones hembra *SUCNR1*^{fl^{ox}fl^{ox}} adenovirus SF1- Cre en el VMH. De igual manera que en el caso anterior, no se observaron diferencias en el peso corporal (Figura 43A) ni en la ingesta (Figura 43B), ni tampoco en la temperatura del BAT (Figura 43C) en los ratones tratados con el virus respecto a sus controles, en ninguno de los experimentos

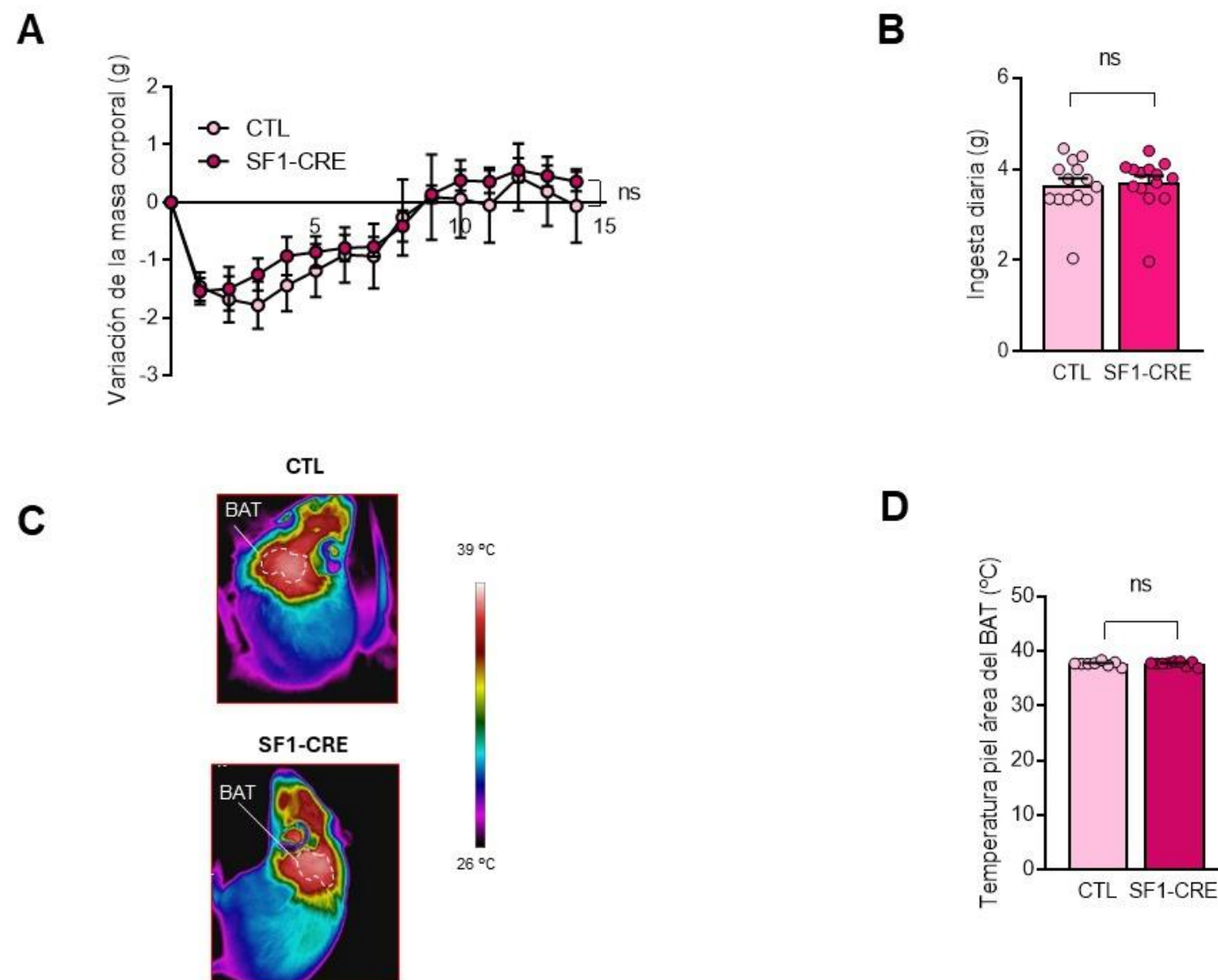


Figura 43. Efecto de la eliminación de SUCNR1 del VMH en el balance energético en hembras (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y tratados adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). (B) Cambios en la ingesta de los animales control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de la activación del BAT. (D) Temperatura del área del BAT control y tratados con adenovirus SF1 en el VMH (7-8 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two way ANOVA (Figura A) y test t-Student (Figuras B y D)..

12 LA DELECCIÓN GENÉTICA DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 AUMENTA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES MACHO SD.

Con el propósito generar un modelo KO de SUNCN1 en el VMH, se generaron ratones mutantes que carecen de SUCNR1 en las neuronas SF1 del VMH (*SUCNR1SF1KO*). Está ampliamente reconocido la existencia de dimorfismo sexual en condiciones patológicas como es el caso de la obesidad (Palmer & Clegg, 2015). Además, teniendo en cuenta los efectos específicos del sexo que poseen las neuronas SF1 del VMH (Fosch et al., 2021), se realizaron análisis de fenotipo en machos y hembras considerando la posibilidad de que fuesen distintos.

En los machos, nuestros resultados revelaron que los ratones *SUCNR1SF1KO* aumentaban su masa corporal tras 20 semanas en dieta estándar en comparación con los controles, que eran sus hermanos de camada (Figura 44A). No se evidenciaron cambios en la ingesta diaria ni nocturna (Figura 44B), ni tampoco la adiposidad (Figura 44C).

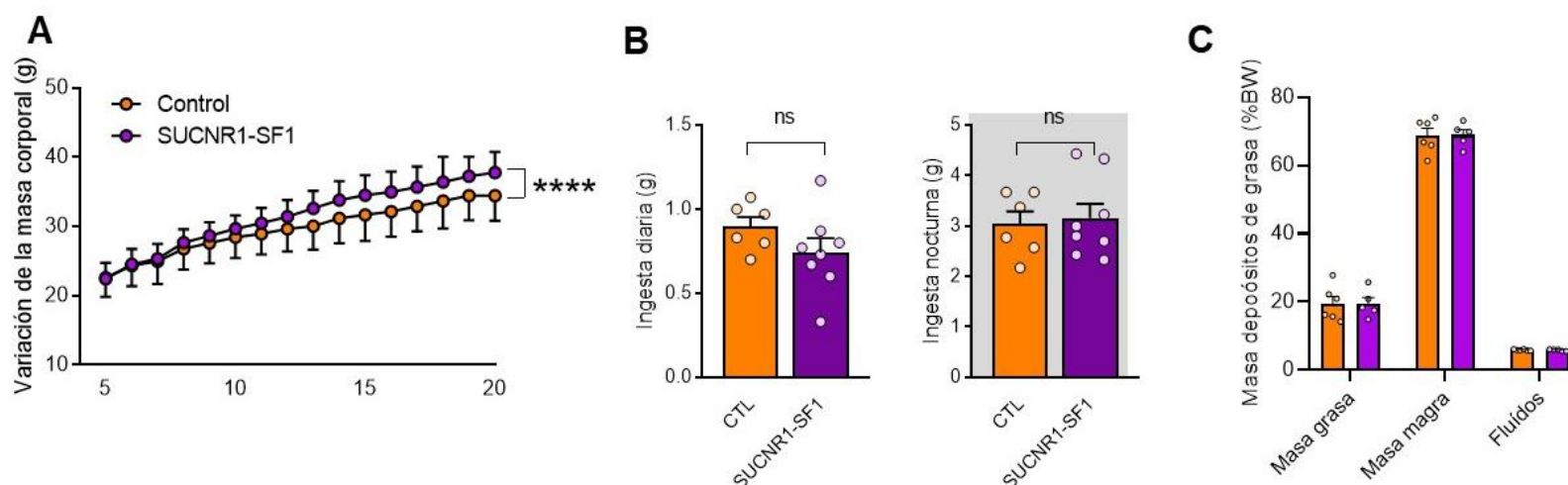


Figura 44. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 del VMH en machos (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y *SUCNR1SF1KO* tras 20 semanas de edad (8-11 animales por grupo) (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de los animales control y *SUCNR1SF1KO* (8-11 animales por grupo). (C) Masa de los depósitos de grasa de los controles y *SUCNR1SF1KO* (14-19 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (Two-way ANOVA **** p <0,0001 vs Control en A y test t-Student en B y C).

Sin embargo, el aumento del peso corporal se asoció con una menor temperatura del BAT (Figuras 45 A y 45B), menor inmunoreactividad de UCP1, (Figuras 45 C y 45D) y con un aumento del tamaño de los adipocitos (Figuras 45E y 45F) en los ratones mutantes (*SUCNR1SF1KO*) en comparación con los controles.

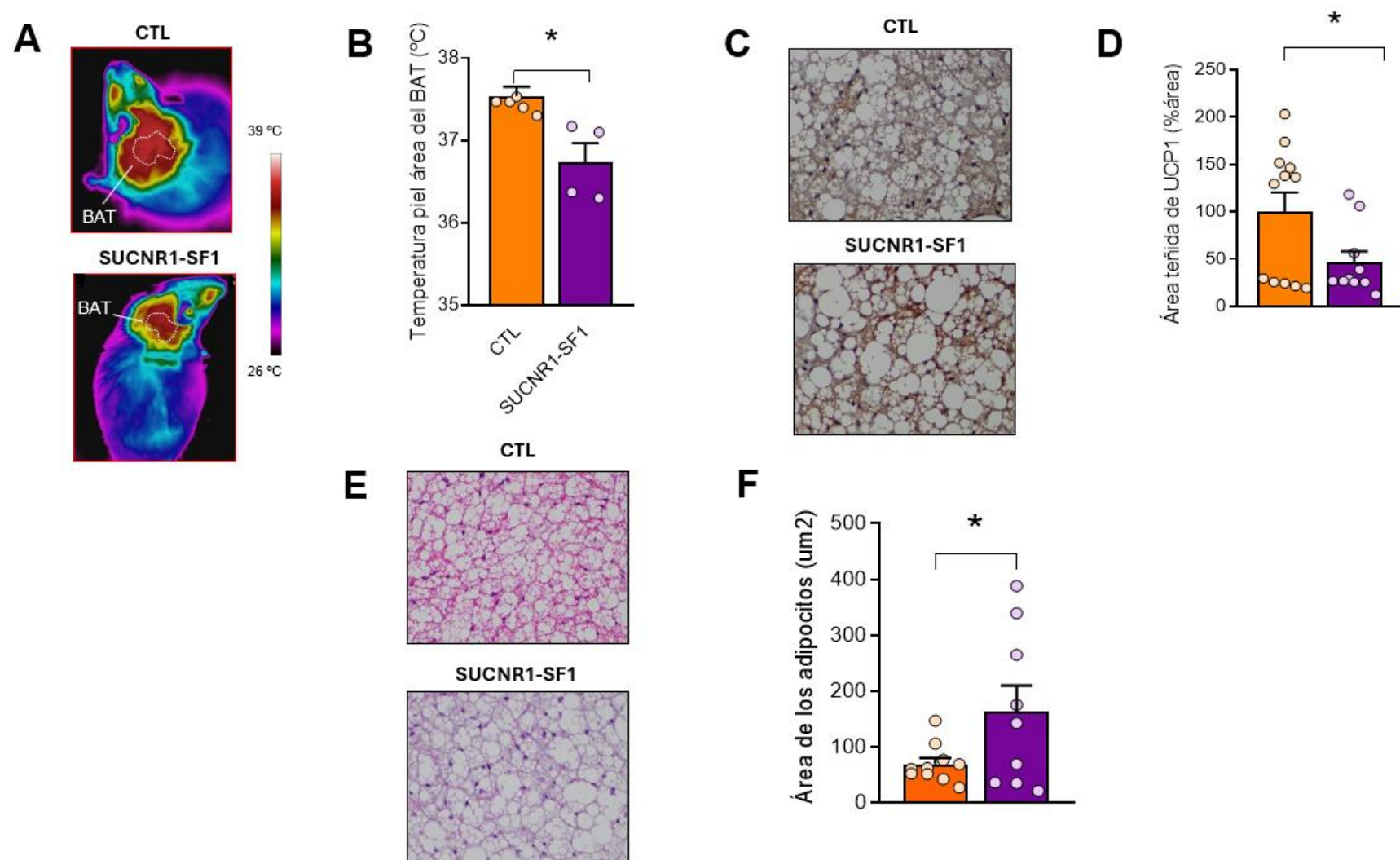


Figura 45. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la termogénesis del BAT en machos. (A) Imágenes termográficas. (B) Cuantificación del área del BAT (6-7 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 del tejido adiposo pardo de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50μm). (D) Área inmunorreactiva de UCP1 del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=10-12 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de HXE de secciones del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50μm). (F) Área de los adipocitos del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=10-12 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM (test t-Student * p<0,05 vs Control).

13 LA DELECCIÓN GENÉTICA DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO MODULA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA SD.

En las hembras, los datos obtenidos indican que los ratones *SUCNR1SF1KO* no muestran cambios en el peso corporal tras 20 semanas con una dieta estándar, en comparación con sus hermanas de camada controles (Figura 46A). Tampoco se observan diferencias en cuanto a la ingesta diaria y nocturna (Figura 46B), ni en los depósitos grasos de los animales (Figura 46C).

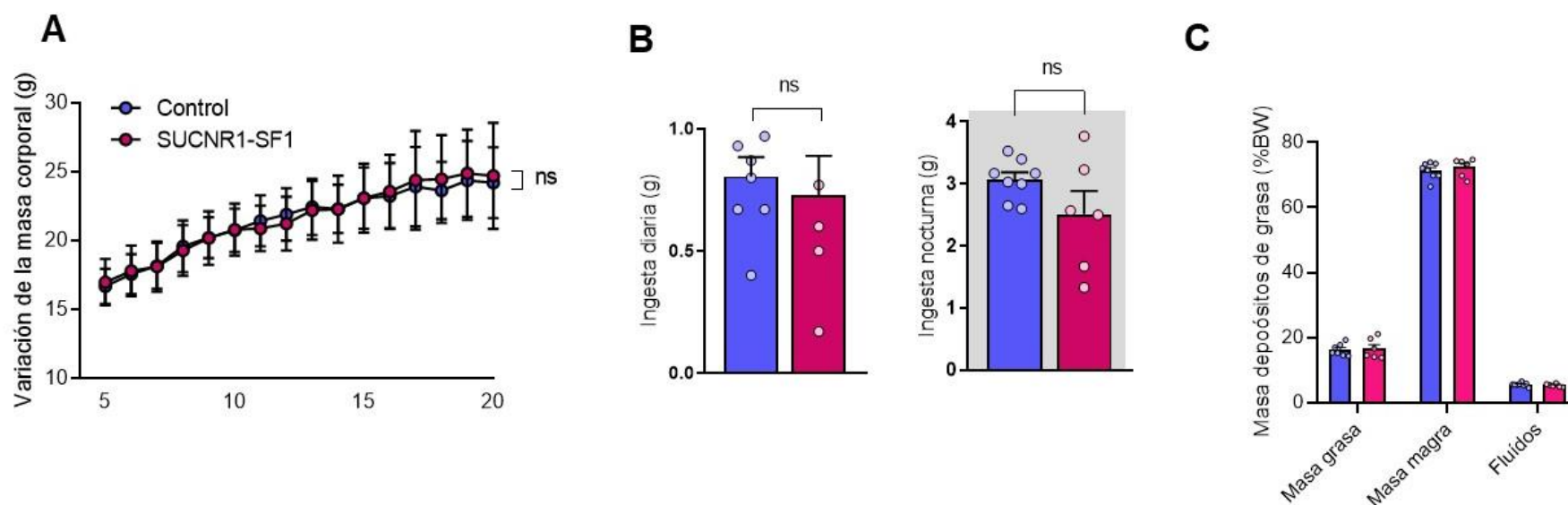


Figura 46. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el balance energético en hembras (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y *SUCNR1SF1KO* tras 20 semanas de edad (13-14 animales por grupo) (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de los animales control y *SUCNR1SF1KO* (6-8 animales por grupo). (C) Masa de los depósitos de grasa de los controles y *SUCNR1SF1KO* (14-19 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two way ANOVA (Figura A) y test t-Student (Figura B y C).

Tampoco se encontraron cambios significativos en la temperatura del BAT de ratones controles y *SUCNR1SF1KO* hembras (Figuras 47Ay 47B) y en consistencia con esto no hubo diferencias significativas en la inmunoreactividad de UCP1 (Figuras 47 C y 47D) ni el área de los adipocitos de los ratones hembra mutantes en comparación con los controles (Figura 47E y 47F).

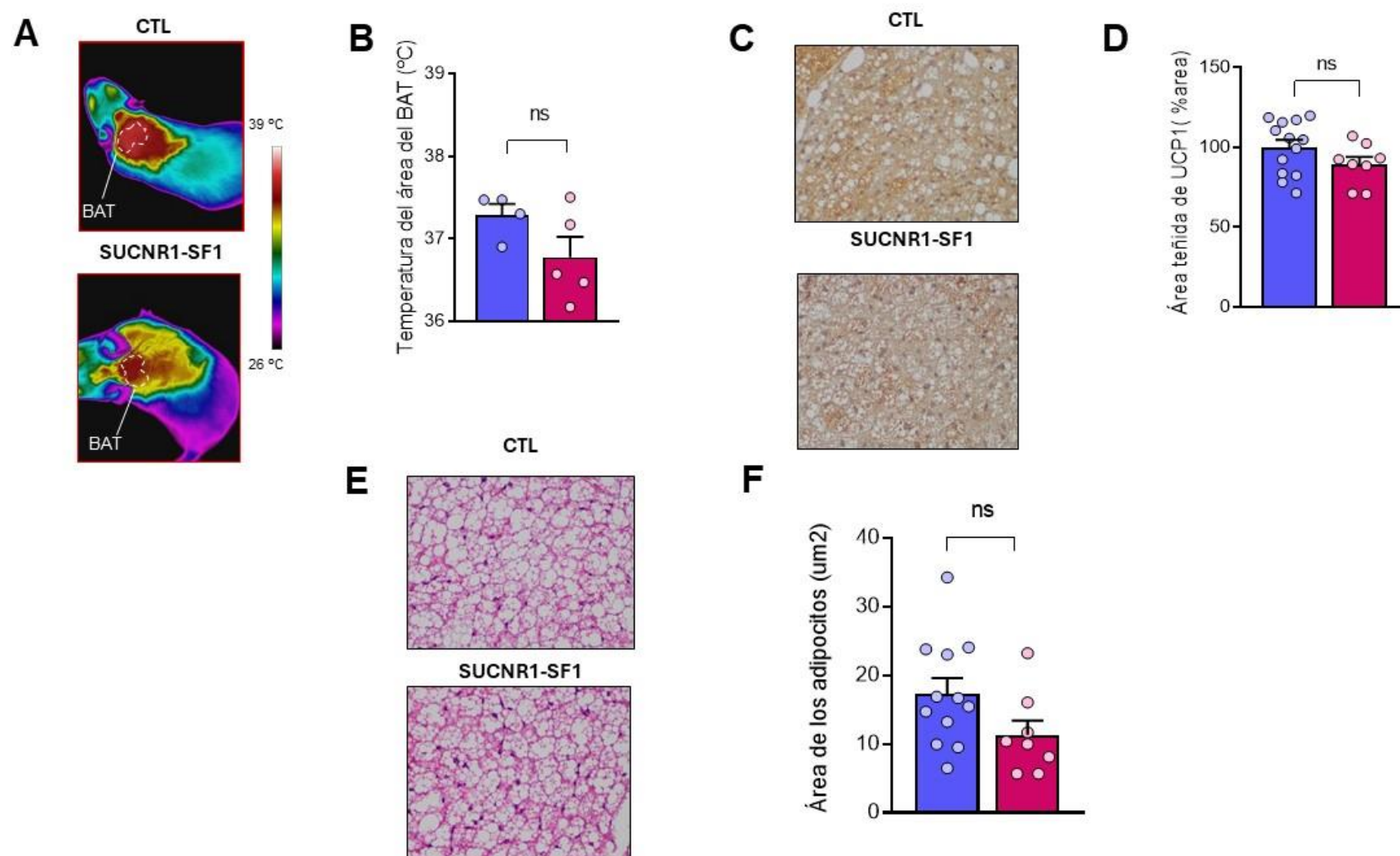


Figura 47. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la termogénesis del BAT en hembras. (A) Imágenes térmicas del BAT de animales controles y *SUCNR1SF1KO*. (B) Cuantificación de la temperatura del área del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=6-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 del tejido adiposo pardo de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50μm). (D) Área inmunorreactiva de UCP1 del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=10-13 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de HXE de secciones del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50μm). (F) Área de los adipocitos del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=10-13 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM y se analizaron mediante test t-Student.

14 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 DISMINUYE EL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES MACHO SD.

A mayores se investigó, si el aumento de peso corporal en los ratones *SUCNR1SF1KO* podía deberse a alteraciones en el gasto energético, coeficiente respiratorio o con la actividad locomotora espontánea a las 20 semanas de edad, es decir cuando se evidenciaron las diferencias en el peso. Los datos obtenidos mostraron que los machos mutantes presentaban una tendencia un menor gasto energético (Figuras 48 A- 48B), con respecto a sus hermanos de camada, pero sin llegar a ser significativo. Además, los animales *SUCNR1SF1KO* presentan una tendencia un mayor índice de intercambio respiratorio (Figura 48 C) y tienden a tener una menor actividad locomotora (Figura 48D) en relación con los controles, pero de nuevo, sin llegar a ser significativo.

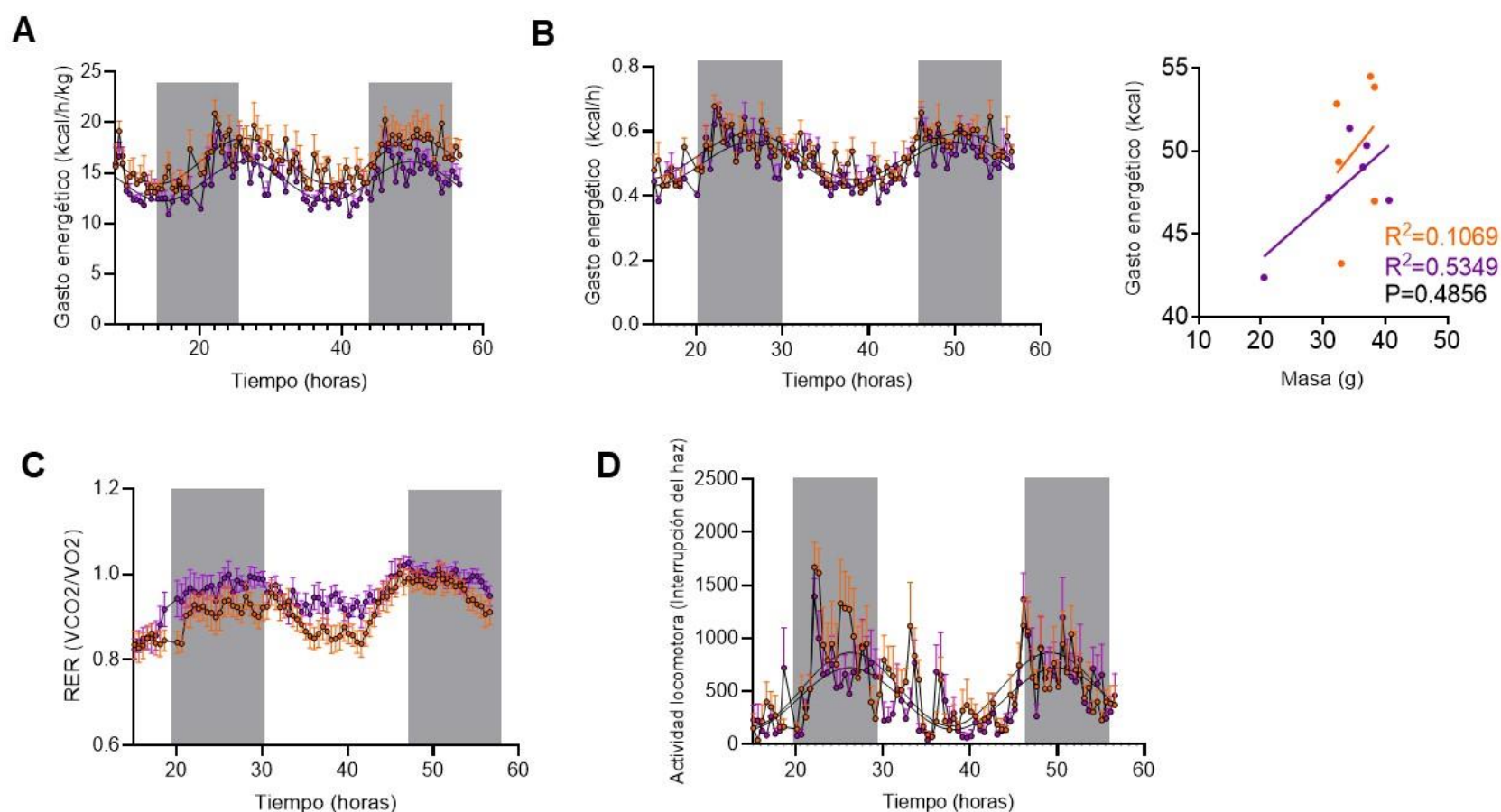


Figura 48. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el gasto energético en machos. (A) Gasto energético (H1) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (B) Gasto energético (H3) (panel izquierdo: acumulado y panel derecho: en relación a la masa corporal) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (C) Índice de intercambio respiratorio (RER) de ratones macho control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (D) Actividad locomotora de ratones macho control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se ajustaron con el modelo cosinor; la significación estadística fue determinada mediante Two-way ANOVA (Figura 48A, 48B (panel izquierdo), 48C y 48D), ANCOVA (Figura 48B panel derecho).

15 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA SD.

Posteriormente, al igual que en el apartado anterior se analizó mediante calorimetría indirecta el gasto energético, coeficiente respiratorio y con la actividad locomotora de las hembras a las 20 semanas de edad. Los datos obtenidos indicaron que las hembras *SUCNR1SF1KO* no mostraron diferencias en el gasto energético (Figura 49 A y 49B), ni en el índice de intercambio respiratorio (Figura 49C), ni tampoco en la actividad locomotora (Figura 49D) respecto a los controles.

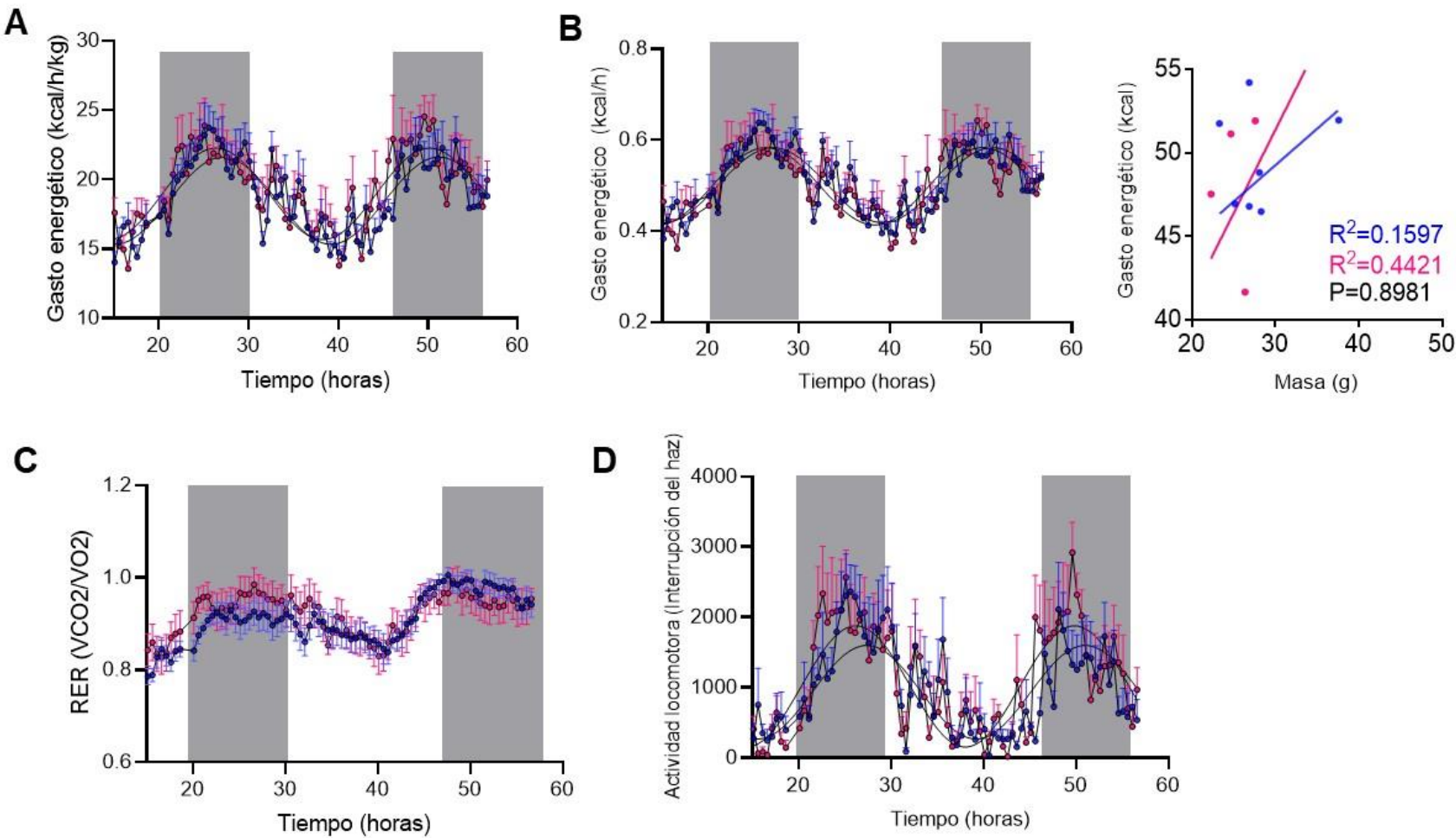


Figura 49. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el gasto energético en hembras. (A) Gasto energético (H1) hembra control y *SUCNR1SF1KO* (6-8 animales por grupo). (B) Gasto energético (H3) (panel izquierdo: acumulado y panel derecho: en relación a la masa corporal) hembra control y *SUCNR1SF1KO* (6-8 animales por grupo). (C) Índice de intercambio respiratorio (RER) de ratones hembra control y *SUCNR1SF1KO* (6-8 animales por grupo). (D) Actividad locomotora de ratones hembra control y *SUCNR1SF1KO* (6-8 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se ajustaron con el modelo cosinor; la significación estadística fue determinada mediante Two-way ANOVA (Figura 49A, 49B (panel izquierdo), 49C y 49D), ANCOVA (Figura 49B panel derecho).

16 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES MACHO SD.

Es bien conocido que las neuronas SF1 tienen un rol esencial en el control de la glucosa en sangre y la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Fosch et al., 2021), por ello se investigó el efecto de la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 sobre la homeostasis de la glucosa mediante GTT e ITT. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa de los ratones macho alimentados de manera *ad libitum*, o en estado de ayuno después de 20 semanas alimentados con dieta estándar (Figura 50A), ni cambios en la tolerancia a la glucosa (Figura 50B), ni tampoco hubo diferencias en cuanto a la sensibilidad a insulina entre los ratones KO y sus hermanos de camada control (Figura 50C).

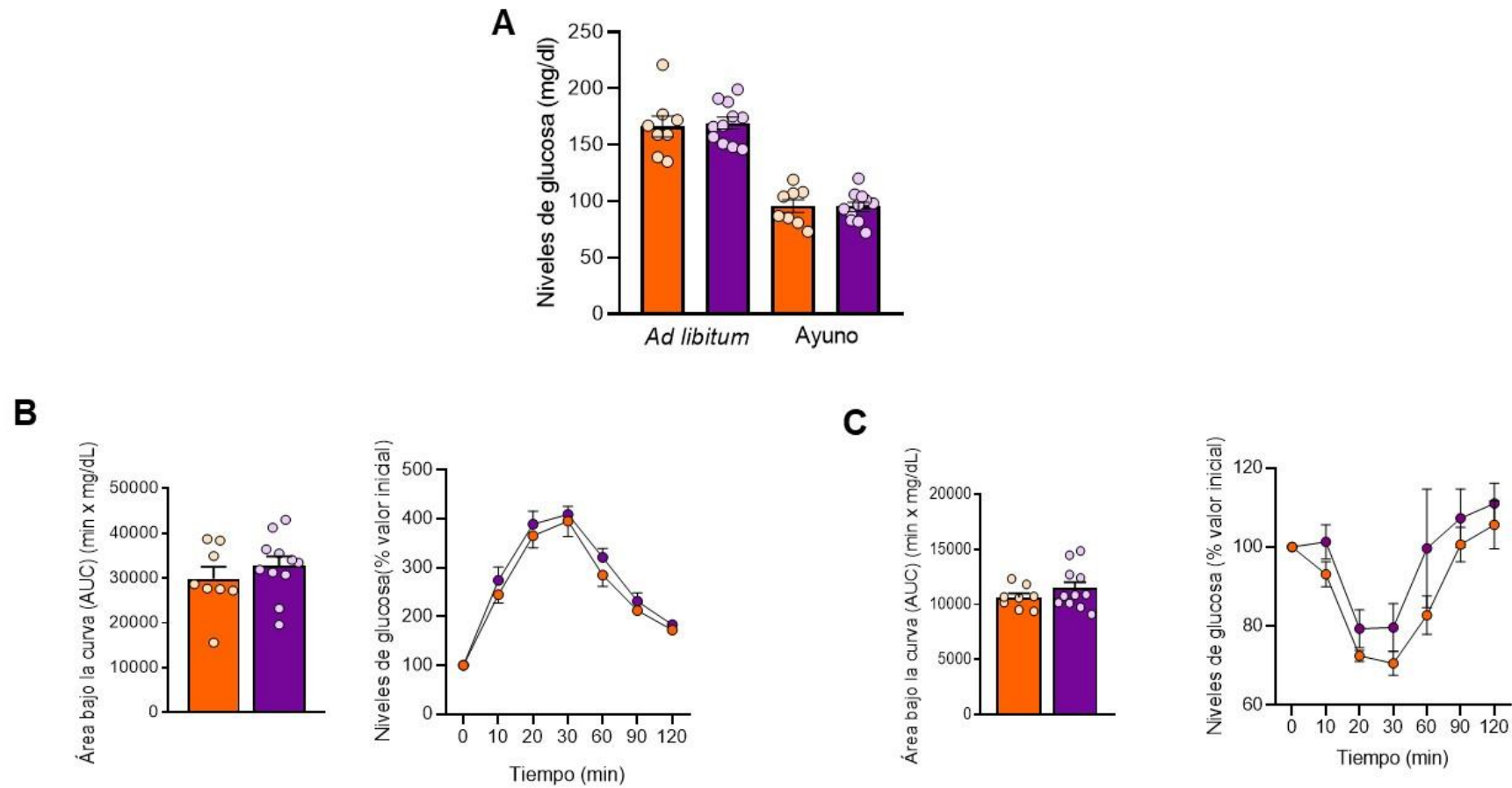


Figura 50. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la homeostasis de la glucosa en machos. (A) Niveles de glucosa ad libitum y en ayuno de machos control y *SUCNR1SF1KO*. (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (n=8-9 animales por grupo). (C) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (n=8-9 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two-way ANOVA y test t-Student.

17 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES HEMBRA SD.

A continuación, de igual manera que en los machos, se exploró el efecto de la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 con la homeostasis de la glucosa. No se apreciaron diferencias en los niveles de glucosa en los ratones alimentados *ad libitum*, ni en ayuno (Figura 51A), tampoco se apreciaron diferencias en los niveles de glucosa (Figura 51B), ni insulina (Figura 51C) de los ratones *SUCNR1SF1KO* respecto a sus controles.

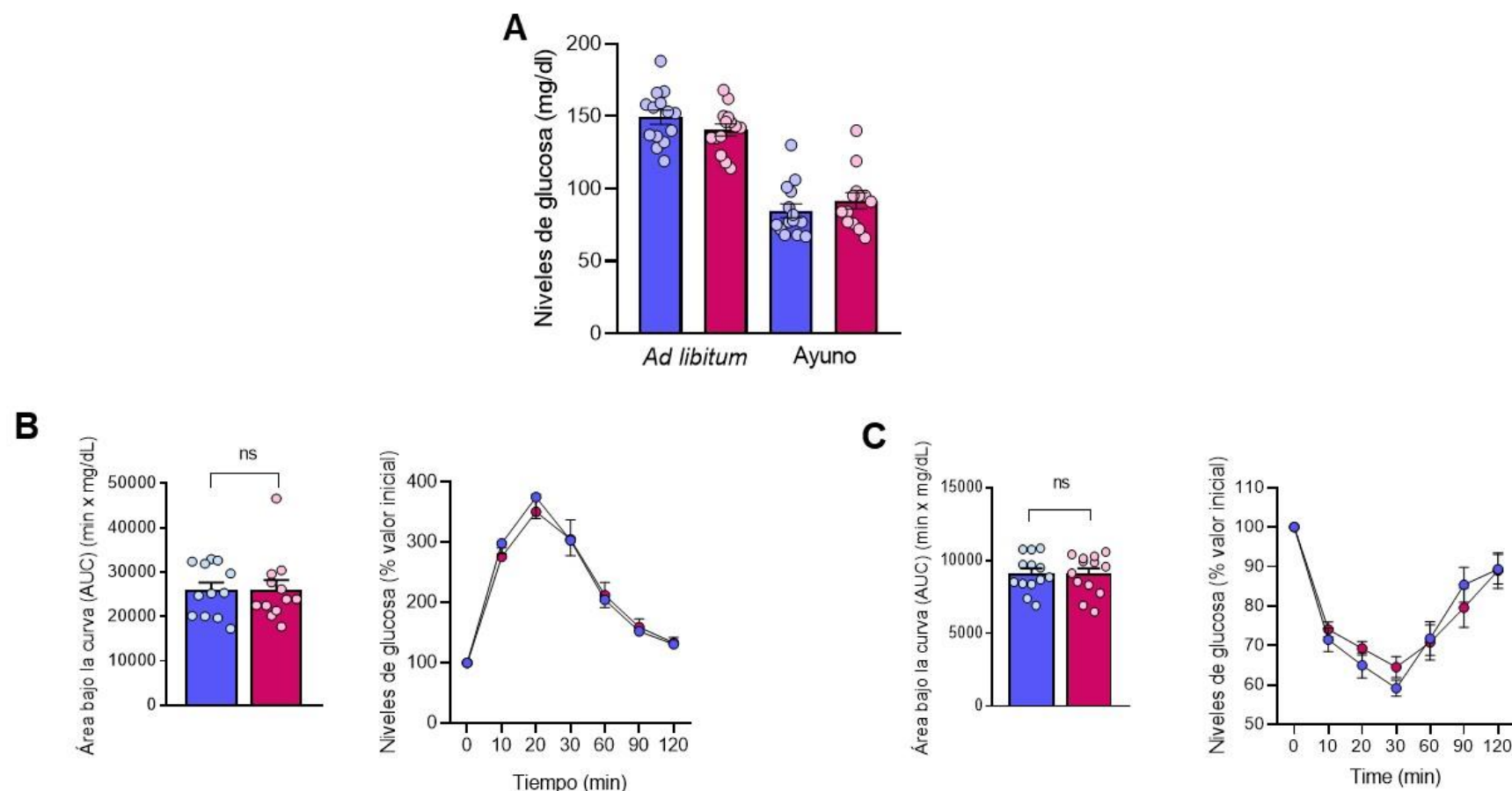


Figura 51. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la homeostasis de la glucosa en hembras. (A) Niveles de glucosa ad libitum y en ayuno de ratones control y *SUCNR1SF1KO*. (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de hembras control y *SUCNR1SF1KO* (n=13-14 animales por grupo). (C) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) de hembras control y *SUCNR1SF1KO* (n=13-14 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two- way ANOVA y test t-Student.

Como resumen de los apartados 12-17, se puede decir que estos hallazgos sugieren que la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 produce un aumento de peso corporal en machos, asociado con una menor termogénesis del BAT. Por el contrario, en hembras no se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros evaluados: peso corporal, ingesta, grasas, y termogénesis, también encontrado en las aproximaciones virogenéticas previas. Por otro lado, se observó que la eliminación de SUCNR1 no afecta a la tolerancia a la glucosa ni insulina, en machos y hembras.

18 LA DELECCIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES MACHO HFD.

Debido al rol de las neuronas SF1 del núcleo ventromedial hipotalámico y en la patología de la obesidad, se realizó el fenotipado metabólico de ratones *SUCNR1SF1KO* machos y hembras alimentadas con una dieta alta en grasas (HFD).

En los machos, no hubo cambios en el perfil metabólico: no se encontraron diferencias significativas en cuanto al peso corporal tras 12 semanas alimentados con una HFD (Figura 52A), ni la ingesta diaria ni nocturna (Figura 52B). Tampoco hubo diferencias en la masa grasa, masa magra y fluidos libres en los animales transgénicos respecto a sus hermanos de camada control (Figura 52C).

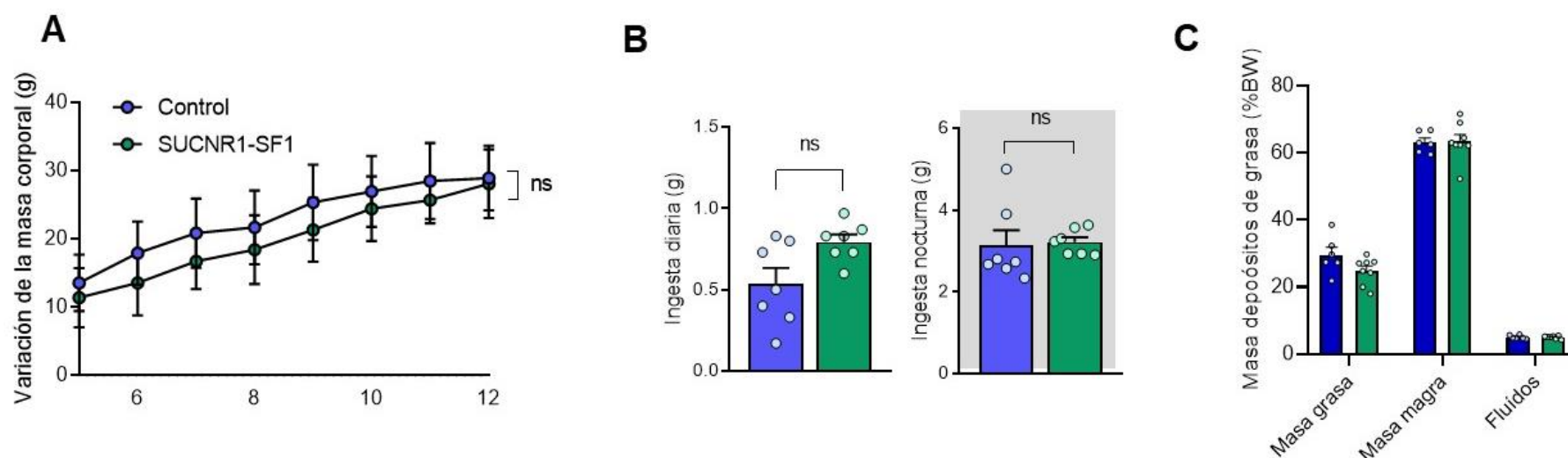


Figura 52. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el balance energético en machos alimentados con HFD (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y *SUCNR1SF1KO* tras 12 semanas de edad (7-7 animales por grupo) (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de los animales control y *SUCNR1SF1KO* con dieta alta en grasas (7-7 animales por grupo). (C) Masa de los depósitos de grasa de los controles y *SUCNR1SF1KO* en HFD (14-19 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (Two-way ANOVA y test t-Student * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs Control).

Se evaluó si la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 conduce a cambios en la termogénesis en los ratones *SUCNR1SF1KO* machos con una dieta alta en grasas. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los animales KO y los controles ni en temperatura del BAT (Figuras 53A y 53B), ni en la inmunoreactividad de UCP1 (Figura 53C y 53D) ni en el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo marrón (Figura 53E y 53F).

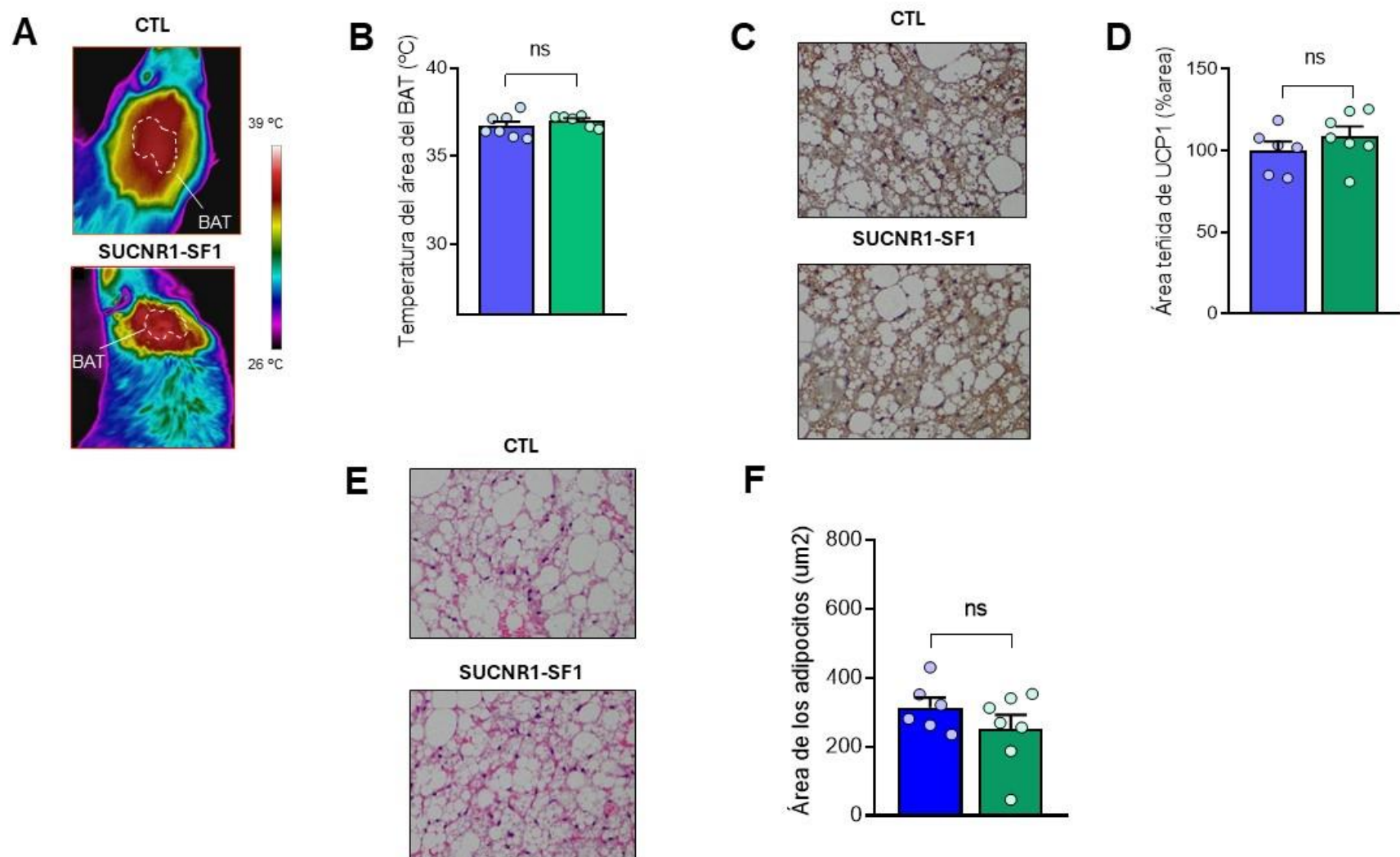


Figura 53. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la termogénesis del BAT en machos alimentados con HFD. (A) Imágenes térmicas del BAT de animales controles y SUCNR1SF1KO. (B) Cuantificación de la temperatura del área del BAT de ratones control y SUCNR1SF1KO (n=6-7 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 del tejido adiposo pardo de ratones control y SUCNR1SF1KO macho (40X, 50µm). (D) Área inmunorreactiva de UCP1 del BAT de ratones control y SUCNR1SF1KO macho (n=6-7 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de HXE de secciones del BAT de ratones control y SUCNR1SF1KO macho (40X, 50µm). (F) Área de los adipocitos del BAT de ratones control y SUCNR1SF1KO macho (n=6-7 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM (test t-Student * p<0,05 vs Control).

19 LA DELECCIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO ALTERA EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA HFD.

En las hembras tampoco hubo cambios en el perfil metabólico, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los ratones *SUCNR1SF1KO* y los controles en cuanto al peso corporal tras 12 semanas alimentadas con HFD (Figura 54A); ni la ingesta diaria, ni nocturna (Figura 54B). Asimismo, no hubo diferencias en la masa grasa, masa magra y fluidos libres en los animales transgénicos respecto a sus hermanas de camada control (Figura 54C).

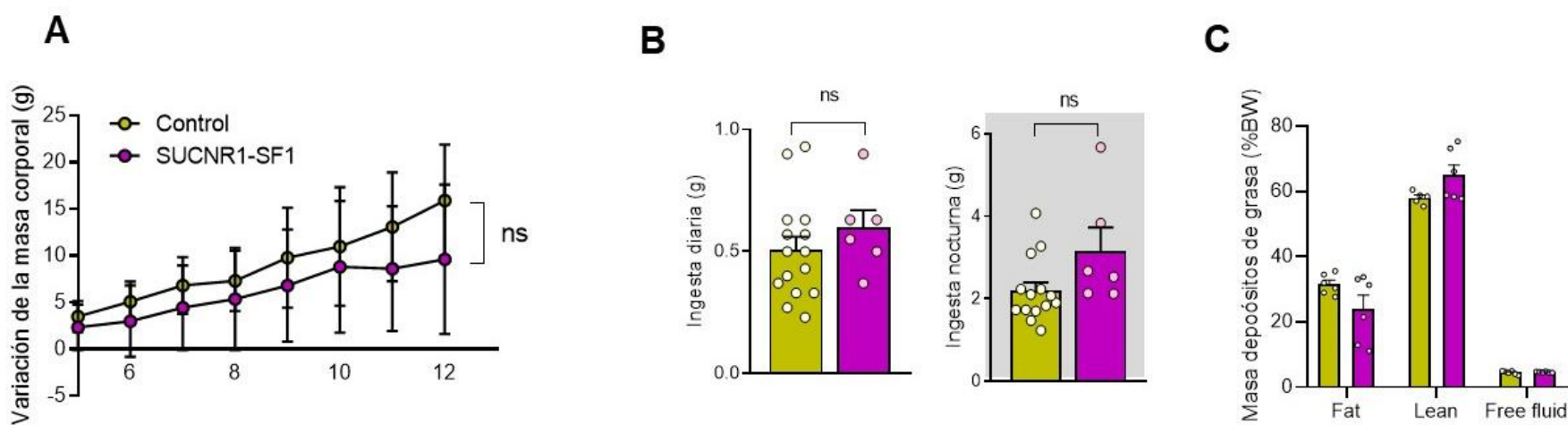


Figura 54. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el balance energético en hembras alimentadas con dieta alta en grasas (A) Cambios en la masa corporal de los animales control y *SUCNR1SF1KO* hembra tras 12 semanas de edad (6-15 animales por grupo) (B) Ingesta en el ciclo de luz y en el ciclo de oscuridad de los animales control y *SUCNR1SF1KO* hembra (6-15 animales por grupo). (C) Masa de los depósitos de grasa de los controles y *SUCNR1SF1KO* hembra (6 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM (Two-way ANOVA y test t-Student * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs Control).

A continuación, se examinó la termogénesis en estos animales, e igual que en los machos, no se encontraron diferencias entre los controles y los ratones *SUCNR1SF1KO* hembra alimentadas con una dieta alta en grasas ni en la temperatura del BAT (Figura 55A y 55B), ni en la inmunoreactividad de UCP1 (Figura 55C y 55D) ni en el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo marrón (Figura 55E y 55F).

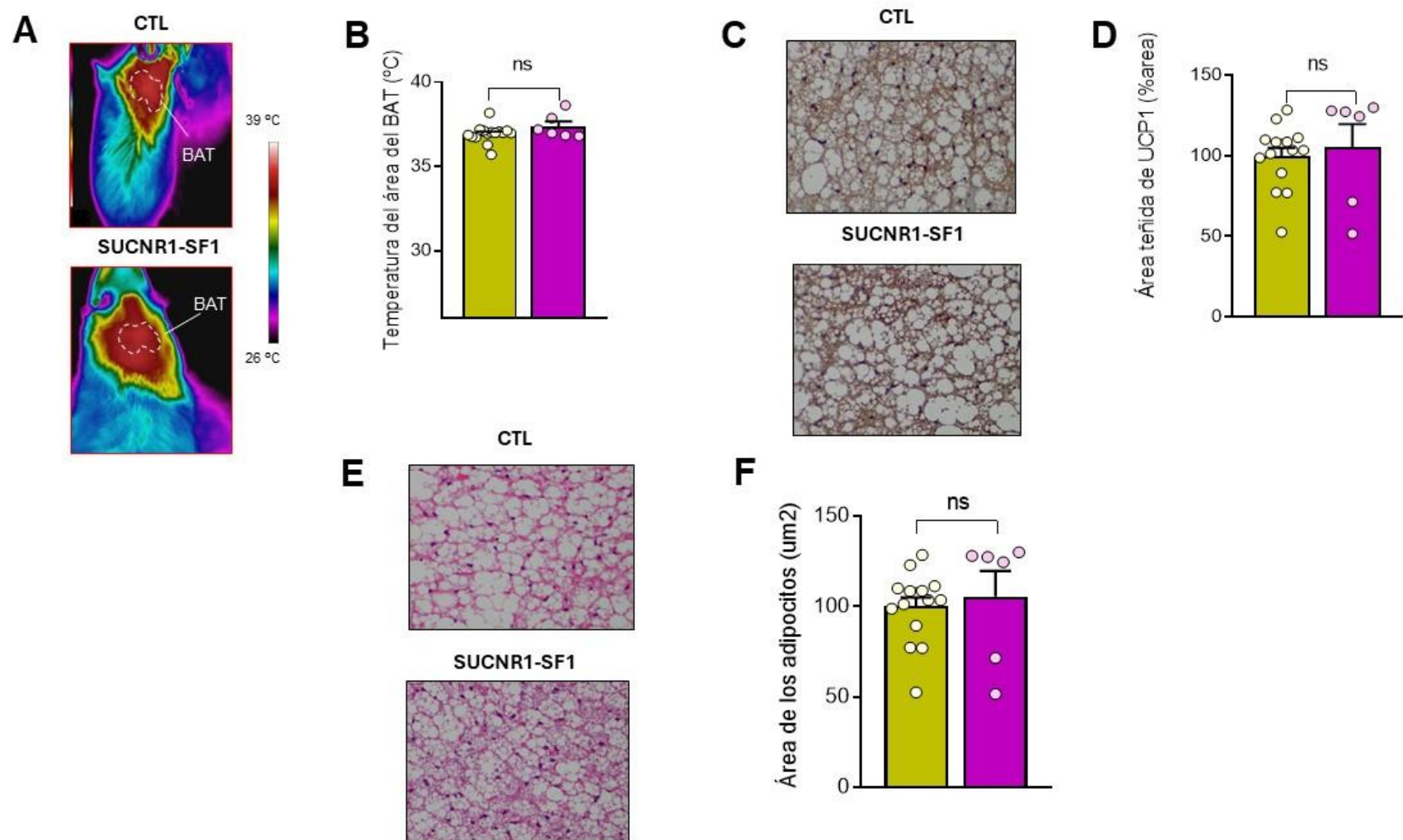


Figura 55. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en hembras en la termogénesis del BAT en HFD. (A) Imágenes térmicas del BAT de animales controles y *SUCNR1SF1KO*. (B) Cuantificación de la temperatura del área del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=6-15 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de inmunohistoquímica de UCP1 del tejido adiposo pardo de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50µm). (D) Área inmunorreactiva de UCP1 del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=6-15 animales por grupo). (E) Imágenes representativas de HXE de secciones del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (40X, 50µm). (F) Área de los adipocitos del BAT de ratones control y *SUCNR1SF1KO* (n=6-15 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA ± SEM. y se analizaron mediante test t-Student.

20 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES MACHO HFD.

También se llevaron a cabo realizaron análisis calorimétricos en los que se obtuvieron resultados del gasto energético (Figura 56A y 56B), coeficiente respiratorio (Figura 56C) y actividad locomotora (Figura 56D), todos ellos sin diferencias respecto a los controles.

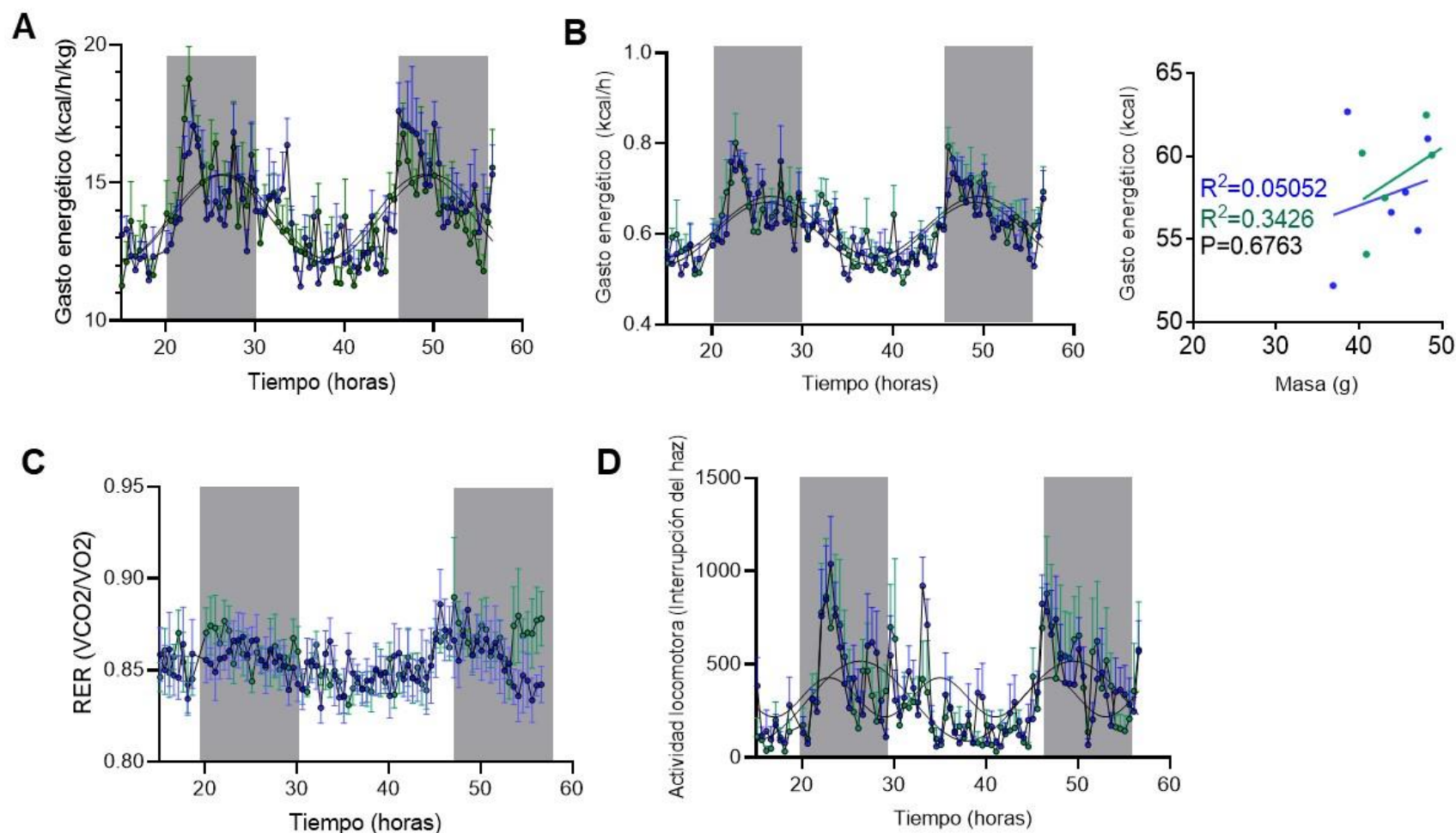


Figura 56. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el gasto energético. (A) Gasto energético (H1) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (6-6 animales por grupo). (B) Gasto energético (H3) (panel izquierdo: acumulado y panel derecho: en relación a la masa corporal) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (6-6 animales por grupo). (C) Índice de intercambio respiratorio (RER) de ratones macho control y *SUCNR1SF1KO* (6-6 animales por grupo). (D) Actividad locomotora de ratones macho control y *SUCNR1SF1KO* (6-6 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se ajustaron con el modelo cosinor; la significancia estadística fue determinada mediante Two-way ANOVA (Figura 56A, 56B (panel izquierdo), 56C y 56 D), ANCOVA (Figura 56B panel derecho).

21 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA AL GASTO ENERGÉTICO EN RATONES HEMBRA HFD.

A continuación, se realizaron análisis calorimétricos en los que se obtuvieron resultados del gasto energético (Figura 57A y 57B), coeficiente respiratorio (Figura 57C) y actividad locomotora (Figura 57D), todos ellos sin diferencias respecto a los controles.

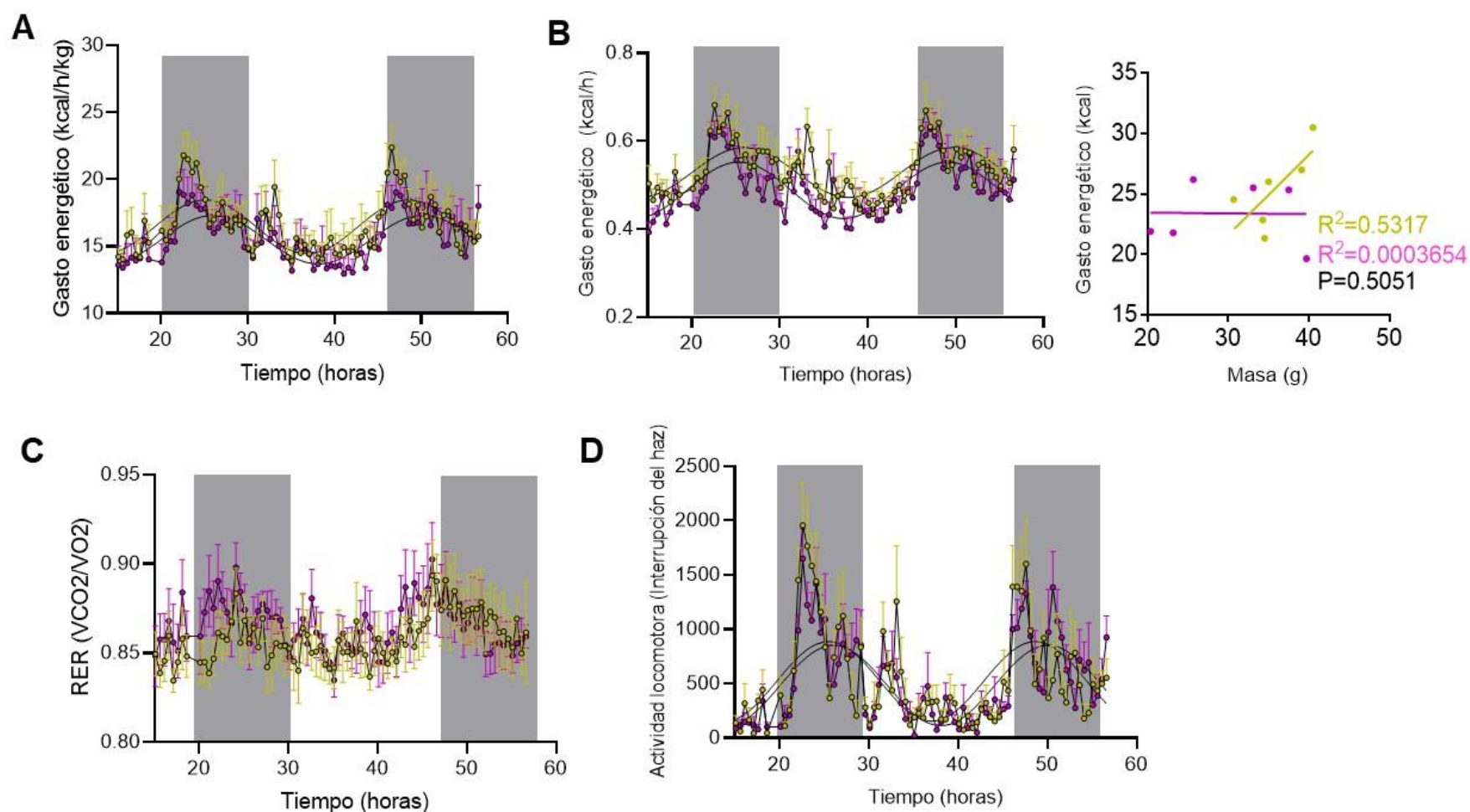


Figura 57. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en el gasto energético. (A) Gasto energético (H1) hembra control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (B) Gasto energético (H3) (panel izquierdo: acumulado y panel derecho: en relación con la masa corporal) hembra control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (C) Índice de intercambio respiratorio (RER) de ratones hembra control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). (D) Actividad locomotora de ratones hembra control y *SUCNR1SF1KO* (5-6 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se ajustaron con el modelo cosinor; la significación estadística fue determinada mediante Two-way ANOVA (Figura 57A, 57B (panel izquierdo), 57C y 57 D), ANCOVA (Figura 57 B panel derecho).

22 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATON MACHO HFD.

Finalmente, se investigó si la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 en dieta alta en grasas afectaba a la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, no hubo cambios con relación a sus hermanos de camada controles en los niveles de glucosa de ratones alimentados *ad libitum* ni en ayuno (Figura 58A), tampoco en los test de GTT (Figura 58B) ni ITT (Figura 58C).

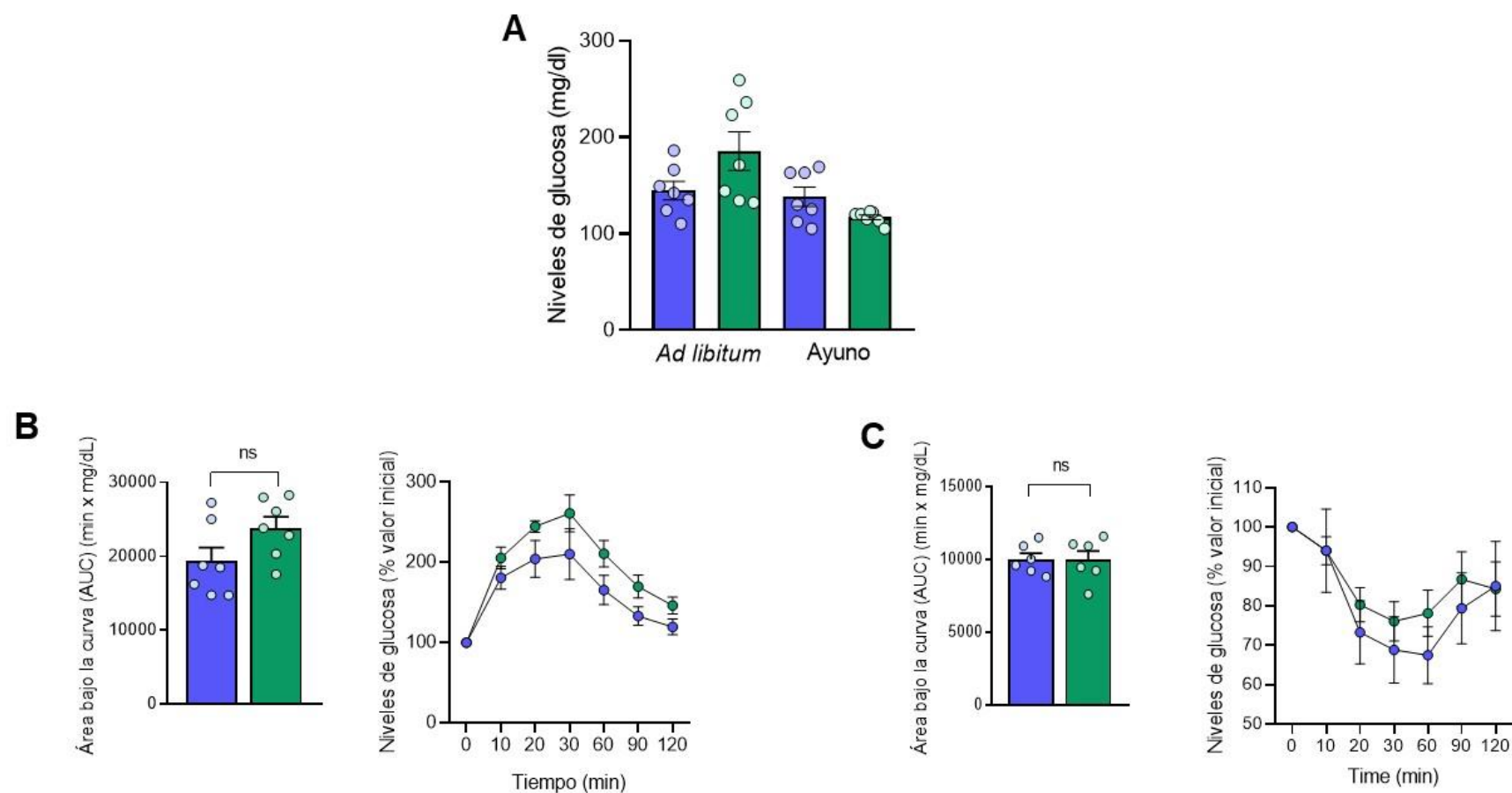


Figura 58. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la homeostasis de la glucosa en machos alimentados con dieta alta en grasas (HFD). (A) Niveles de glucosa *ad libitum* y en ayuno de machos control y *SUCNR1SF1KO*. (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (n=7-7 animales por grupo). (C) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) de machos control y *SUCNR1SF1KO* (n=7-7 animales por grupo). Los datos están expresados como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two-way ANOVA y test t-Student.

23 LA DELECIÓN DE SUCNR1 EN LAS NEURONAS SF1 NO AFECTA A LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA EN RATONES HEMBRAS HFD.

Para finalizar, se realizaron estudios sobre la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, no hubo cambios con relación a sus hermanos de camada controles en los niveles de glucosa de ratones alimentados *ad libitum* ni en ayuno (Figura 59A), tampoco en la tolerancia a la glucosa (Figura 59B) ni en la sensibilidad a la insulina (Figura 59C).

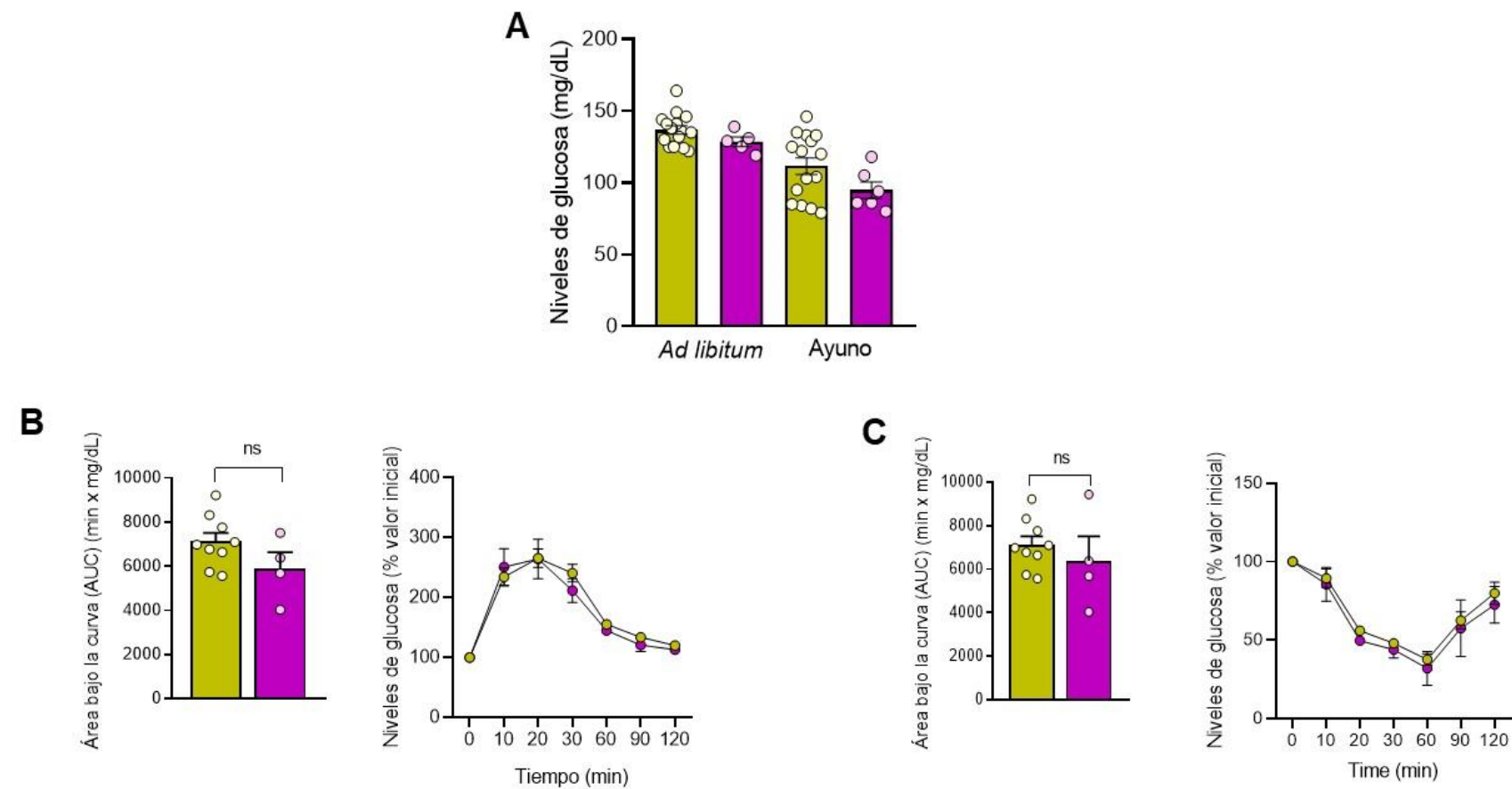


Figura 59. Efecto de la eliminación de SUCNR1 en la homeostasis de la glucosa en hembras alimentadas con dieta alta en grasas (HFD). (A) Niveles de glucosa *ad libitum* y en ayuno de hembras control y *SUCNR1SF1KO*. (B) Prueba de tolerancia a glucosa (GTT) de hembras control y *SUCNR1SF1KO* (n=6 animales por grupo). (C) Prueba de tolerancia a insulina (ITT) de hembras control y *SUCNR1SF1KO* (n=6 animales por grupo). Los datos están expresado como MEDIA $\pm$ SEM y se analizaron mediante Two-way ANOVA y test t-Student.

Como conclusión de los apartados 18-23 se puede extraer que la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 del VMH, tanto en ratones macho como hembra, alimentados con una dieta en que el 60% es grasa, no afecta al balance energético ni a la homeostasis de la glucosa

DISCUSIÓN

En las últimas décadas la obesidad se ha convertido en un problema de salud público, a tal nivel que es conocida también como la pandemia del mundo moderno. Es, de hecho, una de las principales causas de mortalidad debido a sus comorbilidades asociadas, inducidas por el aumento de los niveles de lípidos y la adiposidad y por las alteraciones endocrinas e inflamación asociadas (Panuganti et al., 2023). A menudo esta patología es considerada como el resultado de una ingesta excesiva de alimentos o de una actividad física insuficiente. Hasta la fecha, los tratamientos de la obesidad se centraban de forma exclusiva en el apetito y han fracasado, debido a fenómenos de neuroplasticidad y/o desensibilización de neuronas que generaban alteraciones compensatorias de la homeostasis energética (López & Tena-Sempere, 2017; Müller et al., 2022). Por ello, se requieren desarrollar estrategias efectivas para reducir las tasas de obesidad, lo que requiere una comprensión más profunda de los principales mecanismos homeostáticos que regulan la homeostasis energética del organismo (Hill et al., 2012).

En los últimos años, el papel crítico que desempeña el hipotálamo en la regulación del equilibrio energético, la ingesta de alimentos y el metabolismo periférico ha ganado una importancia sustancial. El hipotálamo integra señales a través de la actividad de los sistemas nerviosos endocrino y autónomo. Sin embargo, los mecanismos exactos y los circuitos neuronales que subyacen a esta regulación y a la patogénesis de la obesidad son complejos y no están totalmente elucidados (Fosch et al., 2021).

El papel del VMH en el control metabólico está bien establecido. A través del SNS, el VMH regula la termogénesis del BAT y el oscurecimiento del WAT. Además, al regular el SNS y el PSNS, el VMH regula la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de los lípidos hepáticos (Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2015). Dentro del VMH, las neuronas que expresan SF1 (codificado por *N5ra1*) han surgido como mediadores clave de la homeostasis energética (Choi et al., 2013; Fosch et al., 2021; K. W. Kim et al., 2011). Estas neuronas SF1, en el hipotálamo son exclusivas del VMH, y expresan muchos receptores de hormonas involucrados en el control metabólico, incluyendo la leptina, insulina, ghrelina, cannabinoides, estrógenos y hormonas tiroideas (Cardinal et al., 2014; Dhillon et al., 2006; Fosch et al., 2021; Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Rouabhi et al., 2021; P. Xu et al., 2011). Además, la eliminación específica de SF1 de algunos de estos receptores o de sus vías downstream, como AMPK, afecta profundamente a la homeostasis metabólica (Cardinal et al., 2014; Dhillon et al., 2006; Rouabhi et al., 2021; P. Xu et al., 2011) (Martínez-Sánchez 2017; Seoane-Collazo, 2018). Por todo ello, en esta Tesis se ha planteado el estudio del posible papel de JNK1 y SUCNR1 en las neuronas SF1 sobre la homeostasis energética.

1. El papel de JNK1 de las neuronas SF1 en el balance energético

JNK1, también conocida como MAPK8, ha surgido recientemente como un regulador clave del equilibrio energético. JNK1 es una quinasa activada por mitógenos (MAPK), se activa principalmente por estrés, como citocinas, exceso de ácidos grasos no esterificados, inflamación y estrés del retículo. El papel de JNK1 en la regulación del equilibrio energético de todo el cuerpo y las enfermedades relacionadas con la obesidad se ha estudiado ampliamente en relación con los órganos metabólicos periféricos (Manieri & Sabio, 2015; Nogueiras & Sabio, 2021). Por ejemplo, en el tejido adiposo JNK1 controla la expresión de la interleucina-6 (IL-6) y en condiciones de obesidad, aumenta la acumulación de lípidos en el hígado; también se ha demostrado que la falta de JNK1 en el hígado o el músculo aumenta la esteatosis hepática, al mismo tiempo que protege contra la resistencia a la insulina muscular (Sabio et al., 2009; Sabio et al., 2010). A nivel central, en el hipotálamo, se ha demostrado que JNK1 está implicado en la regulación del metabolismo de la glucosa (Belgardt et al., 2010), en la acción central de las hormonas tiroideas (Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017), la hormona concentradora de melanina (Imbernon et al., 2013) y el fármaco antipsicótico olanzapina (Ferreira et al., 2023), así como en el efecto obesogénico de la ablación de p53 en las neuronas POMC (Quiñones et al., 2018b) y el efecto pro-diabético de la ablación con fosfatasa de especificidad dual (DUSP8) en neuronas CRH (Schriever et al., 2020). Sin embargo, a pesar de esta evidencia el papel exacto de JNK1 en las neuronas SF1 del VMH no ha sido explorado y es por ello por lo que nos propusimos examinar su importancia.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que JNK1 en las neuronas SF1 desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis energética, provocando un impacto en el peso corporal, la tolerancia a la glucosa y el metabolismo de los lípidos hepáticos. Concretamente, cuando tratamos centralmente con T3 a los ratones que portan la eliminación del gen *jnk1* en las neuronas SF1, estos tienen una respuesta termogénica del BAT normal, pero un metabolismo de los lípidos hepáticos alterado. Este hecho, enfatiza la relevancia de JNK1 en las neuronas SF1 en el efecto central de las hormonas tiroideas y pone en relevancia las distintas vías moleculares que median las acciones inducidas por T3 en el BAT y el hígado.

Numerosos centros en el hipotálamo regulan las señales del sistema autónomo que están dirigidas al hígado y curiosamente estas acciones, se encuentran bajo los efectos centrales de hormonas sobre el metabolismo hepático. Un ejemplo de ello es ARC, el cual media el tráfico simpático y vagal (parasimpático) dirigido al hígado y que está inducido por leptina y a nivel molecular depende de PI3K y AMPK (Tanida et al., 2015). Existen evidencias de que el VMH también participa en la inervación simpática y parasimpática del hígado (Fliers et al., 2010; Martínez-Sánchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Seoane-Collazo et al., 2015; Tanida et al., 2015; Uyama et al., 2004). En un trabajo previo, nuestro grupo demostró que la administración central de T3 actuando en el VMH regula las enzimas lipogénicas hepáticas y que el mecanismo molecular de este efecto depende de la inhibición de AMPK en dicho núcleo, y esto a su vez conduce a un aumento de la actividad de JNK1, promoviendo la estimulación vagal hepática (Martínez-Sánchez et al., 2017). Sorprendentemente este efecto está acoplado a la termogénesis del BAT inducido por T3 central, de tal manera que la acción de las hormonas tiroideas implicaría un aumento de la producción de lípidos en el hígado, que son empleados como sustrato para la termogénesis en el BAT (Martínez-Sánchez et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no existían datos que relacionasen JNKSF1 con el metabolismo de los lípidos hepáticos o con las acciones de las hormonas tiroideas.

Nuestros datos demuestran que la ablación de *Jnk1* en las células SF1 disminuyó el peso corporal de los ratones (*Sf1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}*), sin alterar la ingesta de alimentos, ni en el gasto energético, aunque mejorando la tolerancia a la glucosa. Algo similar a lo que ocurre con los ratones que tienen una inactivación condicional de JNK1 en las células que expresan nestina (JNK1 Δ NES mice). En estos ratones se observó que tras una alimentación alta en grasas presentaban protección contra la esteatosis hepática (Belgardt et al., 2010). Por este motivo decidimos, examinar los efectos de la ablación de *Jnk1* en las células SF1 sobre las concentraciones de los lípidos hepáticos. Nuestros resultados demostraron que los ratones nulos exhibieron una marcada disminución en la acumulación de lípidos hepáticos basales y en los inducidos por T3 central.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis doctoral resultan reveladores, en primer lugar porque confirman que JNK1 ejerce acciones opuestas sobre el metabolismo hepático cuando actúa de manera periférica o central, ya que existen estudios que demuestran que la ablación hepática de *Jnk1* incrementa la esteatosis hepática (Sabio et al., 2009). El hecho de que JNK1, al igual que AMPK (López, 2018b; P. B. Martínez de Morentin et al., 2016), ejerza acciones inversas a nivel periférico e hipotalámico apunta a la existencia de un mecanismo de regulación diferencial tejido-específico “*upstream*”.

En segundo lugar, la ablación de JNK1 no afectó ni a la termogénesis basal estimulada por T3. Esto demuestra que los efectos de T3 mediados por el SNS y el PSNS en el BAT y en el hígado, respectivamente, dependen de diferentes vías dentro de las neuronas SF1. A su vez, esta respuesta molecular dicotómica, explicaría la capacidad de las neuronas SF1 para activar tanto el SNS como PSNS. Aunque los mecanismos moleculares que subyacen a estas acciones siguen sin esclarecerse, el efecto positivo de JNK1 sobre la activación neuronal se ha descrito previamente en las neuronas AgRP hipotalámicas (Tsaousidou et al., 2014). También se sabe que JNK1 regula varios procesos relacionados con la morfogénesis cerebral, la actividad neuronal, la arquitectura axo-dendrítica y la plasticidad sináptica (Komulainen et al., 2014; Mohammad et al., 2018; P. Xu et al., 2011), lo que sugiere su posible implicación. Sin embargo, cabe la posibilidad de que en los circuitos neuronales que modulan ambas ramas del sistema nervioso autónomo intervengan subpoblaciones separadas de neuronas SF1. Es decir, nuestros hallazgos abren nuevas perspectivas que hay que seguir investigando.

Resumen gráfico:

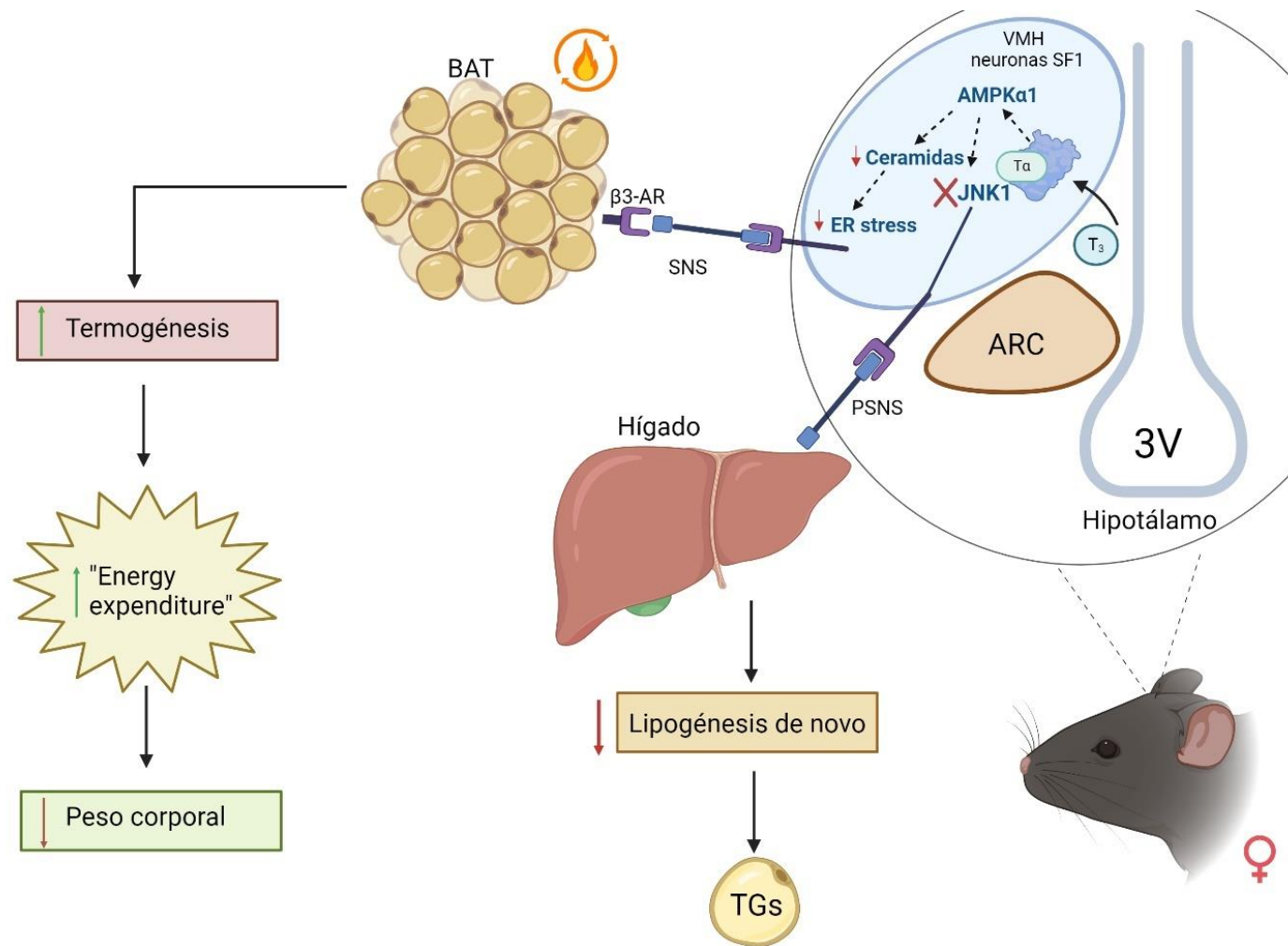


Figura 60. El papel de JNK1 de las neuronas SF1 en el balance energético. La ablación de JNK1 en las neuronas SF1 no afecta a las acciones de las hormonas tiroideas en cuanto a la termogénesis del BAT (termogénesis aumentada, gasto energético aumenta y peso corporal disminuye). Sin embargo, la eliminación de JNK1 en estas neuronas altera la acción de las hormonas tiroideas, ya que, en vez de aumentar la producción de lípidos hepáticos, los disminuye (elaboración propia mediante BioRender.com).

2. El papel de SUCNR1 en el balance energético

Tradicionalmente los metabolitos fueron considerados como fuentes de combustible, pero hoy en día se sabe que tienen funciones adicionales como ligandos receptores específicos de membrana plasmática (Fernández-Veledo et al., 2021). Un buen ejemplo, es el succinato, más conocido como intermediario del ciclo de Krebs; se propuso desde hace tiempo como una señal inducida por el estrés que estimula respuestas proinflamatorias para la activación inmunitaria (Littlewood-Evans et al., 2016; Rubic et al., 2008; Tannahill et al., 2013). Sin embargo, trabajos recientes contradicen este punto de vista, ya que también se le han atribuido funciones antiinflamatorias al receptor de succinato denominado SUCNR1 (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019; Krzak et al., 2021). Curiosamente, de forma similar a lo que ocurre con otras hormonas como la leptina, la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 se asocian con niveles más altos de succinato, pero con una señalización de SUCNR1 deteriorada (Serena et al., 2018). Un estudio ha propuesto el succinato circulante como un posible marcador sustitutivo del control metabólico (Ceperuelo-Mallafre et al., 2019), lo que sugiere nuevas funciones fisiológicas de SUCNR1. Nuestros conocimientos sobre la señalización de SUCNR1 son

muy limitados en comparación con otros GPCRs. De hecho, muy pocos estudios han relacionado previamente SUCNR1 hipotalámico con la obesidad. Por todo ello, se decidió investigar el eje succinato/SUCNR1 hipotalámico y su implicación en el balance energético.

En primer lugar, para averiguar el papel de SUCNR1 en el balance energético se exploraron los efectos de la administración central crónica de succinato y de su agonista en el tercer ventrículo (mediante bombas osmóticas de 7 días) en ratones alimentados con dieta estándar o dieta alta en grasas. Con dieta SD se observó una estimulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón dependiente de UCP1, lo que conlleva un aumento del gasto energético, protegiendo de la obesidad; en concordancia con estudios publicados previos en tejidos periféricos, como por ejemplo el de Mills y colaboradores (Mills et al., 2018) que al administrar intravenosamente succinato a ratones observaron un aumento de la temperatura del BAT interescapular. Sin embargo, en el contexto de dieta alta en grasa no se replicaron los resultados, que a su vez diferían de publicaciones previas realizadas a nivel periférico en las cuales ratones alimentados con HFD y suplementados con succinato reducen el peso corporal (Liu et al., 2022). Estos hallazgos sugieren que a nivel central el receptor SUCNR1 ejerce una función fisiológica modulando el equilibrio energético, pero este rol se ve alterado en condiciones patológicas, lo cual podría interpretarse como un fenómeno de resistencia central a la acción del succinato en la obesidad, tal y como ocurre en la respuesta a otras hormonas como leptina, insulina o *ghrelin* (Cui et al., 2017).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y con la finalidad de identificar de manera precisa las poblaciones neuronales específicas en las que SUCNR1 puede estar modulando el equilibrio energético, se procedió a eliminar el receptor de succinato, en ratones macho y hembra, mediante dos aproximaciones diferentes. Inicialmente, se empleó tecnología Cre-lox utilizando lentivirales (AAV-Cre), para tiempos a largo plazo y adenovirales (Ad SF1-Cre), para tiempos a corto plazo, en MBH y VMH respectivamente. En los machos en SD, se observó un aumento de peso en los ratones tratados respecto a los controles. Además, los animales tratados con ambos virus mostraron un descenso de la temperatura del BAT y en línea con esta observación menores niveles de UCP1 en este tejido. Nuestros resultados revelaron que la eliminación del SUCNR1 tanto en el MBH como VMH altera el equilibrio energético, produciendo un balance energético positivo unida a una menor termogénesis en el BAT. Curiosamente, en hembras no se replicó el resultado: ni se observaron cambios en la masa corporal, ni en la temperatura del BAT, sugiriendo que la modulación del equilibrio energético por parte de SUCNR1 exhibe un claro dimorfismo sexual.

De acuerdo con los resultados obtenidos en machos, y en busca de una mejor caracterización de estas poblaciones neuronales, se procedió a *knockear* SUCNR1 usando el sistema Cre-Lox. En concreto se cruzaron los ratones *SUCNR1^{fllox/fllox}* con ratones SF1-Cre, para generar ratones que carecen de SUCNR1 en las neuronas SF1 (*SUCNR1SF1KO*), neuronas exclusivas del VMH. Estas neuronas juegan un papel clave en el control de los niveles de glucosa en sangre, la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos la plasticidad del tejido adiposo y la activación de la termogénesis (Fosch et al., 2021); debido a ello, se llevó a cabo el fenotipado metabólico de los animales *SUCNR1SF1KO*. Se analizó el peso corporal, la ingesta de alimentos, el EE, RER y LA usando un sistema de calorimetría indirecta. También se llevaron a cabo análisis termográficos de la grasa parda y estudios de la homeostasis de la glucosa (GTT e ITT). Todos estos experimentos se realizaron tanto en machos como en hembras, y en dieta estándar (SD) y dieta alta en grasas (HFD).

En machos en SD, la eliminación selectiva de SUCNR1 en las neuronas SF1 hipotalámicas desencadenó un aumento de peso corporal sin cambios en la ingesta de alimentos. Resultados similares los encontraron Lowell y colaboradores al eliminar de forma selectiva el receptor de la leptina o LEPR en las neuronas SF1 del ventromedial: provocaron un aumento en el peso corporal de los animales, sin cambios en la ingesta de comida y dejando a los animales sin poder activar el gasto energético (Dhillon et al., 2006). En nuestro ratón también se incrementó desdiferenciación del tejido adiposo pardo y se acompañó de una disminución de la temperatura del BAT y menores niveles de UCP1. Se observó una ligera tendencia a un menor gasto energético y actividad locomotora, aunque no llegando a ser significativa. En cuanto al RER no se obtuvieron diferencias significativas. Estos resultados difieren de los de estudios previos realizados en ratones *sucnr1^{-/-}* (es decir un ratón carente del receptor de manera global), que eran fenotípicamente más delgados que los ratones WT, con niveles normales de contenido del BAT y menores niveles de UCP1, pero con una actividad metabólica elevada (McCreath et al., 2015).

Los resultados obtenidos en hembras mutantes alimentadas con dieta estándar no mostraron diferencias en ninguna de las variables estudiadas (peso corporal, ingesta, termogénesis del BAT, gasto energético, actividad locomotora y índice de intercambio respiratorio) con respecto a sus hermanas de camada controles. Estos resultados evidencian un claro dimorfismo sexual al eliminar SUCNR1 en las neuronas SF1 del VMH: en machos la eliminación del receptor SUCNR1 en las neuronas SF1 produce cambios en la termogénesis, impidiendo activar EE; hito que no ocurre en hembras. En busca del origen de estas diferencias, quizás sería importante explorar la coordinación de las neuronas SF1 con otras neuronas fuera del VMH para desencadenar funciones metabólicas.

También, se investigó la posibilidad de una desregulación en la homeostasis de la glucosa en los animales *SUCNR1SF1KO*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa *ad libitum* ni en ayuno de los ratones *SUCNR1SF1KO* machos o hembras y tampoco reflejaron diferencias en la tolerancia a la glucosa o a la sensibilidad a la insulina. A diferencia de los datos obtenidos en estudio previo en donde los ratones *Sucnr1*^{-/-} alimentados en SD presentaban una mejor tolerancia a la glucosa (McCreath et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que a pesar del papel central de las neuronas SF1 en los niveles de glucosa sanguínea y la sensibilidad a insulina periférica (Fosch et al., 2021), la inhibición del receptor SUCNR1 en estas neuronas no tiene un impacto directo sobre la homeostasis de la glucosa.

Dada la evidencia existente, que indica que las neuronas SF1 son particularmente importantes para la adaptación metabólica en las primeras etapas de la obesidad, y a los elevados niveles circulantes de succinato en la patología de la obesidad, se investigaron los efectos de la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 sobre el balance energético en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. Nuestros resultados muestran que la eliminación de SUCNR1 en las neuronas SF1 no provoca cambios en el peso corporal tanto en machos como en hembras alimentados con una dieta alta en grasas (60% de grasa). Datos que coinciden con un trabajo previo realizado en ratones *Sucnr1*^{-/-}, en el que una alimentación con HFD tras 16 semanas no afecta al peso corporal (van Diepen et al., 2017). Tampoco, se encontraron diferencias en la termogénesis del BAT, adiposidad o en los niveles de UCP1. En este punto sería interesante realizar una exposición al frío de estos animales a 4°C para impulsar la acumulación selectiva de succinato y favorecer el “secuestro” de este por parte del BAT (Mills et al., 2018). En lo referente a la homeostasis de la glucosa tampoco hubo diferencias en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a insulina. En la literatura encontramos resultados contradictorios: un estudio vio que en ratones *Sucnr1*^{-/-} la alimentación alta en grasas mejoraba la tolerancia a la glucosa (van Diepen et al., 2017), aunque en otro se demuestra que estos mismos ratones *Sucnr1*^{-/-} aumentan de peso corporal con hiperglucemia concurrente y alteración de la tolerancia a la glucosa (McCreath et al., 2015). En este mismo estudio se comenta que los resultados varían según el tipo y la duración de la alimentación alta en grasas, puesto que la intervención dietética de HFD de 20 semanas es la causante de las alteraciones metabólicas porque una alimentación de 11 semanas con esta misma dieta redujo el peso corporal y mejoró la tolerancia de la glucosa (McCreath et al., 2015).

En resumen, nuestros hallazgos parecen sugerir que en condiciones patológicas la eliminación de SUCNR1 no implica cambios en el balance energético en ratones obesos. Es posible que en nuestro modelo Cre específico sea necesaria una exposición más prolongada a HFD, tal vez 20 semanas o incluso esta dieta resulte demasiado agresiva y sea mejor emplear una dieta con un 40% en grasa. Por otro lado, también puede ocurrir que en HFD la eliminación de SUCNR1 no conlleve cambios en el balance energético porque en obesidad exista una saturación del propio receptor, de manera similar a lo que ocurre con la leptina (Cui et al., 2017). Podría ocurrir algo similar con el succinato, ya que cuando realizamos las inyecciones intracerebroventriculares en animales con dieta SD, es decir que poseían un fenotipo delgado, el succinato extracelular podría encontrarse unido a SUCNR1 y con la administración exógena de succinato llegaría a la concentración adecuada para producir una activación del receptor y desembocar en la reducción de la masa corporal de los animales. Sin embargo, en la patología de la obesidad los niveles de succinato se encuentran muy elevados (Serena et al., 2018) provocando la desensibilización de SUCNR1 e inactivándolo, de esta manera aumentaría la resistencia al succinato. Así, cuando inyectamos succinato en ratones obesos, SUCNR1 se encontraba inactivo, sin poder ejercer su función y como consecuencia el succinato no fue capaz de reducir la masa corporal de los animales; de manera similar en los animales *SUCNR1SF1KO* en HFD, en obesidad el no tener el receptor parece implicar lo mismo que tenerlo inactivo. Por otro lado, tanto los *knockdowns* virogenéticos como la eliminación del receptor de succinato en las neuronas SF1 en los animales *SUCNR1SF1KO* machos en SD, provocaron un aumento de peso corporal sin cambios en la ingesta de alimentos, resultados similares a los encontrados al eliminar de forma selectiva el receptor de leptina en las neuronas SF1 del ventromedial (Dhillon et al., 2006).

Sin embargo, en hembras no se replicaron los resultados obtenidos en machos. En este punto es crucial, además de explorar la coordinación de las neuronas SF1 con otras neuronas fuera del VMH para desencadenar funciones metabólicas, tener en cuenta el papel que ejercen las hormonas sexuales femeninas, proporcionando una protección frente a la obesidad. Se sabe que los estrógenos protegen contra el aumento de la adiposidad/obesidad corporal a través de sus efectos para suprimir el apetito y aumentar el gasto energético (González-García et al., 2017b; López & Tena-Sempere, 2017; P. B. Martínez de Morentin et al., 2014). Por tanto, se observa la necesidad de realizar las estereotaxias, con los virus empleados en esta investigación y anteriormente mencionados, en ratonas hembra ovariectomizadas, así como ovariectomizar *SUCNR1SF1KO* hembras, para observar si de esta manera existen cambios en la masa corporal debido a la eliminación de SUCNR1 en un contexto de depleción de esteroides ováricos.

En general, todos los resultados obtenidos sobre SUCNR1 en esta tesis doctoral indican que el eje succinato/SUCNR1 tiene una función clave protegiendo contra la ganancia de peso antes de desarrollarse la patología de la obesidad. Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que el eje

succinato/SUCNR1 podría ser un nuevo circuito metabólico en el control de la homeostasis energética desempeñando un papel crucial de tipo preventivo en el desarrollo de la obesidad. Hasta que punto este potencial preventivo puede ser utilizado para revertir la obesidad una vez establecida necesita ser explorado más en detalle. Nuestros datos iniciales no apoyan en principio esta posibilidad, pero en los últimos años se ha demostrado que las estrategias terapéuticas para la obesidad son mucho más eficaces cuando actúan sobre más de una diana. Hasta que punto el abordaje conjunto del SUCNR1 con otros, por ejemplo incretinas, puede ser eficaz, debería estudiarse.

Resúmenes gráficos:

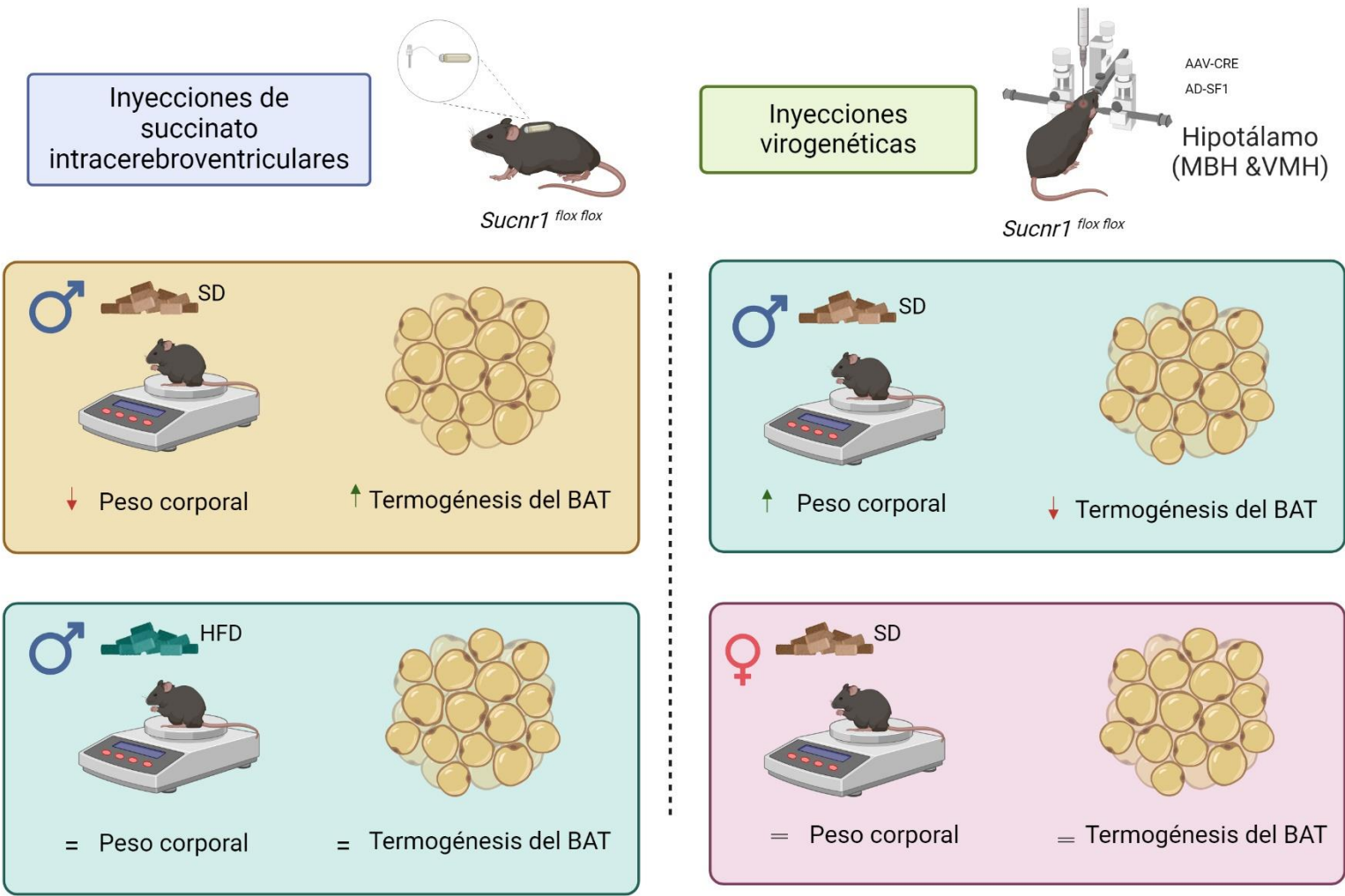


Gráfico 61. Efecto de las inyecciones intracerebroventriculares de succinato e inhibiciones virogenéticas de SUCNR1 en MBH y VMH sobre el peso corporal y termogénesis del BAT. Al administrar de manera central succinato y su agonista en el tercer ventrículo durante siete días: en SD (dieta estándar) se observó un aumento de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT) dependiente de UCP1, lo que conlleva un aumento del gasto energético, y por lo tanto disminuyendo el peso corporal y protegiendo de la obesidad. En HFD (dieta alta en grasas), no se replicaron los resultados de SD: no hubo cambios ni en el peso corporal ni en la termogénesis del BAT. Por otro lado, la eliminación virogenética de SUCNR1 tanto en el MBH como VMH (en SD): en machos produce un aumento del peso corporal junto con una menor termogénesis en el BAT. Sin embargo, en hembras: no se observaron cambios en la masa corporal, ni en la temperatura del BAT (elaboración propia mediante BioRender.com).

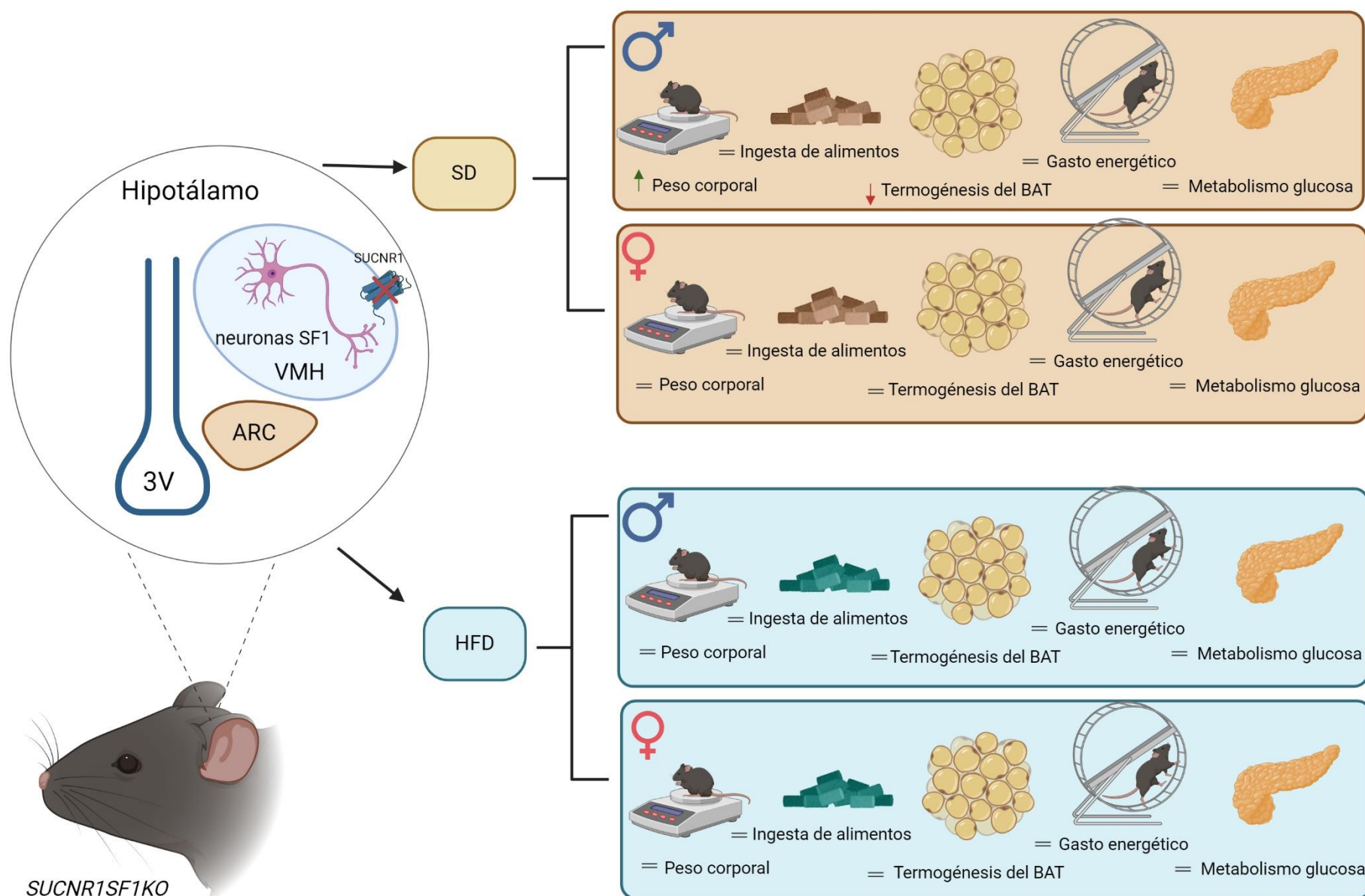


Gráfico 62. El papel de SUCNR1 de las neuronas SF1 en el balance energético en SD y HFD. En machos en SD, la eliminación selectiva de SUCNR1 en las neuronas SF1 hipotalámicas desencadenó un aumento de peso corporal sin cambios en la ingesta de alimentos. Una disminución de la temperatura del BAT, así como menores niveles de UCP1; se observó una ligera tendencia a menor gasto energético y actividad locomotora, pero sin llegar a ser significativa. Tampoco se observaron cambios en el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, tanto en hembras SD como en machos y hembras sometidos a HDF, no hubo cambios en ninguna de las variables estudiadas (elaboración propia mediante BioRender.com).

CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral se obtuvieron resultados basados en la generación de dos modelos KO, además de otros mediante la modificación virogenética, que nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- JNK1 de las neuronas SF1 modula selectivamente el metabolismo lipídico hepático, y posteriormente, los efectos centrales de las TH en el hígado. Es decir, en conjunto nuestros resultados revelan la naturaleza específica del mecanismo hipotalámico, mediado por JNK1, que media el metabolismo y las acciones centrales de las THs para regular el manejo de lípidos en el organismo.

- El eje succinato/SUCNR1 tiene una función clave protegiendo contra la ganancia de peso antes de desarrollarse la patología de la obesidad, en donde se podría especular con una resistencia a su acción. Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que el eje succinato/SUCNR1 podría ser un nuevo circuito metabólico en el control de la homeostasis energética que abre nuevas dianas terapéuticas preventivas de trastornos metabólicos.

BIBLIOGRAFÍA

- A. W. Hetherington, & S. W. Ranson. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutrition Classics*, 78.
- Abdelli, S., Papas, K. K., Mueller, K. R., Murtaugh, M. P., Hering, B. J., & Bonny, C. (2014). Regulation of the JNK3 Signaling Pathway during Islet Isolation: JNK3 and c-fos as New Markers of Islet Quality for Transplantation. *PLoS ONE*, 9(7), e99796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099796>
- Aguiar, C. J., Rocha-Franco, J. A., Sousa, P. A., Santos, A. K., Ladeira, M., Rocha-Resende, C., Ladeira, L. O., Resende, R. R., Botoni, F. A., Barrouin Melo, M., Lima, C. X., Carballido, J. M., Cunha, T. M., Menezes, G. B., Guatimosim, S., & Leite, M. F. (2014). Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Communication and Signaling*, 12(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0078-2>
- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 9047–9054. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.9047>
- Akieda-Asai, S., Poleni, P.-E., & Date, Y. (2014). Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(11), E1284–E1291. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00664.2013>
- Alarcon, C., Wicksteed, B., Prentki, M., Corkey, B. E., & Rhodes, C. J. (2002). Succinate Is a Preferential Metabolic Stimulus-Coupling Signal for Glucose-Induced Proinsulin Biosynthesis Translation. *Diabetes*, 51(8), 2496–2504. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.8.2496>
- Astarraga, B., Martínez, L., Ceperuelo-Mallafré, V., Llauroadó, G., Terrón-Puig, M., Rodríguez, M. M., Casajoana, A., Pellitero, S., Megía, A., Vilarrasa, N., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2020). Impaired Succinate Response to a Mixed Meal in Obesity and Type 2 Diabetes Is Normalized After Metabolic Surgery. *Diabetes Care*, 43(10), 2581–2587. <https://doi.org/10.2337/dc20-0460>
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M., & Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 56(4), 952–964. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>
- Belgardt, B. F., Mauer, J., Wunderlich, F. T., Ernst, M. B., Pal, M., Spohn, G., Brönneke, H. S., Brodesser, S., Hampel, B., Schauss, A. C., & Brüning, J. C. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 6028–6033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001796107>
- Berrington de Gonzalez, A., Hartge, P., Cerhan, J. R., Flint, A. J., Hannan, L., MacInnis, R. J., Moore, S. C., Tobias, G. S., Anton-Culver, H., Freeman, L. B., Beeson, W. L., Clipp, S. L., English, D. R., Folsom, A. R., Freedman, D. M., Giles, G., Hakansson, N., Henderson, K. D., Hoffman-Bolton, J., ... Thun, M. J. (2010). Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2211–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000367>
- 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>
- Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3035–3043. <https://doi.org/10.1172/JCI60047>
- Brooks, C. McC. (1988). The history of thought concerning the hypothalamus and its functions. *Brain Research Bulletin*, 20(6), 657–667. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(88\)90075-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(88)90075-5)
- Brown, J. A., Woodworth, H. L., & Leininger, G. M. (2015). To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00009>
- Bruinstroop, E., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2014). Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(5), 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.05.001>
- Busquets, O., Ettcheto, M., Eritja, À., Espinosa-Jiménez, T., Verdaguer, E., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Castro-Torres, R. D., Casadesús, G., Auladell, C., Bulló, M., Folch, J., & Camins, A. (2019). c-Jun N-terminal Kinase 1 ablation protects against metabolic-induced hippocampal cognitive impairments. *Journal of Molecular Medicine*, 97(12), 1723–1733. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01856-z>
- Cakir, I., & Nillni, E. A. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress, the Hypothalamus, and Energy Balance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(3), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.01.002>
- 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>
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, 460(3), 303–326. <https://doi.org/10.1002/cne.10643>
- Cao, Q., Yu, S., Xiong, W., Li, Y., Li, H., Li, J., & Li, F. (2018). Waist-hip ratio as a predictor of myocardial infarction risk. *Medicine*, 97(30), e11639. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011639>
- 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>
- Castillo, M., Hall, J. A., Correa-Medina, M., Ueta, C., Won Kang, H., Cohen, D. E., & Bianco, A. C. (2011). Disruption of Thyroid Hormone Activation in Type 2 Deiodinase Knockout Mice Causes Obesity With Glucose Intolerance and Liver Steatosis Only at Thermoneutrality. *Diabetes*, 60(4), 1082–1089. <https://doi.org/10.2337/db10-0758>
- Castro-Torres, R. D., Landa, J., Rabaza, M., Busquets, O., Olloquequi, J., Ettcheto, M., Beas-Zarate, C., Folch, J., Camins, A., Auladell, C., & Verdaguer, E. (2019). JNK Isoforms Are Involved in the Control of Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice, Both in Physiological Conditions and in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5856–5865. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1476-7>
- Ceperuelo-Mallafre, V., Llaurodo, G., Keiran, N., Benaiges, E., Astiarraga, B., Martínez, L., Pellitero, S., González-Clemente, J. M., Rodríguez, A., Fernández-Real, J. M., Lecube, A., Megía, A., Vilarrasa, N., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2019). Preoperative Circulating

- Succinate Levels as a Biomarker for Diabetes Remission After Bariatric Surgery. *Diabetes Care*, 42(10), 1956–1965. <https://doi.org/10.2337/dc19-0114>
- Chakrabarti, P., Kim, J. Y., Singh, M., Shin, Y.-K., Kim, J., Kumbrink, J., Wu, Y., Lee, M.-J., Kirsch, K. H., Fried, S. K., & Kandror, K. V. (2013). Insulin Inhibits Lipolysis in Adipocytes via the Evolutionarily Conserved mTORC1-Egr1-ATGL-Mediated Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3659–3666. <https://doi.org/10.1128/MCB.01584-12>
- Cheng, S.-Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews*, 31(2), 139–170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
- Cherkaoui-Malki, M., Surapureddi, S., I. El Hajj, H., Vamecq, J., & Andreoletti, P. (2012). Hepatic Steatosis and Peroxisomal Fatty Acid Beta-oxidation. *Current Drug Metabolism*, 13(10), 1412–1421. <https://doi.org/10.2174/138920012803762765>
- Cho, E.-H. (2018). Succinate as a Regulator of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00455>
- 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>
- Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metabolism*, 29(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. J., Smith, A. C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature13909>
- 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>
- 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>
- Costanzo-Garvey, D. L., Pfluger, P. T., Dougherty, M. K., Stock, J. L., Boehm, M., Chaika, O., Fernandez, M. R., Fisher, K., Kortum, R. L., Hong, E.-G., Jun, J. Y., Ko, H. J., Schreiner, A., Volle, D. J., Treece, T., Swift, A. L., Winer, M., Chen, D., Wu, M., ... Lewis, R. E. (2009). KSR2 Is an Essential Regulator of AMP Kinase, Energy Expenditure, and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, 10(5), 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.010>
- Cubero, F. J., Zoubek, M. E., Hu, W., Peng, J., Zhao, G., Nevzorova, Y. A., Al Masaoudi, M., Bechmann, L. P., Boekschoten, M. V., Muller, M., Preisinger, C., Gassler, N., Canbay, A. E., Luedde, T., Davis, R. J., Liedtke, C., & Trautwein, C. (2016). Combined Activities of JNK1 and JNK2 in Hepatocytes Protect Against Toxic Liver Injury. *Gastroenterology*, 150(4), 968–981. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.019>
- Cui, H., López, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(6), 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>

- 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>
- Davis, K. E., D. Neinast, M., Sun, K., M. Skiles, W., D. Bills, J., A. Zehr, J., Zeve, D., D. Hahner, L., W. Cox, D., M. Gent, L., Xu, Y., V. Wang, Z., A. Khan, S., & Clegg, D. J. (2013). The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Molecular Metabolism*, 2(3), 227–242. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.05.006>
- Davis, R. J. (2000). Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, 103(2), 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00116-1)
- de Alvaro, C., Teruel, T., Hernandez, R., & Lorenzo, M. (2004). Tumor Necrosis Factor α Produces Insulin Resistance in Skeletal Muscle by Activation of Inhibitor κ B Kinase in a p38 MAPK-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17070–17078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312021200>
- de Castro Fonseca, M., Aguiar, C. J., da Rocha Franco, J. A., Gingold, R. N., & Leite, M. F. (2016). GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0126-1>
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*, 146(10), 4192–4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>
- de Vries, E. M., Kwakkel, J., Eggels, L., Kalsbeek, A., Barrett, P., Fliers, E., & Boelen, A. (2014). NF κ B Signaling Is Essential for the Lipopolysaccharide-Induced Increase of Type 2 Deiodinase in Tanycytes. *Endocrinology*, 155(5), 2000–2008. <https://doi.org/10.1210/en.2013-2018>
- Deen, P. M. T., & Robben, J. H. (2011). Succinate Receptors in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(8), 1416–1422. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050481>
- DeVadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., Bäckhed, F., & Mithieux, G. (2014). Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell*, 156(1–2), 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016>
- DeVadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchampt, A., Bäckhed, F., & Mithieux, G. (2016). Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metabolism*, 24(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.013>
- Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., White, R. D., Edelstein, E. A., Coppari, R., Balthasar, N., Cowley, M. A., Chua, S., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2006). Leptin Directly Activates SF1 Neurons in the VMH, and This Action by Leptin Is Required for Normal Body-Weight Homeostasis. *Neuron*, 49(2), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.021>
- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (1999). 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](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80035-0)

- Erdheim J. (1904). Über hypophysenganggeschwülste und hirncholesteatome. *Gerold*.
- Fahien, L. A., & MacDonald, M. J. (2002). The Succinate Mechanism of Insulin Release. *Diabetes*, 51(9), 2669–2676. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2669>
- Faith, J. J., Ahern, P. P., Ridaura, V. K., Cheng, J., & Gordon, J. I. (2014). Identifying Gut Microbe–Host Phenotype Relationships Using Combinatorial Communities in Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, 6(220). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008051>
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C., & Lechan, R. M. (2002). Agouti-Related Protein (AGRP) Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis; Comparisons between the Effect of AGRP and Neuropeptide Y on Energy Homeostasis and the HPT Axis. *Endocrinology*, 143(10), 3846–3853. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220338>
- Fernández-Veledo, S., Ceperuelo-Mallafre, V., & Vendrell, J. (2021). Rethinking succinate: an unexpected hormone-like metabolite in energy homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(9), 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.06.003>
- Fernández-Veledo, S., & Vendrell, J. (2019). Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(4), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09513-z>
- Fenzl, A., & Kiefer, F. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, (2014), 25–37, 19(1). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0022>
- Fernø, J., Señarís, R., Diéguez, C., Tena-Sempere, M., & López, M. (2015). Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.022>
- Ferreira, V., Folgueira, C., García-Altares, M., Guillén, M., Ruíz-Rosario, M., DiNunzio, G., Garcia-Martinez, I., Alen, R., Bookmeyer, C., Jones, J. G., Cigudosa, J. C., López-Larrubia, P., Correig-Blanchar, X., Davis, R. J., Sabio, G., Rada, P., & Valverde, Á. M. (2023). Hypothalamic JNK1-hepatic fatty acid synthase axis mediates a metabolic rewiring that prevents hepatic steatosis in male mice treated with olanzapine via intraperitoneal: Additional effects of PTP1B inhibition. *Redox Biology*, 63, 102741. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102741>
- Fliers, E., Klieverik, L. P., & Kalsbeek, A. (2010). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.008>
- Font-Burgada, J., Sun, B., & Karin, M. (2016). Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. *Cell Metabolism*, 23(1), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.015>
- 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>
- Frayn, K. N., Arner, P., & Yki-Järvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in Biochemistry*, 42, 89–103. <https://doi.org/10.1042/bse0420089>
- Friedman, J. M. (2019). Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism*, 1(8), 754–764. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>
- Gao, S., Howard, S., & LoGrasso, P. V. (2017). Pharmacological Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase Reduces Food Intake and Sensitizes Leptin's Anorectic Signaling Actions. *Scientific Reports*, 7(1), 41795. <https://doi.org/10.1038/srep41795>

- Gao, X.-B., & Horvath, T. (2014). Function and Dysfunction of Hypocretin/Orexin: An Energetics Point of View. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 101–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013855>
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S. C., Koch, M., Horvath, T. L., Yi, C.-X., Chowen, J. A., Verkhatsky, A., 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>
- Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeöld, A., & Bianco, A. C. (2008). Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling1. *Endocrine Reviews*, 29(7), 898–938. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0019>
- Geubelle, P., Gilissen, J., Dilly, S., Poma, L., Dupuis, N., Laschet, C., Abboud, D., Inoue, A., Jouret, F., Pirotte, B., & Hanson, J. (2017). Identification and pharmacological characterization of succinate receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 174(9), 796–808. <https://doi.org/10.1111/bph.13738>
- Gibbons, G. F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Journal*, 268(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/bj2680001>
- Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B., & Hanson, J. (2016). Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 159, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.008>
- Giralt, M., & Villarroya, F. (2013). White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology*, 154(9), 2992–3000. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1403>
- González-García, I., Milbank, E., Martínez-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>
- González-García, I., Tena-Sempere, M., & López, M. (2017a). *Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis* (pp. 315–335). https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_15
- González-García, I., Tena-Sempere, M., & López, M. (2017b). *Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis* (pp. 315–335). https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_15
- Goy, R. W., & Phoenix, C. H. (1963). Hypothalamic regulation of female sexual behaviour; establishment of behavioural oestrus in spayed guinea-pigs following hypothalamic lesions. *Reproduction*, 5(1), 23-NP. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0050023>
- Guyton, & Hall. (2016). *Tratado de fisiología médica*. Elsevier.
- Haffke, M., Fehlmann, D., Rummel, G., Boivineau, J., Duckely, M., Gommermann, N., Cotesta, S., Sirockin, F., Freuler, F., Littlewood-Evans, A., Kaupmann, K., & Jaakola, V.-P. (2019). Structural basis of species-selective antagonist binding to the succinate receptor. *Nature*, 574(7779), 581–585. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1663-8>
- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e218–e218. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2005). Microlesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Effects on sociosexual behaviors in male rats. *Behavioral Neuroscience*, 119(5), 1227–1234. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.5.1227>

- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252–1263. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>
- He, W., Miao, F. J.-P., Lin, D. C.-H., Schwandner, R. T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J.-L., Tian, H., & Ling, L. (2004a). Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*, 429(6988), 188–193. <https://doi.org/10.1038/nature02488>
- He, W., Miao, F. J.-P., Lin, D. C.-H., Schwandner, R. T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J.-L., Tian, H., & Ling, L. (2004b). Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature*, 429(6988), 188–193. <https://doi.org/10.1038/nature02488>
- Henstridge, D. C., Bruce, C. R., Pang, C. P., Lancaster, G. I., Allen, T. L., Estevez, E., Gardner, T., Weir, J. M., Meikle, P. J., Lam, K. S. L., Xu, A., Fujii, N., Goodyear, L. J., & Febbraio, M. A. (2012). Skeletal muscle-specific overproduction of constitutively activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) induces insulin resistance in mice. *Diabetologia*, 55(10), 2769–2778. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2652-8>
- Herwig, A., Ross, A. W., Nilaweera, K. N., Morgan, P. J., & Barrett, P. (2008). Hypothalamic Thyroid Hormone in Energy Balance Regulation. *Obesity Facts*, 1(2), 71–79. <https://doi.org/10.1159/000123428>
- Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2012). Energy Balance and Obesity. *Circulation*, 126(1), 126–132. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>
- Himms-Hagen, J. (1989). Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(4), 394–401. <https://doi.org/10.1139/y89-063>
- Hinnouho, G.-M., Czernichow, S., Dugravot, A., Batty, G. D., Kivimaki, M., & Singh-Manoux, A. (2013). Metabolically Healthy Obesity and Risk of Mortality. *Diabetes Care*, 36(8), 2294–2300. <https://doi.org/10.2337/dc12-1654>
- Hochachka, P. W., & Dressendorfer, R. H. (1976). Succinate accumulation in man during exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 35(4), 235–242. <https://doi.org/10.1007/BF00423282>
- Hollenberg, A. N., & Forrest, D. (2008). The Thyroid and Metabolism: The Action Continues. *Cell Metabolism*, 8(1), 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.008>
- Hollos, P., Marchisella, F., & Coffey, E. T. (2018). JNK Regulation of Depression and Anxiety. *Brain Plasticity*, 3(2), 145–155. <https://doi.org/10.3233/BPL-170062>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Hu, C., Hoene, M., Plomgaard, P., Hansen, J. S., Zhao, X., Li, J., Wang, X., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Häring, H. U., Lehmann, R., Xu, G., & Weigert, C. (2020). Muscle-Liver Substrate Fluxes in Exercising Humans and Potential Effects on Hepatic Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(4), 1196–1209. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz266>
- Huffman, K. M., Koves, T. R., Hubal, M. J., Abouassi, H., Beri, N., Bateman, L. A., Stevens, R. D., Ilkayeva, O. R., Hoffman, E. P., Muoio, D. M., & Kraus, W. E. (2014). Metabolite signatures of exercise training in human skeletal muscle relate to mitochondrial remodelling and cardiometabolic fitness. *Diabetologia*, 57(11), 2282–2295. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3343-4>
- Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E., & Wagner, E. F. (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3943–3953. <https://doi.org/10.1172/JCI37156>

- Ibrahim, S. H., Gores, G. J., Hirsova, P., Kirby, M., Miles, L., Jaeschke, A., & Kohli, R. (2014). Mixed lineage kinase 3 deficient mice are protected against the high fat high carbohydrate diet-induced steatohepatitis. *Liver International*, 34(3), 427–437. <https://doi.org/10.1111/liv.12353>
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vázquez, M. J., Morgan, D. A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., Díaz-Arteaga, A., Senra, A., Busquets, S., Velásquez, D. A., Al-Massadi, O., Varela, L., Gándara, M., López-Soriano, F., Gallego, R., Seoane, L. M., Argiles, J. M., López, M., Davis, R. J., ... Nogueiras, R. (2013). Central Melanin-Concentrating Hormone Influences Liver and Adipose Metabolism Via Specific Hypothalamic Nuclei and Efferent Autonomic/JNK1 Pathways. *Gastroenterology*, 144(3), 636–649.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.051>
- Iqbal, J., & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1183–E1194. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90899.2008>
- Islam, Md. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Ives, S. J., Zaleski, K. S., Slocum, C., Escudero, D., Sheridan, C., Legesse, S., Vidal, K., Lagalwar, S., & Reynolds, T. H. (2020). The effect of succinic acid on the metabolic profile in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Physiological Reports*, 8(21). <https://doi.org/10.14814/phy2.14630>
- Iwao, S., Iwao, N., Muller, D. C., Elahi, D., Shimokata, H., & Andres, R. (2001). Does Waist Circumference Add to the Predictive Power of the Body Mass Index for Coronary Risk? *Obesity Research*, 9(11), 685–695. <https://doi.org/10.1038/oby.2001.93>
- Jaeschke, A., Rincón, M., Doran, B., Reilly, J., Neuberger, D., Greiner, D. L., Shultz, L. D., Rossini, A. A., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2005). Disruption of the *Jnk2 (Mapk9)* gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(19), 6931–6935. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502143102>
- 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>
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
- 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>
- Kim, B. (2008). Thyroid Hormone as a Determinant of Energy Expenditure and the Basal Metabolic Rate. *Thyroid*, 18(2), 141–144. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0266>
- Kim, K. W., Sohn, J.-W., Kohno, D., Xu, Y., Williams, K., & Elmquist, J. K. (2011). 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>
- King, B. M. (2006a). 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, B. M. (2006b). 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>

- 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>
- Komulainen, E., Zdrojewska, J., Freemantle, E., Mohammad, H., Kuleskaya, N., Deshpande, P., Marchisella, F., Mysore, R., Hollos, P., Michelsen, K. A., MÅygard, M., Rauvala, H., James, P., & Coffey, E. T. (2014). JNK1 controls dendritic field size in L2/3 and L5 of the motor cortex, constrains soma size, and influences fine motor coordination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00272>
- Krahn, D. D., Gosnell, B. A., Levine, A. S., & Morley, J. E. (1988). Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Research*, 443(1–2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91598-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91598-3)
- Krzak, G., Willis, C. M., Smith, J. A., Pluchino, S., & Peruzzotti-Jametti, L. (2021). Succinate Receptor 1: An Emerging Regulator of Myeloid Cell Function in Inflammation. *Trends in Immunology*, 42(1), 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.11.004>
- Kuan, C.-Y., Whitmarsh, A. J., Yang, D. D., Liao, G., Schloemer, A. J., Dong, C., Bao, J., Banasiak, K. J., Haddad, G. G., Flavell, R. A., Davis, R. J., & Rakic, P. (2003). A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15184–15189. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336254100>
- Laios, K., Lagiou, E., Konofaou, V., Piagkou, M., & Karamanou, M. (2015). From thyroid cartilage to thyroid gland. *Folia Morphologica*. <https://doi.org/10.5603/FM.a2018.0059>
- Le Thuc, O., Stobbe, K., Cansell, C., Nahon, J.-L., Blondeau, N., & Rovère, C. (2017). Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00197>
- Lei, W., Ren, W., Ohmoto, M., Urban, J. F., Matsumoto, I., Margolskee, R. F., & Jiang, P. (2018). Activation of intestinal tuft cell-expressed *Sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(21), 5552–5557. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720758115>
- 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>
- Leibowitz, G., Khaldi, M. Z., Shauer, A., Parnes, M., Oprescu, A. I., Cerasi, E., Jonas, J.-C., & Kaiser, N. (2005). Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 48(8), 1549–1559. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1811-6>
- Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3441–3446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>
- Li, X., Xie, L., Qu, X., Zhao, B., Fu, W., Wu, B., & Wu, J. (2020). GPR91, a critical signaling mechanism in modulating pathophysiologic processes in chronic illnesses. *The FASEB Journal*, 34(10), 13091–13105. <https://doi.org/10.1096/fj.202001037R>
- Lidell, M. E., Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2014). Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*, 3(1), 63–66. <https://doi.org/10.4161/adip.26896>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>

- Littlewood-Evans, A., Sarret, S., Apfel, V., Loesle, P., Dawson, J., Zhang, J., Muller, A., Tigani, B., Kneuer, R., Patel, S., Valeaux, S., Gommermann, N., Rubic-Schneider, T., Junt, T., & Carballido, J. M. (2016). GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 213(9), 1655–1662. <https://doi.org/10.1084/jem.20160061>
- Liu, K., Lin, L., Li, Q., Xue, Y., Zheng, F., Wang, G., Zheng, C., Du, L., Hu, M., Huang, Y., Shao, C., Kong, X., Melino, G., Shi, Y., & Wang, Y. (2020). Scd1 controls de novo beige fat biogenesis through succinate-dependent regulation of mitochondrial complex II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(5), 2462–2472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914553117>
- Liu, X., Chen, Y., Zhao, L., Tian, Q., deAvila, J. M., Zhu, M.-J., & Du, M. (2022). Dietary succinate supplementation to maternal mice improves fetal brown adipose tissue development and thermogenesis of female offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 100, 108908. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108908>
- Liu, X., Rossmeisl, M., McClaine, J., & Kozak, L. P. (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111(3), 399–407. <https://doi.org/10.1172/JCI15737>
- López, M. (2018a). AMPK Wars: the VMH Strikes Back, Return of the PVH. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 135–137. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.004>
- López, M. (2018b). Hypothalamic AMPK and energy balance. *European Journal of Clinical Investigation*, 48(9). <https://doi.org/10.1111/eci.12996>
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- López, M., Fernández-Real, J. M., & Tomarev, S. I. (2023). Obesity wars: may the smell be with you. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 324(6), E569–E576. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00040.2023>
- López, M., Lelliott, C. J., & Vidal-Puig, A. (2007). Hypothalamic fatty acid metabolism: A housekeeping pathway that regulates food intake. *BioEssays*, 29(3), 248–261. <https://doi.org/10.1002/bies.20539>
- 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., Tena-Sempere, M., & Diéguez, C. (2010). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic–pituitary axes). *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.07.001>
- 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>
- Lückmann, M., Trauelsen, M., Frimurer, T. M., & Schwartz, T. W. (2020). Structural basis for GPCR signaling by small polar versus large lipid metabolites—discovery of non-metabolite ligands. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.005>
- Lynch, J., & Kajon, A. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(04), 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>

- Maggie Armstrong, Edinen Asuka, & Abbey Fingeret. (2023). *Physiology, Thyroid Function*.
- Manieri, E., Herrera-Melle, L., Mora, A., Tomás-Loba, A., Leiva-Vega, L., Fernández, D. I., Rodríguez, E., Morán, L., Hernández-Cosido, L., Torres, J. L., Seoane, L. M., Cubero, F. J., Marcos, M., & Sabio, G. (2019). Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. *Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1108–1119. <https://doi.org/10.1084/jem.20181288>
- Manieri, E., & Sabio, G. (2015). Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(2), R11–R22. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0146>
- Martinez de Mena, R., Scanlan, T. S., & Obregon, M.-J. (2010). The T3 Receptor β 1 Isoform Regulates UCP1 and D2 Deiodinase in Rat Brown Adipocytes. *Endocrinology*, 151(10), 5074–5083. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0533>
- Martínez de Morentin, P. B., Urisarri, A., Couce, M. L., & López, M. (2016). Molecular mechanisms of appetite and obesity: a role for brain AMPK. *Clinical Science*, 130(19), 1697–1709. <https://doi.org/10.1042/CS20160048>
- Martínez de Morentin, P., Martinez-Sanchez, N., Roa, J., Ferno, J., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., & Lopez, M. (2014). Hypothalamic mTOR: The Rookie Energy Sensor. *Current Molecular Medicine*, 14(1), 3–21. <https://doi.org/10.2174/1566524013666131118103706>
- Martínez 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. (2017a). 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>
- 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. (2017b). 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>
- 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. (2017c). 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>
- Mathews, D., & Edwards, D. A. (1977). Involvement of the ventromedial and anterior hypothalamic nuclei in the hormonal induction of receptivity in the female rat. *Physiology & Behavior*, 19(2), 319–326. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90345-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90345-6)

- McClellan, K., Parker, K., & Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(2), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.002>
- McCreath, K. J., Espada, S., Gálvez, B. G., Benito, M., de Molina, A., Sepúlveda, P., & Cervera, A. M. (2015). Targeted Disruption of the *SUCNR1* Metabolic Receptor Leads to Dichotomous Effects on Obesity. *Diabetes*, 64(4), 1154–1167. <https://doi.org/10.2337/db14-0346>
- McGarry, J. D., & Brown, N. F. (1997a). The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. *European Journal of Biochemistry*, 244(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>
- McGarry, J. D., & Brown, N. F. (1997b). The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. *European Journal of Biochemistry*, 244(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>
- Mendis, S., Davis, S., & Norrving, B. (2015). Organizational Update. *Stroke*, 46(5). <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.008097>
- Mills, E. L., Harmon, C., Jedrychowski, M. P., Xiao, H., Garrity, R., Tran, N. V., Bradshaw, G. A., Fu, A., Szpyt, J., Reddy, A., Prendeville, H., Danial, N. N., Gygi, S. P., Lynch, L., & Chouchani, E. T. (2021). UCP1 governs liver extracellular succinate and inflammatory pathogenesis. *Nature Metabolism*, 3(5), 604–617. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00389-5>
- Mills, E. L., Pierce, K. A., Jedrychowski, M. P., Garrity, R., Winther, S., Vidoni, S., Yoneshiro, T., Spinelli, J. B., Lu, G. Z., Kazak, L., Banks, A. S., Haigis, M. C., Kajimura, S., Murphy, M. P., Gygi, S. P., Clish, C. B., & Chouchani, E. T. (2018). Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature*, 560(7716), 102–106. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0353-2>
- Mohammad, H., Marchisella, F., Ortega-Martinez, S., Hollos, P., Eerola, K., Komulainen, E., Kuleshkaya, N., Freemantle, E., Fagerholm, V., Savontous, E., Rauvala, H., Peterson, B. D., van Praag, H., & Coffey, E. T. (2018). JNK1 controls adult hippocampal neurogenesis and imposes cell-autonomous control of anxiety behaviour from the neurogenic niche. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 362–374. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.203>
- Mönnikes, H., Heymann-Mönnikes, I., & Taché, Y. (1992). CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rats. *Brain Research*, 574(1–2), 70–76. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90801-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90801-F)
- 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. *Nature*, 443(7109), 289–295. <https://doi.org/10.1038/nature05026>
- Müller, T. D., Blüher, M., Tschöp, M. H., & DiMarchi, R. D. (2022). Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(3), 201–223. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00337-8>
- Müller, T. D., Finan, B., Bloom, S. R., D'Alessio, D., Drucker, D. J., Flatt, P. R., Fritsche, A., Gribble, F., Grill, H. J., Habener, J. F., Holst, J. J., Langhans, W., Meier, J. J., Nauck, M. A., Perez-Tilve, D., Pocai, A., Reimann, F., Sandoval, D. A., Schwartz, T. W., ... Tschöp, M. H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, 30, 72–130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- 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>
- Murphy, M. P., & O'Neill, L. A. J. (2018). Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell*, 174(4), 780–784. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.030>

- 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>
- 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>
- Nikolic, I., Leiva, M., & Sabio, G. (2020). The role of stress kinases in metabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(12), 697–716. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00418-5>
- Nogueiras, R., & Sabio, G. (2021). Brain JNK and metabolic disease. *Diabetologia*, 64(2), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05327-w>
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y.-K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. *Science*, 278(5335), 135–138. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135>
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, 18(3), 363–374. <https://doi.org/10.1038/nm.2627>
- Pal, M., Febbraio, M. A., & Lancaster, G. I. (2016). The roles of c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *The Journal of Physiology*, 594(2), 267–279. <https://doi.org/10.1113/JP271457>
- Pal, M., Wunderlich, C. M., Spohn, G., Brönneke, H. S., Schmidt-Supprian, M., & Wunderlich, F. T. (2013). Alteration of JNK-1 Signaling in Skeletal Muscle Fails to Affect Glucose Homeostasis and Obesity-Associated Insulin Resistance in Mice. *PLoS ONE*, 8(1), e54247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054247>
- Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2015). The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.029>
- Panuganti, K. K., Nguyen, M., & Kshirsagar, R. K. (2023). Obesity. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459357/>
- Parker, K. L. (2002). Steroidogenic Factor 1: an Essential Mediator of Endocrine Development. *Recent Progress in Hormone Research*, 57(1), 19–36. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.19>
- 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 (PPAR γ) 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>
- Powers, J. B. (1970). Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiology & Behavior*, 5(8), 831–835. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(70\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(70)90167-8)
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., & Clasadonte, J. (2018). The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocrine Reviews*, 39(3), 333–368. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00235>

- Protti, A., Carré, J., Frost, M. T., Taylor, V., Stidwill, R., Rudiger, A., & Singer, M. (2007). Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Critical Care Medicine*, 35(9), 2150–2155. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000281448.00095.4d>
- 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>
- Quiñones, M., Al-Massadi, O., Folgueira, C., Bremser, S., Gallego, R., Torres-Leal, L., Haddad-Tóvolli, R., García-Caceres, C., Hernandez-Bautista, R., Lam, B. Y. H., Beiroa, D., Sanchez-Rebordelo, E., Senra, A., Malagon, J. A., Valerio, P., Fondevila, M. F., Fernø, J., Malagon, M. M., Contreras, R., ... Nogueiras, R. (2018a). p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1. *Nature Communications*, 9(1), 3432. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05711-6>
- Quiñones, M., Al-Massadi, O., Folgueira, C., Bremser, S., Gallego, R., Torres-Leal, L., Haddad-Tóvolli, R., García-Caceres, C., Hernandez-Bautista, R., Lam, B. Y. H., Beiroa, D., Sanchez-Rebordelo, E., Senra, A., Malagon, J. A., Valerio, P., Fondevila, M. F., Fernø, J., Malagon, M. M., Contreras, R., ... Nogueiras, R. (2018b). p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1. *Nature Communications*, 9(1), 3432. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05711-6>
- Ramsay, R. R., Gandour, R. D., & van der Leij, F. R. (2001). Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1), 21–43. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00147-9)
- Ravussin, Y., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2014). A Missing Link in Body Weight Homeostasis: The Catabolic Signal of the Overfed State. *Cell Metabolism*, 20(4), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.002>
- Reddy, A., Bozi, L. H. M., Yaghi, O. K., Mills, E. L., Xiao, H., Nicholson, H. E., Paschini, M., Paulo, J. A., Garrity, R., Laznik-Bogoslavski, D., Ferreira, J. C. B., Carl, C. S., Sjøberg, K. A., Wojtaszewski, J. F. P., Jeppesen, J. F., Kiens, B., Gygi, S. P., Richter, E. A., Mathis, D., & Chouchani, E. T. (2020). pH-Gated Succinate Secretion Regulates Muscle Remodeling in Response to Exercise. *Cell*, 183(1), 62-75.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.039>
- Regard, J. B., Sato, I. T., & Coughlin, S. R. (2008). Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell*, 135(3), 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.040>
- Ribeiro, M. O., Bianco, S. D. C., Kaneshige, M., Schultz, J. J., Cheng, S., Bianco, A. C., & Brent, G. A. (2010). Expression of Uncoupling Protein 1 in Mouse Brown Adipose Tissue Is Thyroid Hormone Receptor- β Isoform Specific and Required for Adaptive Thermogenesis. *Endocrinology*, 151(1), 432–440. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0667>
- Ritchie H, & Roser M. (2017). Obesity. *Our World in Data*.
- Robben, J. H., Fenton, R. A., Vargas, S. L., Schweer, H., Peti-Peterdi, J., Deen, P. M. T., & Milligan, G. (2009). Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney International*, 76(12), 1258–1267. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.360>
- Rother, E., Kuschewski, R., Alcazar, M. A. A., Oberthuer, A., Bae-Gartz, I., Vohlen, C., Roth, B., & Dötsch, J. (2012). Hypothalamic JNK1 and IKK β Activation and Impaired Early Postnatal Glucose Metabolism after Maternal Perinatal High-Fat Feeding. *Endocrinology*, 153(2), 770–781. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1589>

- Rouabhi, M., Guo, D.-F., Morgan, D. A., Zhu, Z., López, M., Zingman, L., Grobe, J. L., & Rahmouni, K. (2021). BBSome ablation in SF1 neurons causes obesity without comorbidities. *Molecular Metabolism*, 48, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101211>
- Rubic, T., Lametschwandtner, G., Jost, S., Hinteregger, S., Kund, J., Carballido-Perrig, N., Schwärzler, C., Junt, T., Voshol, H., Meingassner, J. G., Mao, X., Werner, G., Rot, A., & Carballido, J. M. (2008). Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nature Immunology*, 9(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1038/ni.1657>
- Rutter, J., Winge, D. R., & Schiffman, J. D. (2010). Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, 10(4), 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001>
- Sabadell-Basallote J, Astiarraga B, Castaño C, Ejarque M, Repollés-de-Dalmau M, Quesada I, Blanco J, Nuñez-Roa C, Rodríguez-Peña MM, Martínez L, De Jesus DF, Marroqui L, Bosch R, Montanya E, Sureda FX, Tura A, Mari A, Kulkarni RN, Vendrell J, Fernández-Veledo S. SUCNR1 regulates insulin secretion and glucose elevates the succinate response in people with prediabetes. *J Clin Invest*. 2024 May 7:e173214. doi: 10.1172/JCI173214.
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Ko, H. J., Jung, D. Y., Gray, S., Jun, J. Y., Barrett, T., Mora, A., Kim, J. K., & Davis, R. J. (2009a). Prevention of Steatosis by Hepatic JNK1. *Cell Metabolism*, 10(6), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.007>
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Ko, H. J., Jung, D. Y., Gray, S., Jun, J. Y., Barrett, T., Mora, A., Kim, J. K., & Davis, R. J. (2009b). Prevention of Steatosis by Hepatic JNK1. *Cell Metabolism*, 10(6), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.007>
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., Barrett, T., Kim, J. K., & Davis, R. J. (2008). A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science*, 322(5907), 1539–1543. <https://doi.org/10.1126/science.1160794>
- Sabio, G., & Davis, R. J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.004>
- Sabio, G., & Davis, R. J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in Immunology*, 26(3), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.009>
- Sadagopan Nalini, Wenlin Li, Steven L. Roberds, Terry Major, Gregory M. Preston, Ying Yu, & Michael A. Tones. (2007). Circulating Succinate is Elevated in Rodent Models of Hypertension and Metabolic Disease<subtittle /> *American Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2007.05.010>
- Sakurai, T. (2014). The role of orexin in motivated behaviours. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 719–731. <https://doi.org/10.1038/nrn3837>
- 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, F. W. B., & Griffin, J. L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*, 91(2), 452–468. <https://doi.org/10.1111/brv.12178>
- 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>

- Sapieha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J.-S., Cho, J.-H., Honoré, J.-C., Kermorvant-Duchemin, E., Varma, D. R., Tremblay, S., Leduc, M., Rihakova, L., Hardy, P., Klein, W. H., Mu, X., Mamer, O., Lachapelle, P., Di Polo, A., Beauséjour, C., ... Chemtob, S. (2008). The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature Medicine*, 14(10), 1067–1076. <https://doi.org/10.1038/nm.1873>
- Schriever, S. C., Kabra, D. G., Pfuhmann, K., Baumann, P., Baumgart, E. V., Nagler, J., Seebacher, F., Harrison, L., Irmeler, M., Kullmann, S., Corrêa-da-Silva, F., Giesert, F., Jain, R., Schug, H., Castel, J., Martinez, S., Wu, M., Häring, H.-U., de Angelis, M. H., ... Pfluger, P. T. (2020). Type 2 diabetes risk gene Dusp8 regulates hypothalamic Jnk signaling and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*, 130(11), 6093–6108. <https://doi.org/10.1172/JCI136363>
- 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>
- 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>
- Seki, E., Brenner, D. A., & Karin, M. (2012). A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology*, 143(2), 307–320. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.004>
- Seoane-Collazo, P., Fernø, J., Gonzalez, F., Diéguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & López, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, 50(2), 276–291. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0658-y>
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Liñares-Pose, L., Beiroa, D., Ruíz-Pino, F., López-González, T., Morgan, D. A., Pardavila, J. Á., Sánchez-Tapia, M. J., Martínez-Sánchez, N., Contreras, C., Fidalgo, M., Diéguez, C., Coppari, R., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & López, M. (2018). SF1-Specific AMPK α 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 67(11), 2213–2226. <https://doi.org/10.2337/db17-1538>
- Serena, C., Ceperuelo-Mallafré, V., Keiran, N., Queipo-Ortuño, M. I., Bernal, R., Gomez-Huelgas, R., Urpi-Sarda, M., Sabater, M., Pérez-Brocal, V., Andrés-Lacueva, C., Moya, A., Tinahones, F. J., Fernández-Real, J. M., Vendrell, J., & Fernández-Veledo, S. (2018). Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *The ISME Journal*, 12(7), 1642–1657. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0068-2>
- Setoyama, H., Imaoka, A., Ishikawa, H., & Umesaki, Y. (2003). Prevention of gut inflammation by Bifidobacterium in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with Bacteroides strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes and Infection*, 5(2), 115–122. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00080-1)
- 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>
- Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., & Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *Journal of Lipid Research*, 54(8), 2214–2224. <https://doi.org/10.1194/jlr.M038711>

- Shimogawa, Y., Maekawa, F., & Yamanouchi, K. (2014). Unilateral Lesion Increases Oestrogen Receptor α Expression in the Intact Side of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus in Ovariectomised Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(4), 258–266. <https://doi.org/10.1111/jne.12149>
- 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>
- 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>
- Silva, J. E. (2006). Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, 86(2), 435–464. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2005>
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & R. Bloom, S. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(2), 120–128. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000200002>
- Sjögren, M., Alkemade, A., Mittag, J., Nordström, K., Katz, A., Rozell, B., Westerblad, H., Arner, A., & Vennström, B. (2007). Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *The EMBO Journal*, 26(21), 4535–4545. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601882>
- Starling, S. (2020). Succinate regulates muscle exercise adaptations. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(12), 678–679. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00429-2>
- 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>
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A., & Tepper, R. I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83(7), 1263–1271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90151-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90151-5)
- 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>
- Toma, I., Kang, J. J., Sipos, A., Vargas, S., Bansal, E., Hanner, F., Meer, E., & Peti-Peterdi, J. (2008). Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI33293>

- Tomás-Loba, A., Manieri, E., González-Terán, B., Mora, A., Leiva-Vega, L., Santamans, A. M., Romero-Becerra, R., Rodríguez, E., Pintor-Chocano, A., Feixas, F., López, J. A., Caballero, B., Trakala, M., Blanco, Ó., Torres, J. L., Hernández-Cosido, L., Montalvo-Romeral, V., Matesanz, N., Roche-Molina, M., ... Sabio, G. (2019). p38 γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis. *Nature*, 568(7753), 557–560. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1112-8>
- Townsend, K. L., & Tseng, Y.-H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(4), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.004>
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R., & Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics*, 23(1), 99–103. <https://doi.org/10.1038/12703>
- Tsaousidou, E., Paeger, L., Belgardt, B. F., Pal, M., Wunderlich, C. M., Brönneke, H., Collienne, U., Hampel, B., Wunderlich, F. T., Schmidt-Supprian, M., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2014). Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. *Cell Reports*, 9(4), 1495–1506. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.045>
- 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, A., Pata, M., Milbank, E., López, N., Mandiá, N., Grijota-Martínez, C., Salgado, C., Nogueiras, R., Diéguez, C., Villarroya, F., Fernández-Real, J., Couce, M., López, M. (2021). BMP8 and activated Brown adipose tissue in human newborns. *Nature Communications*, 12, 5274. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25456-z>
- Uyama, N., Geerts, A., & Reynaert, H. (2004). Neural connections between the hypothalamus and the liver. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280A(1), 808–820. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20086>
- van Diepen, J. A., Robben, J. H., Hooiveld, G. J., Carmone, C., Alsady, M., Boutens, L., Bekkenkamp-Grovenstein, M., Hijmans, A., Engelke, U. F. H., Wevers, R. A., Netea, M. G., Tack, C. J., Stienstra, R., & Deen, P. M. T. (2017). SUCNR1-mediated chemotaxis of macrophages aggravates obesity-induced inflammation and diabetes. *Diabetologia*, 60(7), 1304–1313. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4261-z>
- 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>
- Varela, L., Martínez-Sánchez, N., Gallego, R., Vázquez, M. J., Roa, J., Gándara, M., Schoenmakers, E., Nogueiras, R., Chatterjee, K., Tena-Sempere, M., Diéguez, C., & López, M. (2012). Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *The Journal of Pathology*, 227(2), 209–222. <https://doi.org/10.1002/path.3984>
- Vernia, S., Cavanagh-Kyros, J., Garcia-Haro, L., Sabio, G., Barrett, T., Jung, D. Y., Kim, J. K., Xu, J., Shulha, H. P., Garber, M., Gao, G., & Davis, R. J. (2014). The PPAR α -FGF21 Hormone Axis Contributes to Metabolic Regulation by the Hepatic JNK Signaling Pathway. *Cell Metabolism*, 20(3), 512–525. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.010>
- Vernia, S., Edwards, Y. J., Han, M. S., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Kim, J. K., & Davis, R. J. (2016). An alternative splicing program promotes adipose tissue thermogenesis. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17672>

- Vernia, S., Morel, C., Madara, J. C., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Chase, K., Kennedy, N. J., Jung, D. Y., Kim, J. K., Aronin, N., Flavell, R. A., Lowell, B. B., & Davis, R. J. (2016). Excitatory transmission onto AgRP neurons is regulated by cJun NH2-terminal kinase 3 in response to metabolic stress. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.10031>
- Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J., & Giralt, M. (2017). Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 26–35. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.136>
- 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 Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine*, 360(15), 1518–1525. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S.-J., & Liu, H. (2019). Parabacteroides distasonis Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Reports*, 26(1), 222–235.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.028>
- 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>
- Warner, A., & Mittag, J. (2012). Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(1), R29–R35. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0068>
- Werther, G. A., Abate, M., Hogg, A., Cheesman, H., Oldfield, B., Hards, D., Hudson, P., Power, B., Freed, K., & Herington, A. C. (1990). Localization of Insulin-Like Growth Factor-I mRNA in Rat Brain by *in Situ* Hybridization—Relationship to IGF-I Receptors. *Molecular Endocrinology*, 4(5), 773–778. <https://doi.org/10.1210/mend-4-5-773>
- Xu, P., Das, M., Reilly, J., & Davis, R. J. (2011). JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes & Development*, 25(4), 310–322. <https://doi.org/10.1101/gad.1984311>
- Yarza, R., Vela, S., Solas, M., & Ramirez, M. J. (2016). c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine*, 5(9), 1066–1070. <https://doi.org/10.1038/12506>
- Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F. J., Park, S., & Cai, D. (2011). Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation. *PLoS Biology*, 9(7), e1001112. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001112>
- Zhao, G., Hatting, M., Nevzorova, Y. A., Peng, J., Hu, W., Boekschoten, M. V, Roskams, T., Muller, M., Gassler, N., Liedtke, C., Davis, R. J., Cubero, F. J., & Trautwein, C. (2014). Jnk1 in murine hepatic stellate cells is a crucial mediator of liver fibrogenesis. *Gut*, 63(7), 1159–1172. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305507>

AGRADECIMIENTOS



Este manuscrito ten resumida parte da investigación que levei a cabo nestes anos, sen embargo non reflicte o arduo camiño que supón facer unha tese doutoral. A pesares diso, se boto a mente atrás, aínda que houbo intres de moito traballo duro e difíciles; os bos momentos teñen un maior peso e son os que gardarei como lembranzas sempre. Neste percorrido con altibaixos aprendín, vaia se aprendín! A non renderme nunca, a tratar de dar sempre máis do que recibo e a seguir sendo eu en todo momento a pesares das circunstancias.

Quería agradecerlle aos meus directores de tese a oportunidade de traballar nun laboratorio de gran prestixio que me permitiu seguir formándome e facer o que me gusta. Sen embargo, os pilares fundamentais deste camiño foron a miña familia e amigos:

- Comezando polo laboratorio:

A María Silveira, porque sen ela esta aventura non sería o mesmo. A ela débolle todo! Gracias por ensinarme e axudarme sempre que o necesitei, por ser paracaídas e curandeira de feridas, por descubrimme multitude de lugares fermosos, por ser copilota de aventuras e viaxes, pero sobre todo gracias por ser amiga, desas que xa son familia!

A Verónica, a cal moito admiro. Vero é sinónimo de afouteza, de valor, de coraxe. Polas escapadas xuntas, os consellos; por ser compañeira, pero sobre todo por ser amiga, desas de verdade!

A Ánxela, por ser capitana no campo e no laboratorio, sen ela o barco afondaría. A Óscar que é capaz de resolverche calquera dúbida científica. A Amanda polos conselliños de inglés e a confianza depositada en min. A Paola que sempre está disposta a botar unha man. A Vítor, por traer aires de cambio a este laboratorio. A todos gracias por estes anos! A Jane: thank you for all the advice and trust you have placed in me.

A María Luengo e a Antía, gracias pola axuda coas inmunos, polos momentos compartidos fóra do CiMUS e o apoio neste último ano. ¡Non sodes compañeiras, sodes amigas!

As persoas que xa non están no laboratorio e coas que coincidín: Valentina, Sayani e Carlos, gracias pola axuda brindada.

Por último, e por iso non menos importante, xa que ela foi a clave, moitísimas gracias a Eva Rial, por apoiarme e crer en min cando ninguén máis o facía, ensinarme as técnicas fundamentais, por todo iso, estarei eternamente agradecida.

- Seguindo cos POLES:

A Martita, por axudarme coa estatística nos comezos. Non atoparedes a ninguén que saiba máis deste tema ca ela. A Violet, por ser tan boa amiga, gracias por alegrarme os días. A Cris P0L4, a mellor persoa que coñecín na miña vida. Gracias polos consellos científicos e sobre todo persoais. A Sara polas conversas e ánimos cando o necesitei. Gracias a ambas polos cafés compartidos e por esa viaxe a Málaga da que volvíñ recargada de forzas e co corazón cheiño. A Paola P0L4 polas confidencias: Deséxoches o mellor hoxe e sempre, moito ánimo que xa case remataches! A Valentina P0L4: Gracias pola confianza e por contarnos contos; esta nova xeración ven pisando forte, confío en que cando marche a dirección das CiMUS partys quedará en boas mans. A Dani, por ensinarme a facer estereotaxias. E como non, moitas gracias á miña “coach” Bego, por todos os bos consellos que me axudaron un mundo!

- Continúo cos meus amigos

A María Cascallar, que viviu gran parte desta época xunto a min e estivo nas boas e nas malas, apoiándome e coidándome sempre. Nunca esqueceré as nosas charlas terapéuticas no pisiño, os chocolates agasallados en días grises e as empanadas de millo de túa nai. Gracias por estes anos sendo fogar!

A Jeni e a Nico, polos cafés de tertulia e as comidiñas ao aire libre nos comezos desta etapa e por ser “aguantadores” por sempre dende o primeiriño día de Uni.



A Miguel, Ana e Carol, polo plans tan guais que me propoñen e que fan que saia un pouco da rutina: concertos, monólogos, ceniñas... e as rutas de senderismo que a María tanto lle gustan. Non me podo olvidar dos postres que fai Ana, os mellores sen dúbida!

A Nere, por darlle chispa á vida!

A Clara, a cal ten un brillo tan especial que deslumbra alá onde vai. Ela sempre estivo e non me cabe duda de que estaremos sempre unha para a outra. Como ti decías alá polo 2012: Ata velliñas xuntas!

A Anabel, espero que agora que remato esta etapa non haxa excusas para facer esa viaxe xuntas a Exipto que soñamos dende os 7 anos.

A Miriam, a miña primeira amiga, creo que xa éramos amigas antes de que nacéramos. Gracias por ter ese corazón tan enorme que tes.

A Cris, gracias por deixarme formar parte dos seus plans alocados e improvisados, por descubrirme música e sempre contar connigo. Avante e a contracorrente sempre, amiga!

A Helena, por ser fonte de sabiduría e inspiración.

A Andrea, porque dende que nos sentamos xuntas na Uni sabemos que por moita distancia que nos separe, “non atoparei unha amiga igual ca ti”.

A Eva Fernández, por ser compitrueno sempre.

A Águeda por ser conselleira e por darle a vida un toque de humor.

A Aloia, o meu gran descubrimento, gracias por ser tan boa amiga e estar sempre. Qué sorte haberte atopado!

A Lucía, por ser increíble. Tiñamos o soño de crear algo que unificase a xente do CiMUS para coñecernos mellor e axudarnos a seguir co doutoramento, e conseguímolos, xuntas revivimos as CiMUS party máis fortes ca nunca. É a proba que estandoxuntas imos conseguir todo o que nos propoñamos!

A David, por ser o meu mellor amigo aquí dentro. Polas nosas charliñas e polos consellos tan bos que me das e por alegrarte coas cousas que me pasan moito máis ca min.

A Manuel, según el encabezado a lista negra do Cebega e que de tanto que estou aí me hai que por unha cama alí dentro ou un diván de terapia... Gracias por se apoio cando o necesitei.

- Remato coa miña familia

Empezo coa patroa, a miña avoa Angelita por criarme e coidarme. Sei que o segue facendo alí onde esté.

A miña curmán Mirian, por ser o meu exemplo a seguir e ser coma unha irmá para min.

A miña tía María, por preocuparse tanto por min. É a mellor tía do mundo!

A Paula, por ser fonte de inspiración, confianza e exemplo a seguir.

A Arelys e José por tratarme con tanto cariño e facerme sentir a calor da familia.



Ao meu gran amor, José Carlos, síntome moi afortunada de terte ao meu carón e de medrar xuntos. Gracias por ensinarme a por límites na miña vida, contigo non teño medos e síntome capaz de lograr calquera cousa que me propoña. Mírote e penso: Que sorte a miña!

Por último, quería non so agradecer senón adicar esta tese doutoral ás persoas máis importantes na miña vida: os meus pais.

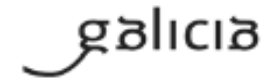
Mamá, papá, son moi afortunada porque sodes os mellores pais que alguén pode ter e desexar. Gracias por criarme nun ambiente cheo de amor, coidarme sempre, porme as cousas moito máis fáciles para que conseguise todo o que me propuxera e sobre todo por creer en min e impulsarme a ser cada día mellor persoa. Quérovos moitísimo!



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Avda. do Camiño Francés, 10, Baixo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Axencia Galega
da Calidade Alimentaria



**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á
CATEGORÍA "B" EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "B"

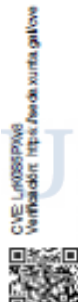
- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "B"

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*



Xacobeo 2021

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

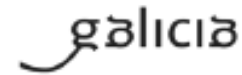
1. IDENTIFICACIÓN		
1.1 Apellidos / Apellidos / Surnames FERNÁNDEZ GONZÁLEZ		
1.2 Nome / Nombre / First names IARA		DNI, DNI / Identity card number 44662411E
1.3. Categoría/Category/Category: "b"	1.4. Especies/Especies/Species: ROEDORES	1.5. Válido ata/ válido hasta/expires: 17/07/2028
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
B468		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1 Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate: CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 Baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2 Teléfono / Teléfono / Telephone: 981 546 654	3.3 Fax / Fax / Fax: 981 546 651	3.4 Correo electrónico / Correo electrónico / Email: formacion.cmrn@xunta.es
3.5 Data / Fecha / Date: 18/12/2020	3.6 Lugar / Lugar / Place: Santiago de Compostela	
3.7 Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8 Selo / Sello / Stamp Asdo.: Manuel López Luaces Xefe de Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria (asinado dixitalmente)		



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Avda. do Camillo Franes, 10, Bebo
15703 Santiago de Compostela
A Coruña

AGACAL
Axencia Galega
da Calidade Alimentaria



MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA “C” REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO

MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA “C”

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedementos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirurxía (5 horas)*

MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimento y la angustia (3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA “C”

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados (8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*



Xacobeo 2021

Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.

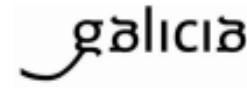
Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.

1. IDENTIFICACIÓN		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname FERNÁNDEZ GONZÁLEZ		
1.2. Nome / Nombre / First names IARA		DNI / DNI / Identity card number 44662411E
1.3. Categoría / Categoría / Category "C"	1.4. Especies / Especies / Species ROEDORES	1.5. Válido ata / válido hasta / expires 17/07/2028
2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER		
C502		
3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone 981 546 654	3.3. Fax / Fax / Fax 981 546 651	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email formacion.cmm@xunta.es
3.5. Data / Fecha / Date 18/12/2020	3.6. Lugar / Lugar / Place Santiago de Compostela	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature Asdo.: Manuel López Luaces Xefe de Área de Formación, Innovación e Investigación Agraria (asinado dixitalmente)		



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Xefatura Territorial
Sª 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



RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

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

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

ANTECEDENTES

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

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

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

Persoa responsable do proxecto: Miguel Anotnio López Pérez

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

Clasificación do proxecto : Tipo I ☐ Tipo II ☐ Tipo III ☒

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

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

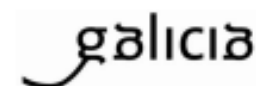
2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.



Xacobeo 2021



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.

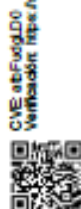
A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

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.

Afirmado por: LOPEZ LOPEZ, MONICA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 06/11/2020 16:07:08



Xacobeo 2021



En esta tesis doctoral se ha estudiado el impacto de JNK1 y SUCNR1 en el hipotálamo, en concreto en las neuronas SF1 del núcleo ventromedial (VMH). Se generaron dos ratones *knockout*: $SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}$ y $SUCNR1SF1KO$. Los ratones $SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}$ mostraron reducción del peso corporal, mejor tolerancia a la glucosa y menos lípidos hepáticos. La administración central de T3 indujo pérdida de peso en ratones salvajes y $SF1^{Cre}/JNK1^{fl/fl}$, sin acumulación de lípidos hepáticos en estos últimos. Por otro lado, en los animales $SUCNR1SF1KO$ y en las aproximaciones virogenéticas para “*knockear*” el receptor SUCNR1, se observó un aumento del peso corporal y una reducción de la termogénesis del BAT. En resumen, estos hallazgos revelan el papel fisiológico crucial de JNK1 y SUCNR1 en el VMH para la regulación del balance energético.