



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**NUEVOS MECANISMOS DE
REGULACIÓN DEL BALANCE
ENERGÉTICO. PAPEL DE AMPK
Y DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO
HIPOTALÁMICO**

Patricia Seoane Collazo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2018





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL BALANCE
ENERGÉTICO. PAPEL DE AMPK Y DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO HIPOTALÁMICO

D./Dña. Patricia Seoane Collazo

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

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

En Santiago de Compostela, ... de de 2018.

Fdo. Patricia Seoane Collazo





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL BALANCE
ENERGÉTICO. PAPEL DE AMPK Y DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO HIPOTALÁMICO

D. Miguel Antonio López Pérez
D. Carlos Diéguez González

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Patricia Seoane Collazo**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, ... de de 2018



Resumo

AMPK é un sensor celular que se activa en estado de baixa enerxía, aumentando a produción e inhibindo o consumo da mesma. As evidencias actuais vinculan á AMPK hipotalámica coa regulación central do balance enerxético. Sen embargo, cal é a isoforma de AMPK e o tipo neuronal que media estes efectos aínda non se dilucidou. Nesta Tesis demostramos que a inhibición xenética de AMPK no VMH protexe fronte a obesidade inducida por dieta ó diminuír o ER estrés no hipotálamo e ó aumentar a termoxénese do BAT e, posteriormente, o gasto de enerxía. Este efecto depende da isoforma AMPK α 1 nas neuronas SF1 do VMH, xa que os ratos con ablación selectiva SF1 Cre AMPK α 1 mostran resistencia á obesidade inducida pola dieta, diminución do ER estrés e da inflamación no VMH asociadas a un aumento da termoxénese no BAT e do *browning* do WAT. Do mesmo xeito, tamén presentan unha homeostase lipídica e glicídica mellorada. Estes datos suxeren que a modulación de AMPK en tipos neuronais específicos podería ser unha diana terapéutica adecuada para combater a obesidade e as complicacións metabólicas relacionadas. **Palabras clave:** AMPK, hipotálamo, ER estrés, inflamación, BAT.

Resumen

AMPK es un sensor celular que se activa en estado de baja energía, aumentando la producción e inhibiendo el consumo de la misma. Las evidencias actuales vinculan la AMPK hipotalámica con la regulación central del balance energético. Sin embargo, cual es la isoforma de AMPK y el tipo neuronal que está mediando estos efectos todavía no se ha dilucidado. En esta Tesis, demostramos que la inhibición genética de AMPK en el VMH protege contra la obesidad inducida por dieta al disminuir el ER estrés en el hipotálamo y al aumentar la termogénesis del BAT y, posteriormente, el gasto de energía. Este efecto depende de la isoforma AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH, ya que los ratones con ablación selectiva SF1 Cre AMPK α 1 muestran resistencia a la obesidad inducida por dieta, disminución del ER estrés e inflamación en el VMH asociados a un aumento de la termogénesis en el BAT y *browning* del WAT. Asimismo, también presentan una homeostasis lipídica y glucídica mejorada. Estos datos sugieren que la modulación de AMPK en tipos neuronales específicos podría ser una diana terapéutica adecuada para combatir la obesidad y las complicaciones metabólicas relacionadas. **Palabras clave:** AMPK, hipotálamo, ER estrés, inflamación, BAT.

Abstract

AMPK is a cellular gauge that is activated under conditions of low energy, increasing energy production and reducing energy waste. Current evidence links hypothalamic AMPK with the central regulation of energy balance. However, it is unclear which AMPK isoform and which types of neurons are mediating those effects. Here, we show that genetic inhibition of AMPK in the VMH protects against diet-induced obesity by reducing ER stress in the hypothalamus and increasing BAT thermogenesis and subsequently energy expenditure. This effect depends upon the AMPK α 1 isoform in SF1 neurons of the VMH, since mice bearing selective ablation SF1 Cre AMPK α 1 display resistance to diet-induced obesity, decreased ER stress and inflammation in the hypothalamus, associated with increased BAT thermogenesis and browning of WAT, as well as improved glucose and lipid homeostasis. This evidence suggests that the modulation of AMPK in specific neurons may be a suitable target to combat obesity and related metabolic complications. **Keywords:** AMPK, hypothalamus, ER stress, inflammation, BAT.



ÍNDICE





ÍNDICE.....	9
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	15
INTRODUCCIÓN	23
1 Obesidad y homeostasis energética.....	25
1.1 Obesidad.....	25
1.2 Homeostasis energética	25
1.2.1 Señales gastrointestinales	27
1.2.2 Señales pancreáticas.....	28
1.2.3 Señales del tejido adiposo	29
2 Gasto energético y termogénesis	30
3 Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética	33
3.1 Núcleo arcuato	33
3.2 Núcleo ventromedial	35
3.3 Núcleo dorsomedial.....	38
3.4 Núcleo paraventricular.....	38
3.5 Área lateral hipotalámica	39
4 Papel de las neuronas SF1 en la regulación homeostática.....	40
4.1 Las neuronas SF1 en la regulación de la homeostasis energética	40
4.2 Las neuronas SF1 en la regulación del metabolismo de la glucosa.....	41
5 Estrés del retículo endoplasmático e inflamación hipotalámica	43
5.1 ER estrés.....	43
5.2 Inflamación hipotalámica.....	45
5.3 Autofagia hipotalámica.....	46
6 AMPK como sensor energético	47
6.1 Regulación de AMPK.....	48
6.2 AMPK en el hipotálamo	50
6.3 AMPK y gasto energético	51
6.4 AMPK y homeostasis de la glucosa.....	52
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
7 Modelos animales y cuidados.....	61
7.1 Consideraciones legales y éticas.....	61
7.2 Modelos animales	61
8 Anestesia y analgesia	62
9 Vías de administración de sustancias	63
9.1 Vía intraperitoneal (IP)	63

9.2	Vía subcutánea (SC)	63
9.3	Vía núcleo-específica	63
10	Procedimientos no quirúrgicos	64
10.1	Generación de ratones knock-out condicionales SF1 AMPK α 1	64
10.2	Monitorización de la ingesta y de la masa corporal	64
10.3	Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora	65
10.4	Determinación de la composición corporal	65
10.5	Medición de la temperatura corporal	65
10.6	Medición de la temperatura del BAT	65
10.7	Test de disipación de temperatura	65
10.8	Test de tolerancia al frío	66
10.9	Test de tolerancia a glucosa e insulina	66
10.10	PET-CT	66
11	Procedimientos quirúrgicos	67
11.1	Estereotaxia núcleo-específica	67
11.2	Registro de la actividad simpática	68
11.3	Disección y extracción de tejidos	68
12	Diseños experimentales	69
12.1	Inoculación de adenovirus AMPK α 1 α 2-DN en ratas alimentadas con HFD	69
12.2	Inoculación de adenovirus AMPK α 1-DN o AMPK α 2-DN y SR59230A SC	69
12.3	Inoculación de adenovirus AMPK α 1-DN en ratas alimentadas con HFD	70
12.4	Inoculación de adenovirus AMPK α 1-CA en ratones SF1 Cre AMPK α 1 ^{flox/flox}	71
13	Técnicas analíticas	71
13.1	Análisis de proteínas por western blot	71
13.2	PCR para genotipado	77
13.3	Análisis de RNA mensajero por PCR en tiempo real	80
13.4	Inmunohistoquímica	83
13.5	Hibridación <i>in situ</i>	83
13.6	Doble hibridación <i>in situ</i> /inmunohistoquímica	84
13.7	Histología	85
13.8	Análisis de metabolitos	85
13.9	Análisis de niveles hormonales	86
14	Estadística	86
14.1	Test paramétricos	87
14.1.1	ANOVA de una vía	87
14.1.2	T-test	87
14.2	Test no paramétricos	87

14.2.1	Test Kruskal-Wallis	88
14.2.2	Test Mann-Whitney	88
	RESULTADOS	91
1.	La inhibición de AMPK α en el VMH revierte la obesidad inducida por dieta	93
2.	La inhibición específica de la isoforma AMPK α 1 en el VMH regula el gasto energético.	95
3.	La inhibición específica de la isoforma AMPK α 1 en el VMH revierte la obesidad inducida por dieta.....	97
4.	Caracterización de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH.....	98
5.	La eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH disminuye el peso corporal y aumenta el gasto energético	101
6.	La eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH incrementa el <i>browning</i> del WAT	109
7.	La sobreexpresión de AMPK α 1 revierte el balance energético en los ratones SF1 AMPK α 1 ^{flox/flox}	109
8.	La eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 modula el metabolismo lipídico hepático	110
9.	Los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH son resistentes a la obesidad inducida por dieta	111
10.	La eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH reduce el ER estrés y la inflamación hipotalámica en ratones obesos	113
11.	Los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH muestran una mejora en la homeostasis de la glucosa.....	116
	DISCUSIÓN.....	121
	CONCLUSIONES.....	129
	BIBLIOGRAFÍA.....	133
	ANEXO 1	167



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC: adenilato ciclasa, *adenylate cyclase*.

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

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

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

AP: área postrema, *area postrema*.

AP1: proteína activadora 1, *activator protein 1*.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

ASP: proteína estimulante de la acilación, *acylation stimulating protein*.

ATF4: factor de transcripción activador 4, *activating Transcription Factor 4*.

ATF6: factor de transcripción activador 6, *activating transcription factor 6*.

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

BBB: barrera hematoencefálica, *blood brain barrier*.

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

BMI: índice de masa corporal, *body mass index*.

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

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

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

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

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

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

Cbln1: cerebelin 1, *cerebellin 1*.

CHOP: proteína homóloga C / EBP, *homologous protein C / EBP*.

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

CKK: colecistoquinina, *cholecystokinin*.

CKO: *knockout* condicional, *conditional knockout*.

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

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

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

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

E2: estradiol, *estradiol*.

EE: gasto energético, *energy expenditure*.

eIF2a: factor de iniciación de traducción eucariota 2a, *eukaryotic translation initiation factor 2a*.

ER: retículo endoplasmático, *endoplasmic reticulum*.

ER α : receptor de estrógenos alfa, *estrogen receptor alpha*.

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

FOXO1: *Forkhead box protein O1*.

GALP: péptido similar a la galanina, *galanin-like peptide*.

GCK: proteína glucoquinasa, *glucokinase*.

GE: excitadas por glucosa, *glucose-excited*.

GHS: receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento, *growth hormone secretagogue receptor*.

GI: inhibidas por glucosa, *glucose-inhibited*.

GIP: péptido inhibitor gástrico, *gastric inhibitory peptide*.

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

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

GRP78/BiP: proteína chaperona regulada por glucosa 78/proteína de unión a inmunoglobulina, *chaperone glucose regulated protein 78/binding immunoglobulin protein*.

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

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

ICH: inmunohistoquímica, *immunohistochemistry*.

IKK: inhibidor de factor nuclear kB, *I κ B kinase*.

IL1 β : interleucina 1 β , *interleukine 1 β* .

IL6: interleucina 6, *interleukine 6*.

IO: oliva inferior, *inferior olive*.

IR: receptor de insulina, *insulin receptor*.

IRE1: proteína requerida de inositol 1, *inositol - requiring enzyme-1*.

ISH: hibridación *in situ*, *in situ hybridization*.

JNK: quinasa c-Jun N-terminal, *c-Jun N-terminal kinase*.

KSR2: quinasa supresora de Ras, *kinase suppressor of Ras*.

- LA: actividad locomotora, *locomotor activity*.
- LCFA-CoA: ácidos grasos de cadena larga-CoA, *long chain fatty acids-CoA*.
- LEPR: receptor de leptina, *leptin receptors*.
- LHA: área lateral hipotalámica, *lateral hypothalamic area*.
- LKB1: quinasa hepática B1, *liver kinase B1*.
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38, *mitogen-activated protein kinase*.
- MC3R y MC4R: receptores de melanocortinas 3 y 4, *melanocortin receptors 3 and 4*.
- MCD: malonil-CoA descarboxilasa, *malonyl-CoA decarboxylase*.
- MCH: hormona concentradora de melanina, *melanin-concentrating hormone*.
- ME: eminencia media, *median eminence*.
- MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.
- mRNA: RNA mensajero, *messenger RNA*.
- α -MSH: hormona estimuladora de melanocitos alfa, *alpha melanocyte stimulating hormone*.
- mTOR: diana de rapamicina de mamífero, *mammalian target of rapamycin*.
- Myf5: factor miogénico 5, *myogenic factor 5*.
- NEFA: ácidos grasos libres no-esterificados, *nonesterified free fatty acids*.
- NF- κ B: factor nuclear kappa B, *nuclear factor kappa B*.
- NMR: resonancia magnética nuclear, *nuclear magnetic resonance*.
- NPY: neuropeptido Y, *neuropeptide Y*.
- NPYR1-5: receptores de neuropeptido Y 1-5, *neuropeptide Y receptors 1-5*.
- Nr5a1: receptor nuclear subfamilia5, grupo A, miembro 1 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*).
- NTS: núcleo del tracto solitario, *nucleus of solitary tract*.
- OMS: organización mundial de la salud.
- OX: orexina, *orexin*.
- OX1R y OX2R: receptores de orexina 1 y 2, *orexin receptor 1 and 2*.
- PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*.
- PAI-1; inhibidor del activador del plasminógeno 1, *plasminogen activator inhibitor-1*.
- PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*.
- PERK: quinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplasmático iniciador de la traducción eucariota, *protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*.

PET-CT: tomografía por emisión de positrones-tomografía computada, *positron emission tomography-computed tomography*.

PFA: área perifornical, *perifornical area*.

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

PGC1 β : proteína 1 beta coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta*.

PGE2: prostaglandina E2, *prostaglandin E2*.

PI3K: fosfatidilinositol-3-kinasa, *phosphatidyl inositol 3-kinase*.

PKA: protein kinasa A, *protein kinase A*.

POMC: proopiomelanocortina, *proopiomelanocortin*.

PP: polipéptido pancreático, *pancreatic polipeptide*.

PP2C α : proteína fosfatasa 2C α , *protein phosphatase 2C alpha*.

PR: receptor de progesterona, *progesterone receptor*.

PTP1B: protein kinasa fosfatasa 1B, *protein tyrosine phosphatase 1B*.

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

PYY: péptido YY3-36, *Peptide YY (PYY)₃₋₃₆*.

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

RPa: rafe pálido, *raphe pallidus*.

RQ: coeficiente respiratorio, *respiratory quotient*.

SD: dieta estándar, *standard diet*.

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

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

SNS: sistema nervioso simpático, *sympathetic nervous system*.

SIRT1: sirtuina 1, *sirtuin 1*.

SOCS3: supresor de la señalización por citoquinas 3, *suppressor of cytokine signaling-3*.

STAT3: transductor de señal y el activador de la transcripción 3, *signal transducer and activator of transcription 3*.

SUV: valores de absorción estandarizados, *standardized uptake values*.

T3: triyodotironina, *triiodothyronine*.

TAG: triacilglicerol, *triacilglycerol*.

TAK1: kinasa 1 activada por TGF- β , *TGF- β -activated kinasa 1*.

TH: hormona tiroidea, *thyroid hormone*.

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

TRH: hormona liberadora de tirotrópina, *tyrotrophin-releasing hormone*.

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

ULK1: quinasa activadora de autofagia tipo Unc-51, *Unc-51 like autophagy activating kinase*.

UPR: respuesta de proteínas mal plegadas, *unfolded protein response*.

VGLUT2: transportador de glutamato vesicular 2, *vesicular glutamate transporter 2*.

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

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

XBP1: proteína de unión X-box-1, *X-box binding protein 1*.

ANGLICISMOS

Browning: amarronamiento

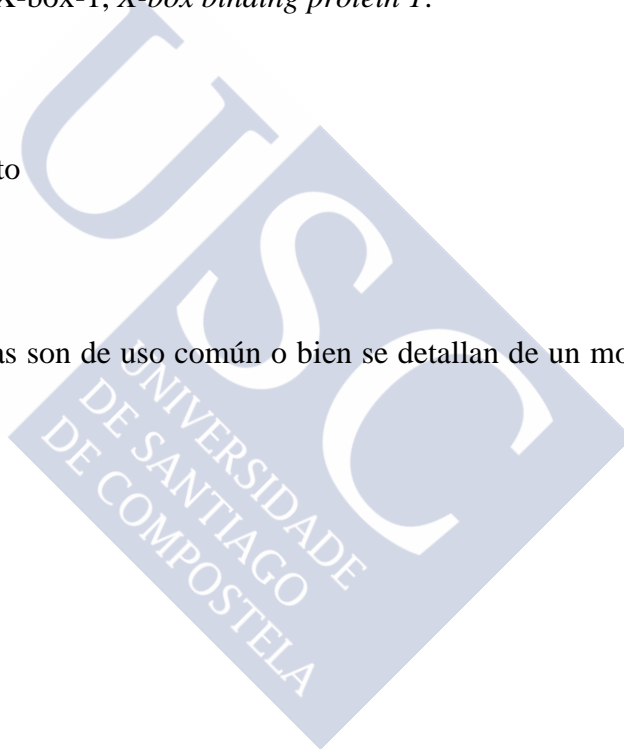
Downstream: más abajo

Knockout

Upstream: más arriba

Wildtype

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





INTRODUCCIÓN





1 OBESIDAD Y HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

1.1 OBESIDAD

La Organización Mundial para la Salud (OMS) define la obesidad y el sobrepeso como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Generalmente, se utiliza el índice de masa corporal (BMI, *body mass index*) como un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Este se calcula dividiendo la masa de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Un BMI igual o superior a 25 se considera sobrepeso, mientras que se considera obesidad si el BMI es igual o superior a 30. La obesidad se asocia con un grupo de desórdenes metabólicos como son la hipertensión, dislipidemia, hipertriacilgliceridemia, resistencia a insulina, inflamación, entre otros. Cuando se combinan varios de estos factores este conjunto de alteraciones se denomina síndrome metabólico y es considerado un factor de riesgo para desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares. El aporte constante de comida con un alto contenido energético y un tipo de vida cada vez más sedentario ha dado lugar a un aumento de la incidencia de la obesidad en un gran segmento de la población, independientemente de la renta per capita de los países o su nivel de desarrollo¹. Actualmente, se considera que la obesidad ha alcanzado proporciones pandémicas a nivel mundial. En 2016, más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, más de 650 millones eran obesos y cada año mueren al menos 2,8 millones de personas al año debido al sobrepeso o la obesidad. Según la OMS desde 1976 a 2016 casi se ha triplicado la prevalencia de la obesidad. Asimismo, la obesidad infantil se ha convertido en un grave problema de salud pública. Los niños con sobrepeso tienen más probabilidades de convertirse en adultos obesos, de sufrir diabetes a edades tempranas y enfermedades cardiovasculares, que se asocian a un aumento en la probabilidad de muerte prematura y discapacidad. La mayor parte de los problemas de salud asociados a la obesidad son debidos a un exceso de acumulación de grasa en el tejido adiposo y en otros tejidos u órganos^{2, 2-6}. Debido a las grandes complicaciones asociadas a la obesidad, como la resistencia a insulina, la diabetes tipo II, la enfermedad del hígado graso, eventos cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, el gasto sanitario debido a la obesidad representa una gran carga presupuestaria en los países desarrollados. Debido a esto, se está dirigiendo un gran esfuerzo a la identificación de los mecanismos moleculares básicos que controlan la homeostasis energética.

1.2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La regulación y el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo son esenciales para la supervivencia. El balance energético puede ser influenciado por diversos factores, entre ellos genéticos, hormonales y nutricionales, así como por variables ambientales y psicosociales del entorno. La variación en la masa corporal es resultado de una alteración en el balance entre la ingesta y el gasto energético. Cuando el balance sea negativo, va a provocar delgadez; mientras que si es positivo derivará en sobrepeso u obesidad. Así, la obesidad se manifiesta cuando el número de calorías ingeridas es superior, de manera continuada, al número de calorías consumidas (Imagen 1). Los individuos con una masa corporal equilibrada están protegidos contra un incremento o una disminución desmesurada

de sus depósitos de grasa debido a cambios compensatorios del gasto energético ⁷⁻⁹. De esta forma, un aumento de la ingesta asociado a un aumento de masa corporal, está asociado a su vez a un aumento en el gasto energético. En concordancia, una reducción de la ingesta asociada a una disminución de peso promoverá un menor gasto energético ⁸.

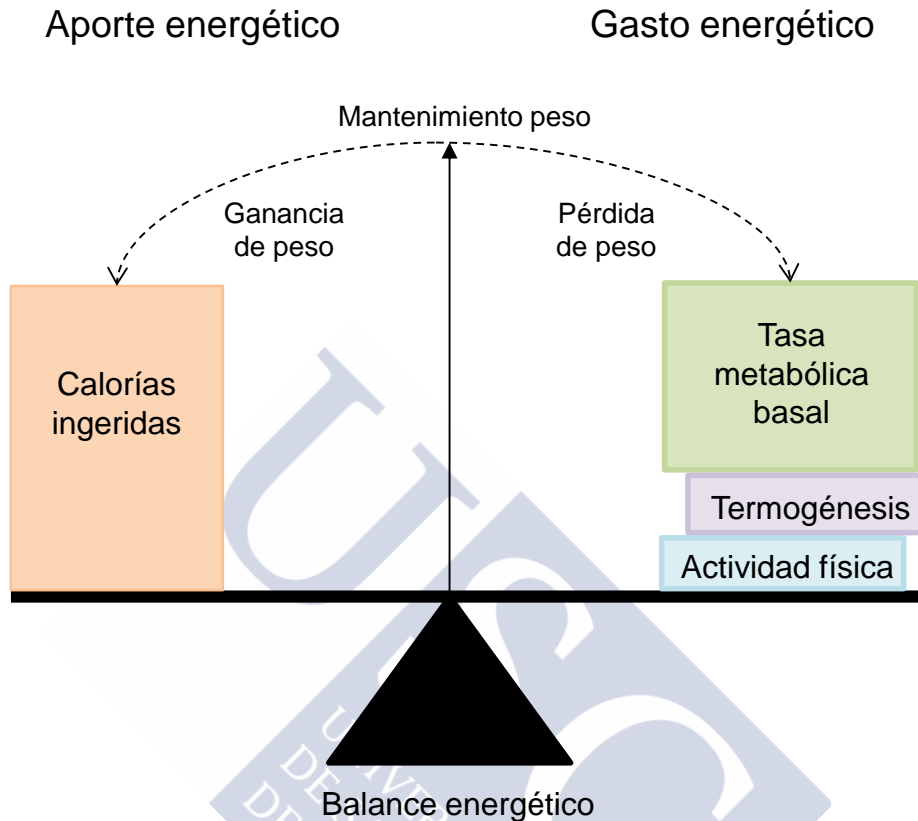


Imagen 1. Componentes del balance energético.

La ingesta es una conducta compleja que implica tanto al instinto de supervivencia como a mecanismos de recompensa. Así, áreas primarias como el hipotálamo o centros del troncoencéfalo están implicados en el control de la ingesta; pero también otras áreas superiores van a influenciar nuestra alimentación diaria, estimuladas por el sabor, el olor y la apariencia de la comida. Además, ciertos componentes psicológicos pueden promover la ingesta, en parte debido a proyecciones desde el córtex ¹⁰.

El hipotálamo es una región capaz de regular el balance energético gracias a su capacidad de responder a señales centrales, endocrinas y metabólicas; integrando estas y generando una respuesta conductual, autónoma y/o endocrina ¹¹⁻¹³.

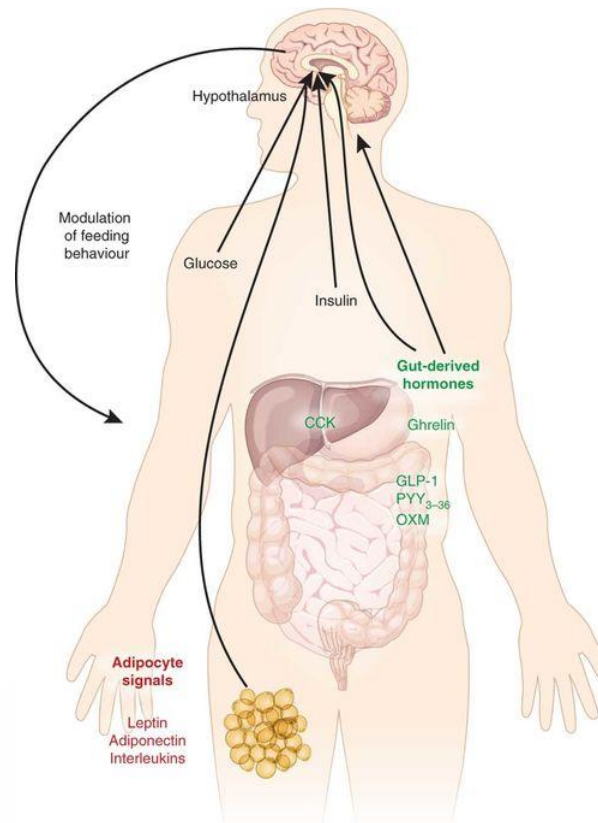


Imagen 2. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal y el tejido adiposo ¹³. Imagen reproducida con permiso de Springer Nature.

De esta forma, el hipotálamo modula tanto la ingesta como el gasto de energía, así como la utilización y particionamiento de nutrientes, el metabolismo lipídico periférico y la regulación del homeostasis de la glucosa ¹⁴. En respuesta a la entrada de alimento se originan señales de saciedad a nivel gastrointestinal, como la colecistoquinina (CKK, *cholescistokinin*), el péptido YY3-36 (PYY, *Peptide YY (PYY)₃₋₃₆*) o el péptido análogo de glucagón 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) ¹⁵ u otras señales periféricas procedentes del tejido adiposo o el estómago, que son capaces de llegar al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*), como son la hormona anorexigénica leptina ^{16, 17}, la insulina producida por las células β pancreáticas o el péptido orexigénico ghrelin ^{15, 18-20} (Imagen 2).

1.2.1 Señales gastrointestinales

El tracto gastrointestinal juega un papel crucial en la regulación de la ingesta de alimentos, informando al sistema nervioso central (CNS, *central nervous system*) sobre la cantidad de alimento ingerido y la composición nutricional del mismo. El CNS recibe señales del tracto intestinal través de innervación sensorial y de la circulación. Las señales nerviosas son transmitidas a través del nervio vago y convergen en el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus of the solitary tract*). Las proyecciones desde el NTS inervan diversas áreas de CNS, como son el hipotálamo, los núcleos centrales de la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal ²¹. El tracto gastrointestinal también secreta hormonas que controlan la ingesta. Estos péptidos pueden activar el NTS o incluso actuar directamente sobre regiones como el área postrema (AP, *area postrema*), localizada en el techo del cuarto ventrículo. Las neuronas de estas regiones responden directamente a las hormonas gastrointestinales circulantes y envían

señales a circuitos neuronales del troncoencéfalo y del cerebro anterior²¹. En los últimos años se han identificado numerosas hormonas peptídicas procedentes del tracto gastrointestinal, con una gran capacidad de regular la ingesta. Excepto ghrelin, que es la única hormona gastrointestinal que es orexigénica, todas las demás hormonas identificadas son anorexigénicas. Entre ellas se encuentran el péptido YY3-36, CKK, GLP-1, péptido inhibidor gástrico (GIP, *gastric inhibitory peptide*), péptido liberador gástrico (GRP, *gastrin-realising peptide*), oxintomodulina y la enterostatina, entre otras²²⁻²³.

Ghrelin

Ghrelin es un polipéptido secretado principalmente por el estómago que actúa como un ligando endógeno natural del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS, *growth hormone secretagogue receptor*)²⁴⁻²⁶. Ghrelin puede ser secretado también en menor proporción por otros tejidos y órganos como son el tejido intestinal, el páncreas endocrino, el hígado, las gónadas, la placenta, la hipófisis y el hipotálamo²⁷. Los niveles de ghrelin aumentan antes de las comidas y su función es clave para inducir la ingesta durante el ayuno. Después de comer sus niveles se reducen en proporción a las calorías ingeridas^{26, 28, 29}. Su expresión y secreción también aumenta en un estado hipoglucémico producido por la insulina y cuando se produce una pérdida de peso^{28, 30}. De este modo, los niveles circulantes de ghrelin correlacionan inversamente con el peso corporal en humanos. Aunque los niveles plasmáticos de ghrelin se encuentran reducidos en personas obesas, otras hormonas gastrointestinales pueden contribuir al mantenimiento de la obesidad, como el péptido YY3-36 o el polipéptido pancreático (PP, *pancreatic polipeptide*)¹⁷. Por el contrario, en individuos que padecen anorexia nerviosa o que están sometidos a restricción calórica los niveles de esta hormona se encuentran elevados^{29, 31} aunque hay autores que muestran una disminución en ghrelin acilada y un incremento en ghrelin no-acilada durante el ayuno prolongado³². Estas discrepancias posiblemente están relacionadas con el tipo de inmunoensayos usados en la cuantificación de ghrelin acilada y no acilada. En cualquier caso, el reciente descubrimiento de un antagonista endógeno LEAP2 que se une al receptor de ghrelin, GHSR-1A, obligará a reconsiderar el sistema de ghrelin en su conjunto.

La administración central o periférica de ghrelin estimula la ingesta y el aumento del peso corporal³³, debido a que reduce el gasto energético^{34, 35} y favorece el almacenaje de grasa en el tejido adiposo^{33, 36}. Una vez secretada, ghrelin atraviesa la BBB y activa su receptor hipotalámico GHSR-1A, que se expresa predominantemente en neuronas del núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*) y en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH, *ventromedial nucleus*). Al activarse su receptor se induce la sobreexpresión de péptido relacionado con agutí (AgRP, *agouti-related peptide*) y el neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) en el ARC,^{19, 33, 37, 38}. Ghrelin ejerce sus efectos sobre el tejido adiposo blanco a través de los receptores de melanocortinas del hipotálamo, transmitiendo la señal a la grasa a través del sistema nervioso simpático (SNS, *sympathetic nervous system*)³⁹. Además, ghrelin también ejerce su efecto orexigénico a través de su efecto hormonal en el tronco encéfalo⁴⁰ o a través de señales de nervio vago activadas por la secreción de ghrelin en el estómago⁴¹.

1.2.2 Señales pancreáticas

El páncreas tiene un papel clave en la regulación de la digestión de macronutrientes y en la homeostasis metabólica/energética mediante la liberación de diversas enzimas digestivas y hormonas pancreáticas. Juega un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa secretando distintas hormonas como el glucagón que aumenta los niveles de glucosa en sangre

o la insulina y la amilina que la disminuyen. La somatostatina inhibe tanto la liberación de glucagón como la insulina, mientras que PP regula la actividad de secreción exocrina y endocrina del páncreas ⁴².

La insulina es una hormona producida por los islotes de Lagerhans en las células β del páncreas en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa en sangre. Es la principal hormona encargada de captar la glucosa circulante para los tejidos actuando a través del receptor de insulina tirosin-quinasa (IR, *insuline receptor*), lo que provoca una activación de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K, *phosphatidyl inositol 3-kinase*)/AKT en tejidos periféricos como el músculo esquelético, el tejido adiposo o el hígado ⁴³. Asimismo favorece la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas; además de inhibir la degradación y liberación de ácidos grasos y glucosa al torrente sanguíneo, favoreciendo, por lo tanto, el almacenamiento energético en tejidos periféricos ^{43,44}. La insulina puede también estar vinculada a las reservas de grasa en el cuerpo, al igual que sucede con otras hormonas como la leptina ^{45,46}.

La insulina circulante atraviesa la BBB en proporción a su concentración plasmática por un mecanismo de transporte saturable mediado por un transportador ^{47,48}. El IR está distribuido de forma dispersa por todo el cerebro, pero presenta altas concentraciones en determinadas zonas, entre ellas el hipotálamo ^{49,50}. Las neuronas de proopiomelanocortina (POMC, *proopiomelanocortin*) y AgRP en el ARC, son dianas clave de la señalización por insulina ⁵¹. En estas neuronas la insulina disminuye la producción y expresión de NPY, favoreciendo la de POMC; y por tanto activa la ruta de las melanocortinas produciendo una reducción de la ingesta ⁵²⁻⁵⁴. Además del efecto anorexigénico, la acción de la insulina en el hipotálamo modula el metabolismo de la glucosa, aumentando la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos y disminuyendo la gluconeogénesis hepática ⁵⁵. Finalmente, la insulina también puede regular a nivel central los depósitos de grasa disminuyendo la lipólisis en el tejido adiposo blanco, de forma independiente a su efecto anorexigénico ⁵⁶.

1.2.3 Señales del tejido adiposo

Como órgano endocrino, el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) es responsable de la síntesis y secreción de varias hormonas que ejercen un fuerte impacto en el metabolismo corporal. Las hormonas secretadas por el WAT son activas en una gran variedad de procesos, como la ingesta calórica mediada por leptina y angiotensina, la regulación de la sensibilidad a insulina y como mediadores del proceso inflamatorio por el factor de necrosis tumoral α (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*), interleucina 6 (IL6, *interleukine 6*), resistina, visfatina o adiponectina; o de otras vías como el sistema fibrinolítico mediado por el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1*) o la síntesis de triacilglicerol (TAG, *tryacilglicerol*) en los adipocitos por la proteína estimulante de la acilación (ASP, *acylation stimulatins protein*).

La leptina es una adipoquina producida mayoritariamente por el tejido adiposo, que ejerce sus efectos a nivel central y periférico y su principal función es regular la ingesta y el gasto energético ^{57,58}. Se considera la principal hormona moduladora de energía, puesto que posee una función de retroalimentación negativa que mantiene constante la masa del tejido adiposo. Los niveles de leptina en sangre son proporcionales al contenido en grasa, y varían en función de gasto energético y de la ingesta de alimentos; de forma que aumentan después de comer y disminuyen durante el ayuno ^{46,59-62}. En consecuencia, la deficiencia en leptina provoca obesidad severa con marcada hiperfagia ^{58,63}.

La leptina atraviesa la BBB mediante un mecanismo saturable y dependiente de receptor ⁶⁴. Los receptores de leptina (LEPRs, *leptin receptors*) se expresan en distintas regiones del cerebro, incluyendo el ARC ^{65, 66}, donde la activación de los LEPRs induce la expresión de neuropéptidos anorexigénicos POMC y el transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) e inhibe la de los orexigénicos NPY y AgRP produciendo la disminución de la ingesta ⁶⁷⁻⁶⁹. La leptina también puede estimular el tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) y la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*) a través del SNS ^{66, 70}.

2 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

El gasto energético (EE, *energy expenditure*) total engloba varios factores: la tasa metabólica basal (BMR, *basal metabolic rate*), la actividad física y la termogénesis. La BMR representa aproximadamente el 80% del gasto de energía en humanos sedentarios, de este porcentaje dos terceras partes son para el mantenimiento de la homeotermia y aproximadamente una tercera parte para el metabolismo celular. Otro 10% del EE es debido a la actividad física en humanos muy sedentarios, y comprende tanto la actividad física intencional como la no intencional (incluida la postura bípeda erguida). El 10% restante se debe a la termogénesis, producción de calor no relacionada con la actividad física ⁷¹. Cabe resaltar, que en individuos activos la combinación de actividad y termogénesis representa aproximadamente el 44% del EE total en promedio, de forma que la BMR sólo constituiría el 56% del EE ^{71, 72}.

La termogénesis es un proceso fundamental para el mantenimiento de la temperatura en organismos homeotermos. El BAT es un tejido especializado cuya función principal es producir calor ⁷³, es especialmente importante en mamíferos pequeños, ya que les permite generar calor de forma independiente de la termogénesis mediada por temblor, que genera calor derivado de los músculos ^{73, 74}. En roedores, el BAT se encuentra en las regiones interescapular, subescapular, axilar, perirrenal y periaórtica ⁷³, mientras que en los humanos se localiza en las zonas subescapular, cervical, peri-espinal, mediastínica, periaórtica, regiones pericárdicas y perirrenales ^{73, 75, 75-80}.

Los adipocitos del BAT, llamados adipocitos marrones se diferencian de los adipocitos blancos de WAT. Muestran una forma poligonal con gotas lipídicas multiloculares rodeadas por numerosas mitocondrias bien desarrolladas ⁸¹, que contienen citocromos pigmentados con hierro que son en gran parte responsables del color marrón de BAT. Están ricamente inervados por fibras eferentes nerviosas simpáticas ^{73, 77, 82-84}, que aseguran el control central de la termogénesis. En las mitocondrias la energía resultante del movimiento de los electrones a través de la cadena respiratoria es utilizada por la ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP ⁸⁵⁻⁸⁷. Sin embargo, este proceso en las mitocondrias del BAT se ve modificado por UCP1, que proporciona una vía opcional para que los protones vuelvan a la matriz mitocondrial, eludiendo la ATP sintasa y produciendo calor ^{73, 88, 89}. Por su parte, los adipocitos blancos se consideran principalmente depósitos de grasa que contienen pocas mitocondrias y una única gota grande de lípidos para almacenar el exceso de calorías. En el

WAT se pueden desarrollar adipocitos similares a los adipocitos marrones en un proceso denominado "beiging" o "browning" del WAT⁹⁰ (Imagen 3). Los adipocitos marrones y los blancos no sólo se diferencian morfológicamente, sino que también se ha observado que provienen de distintas células precursoras⁹¹⁻⁹⁵. En efecto, los adipocitos marrones provienen de células que expresan el factor miogénico 5 (Myf5, *myogenic factor 5*), que también son precursoras de miocitos^{74, 96, 97}. Los adipocitos beige provienen de un origen distinto del linaje Myf5 y están más cerca del linaje celular de los adipocitos blancos, pero aun así exhiben las mismas propiedades que BAT con respecto a la termogénesis^{98, 99, 100}. Sin embargo, la capacidad termogénica de las células beige/brite (*brown-in-white*) *in vivo* es mucho menor en comparación con los adipocitos marrones¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

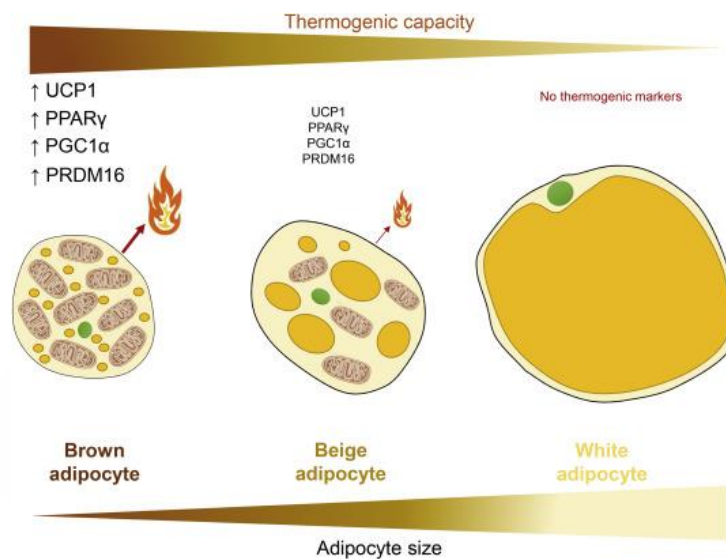


Imagen 3. Adipocitos marrones, beige y blancos¹⁰⁵. Imagen reproducida con permiso de Elsevier.

Hasta hace pocos años el BAT era considerado un tejido relevante sólo en roedores, mamíferos hibernantes y en humanos recién nacidos^{73, 78, 83, 106}. Sin embargo, mediante tomografía por emisión de positrones-tomografía computerizada (PET-CT, *positron emission tomography-computed tomography*) se localizó BAT funcional en humanos adultos. Se observó que estaba distribuido en áreas definidas, pero dispersas; principalmente en el cuello, zona supraclavicular, perirrenal, áreas intercostales y regiones periaórticas⁷⁶⁻⁸⁰. En sucesivos estudios, se comprobó que el BAT del área supraclavicular en humanos adultos presentaba un perfil de expresión más similar a los adipocitos beige/*brite* que a los adipocitos marrones^{90, 99}. En humanos se ha estimado que un BAT completamente activado contribuye al 5% de la BMR¹⁰⁷. En roedores se estima teóricamente que la termogénesis puede llegar a aumentar el EE diario hasta en un 20%^{100, 108}.

El BAT puede ser regulado tanto a nivel central como periférico. Para la activación de la termogénesis es fundamental el SNS. Al aumentar el tono simpático que inerva el BAT da lugar a la liberación de norepinefrina en las terminaciones nerviosas y a la activación de los receptores adrenérgicos β en los adipocitos marrones, principalmente el receptor adrenérgico β_3 . Estos receptores están acoplados a proteínas G, y una vez estimulados, esta activa la adenilato ciclasa (AC, *adenylate cyclase*), lo que provoca un aumento del cAMP, que a su vez activa la protein quinasa A (PKA, *protein kinase A*), induciendo la termogénesis y posteriormente la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*)^{73, 100, 109}. PKA puede ejercer efectos agudos o crónicos

sobre el BAT. Los efectos agudos de PKA aumentan la lipólisis y se producen por la activación de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), la lipasa sensible a hormonas (HSL, *hormone-sensitive lipase*, la forma activada es pHSL) y la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*), que van a hidrolizar los TAG para liberar ácidos grasos libres no-esterificados citosólicos (NEFA, *nonesterified free fatty acids*). Después la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a *carnitine palmitoyltransferase 1a*) introduce los NEFA-CoA en la mitocondria, donde se oxidarán y darán lugar a NADH y FADH, que serán oxidados en la cadena de transporte de electrones ^{100, 110-113} (Imagen 4). Estudios recientes han cuestionado si este modelo explica completamente el mecanismo de activación de la termogénesis. En el modelo estándar, UCP1 está en estado inactivo debido a su unión a ATP y ADP (o GDP) y esta inhibición es anulada por los NEFAs liberados desde la gota lipídica a través de la actividad de ATGL. Nuevas evidencias han demostrado que incluso en ausencia de ATGL o de enzimas activadas por ésta, la termogénesis es posible ya que el BAT capta NEFAs liberados por el WAT ^{114, 115} que son utilizados como sustratos y activadores de UCP1. En este modelo la importancia a corto plazo del SNS se pierde. Se ha postulado entonces otro modelo en el que es necesario un activador “no ácido graso” inducido por norepinefrina que active UCP1 y permita el desacoplamiento para que los NEFA externos puedan ser utilizados para la termogénesis ¹¹⁶. Por otra parte, los efectos crónicos debidos a la estimulación prolongada del BAT aumentan los niveles proteicos de UCP1, la biogénesis mitocondrial e hipertrofia e hipertrofia del BAT ^{73, 100, 106, 117}.

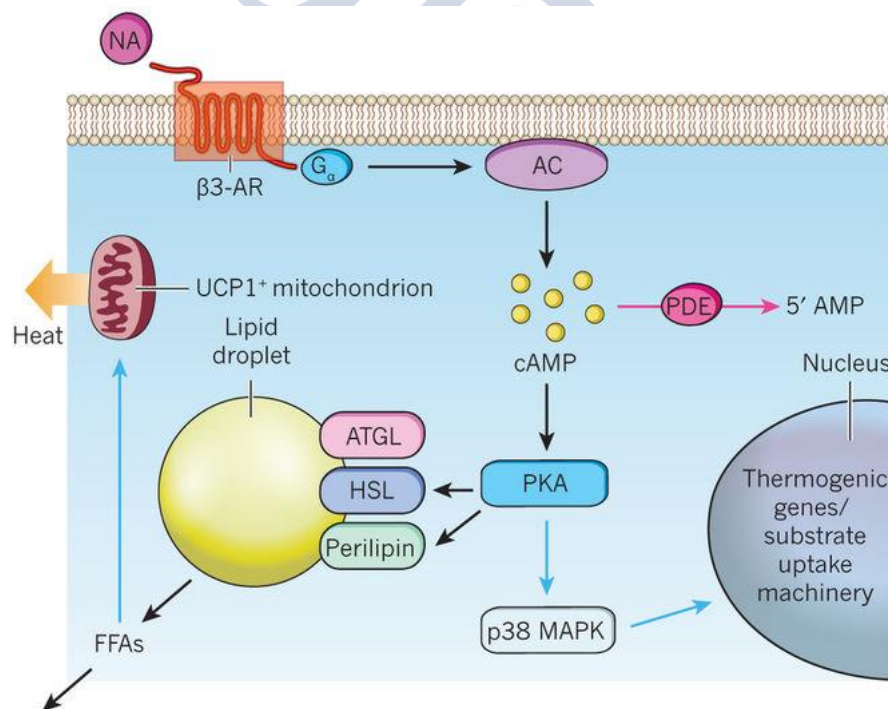


Imagen 4. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT ¹¹⁸. Imagen reproducida con permiso de Springer Nature.

El BAT no solo incrementa el gasto de energía, sino que también provoca la eliminación de TAG plasmáticos y mejora la homeostasis de la glucosa ¹¹⁹⁻¹²¹ debido a su capacidad de captación y eliminación de grandes cantidades de lípidos y glucosa de la circulación para emplearlos como sustratos para la termogénesis ^{73, 100, 120, 122}.

3 HIPOTÁLAMO Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El hipotálamo desempeña un papel fundamental en la integración de las señales aferentes que llegan al CNS y activa respuestas autonómicas, endocrinas y conductuales ¹²³. Está situado bajo el tálamo, abarcando la mayor parte del diencéfalo ventral y es un área especializada formada por varios núcleos, o clústeres de neuronas que contiene circuitos neuronales altamente conservados que controlan las funciones básicas de la vida, entre las que se incluyen el metabolismo energético, el control metabólico y el gasto de energía ^{123, 124}, el balance hídrico y electrolítico, la termorregulación, los ciclos de vigilia-sueño y respuestas a estrés del medio ambiente y la reproducción ^{123, 125}. La parte rostral del hipotálamo (área preóptica) contiene circuitos integradores para la termorregulación, fiebre, equilibrio electrolítico, vigilia-sueño, ritmos circadianos y comportamiento sexual. La parte media (área tuberal) contiene un circuito integrador para la alimentación y la termorregulación, y circuitos de salida para el comportamiento sexual, la agresividad y muchas respuestas autónomas y endocrinas. La parte posterior (área posterior) proporciona salidas al sistema de excitación hipocampo, que se cree que juegan un papel en la regulación de la vigilia y las respuestas al estrés ¹²³ (Imagen 5).

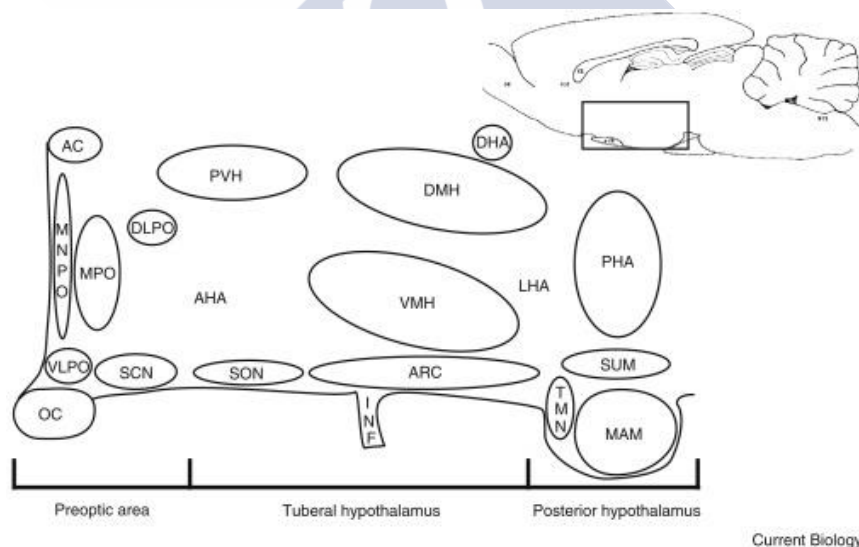


Imagen 5. Distribución de los distintos núcleos hipotalámicos ¹²³. Imagen reproducida con permiso de Elsevier.

A continuación, profundizaremos en los núcleos hipotalámicos que juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis energética.

3.1 NÚCLEO ARCUATO

El ARC es uno de los núcleos más importantes en la regulación de la ingesta. Se localiza en la parte inferior del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo, próximo a la eminencia

media, que es una región del cerebro donde la BBB permite el paso de las señales circulantes del estado nutricional como son la leptina, ghrelin o la insulina, entre otras^{25, 126}. Estudios de lesiones en el ARC mostraron su implicación en la homeostasis energética ya que estas lesiones inducían obesidad e hiperfagia^{21, 127}.

La población neuronal del ARC es heterogénea, distinguiéndose dos poblaciones primarias de neuronas que integran las señales del balance energético, y que ejercen efectos opuestos. Una de estas poblaciones de neuronas responde a señales orexigénicas, estimulando la ingesta a través de la expresión de NPY y AgRP, se encuentra en la zona ventromedial del ARC y proyecta sus axones mayoritariamente a otras neuronas de segundo orden localizadas en otras áreas hipotalámicas como el núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*). Otra gran población responde a señales anorexigénicas, inhibiendo la ingesta a través de la expresión de los neuropéptidos POMC y CART. Se encuentra en la zona ventrolateral del ARC y proyecta a zonas más amplias del CNS, a núcleos hipotalámicos secundarios, como el hipotálamo dorsomedial (DMH, *dorsomedial nucleus of the hypothalamus*), el área lateral hipotalámica (LHA, *lateral hypothalamic area*, LHA) y el área perifornical (PFA, *perifornical area*), así como al PVH. Normalmente, las neuronas AgRP/NPY y CART/POMC actúan como el primer sitio de acción de las hormonas periféricas, como insulina y leptina. Dependiendo de las señales que reciban desde el ARC, las neuronas de segundo orden modulan la liberación de neuropéptidos para la regulación de la ingesta¹²⁴.

- Neuronas AgRP/NPY: las neuronas AgRP se definen por la co-expresión de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY. Se ha observado que la administración central de AgRP o su sobreexpresión genética incrementa la ingesta y disminuye el gasto energético, dando lugar así a un fenotipo obeso^{128, 129}. Esto ocurre debido a que AgRP actúa como un agonista inverso de los receptores de melanocortinas¹²⁸⁻¹³⁰. La estimulación de este grupo neuronal, tanto de forma farmacológica como con técnicas como la optogenética, estimula rápidamente la ingesta en ratones^{131, 132}, mientras que su inhibición reduce la ingesta en ratones en después del ayuno¹³². Por otra parte, NPY se expresa en todo el CNS, pero la mayoría de las neuronas que expresan NPY se encuentran especialmente en el ARC¹³³, donde actúa sobre sus receptores 1-5 (NPYR1-5, *neuropeptide Y receptors 1-5*). La expresión de NPY se ve modulada por cambios en el estado energético, siendo incrementada durante el ayuno y disminuida durante la ingesta^{134, 135}. NPY también está implicado en el metabolismo energético, la inyección de NPY intracerebroventricular (ICV) estimula la ingesta¹³⁶ e induce una disminución de la termogénesis en el BAT^{137, 138}, efecto que se comprobó asociado a la inhibición del eje tiroideo¹³⁹⁻¹⁴¹.
- Neuronas POMC/CART: La excitación de las neuronas POMC reduce la ingesta¹³¹, mientras que su ablación da lugar a hiperfagia y obesidad¹⁴²⁻¹⁴⁶. Esto es debido a la acción de la hormona estimuladora de melanocitos alfa (α -MSH, *alpha melanocyte stimulating hormone*), que es el producto proteolítico de POMC, y que se une a los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3R y MC4R, *melanocortin receptors 3 and 4*). Los ratones deficientes para MC4R son obesos, debido a que presentan hiperfagia y gasto energético disminuido^{25, 147}. La ingesta modula la expresión de POMC y α -MSH, de modo que sus niveles aumentan durante la ingesta y se reducen durante el ayuno¹⁴⁸. La mayoría de las neuronas POMC en el ARC co-expresan CART, el cual se expresa por todo el cerebro, pero es especialmente abundante en el hipotálamo. La

administración de CART inhibe la ingesta, mientras que la inyección ICV de antisuero de CART produce hiperfagia¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Sus niveles se correlacionan con los niveles de leptina circulante^{46, 149}, de forma que se incrementan al administrar leptina periférica^{149, 152, 153}. Asimismo, se ha descrito también la capacidad de CART para estimular la termogénesis en el BAT¹⁵⁴.

3.2 NÚCLEO VENTROMEDIAL

El VMH es un grupo de células bilaterales situado en el hipotálamo mediobasal adyacente al tercer ventrículo, con forma elíptica situado lateralmente al ARC. El VMH fue el primer núcleo considerado como regulador del peso corporal y la homeostasis energética y se mantiene como un núcleo con gran importancia en la regulación del peso corporal y la homeostasis de la glucosa¹⁵⁵⁻¹⁶¹. Estudios de lesiones mostraron el gran impacto que tiene este núcleo en el peso corporal predominantemente a través de SNS¹⁵⁹. Además, el VMH se ha relacionado con un gran número de funciones homeostáticas y conductuales, como son la regulación del comportamiento sexual femenino y la función cardiovascular^{162, 163}.

El VMH está compuesto de varios tipos celulares con patrones de expresión génica muy variados y ampliamente expresados por toda su extensión (Imagen 6), entre ellos el receptor canabinoide 1 (CB1, *cannabinoid receptor 1*), el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) y cerebelin 1 (Cbln1, *cerebellin 1*)¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Otros genes como el receptor de estrógenos alfa (ER α , *estrogen receptor alpha*) y el receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*) presentan un patrón de expresión restringido a la parte ventro-lateral del VMH. Asimismo, LEPR e IR se expresan abundantemente en el VMH^{65, 161}, y al igual que se observa en las neuronas POMC, las neuronas sensibles a leptina e insulina se encuentran segregadas en un tipo neuronal específico del VMH que expresa el factor esteroidogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*)^{161, 168, 169}, que es un factor de transcripción requerido tanto para el desarrollo como para la mediación de procesos fisiológicos modulados por el VMH^{165, 170, 171}. SF1 es el único gen expresado en el VMH que es específico y exclusivo de este núcleo dentro del SNC^{158, 160}. Debido a la importancia de las neuronas del VMH que expresan SF1 en este trabajo, este tema se desarrollará en un epígrafe aparte.

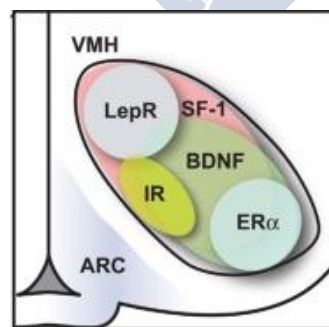


Imagen 6. Grupos neuronales del VMH¹⁶⁹. Licencia Creative Commons.

El VMH recibe numerosas proyecciones de neuronas NPY, AgRP y POMC desde el ARC^{25, 172} y en él se expresan los receptores de NPY Y1 y Y5 así como MC4R¹⁷³⁻¹⁷⁵. Posee también numerosos receptores que responden a dopamina, serotonina, GABA e histamina¹⁶³. El VMH contiene una gran población de neuronas capaces de responder a la glucosa, y que

median los efectos de la leptina, la insulina y ghrelina¹⁵⁹. Estas neuronas responden a las señales de las poblaciones POMC/CART y AgRP/NPY del ARC sintetizando BDNF, que actúa como efector directo de la anorexia mediada por leptina^{176, 177}, así como regulador de la masa corporal en roedores y humanos^{164, 178, 179}. El VMH presenta numerosas conexiones neuronales con otras áreas del cerebro implicadas en la homeostasis energética. Desde el VMH se proyectan aferencias al ARC, DMH y LHA, así como al tronco cerebral, la amígdala, la eminencia media; entre otros^{180, 181}.

La primera demostración de que el VMH era una región importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, se obtuvo por estimulación eléctrica en conejos que daba lugar a un aumento de los niveles de glucosa en sangre, así como a un incremento de la glucogenolisis en el hígado y la consiguiente disminución del contenido de glucógeno hepático¹⁸². Asimismo, se demostró que la hiperglucemia producida por la estimulación de VMH estaba mediada por hormonas gluconeogénicas como el glucagón, y por la inervación simpática del hígado¹⁸³⁻¹⁸⁶. En contraste con estos resultados, la estimulación eléctrica del VMH generaba también un aumento de utilización de la glucosa en los tejidos periféricos, incluidos el músculo esquelético, el corazón y el BAT^{187, 188}.

En VMH expresa el LEPR y además es diana de la leptina y la insulina para la regulación de la homeostasis energética⁶⁵. Al administrar leptina directamente en este núcleo se incrementa la captación de glucosa en el BAT, corazón, músculo esquelético y en el bazo, pero no en el tejido adiposo blanco, sin que observen cambios significativos en los niveles plasmáticos de glucosa o insulina^{189, 190} efecto que se abole al denervar el SNS, lo que indica la importancia de la señalización de leptina en el VMH en la modulación del tono simpático desde el VMH a los tejidos periféricos^{190, 191, 169, 189, 192-194}. Estos efectos son, por lo tanto, esencialmente similares a los de la estimulación eléctrica o química del VMH. El importante papel que juega el VMH en la regulación de la homeostasis de la glucosa mediada por leptina se observó cuando la inyección de esta hormona en el VMH aumentaba la captación de glucosa en músculo esquelético, BAT y corazón, mientras que la inyección de leptina en el ARC sólo aumentaba la captación de glucosa en el BAT y su inyección en el núcleo DMH o PVH no tenía efecto¹⁹⁵. La regulación de la absorción de glucosa por los tejidos periféricos está mediada en gran medida por el efecto sinérgico de leptina e insulina en el hipotálamo a través del eje VMH-SNS^{186, 192}. Por una parte, el VMH incrementa la producción de glucosa hepática y regula la respuesta contrarreguladora frente a la hipoglucemia estimulando la producción de glucagón; por otra aumenta la utilización de glucosa por los tejidos periféricos y aumenta los niveles de insulina manteniendo así los niveles de glucosa en sangre¹⁸⁶.

El VMH ha sido relacionado también con la regulación del gasto energético. Las primeras señales de esto se obtuvieron cuando al estimular eléctricamente este núcleo aumentaba la temperatura del BAT escapular y que este efecto era abolido al bloquear los receptores adrenérgicos β ¹⁹⁶. El VMH integra señales periféricas para coordinar la respuesta termogénica, mediante la modulación del tono simpático al BAT y WAT, gracias a la conexión anatómica con estos tejidos^{197, 198} a través del rafe pálido (RPa, *Raphe pallidus*) y la oliva inferior (IO, *inferior olive*) en el troncoencéfalo, que son áreas involucradas en la regulación de la termogénesis del BAT^{199, 199-205}. A raíz de las evidencias acumuladas a lo largo del tiempo, se propuso que este núcleo forma parte de un eje entre VMH-SNS-BAT, en donde la inhibición de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) en el VMH activa el programa termogénico^{19, 124, 203, 204, 206-212}.

Diversas señales periféricas, como las hormonas tiroideas (TH, *thyroid hormone*) o el estradiol (E2, *estradiol*) actúan en el VMH induciendo la termogénesis en el BAT, un efecto que es abolido por el bloqueo de los receptores adrenérgicos β_3 ^{203, 204, 212}. Asimismo, la administración de agonistas de GABA en el VMH bloquea la activación simpática del BAT dependiente de prostaglandina E2 (PGE2, *prostaglandin E2*) ^{157, 213}. La administración de glutamato, norepinefrina, serotonina y triptófano en el VMH también activa la termogénesis en el BAT ^{157, 214-218}. En consonancia con esto, ratas hembra en las se ha silenciado en el ER α en el VMH, desarrollaban obesidad debido a un gasto energético y termogénesis del BAT deficiente ²¹⁹. Recientemente se ha postulado que regulación de la termogénesis por el VMH está mediada por los ritmos circadianos, ya que ratones que carecen del gen *Bmal1* en el VMH muestran una inhibición de la termogénesis durante la fase nocturna ^{205, 220} (Imagen 7).

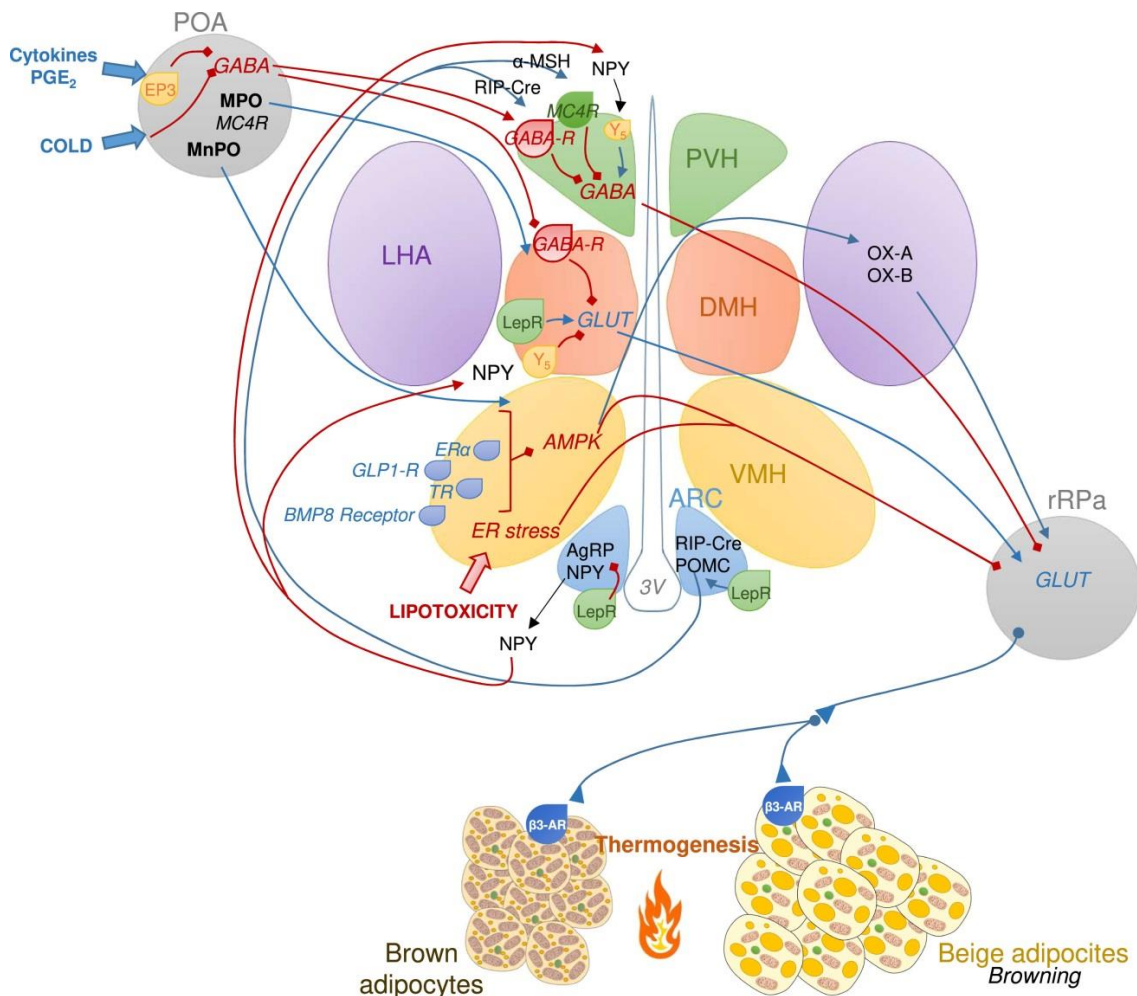


Imagen 7. Circuitos hipotalámicos que regulan la termogénesis del BAT y el browning del WAT ²⁰⁵. Licencia Creative Commons.

Otras señales como las ceramidas hipotalámicas, se han visto relacionadas con la modulación de la termogénesis, de modo que al aumentar su concentración provocan lipotoxicidad y esto da lugar a estrés de retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*) y a una reducción del tono simpático al BAT. Esto puede ser revertido mediante la sobreexpresión de la proteína chaperona regulada por glucosa 78 (GRP78/BiP, *chaperone glucose regulated protein 78/binding immunoglobulin protein*) específicamente en el VMH ²²¹.

En relación al browning del WAT, apenas se ha investigado, pero si se ha demostrado que la administración de liraglutide (un análogo de GLP-1) en el VMH no sólo induce la termogénesis del BAT, sino que también activa el programa termogénico en el WAT a través de la inhibición de AMPK en el VMH ²²². Un efecto similar ha sido descrito también para las THs ²¹¹.

3.3 NÚCLEO DORSOMEDIAL

El DMH está implicado en un amplio número de procesos fisiológicos tales como apetito, termorregulación, estrés y ritmos circadianos ². Al núcleo DMH también se le atribuyen capacidades de integración y procesamiento de señales procedentes de otras áreas de hipotálamo, ya que recibe proyecciones del ARC y manda proyecciones hacia el PVH y LHA ²²³. Estas proyecciones del ARC son terminales de neuronas NPY/AgRP y POMC/CART ⁴⁶. Además, las neuronas del DMH expresan NPY y CART, asociado a la respuesta hiperfágica típica de la gestación ²²⁴ y en respuesta al ayuno ²²⁵. NPY en el DMH también se ve incrementado en ratones obesos y en ratones deficientes en MC4R ^{223, 226}. Además, el NPY en el DMH modula el gasto de energía probablemente al afectar la formación de adipocitos marrones y la actividad termogénica ²²⁷. Sin embargo, mientras que NPY en el ARC es modulado por los niveles de leptina, la regulación de NPY en el DMH es independiente de esta hormona. Además, la expresión del gen de *Npy* en el DMH está regulada por la CKK y otras moléculas aún por identificar ²²⁸. Desde el DMH también se proyectan fibras α -MSH al PVH, terminando en neuronas de hormona liberadora de tirotrópina (TRH, *thyrotropin-releasing hormone*) ²²⁹. En la zona caudal del núcleo se encuentra también una población de neuronas que expresan el péptido similar a la galanina (GALP, *galanin-like peptide*) ^{172, 230}.

3.4 NÚCLEO PARAVENTRICULAR

El PVH se sitúa en los lados superiores del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. Se caracteriza por ser un centro integrador, en el cual convergen numerosas vías neurales que modula la homeostasis energética. Está protegido por la BBB, pero sus células neuroendocrinas se extienden hasta regiones más allá de esta, como la eminencia media (ME, *median eminence*) y la hipófisis posterior ²³¹. Recibe un gran número de aferentes desde otras áreas hipotalámicas, del tronco cerebral, del hipocampo, así como de señales de sensores del estado fisiológico del organismo ²³². Las neuronas sensibles a leptina presentes en el ARC proyectan sus axones a este núcleo ^{233, 234}. La ruta de las melanocortinas está muy estrechamente ligada a la función de este núcleo y en el existe una densa expresión de receptores de melanocortinas ^{234, 235}. Está fuertemente inervado por axones que proyectan desde las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC y así como de neuronas orexina (OX, *orexin*) del hipotálamo lateral ^{65, 233, 236, 237}. El PVH es un núcleo en el que abundan las terminales nerviosas que sintetizan neuropéptidos muy vinculados a la regulación de la ingesta, como son NPY, α -MSH, serotonina, galanina, noradrenalina y péptidos opioides, y el PVH es un núcleo especialmente sensible a los efectos de estos neurotransmisores sobre la ingesta y el gasto energético ²³⁸. El PVH de rata contiene dos grandes regiones, la parvocelular y la magnocelular. Las neuronas autonómicas de la región parvocelular proyectan al NTS, al núcleo motor dorsal de vago y a la columna celular intermediolateral de

la médula espinal¹⁸¹. De esta forma, regula la secreción pancreática, el almacenamiento de grasa, la termogénesis, la captación de glucosa periférica y el flujo de glucosa hepático²³⁹⁻²⁴¹. Las neuronas parvocelulares también pueden liberar péptidos señalizadores en la ME regulando así la producción de hormonas hipofisarias. Concretamente, la hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotrophin-releasing hormone*), que regula el eje adrenal y TRH, que regula el eje tiroideo. Las neuronas CRH y TRH, están implicadas en la regulación de la ingesta y del balance energético que reducen la ingesta, por lo que son estimuladas por las neuronas POMC/CART e inhibidas por las neuronas NPY/AgRP de ARC^{46, 176, 242}. Las neuronas magnocelulares liberan tanto vasopresina como oxitocina en la circulación sistémica, la segunda de las cuales ha sido también implicada en la regulación de la ingesta²⁴³.

La CRH, TRH y oxitocina en el PVH juegan un papel importante en la regulación de la ingesta y el gasto energético. Responden a déficit de energía, primero alterando el eje neuroendocrino, y segundo, modulando el tono simpático o parasimpático e influenciando la función de los órganos periféricos^{239, 244, 245}. Así, lesiones en este núcleo dan lugar a un aumento de la ingesta, seguido del desarrollo de obesidad^{246, 247}. En este sentido, la administración de un agonista de receptor de melancortinas produce un aumento en el gasto energético^{233, 234}.

3.5 ÁREA LATERAL HIPOTALÁMICA

La LHA es una región del hipotálamo que comprende una gran y difusa población de neuronas que incluye subpoblaciones definidas que expresan OX y la hormona concentradora de melanina (MCH, *melanin-concentrating hormone*), ambas poblaciones se inhiben por leptina y se estimulan por ghrelin, por lo tanto, estimulan la ingesta. La LHA recibe e integra numerosas señales que modulan la ingesta, la actividad y el estado de alerta según las condiciones ambientales y nutricionales^{248, 249}. Presenta numerosas terminales de neuronas NPY, AgRP y α -MSH que están en contacto con células que expresan OX y MCH^{248, 250, 251}. La región perifornical de la LHA contiene una gran densidad de receptores de NPY-Y5, que median los efectos estimulantes de NPY sobre la ingesta²⁵². Este núcleo también presenta un gran número de neuronas sensibles a glucosa, que responden a sus niveles circulantes, probablemente mediante vías ascendentes del hipotálamo²⁵³.

La regulación de la ingesta por este núcleo, se observó con estudios donde su estimulación incrementaba la ingesta, mientras que su lesión la atenuaba llegando a provocar incluso afagia o ausencia de ingesta^{172, 254} y la consiguiente disminución del peso corporal. Las lesiones en este núcleo producen graves alteraciones metabólicas y endocrinas, como son problemas de crecimiento, disfunción del eje tiroideo y de la homeostasis de la glucosa^{203, 253}. Desde la LHA, las neuronas proyectan a otras regiones del cerebro, como el ARC y otros núcleos hipotalámicos y al sistema mesolímbico, encargado del control hedónico del comportamiento de la ingesta^{61, 176}.

-Neuronas OX: la OX, también llamada hipocretina, presenta dos isoformas que derivan del mismo precursor: OX A y OX B; que actúan a través de dos receptores de OX 1 y 2 (OX1R y OX2R, *orexin receptor 1 and 2*). La leptina es un modulador clave de la OX, ya que inhibe la activación de estas neuronas^{248, 255, 256}. La administración central de este neuropéptido promueve a su vez la ingesta^{203, 257}. Otro papel importante de la OX es en la

regulación de los ciclos de sueño, de forma que su ausencia provoca narcolepsia. Esto se ha postulado como una posible explicación a los efectos que este neuropéptido tiene en la ingesta^{25, 258, 259}. Por otra parte, es necesario resaltar el papel de las neuronas OX sobre la modulación de la tasa metabólica, la actividad física y la termogénesis²⁶⁰. Las neuronas OX proyectan desde el LHA al RaP del tronco encéfalo, estimulando la termogénesis en ratas²⁶¹.

-Neuronas MCH: son neuronas productoras de MCH y se localizan exclusivamente en el LHA, pero realizan proyecciones por diferentes áreas del cerebro²⁶². En humanos se han identificado dos receptores de MCH (*Mchr1* y *Mchr2*), sin embargo, en roedores sólo se ha identificado *Mchr1*. Los ratones deficientes en este receptor muestran un aumento del gasto energético, de la actividad locomotora y presentan resistencia a la obesidad inducida por dieta^{25, 263}. Sin embargo, la sobreexpresión de MCH en ratones induce obesidad y resistencia a insulina (Chen et al., 2002). En consonancia con esto, la inyección de MCH en la LHA promueve un aumento de la ingesta en ratas y un incremento de la lipogénesis hepática mediada por el sistema nervioso parasimpático (PSNS; *parasympathetic nervous system*) y el SNS²⁶³⁻²⁶⁵.

4 PAPEL DE LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA

4.1 LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

Las neuronas SF1 del VMH son una población heterogénea implicada en diversos aspectos de la regulación metabólica. La primera vez que se relacionó a las neuronas SF1 en este papel fue cuando se observó que ratones deficientes en SF1 en la línea germinal presentaban una insuficiencia adrenal que les provocaba la muerte¹⁷⁰, mientras cuando se les trasplantaban glándulas adrenales de ratones *wildtype* (WT) desarrollaban obesidad¹⁶⁹. Para discernir si esto era debido a la implicación de SF1 en la inhibición de la ganancia de peso o a un efecto secundario de un defecto en citoarquitectura del VMH^{170, 266, 267}, generaron ratones deficientes para SF1 en el VMH en la etapa postnatal, una vez finalizado el desarrollo del VMH²⁶⁸, y se comprobó que de hecho SF1 es necesario para la homeostasis energética mediante la modulación de gasto energético, especialmente bajo condiciones de exposición a una dieta alta en grasa^{169, 268}. De hecho, los ratones deficientes para SF1 en el VMH presentan niveles de expresión de UCP1 reducidos en el BAT^{268-270, 270}.

Una vez identificadas las neuronas SF1 como responsables de la modulación de la homeostasis energética, han aparecido numerosos estudios que han mostrado como diversas modificaciones en estas neuronas dan lugar a alteraciones en el balance energético. Así, se demostró que la eliminación del LEPR en las neuronas SF1 del VMH provocaba un aumento en la ganancia de peso corporal, efecto que era similar en la regulación del peso corporal al observado cuando se elimina este receptor de las neuronas POMC de ARC^{158, 271}. Mediante la eliminación en las neuronas SF1 del supresor de la señalización por citoquinas 3 (*SOCS3*, *suppressor of cytokine signaling-3*), que actúa como un regulador negativo de la acción de la

leptina, apenas se producía efecto sobre el peso pero se aumentaba la sensibilidad a insulina²⁷².

De igual modo, se realizaron estudios en relación con la señalización de la insulina en estas neuronas. La primera evidencia directa de la señalización por esta hormona en el VMH se observó mediante la generación de *knock-out* (KO) para el IR en las neuronas SF1¹⁶¹. Estos ratones en dieta alta en grasa (HFD, *high fat diet*) presentaban un aumento en la excitación neuronal de las proyecciones a las neuronas POMC, lo que protegía a los animales frente a un aumento de peso inducido por HFD^{161, 168}. Además, se observó que la eliminación de la subunidad catalítica de PI3K, p110 α , en las neuronas SF1 aumentaba la sensibilidad a la obesidad inducida por dieta²⁷³. Resulta interesante que la eliminación en las neuronas SF1 del factor de transcripción FOXO1 (*Forkhead box protein O1*), que actúa como efector downstream de PI3K, mostró un fenotipo delgado debido al aumento del gasto energético y a una mejora en la sensibilidad a insulina debido a un incremento de la disposición de la glucosa estimulada por insulina en músculo cardíaco y esquelético^{169, 194}.

Además, tanto estudios de inhibición como de activación de sirtuina 1 (SIRT1, *sirtuin 1*) en las neuronas SF1, han mostrado el rol protector de SIRT1 contra el desequilibrio energético inducido por la dieta²⁷⁴, así los ratones a los que se le inhibió SIRT1 eran hipersensibles a la obesidad inducida por dieta debido a un gasto energético ineficiente, mientras que aquellos en los que se sobreexpresó SIRT1 eran más resistentes. En parte esto era debido a la disminución de las acciones metabólicas de OX y leptina²⁷⁴. Por otra parte, la eliminación de ER α , específicamente en la zona ventro-lateral del VMH en las neuronas SF1 en hembras dio lugar a la reducción del gasto energético y obesidad abdominal^{169, 269}.

4.2 LAS NEURONAS SF1 EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

En el VMH existe un subconjunto de neuronas, entre ellas las que expresan SF1, que detectan cambios en la concentración de glucosa y se clasifican como excitadas por glucosa (GE, *glucose-excited*) o inhibidas por glucosa (GI, *glucose-inhibited*), cuya frecuencia de potencial de acción aumenta y disminuye, respectivamente, según los niveles de glucosa aumentan (Imagen 8). Los grupos de neuronas GE y GI, constituyen cada uno aproximadamente el 10% de todas las neuronas de SF1 del VMH²⁷⁵. Además, recientemente se ha observado que los programas transcripcionales de SF1 son necesarios para la homeostasis de la glucosa en roedores, especialmente en grupos de edad avanzada (Kim et al., 2012). Así pues, la estimulación de las neuronas SF1 mediante optogenética indujo hiperglucemia y mejoró la respuesta contrarreguladora a la glucopenia^{186, 276}. Recientes estudios han demostrado el rol clave que desempeña el transportador de glutamato vesicular 2 (VGLUT2, *vesicular glutamate transporter 2*) en la acción contrarreguladora de la glucemia inducida por insulina en las neuronas SF1 del VMH²⁷⁷. Ratones deficientes para el transportador en estas neuronas presentaban mayor peso corporal que sus controles, especialmente cuando se exponían a HFD. Exhibían también, alteración de la homeostasis de la glucosa en ayuno junto con una menor respuesta contrarreguladora a la hipoglucemia inducida por la insulina. Así como una función alterada de efectores contrarreguladores como el glucagón o la epinefrina²⁷⁷. La eliminación de LEPR en células que expresan SF1 provoca un aumento de adiposidad y un metabolismo alterado de la glucosa^{158, 160}, lo que sugiere que los receptores de leptina expresados en neuronas SF1 son esenciales para la acción reguladora

de la leptina en el metabolismo energético. De esta forma leptina, insulina y sus efectores downstream también actúan como reguladores de la homeostasis de la glucosa en las neuronas SF1.

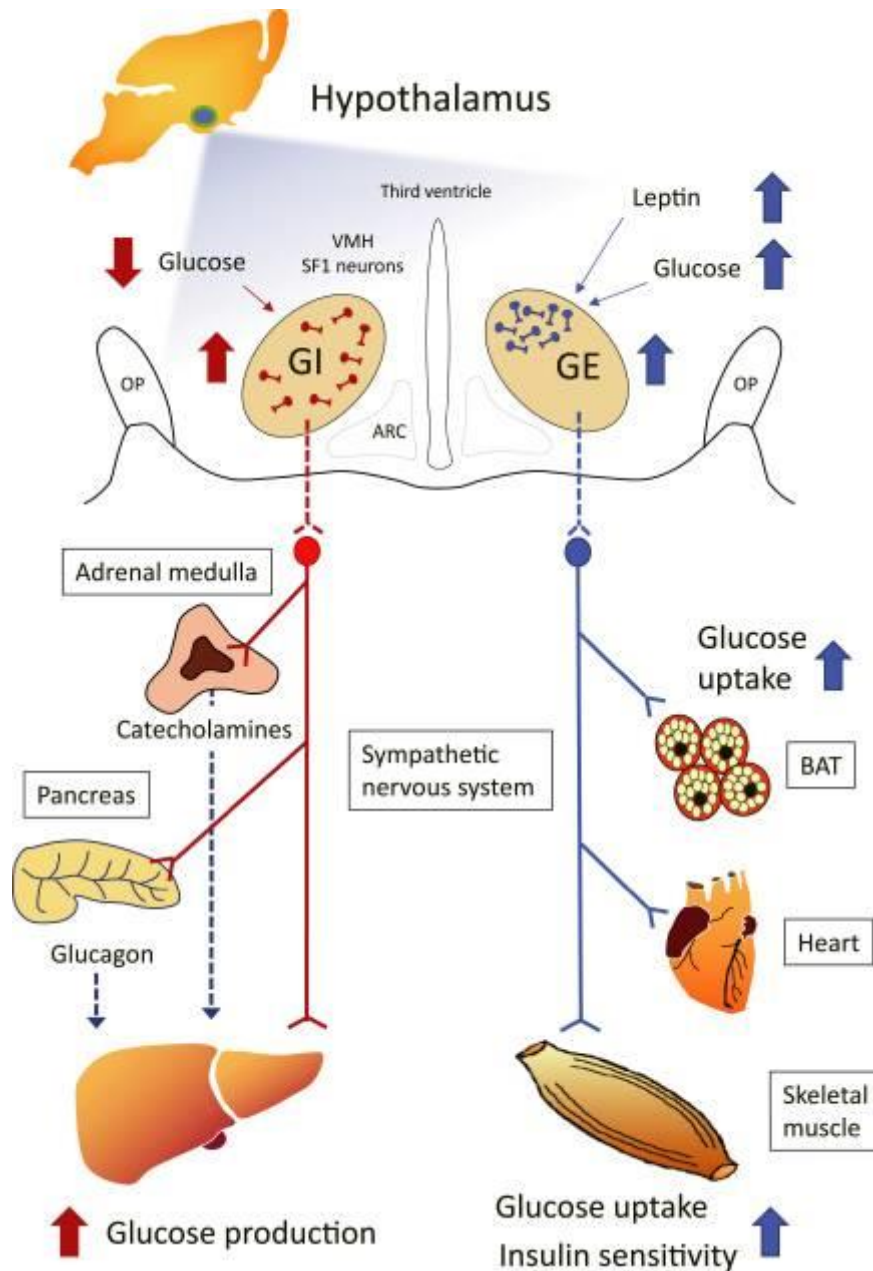


Imagen 8. Modelo que muestra las funciones de las neuronas GE y GI del VMH en la glucorregulación sistémica y la posible relación de estas neuronas con las neuronas que responden a SF1 y leptina ¹⁸⁶. Licencia Creative Commons.

De hecho, se ha sugerido como una potencial vía de señalización para la homeostasis glucémica a la ruta leptin-PI3K-FOXO1 en las neuronas SF1 ^{194, 278-280}. Junto con la vía leptin-PI3K-FOXO1, un estudio efectuado con ratones KO sugirió que el transductor de señal y el activador de la transcripción 3 fosforilado (pSTAT3, *phosphorilated signal transducer and activator of transcription 3*) también está relacionado con la regulación glucémica en las neuronas SF1 del VMH ^{169, 272}. En los ratones en los que se inhibió SIRT1 en las neuronas SF1 presentaban una mayor susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 2 inducida por la dieta,

debido a la resistencia a insulina mostrada por el músculo esquelético. Contrariamente, al sobreexpresarse SIRT1 los ratones mostraban una sensibilidad a insulina aumentada en este músculo²⁷⁴. También se ha visto que UCP2 ejerce un rol fisiológico en las neuronas SF1 del VMH en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Este mecanismo es regulado por la dinámica mitocondrial y la excitabilidad de las neuronas sensibles a glucosa del VMH, lo que permite una respuesta apropiada al aumento en los niveles de glucosa, dando lugar a una mejora de la sensibilidad a insulina en los órganos periféricos²⁷⁵.

5 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E INFLAMACIÓN HIPOTALÁMICA

Numerosos estudios han demostrado que una dieta rica en ácidos grasos de cadena larga y/o la obesidad provocan cambios en los centros de regulación de la homeostasis energética, lo que da lugar al desarrollo de resistencia a insulina y leptina. Estos cambios en los centros reguladores incluyen el aumento del estrés oxidativo, ER stress, inflamación y cambios en la tasa de apoptosis y regeneración neuronal. También se ha observado que la obesidad y sus procesos metabólicos asociados pueden inducir una autofagia deficiente; aunque paradójicamente la inhibición de la autofagia, en contextos específicos, produce de forma indirecta efectos beneficiosos que reducen las consecuencias adversas de la obesidad^{281, 282}. Todos los cambios hipotalámicos inducidos por una dieta alta en grasas parecen estar relacionados causalmente y los inhibidores de la inflamación, el ER estrés y una autofagia deficiente pueden prevenir o revertir el desarrollo de la obesidad apuntando a potenciales dianas farmacológicas en la prevención de la obesidad y la disfunción metabólica¹⁴. La inflamación y el ER estrés están vinculados en muchos niveles: ambos son sistemas adaptativos a corto plazo necesarios para la función y la supervivencia del organismo, y ambos son perjudiciales cuando están comprometidos crónicamente²⁸³.

5.1 ER ESTRÉS

En respuesta a una nutrición excesiva se produce en el hipotálamo y en los órganos periféricos ER stress²⁸⁴. El ER es el orgánulo celular responsable del plegamiento de proteínas, la maduración, el control de calidad y el tráfico de estas al aparato de Golgi. Cuando el ER se “estresa” debido a la acumulación de proteínas mal plegadas, se activa la respuesta adaptativa de proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*)²⁸³. Esta presenta tres ramas que se cruzan a su vez con los sistemas de señalización inflamatoria y de estrés, que incluyen las vías factor nuclear kappa B (NF-κB, *nuclear factor kappa B*)/-inhibidor de factor nuclear kB (IKK, *IκB kinase*) y quinasa c-Jun N-terminal (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*)- proteína activadora 1 (AP1, *activator protein 1*), así como vías activadas por estrés oxidativo, que pueden influir en el metabolismo.

En condiciones que alteran la función del ER, particularmente un aumento en proteínas recién desarrolladas y sintetizadas en la luz del ER, este orgánulo activa la UPR²⁸⁵. Esta está

mediada por tres ramas canónicas, conservadas en todas las células eucarióticas, que incluyen las proteínas ER asociadas a la membrana, la quinasa del factor de transcripción pancreático del retículo endoplasmático iniciador de la traducción eucariota (PERK, *protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*), proteína requerida de inositol 1 (IRE1, *inositol - requiring enzyme-1*) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6, *activating transcription factor 6*). En un estado normal estas proteínas están inactivas gracias a la unión a una chaperona, denominada GRP78/BiP^{286, 287}. En un estado de ER estrés se activan por la liberación de BIP o también por otros mecanismos, y van a mitigar el ER estrés reduciendo la síntesis de proteínas, facilitando la degradación de proteínas mal plegadas y aumentando la producción de chaperonas que ayudan a las proteínas en el lumen de la ER a plegarse (Imagen 9).

- ATF6: requiera la translocación de ATF6 al aparato de Golgi donde será procesado para producir un factor de transcripción activo²⁸⁸.
- IRE1: la actividad endoribonucleasa de IRE1a escinde un segmento del ARN mensajero (mRNA, *messenger RNA*) de la proteína de unión X-box-1 (XBP1, *X-box binding protein 1*), lo que se traduce en la forma activa de XBP1²⁸⁹. XBP1s, sólo o junto con ATF6 α , inicia un programa de transcripción para producir chaperonas y proteínas implicadas en la biogénesis de ER, la síntesis de fosfolípidos, la degradación de proteínas asociada a ER y la secreción desencadenada durante la UPR²⁹⁰.
- PERK: La activación PERK da como resultado la fosforilación del factor de iniciación de traducción eucariota 2a (eIF2a, *eukaryotic translation initiation factor 2a*), que convierte eIF2a en un competidor de eIF2b, lo que reduce la síntesis global de proteínas y por tanto la carga de trabajo del ER^{291, 292}. Esta rama también está involucrada en la regulación de la activación NF- κ B, implicado en la respuesta inflamatoria o del factor de transcripción activador 4 (ATF4, *activating transcription factor 4*) que es un inductor de la expresión de genes implicados en la apoptosis, tales como proteína homóloga C / EBP (CHOP, *homologous protein C / EBP*)²⁸³.

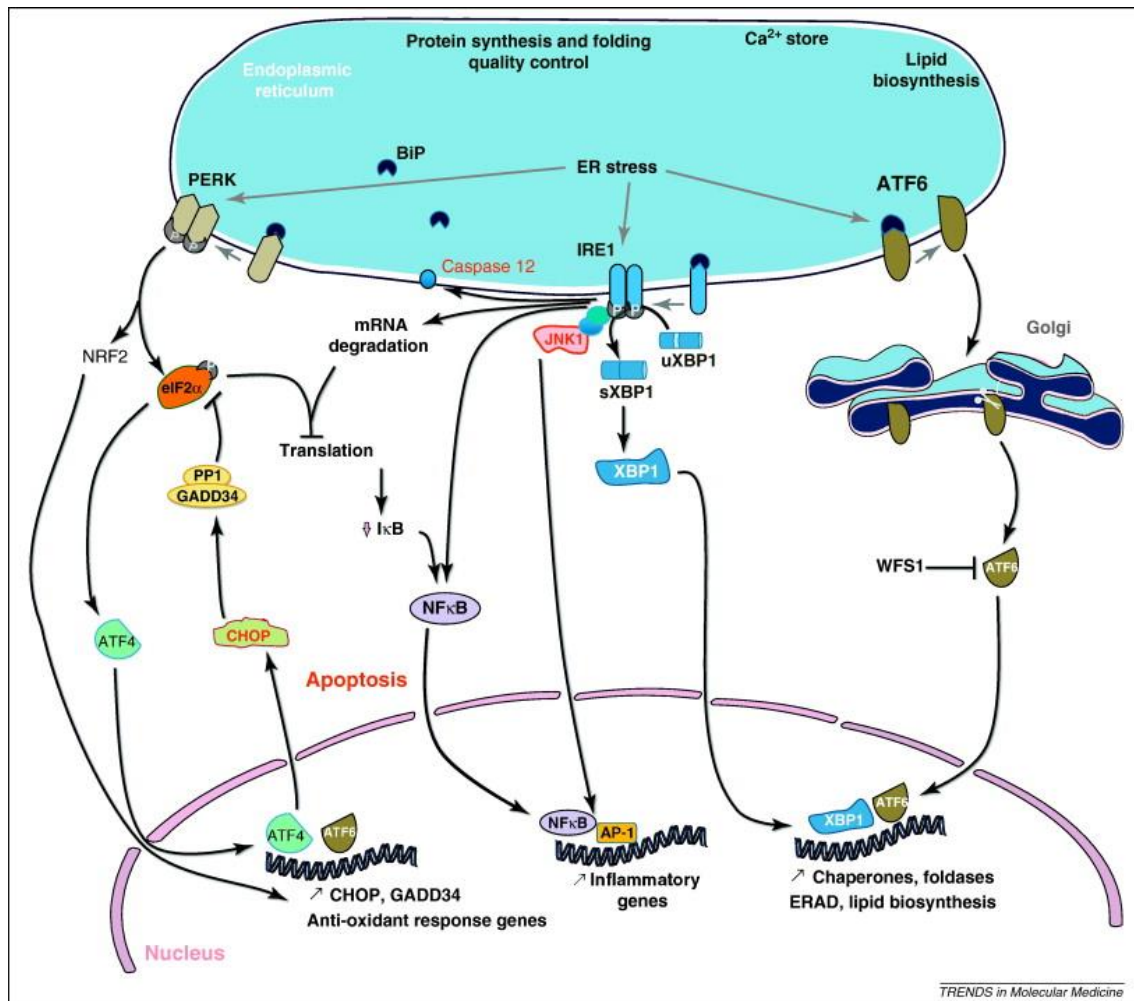


Imagen 9. Transducción de señal de estrés del retículo endoplasmático²⁹³. Imagen reproducida con permiso de Elsevier.

Si aun así el ER estrés no se resuelve y la célula está comprometida funcionalmente, se desencadenan mecanismos de apoptosis y muerte celular, como en el caso de la diabetes tipo 2, donde al incrementarse la demanda en las células β pancreáticas para producir insulina, la UPR conduce finalmente a la muerte de estas células²⁹⁴. Este mecanismo de regulación del ER estrés también interfiere con la señalización de insulina en el hígado²⁹⁵.

En el hipotálamo, en respuesta a una dieta alta en grasa, se activa la UPR y se ha demostrado que es causa y consecuencia de la vía inflamatoria de NF- κ B²⁹⁶. El ER estrés también está relacionado con la inhibición de la señalización de leptina e insulina a través de la inducción de la protein quinasa fosfatasa 1B (PTP1B, *protein tyrosine phosphatase 1B*)²⁹⁷. La administración central de fármacos que inducen estrés ER recapitula los efectos de una dieta alta en grasa en la vía IKK β / NF- κ B²⁹⁶ y las chaperonas que revierten el UPR cuando se administran centralmente inhiben el aumento de peso^{221, 296}.

5.2 INFLAMACIÓN HIPOTALÁMICA

Aunque el papel de la inflamación relacionada con la obesidad en los tejidos periféricos, particularmente en el WAT y el hígado ha sido muy bien documentado¹⁴, sólo recientemente

se ha comenzado a entender el importante rol que desempeña la inflamación hipotalámica en la regulación de la homeostasis energética. De hecho, se ha demostrado que la inflamación produce daño hipotalámico a partir del primer día de exposición a dieta alta en grasa²⁹⁸ y que esta inflamación inducida por dieta difiere de la causada por enfermedad²⁹⁹.

Numerosos factores influyen en la estimulación de las vías inflamatorias. Entre ellos se encuentran citoquinas proinflamatorias, virus y componentes bacterianos y factores como el estrés oxidativo y el ER estrés¹⁴. Estos pueden estimular a IKK β , que es una parte fundamental del complejo regulador encargado de la activación de la vía inflamatoria de NF- κ B. Así, IKK β favorece la liberación de NF- κ B, que entonces se dimeriza y entra en el núcleo donde regula la transcripción de varios genes relacionados con la inflamación^{14, 300}. La actividad de IKK β y la prevención del desarrollo de ER estrés es fundamental para el mantenimiento de la sensibilidad a la leptina²⁹⁶. IKK β es expresado en niveles relativamente altos en el hipotálamo y se activa bajo la exposición a obesidad, tanto inducida por dieta como genética, o a la estimulación de nutrientes como glucosa o lípidos. De hecho, se ha comprobado que la estimulación de la vía IKK β / NF- κ B, tanto por activación farmacológica como por la introducción de IKK β constitutivamente activa, causa obesidad e insensibilidad a la insulina y la leptina, mientras que su inhibición mantiene la sensibilidad a la insulina y la leptina y protege contra la obesidad²⁹⁶.

Otra vía inflamatoria es la mediada por JNK y TNF α . Se ha observado en roedores expuestos a dieta alta en grasa una regulación positiva de las citoquinas inflamatorias TNF α , interleucina 1 β (IL1 β , *interleukine 1 β*) e IL6 asociado a resistencia a insulina en el hipotálamo³⁰¹. El bloqueo de la vía inflamatoria en el hipotálamo con un inhibidor específico de JNK inhibió el aumento de masa grasa asociado a una dieta alta en grasa y restableció las vías de señalización de insulina, de forma independiente de ingesta. Sin embargo, la inhibición de la señalización por JNK no fue suficiente para revertir la insensibilidad a leptina en los individuos alimentados con dieta alta en grasa^{14, 301}. También se ha demostrado que TNF α inhibe en el hipotálamo los efectos anorexigénicos de la insulina y la leptina, de forma dependiente de dosis³⁰². A través de TNF α , la inflamación aumenta los niveles de PTP1B hipotalámico, que es un importante regulador negativo de la sensibilidad a la insulina y la leptina³⁰³⁻³⁰⁵.

5.3 AUTOFAGIA HIPOTALÁMICA

La autofagia es un proceso por el cual los componentes de la célula en exceso o defectuosos se degradan para mantener la actividad esencial y la viabilidad celular en respuesta a la limitación de nutrientes o como respuesta al estrés celular, particularmente, ER estrés y estrés oxidativo, ambos inducidos por sobrenutrición, para su descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes^{306, 307}. En el desencadenamiento de la autofagia en respuesta a la señalización de nutrientes juega un papel muy importante AMPK, que actúa como sensor de energía y regula el metabolismo celular para mantener la homeostasis energética. Por el contrario, la diana de rapamicina de mamífero (mTOR, *mammalian target of rapamycin*) que es regulador central del crecimiento celular, inhibe la autofagia (Imagen 10). Recientemente se ha demostrado que AMPK promueve la autofagia activando por fosforilación a la quinasa activadora de autofagia tipo Unc-51 (ULK1, *Unc-51 like autophagy activating kinase*), que es una quinasa iniciadora de la autofagia en mamíferos

en estado de hipoglucemia. Sin embargo, durante un estado nutricional adecuado mTOR previene la activación de ULK1, interrumpiendo la interacción entre AMPK y ULK1³⁰⁸.

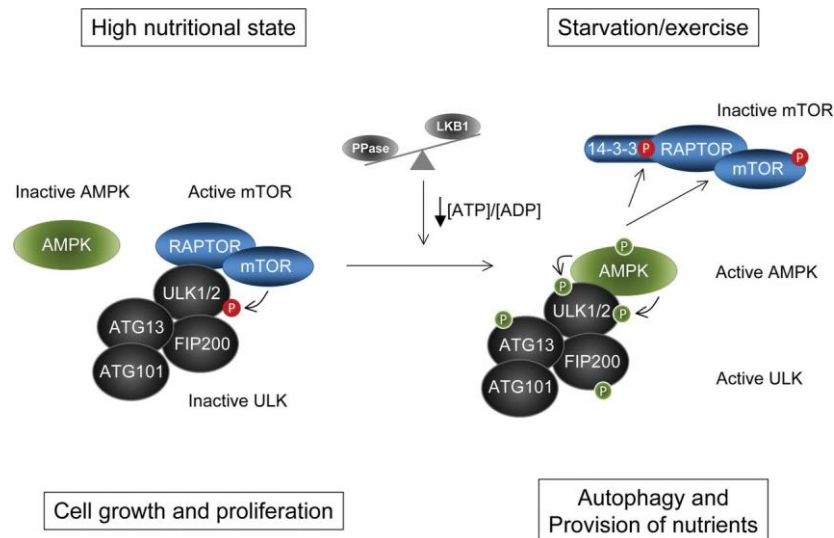


Imagen 10. Regulación de ULK por AMPK y mTOR en función del estado nutricional³⁰⁹. Licencia STM Permissions.

La autofagia también puede ser inducida por las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) que si continúan durante largos periodos de tiempo dan lugar a defectos en el mecanismo de autofagia, lo que anula la capacidad de la célula para eliminar el daño y puede activar la vía de señalización de IKK β / NF- κ B³¹⁰. Esto se comprobó mediante la eliminación de un gen clave para la autofagia (*Atg7*) en el hipotálamo mediobasal de ratones, que por defecto comían más y aumentaban de peso. Asociado a ello, presentaban una mayor activación hipotalámica de la vía IKK β / NF- κ B. La evidencia que demostró la relación entre el mecanismo de autofagia deficiente y la inflamación hipotalámica fue que al inhibir IKK β en estos ratones se revertía el efecto de la autofagia defectuosa^{14, 311}.

6 AMPK COMO SENSOR ENERGÉTICO

AMPK es una serina/treonina quinasa muy conservada desde levaduras a mamíferos. Es una proteína heterotrimérica que presenta una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . En mamíferos, cada subunidad es codificada por múltiples genes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) que resulta en 12 posibles combinaciones de complejos AMPK³¹². La subunidad α contiene el dominio serina/treonina quinasa N-terminal y un dominio regulador carboxi-terminal, involucrado en la formación del complejo con las subunidades β y γ . La subunidad β contiene un dominio C-terminal que actúa como un andamio para unir la subunidad γ y contiene un dominio de unión al glucógeno. Por último, la subunidad γ contiene un dominio de unión al AMP y ATP, que son los efectores alostéricos de la AMPK³¹³.

AMPK es un regulador fundamental de la ruta de síntesis de los ácidos grasos. Una vez activada, AMPK fosforila ACC, lo que produce su inhibición, y previene así la producción de

malonil-CoA. Esto estimula a CPT1 favoreciendo así la oxidación de los ácidos grasos mitocondriales³¹⁴⁻³¹⁶ (Imagen 11).

Cuando aumenta el ratio AMP:ATP, porque el consumo de ATP es mayor que su síntesis, el AMP se une alostericamente a AMPK y se produce la fosforilación de la treonina de la subunidad α , llevada a cabo por AMPK quinasa como la quinasa hepática B1 (LKB1, *liver quinasa B1*), la calcio/calmodulina quinasa quinasa 2 (CaMKK2, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2) o la quinasa 1 activada por TGF- β (TAK1, *TGF- β -activated kinase 1*)^{309, 313}. Cuando AMPK es fosforilada (pAMPK), se activa e inhibe los procesos anabólicos, que consumen energía, como la síntesis de ácidos grasos, gluconeogénesis, síntesis de proteínas, síntesis de colesterol y síntesis de triacilglicéridos³¹⁷⁻³²⁰, y promueve los procesos catabólicos como la oxidación de los ácidos grasos y aumenta la expresión de genes glucolíticos^{321, 322} para producir ATP y así restablecer el equilibrio del ratio AMP/ATP³¹². Además, AMPK recibe señales hormonales y nutricionales y mantiene la homeostasis energética al regular la ingesta, los ritmos circadianos y el gasto de energía tanto a nivel celular como de organismo completo^{316, 323-326}. De hecho, alteraciones en las funciones de AMPK se asocian con desordenes metabólicos y hormonales, resistencia a insulina, obesidad y enfermedades cardiovasculares.^{312, 315, 327-329}

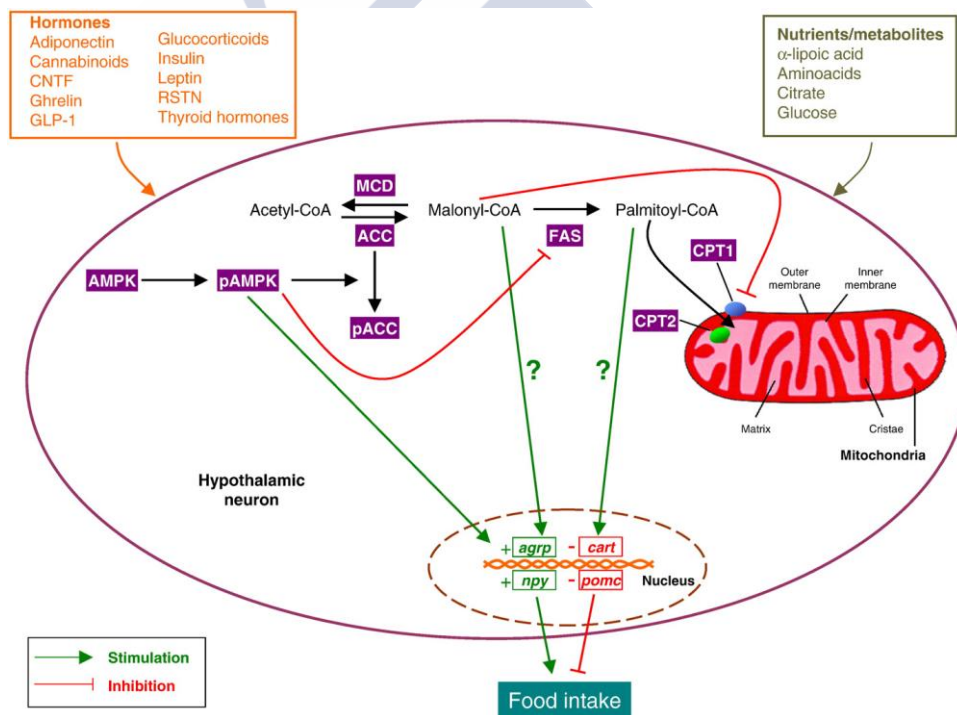


Imagen 11. Regulación de la lipogénesis de novo³³⁰. Imagen reproducida con permiso de Elsevier.

6.1 REGULACIÓN DE AMPK

La actividad AMPK está determinada por la relación AMP: ATP. Puede ser regulada también por la activación alostérica directa de AMP, la fosforilación reversible, ADP o la degradación por ubiquitinación. La activación alostérica de AMPK se ve afectada

específicamente por AMP y sus análogos^{331, 332}. AMPK es regulada principalmente por fosforilación, es necesaria la fosforilación en un residuo de treonina (Thr-172) en la subunidad catalítica α por una quinasa *upstream* sensible a AMP para su activación³³³. Se han identificado dos principales quinasas *upstream* involucradas en la fosforilación de AMPK: la quinasa supresora tumoral, LKB1 la principal quinasa para la fosforilación de AMPK en condiciones de estrés energético^{329, 334-337} y las CaMKK α o CaMKK β también llamadas CaMKK1 y CaMKK2, respectivamente; aumenta la fosforilación de AMPK en Thr-172^{338, 334}, aunque *in vivo*, la isoforma 2 parece ser más importante³³⁵. Se han identificado otros activadores de AMPK, como TAK1^{338, 339, 339, 340} y la quinasa supresora de Ras (KSR2, *kinase suppressor of Ras*) que interactúa con la subunidad $\alpha 1$ de AMPK, regulando su actividad³⁴¹. Al mismo tiempo, se ha observado que la proteína fosfatasa 2C α (PP2C α , *protein phosphatase 2C alpha*) inhibe AMPK mediante una desfosforilación³⁴²⁻³⁴⁴ (Imagen 12).

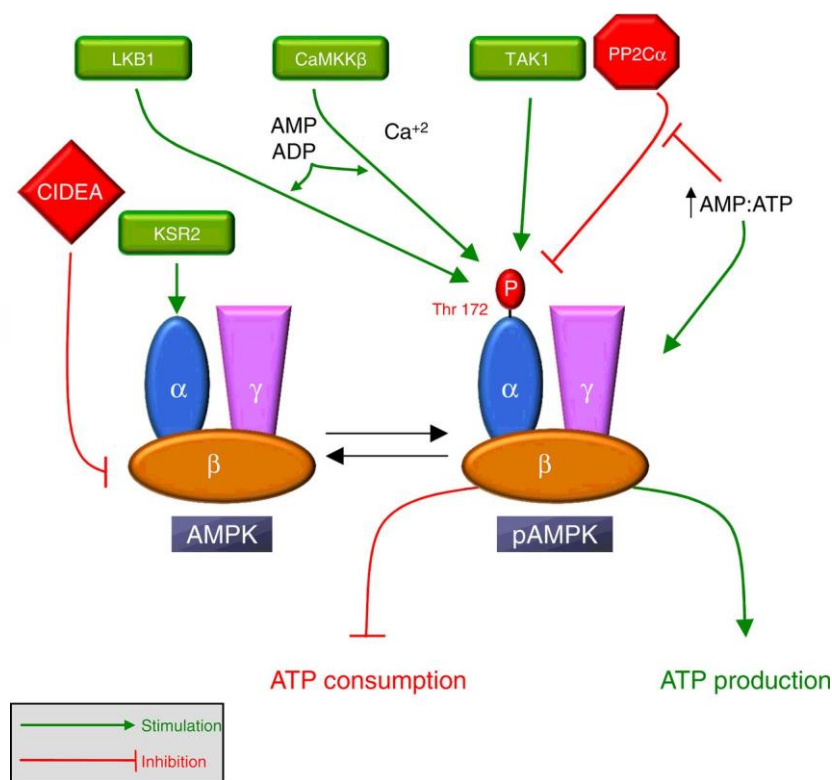


Imagen 12. Mecanismos de regulación de AMPK³⁴⁵. Licencia STM Permissions.

Se han propuestos varios mecanismos de modulación de la actividad de AMPK: (1) Un mecanismo de regulación dependiente de AMP mediante el cual AMPK es activado alostericamente por AMP, que a su vez inhibe PP2C α , lo que produce un aumento en la fosforilación en Thr-172 y por tanto su activación^{312, 346}; (2) un mecanismo dependiente de Ca^{2+} e independiente de AMP, por el cual el aumento de Ca^{2+} induce la activación de CaMKK β , que incrementa la fosforilación en Thr-172 y se activa AMPK³⁴⁶; y (3) un mecanismo inhibitorio mediado por ubiquitinación, que conduce a la degradación de AMPK después que se forme un complejo entre el efector A inductor de muerte celular por fragmentación de DNA (CIDEA, *cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector A*) y la subunidad reguladora β (Qi et al., 2008).

6.2 AMPK EN EL HIPOTÁLAMO

AMPK está presente en los principales núcleos hipotalámicos encargados del balance energético³²³, las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ de AMPK están altamente expresadas en el ARC, PVH, VMH y LHA³¹⁶. La modulación de la actividad de AMPK en el hipotálamo es uno de los cambios moleculares más evidentes observados durante los mecanismos fisiológicos de la regulación de la ingesta. El ayuno incrementa su actividad, mientras que la ingesta la reduce^{19, 323, 328}. Asimismo, la activación de AMPK en el hipotálamo incrementa la ingesta y la ganancia de masa corporal, mientras que su inhibición promueve la hipofagia y la pérdida de masa^{124, 323, 328}. Estos efectos están relacionados con las variaciones en los niveles circulantes de nutrientes y de las hormonas involucradas en la regulación de balance energético. Así, en condiciones de ayuno, la activación de AMPK por ghrelin o hipoglucemia, provocará la fosforilación y consiguiente inactivación de ACC, inhibiendo así la síntesis de ácidos grasos¹⁹. Además, las alteraciones en la actividad de esta enzima están asociadas a cambios en la expresión de los neuropéptidos hipotalámicos³²³. La activación de AMPK en el VMH, el ARC y el PVH parece desempeñar un papel importante en la detección de los niveles de glucosa induciendo su regulación³⁴⁷. Numerosos metabolitos modulan la función de AMPK en el hipotálamo. La glucosa^{323, 348}, el ácido lipoico, los ácidos grasos, el citrato, el lactato y aminoácidos disminuyen la ingesta inhibiendo la actividad de AMPK, ACC y provocando un aumento en la concentración de malonil-CoA, que actúa como señal anorexigénica en el hipotálamo³¹⁶.

La actividad de AMPK también puede ser modulada por hormonas anorexigénicas y orexigénicas. Supresores de apetito como leptina, insulina, glucagón, GLP1, E2, CKK, factor neurotrófico ciliar y proteína relacionada con la angiopoyetina inhiben AMPK en el hipotálamo³¹⁶. Sin embargo los inductores de la ingesta como ghrelin, adiponectina, glucocorticoides, canabinoides y AgRP³¹⁶ activan AMPK. En cambio, la resistina que tiene efecto anorexigénico, activa AMPK en el hipotálamo^{316, 349}.

La ingesta también puede ser regulada por agentes farmacológicos como los agonistas de los receptores de melanocortina, el inhibidor de FAS C75 y la nicotina a través de la inhibición de AMPK hipotalámica^{207, 208, 323, 350}. Por el contrario, fármacos como el antipsicótico olanzapina, que ejerce efectos orexigénicos e induce obesidad, activa AMPK hipotalámica^{316, 351}.

La inhibición de AMPK en el hipotálamo usando isoformas dominante negativas disminuye la expresión de mRNA de AgRP y NPY en el ARC. Mientras que su sobreexpresión aumenta todavía más los niveles de AgRP e NPY en el ARC y MCH en el LHA durante el ayuno³²³. Estos resultados sugerían que la modulación de AMPK en el hipotálamo podría mostrar efectos núcleo-específicos, lo que se demostró con la observación de que ratones deficientes de la isoforma $\alpha 2$ en las neuronas POMC exhibían obesidad provocada por hiperfagia³⁵². En cambio, la deficiencia de esta isoforma en neuronas AgRP inducía un fenotipo delgado que era además dependiente de la edad³⁵².

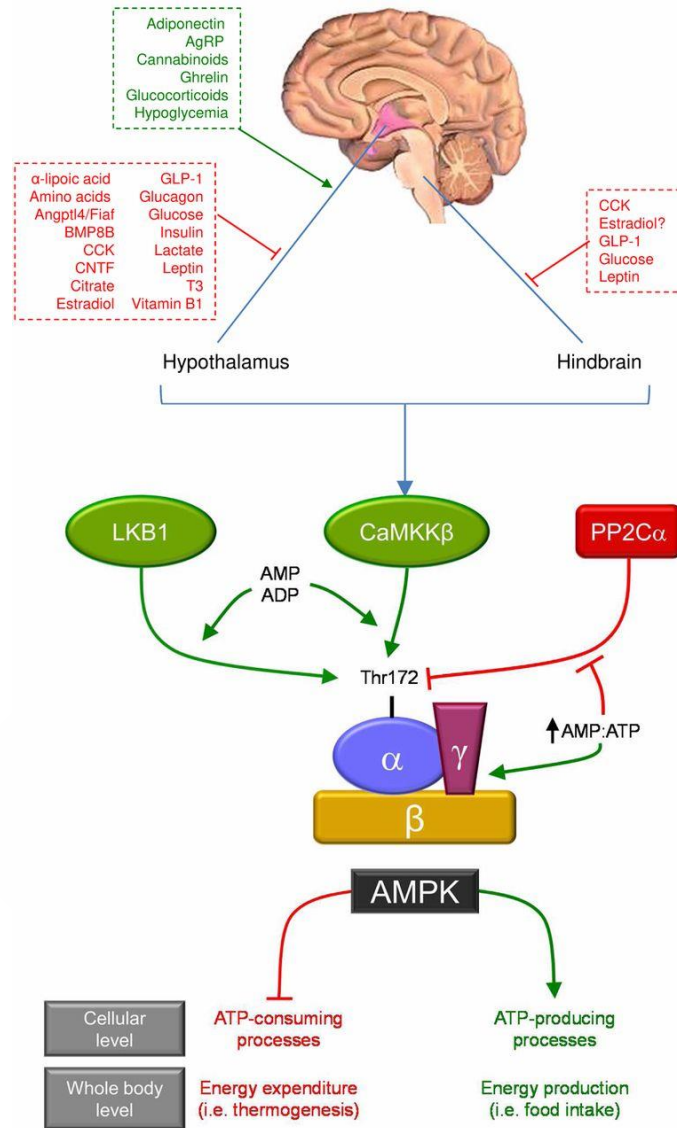


Imagen 13. Estructura, regulación y rol de AMPK en el balance energético ³⁵³. Licencia Creative Commons.

6.3 AMPK Y GASTO ENERGÉTICO

En los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de evidencia que sugiere el papel regulador de AMPK sobre la termogénesis del BAT a través de la modulación del SNS. Estudios realizados con ratones KO han mostrado la implicación de la isoforma $\alpha 2$ en la regulación de la activación del BAT. Así, los ratones KO para $\alpha 2$ mostraban niveles de secreción urinaria de catecolaminas elevados, lo que es indicativo de hiperactividad del SNS ³⁵⁴. A su vez se observó que $\alpha 2$ mediaba la disminución de peso corporal y protegía frente a la obesidad inducida por dieta en ratones deficientes para la tirosina fosfatasa 1B ³⁵⁵, que es un inhibidor de la señalización de los IR e LEPR, probablemente debido al aumento de la activación de la termogénesis (aunque no fue demostrado), de la biogénesis mitocondrial y oxidación muscular, que contribuyen al aumento del gasto energético, la delgadez y la resistencia a la obesidad inducida por la dieta ³⁵⁵.

AMPK también media los efectos de las TH en el gasto energético. Se ha observado que la inyección de triiodotironina (T3, *triiodothyronine*) directamente en el VMH inhibe AMPK en este núcleo, promoviendo un aumento en la termogénesis y un incremento en la actividad del SNS al BAT^{203, 212}. Igualmente, se ha observado un efecto similar producido por el E2, que actúa en del VMH inhibiendo AMPK a través del ER α , lo que da lugar a la activación de la termogénesis²⁰⁴. Al sobreexpresar AMPK en animales tratados centralmente con T3 o E2 se reducía la activación del BAT y se prevenía la pérdida de peso^{203, 204}. Parece que este es un mecanismo canónico para la modulación del gasto energético, ya que otras señales como la proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B, *bone morphogenetic protein 8B*),^{93, 206, 210, 356}; así como la leptina³⁵⁷ ejercen sus efectos a través del eje AMPK(VMH)-SNS-BAT¹⁰⁰. La adiponectina y la resistina activan AMPK y reducen la termogénesis del BAT^{349, 358-362}; pero si lo hacen a través de AMPK en el VMH todavía no se ha comprobado. De manera similar, la administración de nicotina induce un aumento de la termogénesis y una pérdida de peso mediante el mismo mecanismo^{207, 208}. Liraglutide, un análogo de GLP1, también inhibe la actividad de AMPK en el hipotálamo y activa el BAT y el *browning* del WAT a través de SNS, disminuyendo el peso corporal²²².

6.4 AMPK Y HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

En situación de hipoglucemia AMPK juega un papel fundamental en la homeostasis energética actuando como sensor de glucosa³³². La administración ICV de glucosa disminuye la actividad hipotalámica de AMPK, mientras que la inhibición de la utilización de glucosa intracelular en el cerebro la aumenta^{363, 364}. AMPK está implicada en la respuesta hormonal contrarreguladora a través del glucagón, la epinefrina y la corticosterona^{347, 364-366}, en cambio al inhibir AMPK en el hipotálamo mediobasal se altera la secreción de estas señales lo que produce una hipoglucemia grave y prolongada^{347, 365}. Por el contrario, la activación de AMPK en VMH reduce la sensibilidad a la insulina³⁶⁵, aumenta los niveles de las hormonas contrarreguladoras y estimula la actividad neuronal en las neuronas sensibles a la glucosa en el VMH³⁶⁷.

Asimismo, AMPK en el hipotálamo también media otras señales que controlan la producción de glucosa, como la leptina que normaliza los niveles de glucosa en sangre en modelos de roedores de diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 y en pacientes con lipodistrofia^{280, 368} o la fructosa, que estimula AMPK en la LHA, ARC y PVH y aumenta la gluconeogénesis³⁶⁹. Por otra parte, estudios realizados con clamps hiperinsulinémicos-glucémicos se ha observado que la inhibición de AMPK hipotalámica reduce la producción de glucosa sin que haya cambios en su captación³⁷⁰. Además, se observó que ratones deficientes en LKB1 en las neuronas POMC mostraban una deficiente homeostasis de la glucosa³³⁶. AMPK no sólo modula la homeostasis de la glucosa en el hipotálamo. Las neuronas GABAérgicas que expresan el transportador de glucosa 2 en el NTS, responden a la hipoglucemia al aumentar la actividad de AMPK³⁷¹. Estas neuronas envían proyecciones al núcleo motor dorsal del vago, lo que aumenta el tono del PSNS y consecuentemente la secreción de glucagón para contrarrestar la hipoglucemia³⁷¹.

A nivel periférico, fármacos como la metformina induce la activación de AMPK y actúa reduciendo los niveles de glucosa en sangre, principalmente mediante la inhibición de la gluconeogénesis³⁷², pudiendo interactuar con GLP1 para reducir la producción de glucosa hepática³⁷³. Finalmente, la metformina también ayuda a restablecer la sensibilidad a insulina

debido a que produce alteraciones en el metabolismo lipídico hepático, ya que la activación de AMPK inhibe la ACC hepática ³⁷⁴.

La evidencia actual indica que AMPK como sensor de energía desempeña en el hipotálamo un papel fundamental en la regulación del balance energético modulando la ingestas, el gasto energético y la homeostasis de la glucosa, así como la resistencia a la leptina ^{375, 376}. La vía de AMPK hipotalámica se ha propuesto como una vía canónica que regula el metabolismo corporal, mediante la integración de señalización periférica y central. Es importante resaltar que varios tratamientos antiobesidad y / o antidiabéticos, como la metformina y la liraglutida, llevan a cabo algunas de sus acciones a través de AMPK. Esto, convierte a esta enzima en una interesante diana para el desarrollo de fármacos, debido a su potencial para modular ambos lados de la ecuación del balance energético, es decir, la ingesta de alimentos y el gasto energético ³⁵³. Sin embargo, hasta ahora no está claro 1) si la inhibición específica de la AMPK hipotalámica podría aliviar la obesidad, 2) qué isoforma AMPK sería el mejor objetivo, y 3) qué población neuronal que expresa AMPK debería ser el objetivo.





OBJETIVOS





Dado el relevante papel de AMPK hipotalámica como sensor de energía modulando el gasto energético y la ingesta, así como la homeostasis de la glucosa, los objetivos de este trabajo fueron:

1) Estudiar el efecto de la manipulación de las distintas isoformas de AMPK en el hipotálamo sobre la masa corporal en machos, tanto en modelos normopeso como en modelos de obesidad inducida por dieta

2) Estudiar la relevancia de AMPK en distintas poblaciones hipotalámicas en relación con la regulación del balance energético

3) Generar y caracterizar fenotípicamente un ratón deficiente de AMPK α 1 en neuronas SF1 del VMH, tanto en dieta normal como en dieta rica en grasa





MATERIALES Y MÉTODOS





7 MODELOS ANIMALES Y CUIDADOS

7.1 CONSIDERACIONES LEGALES Y ÉTICAS

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales efectuados durante la realización de esta tesis se llevaron a cabo bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela y han sido aprobados previamente por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de La Coruña (competente para dictar dicha resolución en base al Decreto 245/2009 del 3 de abril por el que se regulan las delegaciones territoriales da Xunta de Galicia y el Decreto 46/2012 del 19 de enero por el que se establece la estructura orgánica de la Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria) cuya persona responsable es Miguel A. López Pérez y realizados bajo los números de procedimientos: ID 15005AE/10/FUN/FISIO2/MLP2 (bajo el cumplimiento del RD 1201/2005 del 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos) y el ID 15010/14/006 (bajo el cumplimiento del actual y vigente RD 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), de acuerdo a la legislación vigente: Ley 30/1992 del 26 de noviembre del régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común, modificada por la Ley 4/1999, del 14 de enero, por la que se establece que la resolución que proponga fin al procedimiento decidirá todas las cuestiones expuestas por los interesados y aquellas otras derivadas de este; el Decreto 296/2008 del 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el ‘Registro de centros de cría’, de suministradores y usuarios y la ‘Comisión Galega de Benestar de los Animales de Experimentación’; orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el ‘Comité de Bioética da Consellería Rural’; Decreto 153/1998 del 2 de abril por lo que se aprueba el reglamento que desarrolla la Ley 1/1993 del 13 de abril (protección de animales domésticos y salvajes en cautividad); Ley 32/2007 del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte y sacrificio; siguiendo también la Directiva Europea de Experimentación Animal (2010/63/UE).

Durante la realización de esta tesis se tuvo en cuenta el artículo 4 del real decreto 53/2013 (Principio de reemplazo, reducción y refinamiento) que tiene como finalidad principal asegurar que el número de animales utilizados en los procedimientos se reduzca al mínimo y que no se les cause innecesariamente dolor. En consecuencia, se intentó evitar la duplicación innecesaria de experimentos y reducir al máximo dentro de cada grupo experimental sin llegar a comprometer la finalidad del estudio, teniendo en cuenta posibles resistencias a tratamientos y la variabilidad intraespecífica y poniendo especial cuidado en el bienestar animal para reducir el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en los animales.

7.2 MODELOS ANIMALES

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron:

1) Rata macho común (*Rattus Norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley suministrados por el Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela, con una masa corporal de unos 250 gramos aproximadamente (9-11 semanas).

2) Ratones macho knock-out para el gen AMPK α 1 en tejidos que expresan SF1 generados expresamente para esta tesis (ver detalle en Procedimientos no quirúrgicos)

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

Durante todo este tiempo, los animales fueron mantenidos en condiciones de acceso libre a dieta estándar y a agua, con excepción de aquellos procedimientos experimentales en los que se especifique. Para verificar el correcto bienestar de los animales, estos fueron monitorizados periódicamente mediante un seguimiento controlado de masa corporal e ingesta, además de valorar su correcto aspecto físico, acostumbrarlos al manejo por el personal de laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés generado durante los experimentos llevados a cabo.

La estabulación de los animales fue colectiva o individual en función de las características de cada procedimiento y siempre teniendo en cuenta el comportamiento social de estos animales. Así en la mayoría de los experimentos en los que se requirió un seguimiento de la masa corporal o ingesta, se estabularon individualmente, pero nunca por períodos superiores a 10 días.

8 ANESTESIA Y ANALGESIA

Como paso previo a cada procedimiento quirúrgico, se inoculó a los animales anestesia general intraperitoneal (IP). La composición de la anestesia fue de 42.5% de ketamina (*Imalgene 1000 inyectable*, Merial, Barcelona, España), 20% de xilacina (*Rompun 2%*, Bayer Health Care, Berlin, Alemania) y 37.5% de suero fisiológico (*Suero fisiológico isotónico*, Phsysan, Madrid, España) para rata. Se utilizó una dosis de 200 $\mu\text{l}/100\text{ g}$ para rata. Para ratón la composición de la anestesia fue 13.8% de ketamina, 3.45% de xilacina y 82.75% de suero salino y la dosis fue de 100 $\mu\text{l}/10\text{ g}$ de masa corporal. Para comprobar el estado de anestesia de cada individuo, se determinó el reflejo podal y palpebral, su ausencia indica que se puede proceder al procedimiento quirúrgico. Tras los procedimientos quirúrgicos los animales fueron tratados con ketoprofeno como medida de analgesia (*Ketoprofeno-Orudis 100 mg*, Sanofi-aventis, Barcelona, España) por vía subcutánea (SC), administrando unos 2,5 mg por Kg de masa corporal.

9 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

9.1 VÍA INTRAPERITONEAL (IP)

Esta vía fue utilizada para la administración de la anestesia (dosis detallada en la sección anterior) y otros reactivos como glucosa e insulina. La administración intraperitoneal se realiza en la parte ventro-caudal de la rata por debajo de peritoneo. Se sujeta al animal por la espalda oprimiéndole ligeramente las extremidades anteriores para inmovilizarlo. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras y se inserta la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgicals Systems*) acoplada a una jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems*) prácticamente de manera perpendicular a este, preferiblemente por su costado derecho.

9.2 VÍA SUBCUTÁNEA (SC)

Esta vía de administración no requiere anestesia y se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata. Se pellizca la piel del lomo del animal y con la misma mano se inmoviliza este, con la otra mano se introduce la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgicals Systems*) acoplada a una jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgicals Systems*) de forma paralela a la columna vertebral.

9.3 VÍA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta vía de administración requiere anestesia general del animal. En este caso, la administración se realiza bilateralmente en diferentes núcleos hipotalámicos mediante el uso de coordenadas concretas para cada núcleo, utilizando el bregma como punto de referencia para la obtención de las coordenadas estereotáxicas antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV), seleccionadas siguiendo las indicaciones del atlas estereotáxico de cerebro de rata y de ratón^{377, 378}. Siguiendo las indicaciones del atlas, las coordenadas de los núcleos hipotalámicos estudiados fueron las siguientes:

- Núcleo ventromedial en rata: -2,85 mm AP; $\pm 0,6$ mm L; 10,1 mm DV.
- Núcleo ventromedial en ratón: -1,7 mm AP; $\pm 0,5$ mm L; -5,5 mm DV.

Una vez anestesiado el animal se inyecta la sustancia de interés mediante la utilización de un aparato de estereotaxia (*David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA*) (ver en más detalle en Procedimientos quirúrgicos) y jeringuillas de microinyección (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1 μ l calibre 25 para rata y Hamilton, NeuroHamilton Modelo 7001KH NeuroSyringe, en el caso de ratón*), con un flujo de inyección de 200 nl/min durante 5 minutos en el caso de ratas y 10-15 minutos en el caso de ratón.

10 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

10.1 GENERACIÓN DE RATONES KNOCK-OUT CONDICIONALES SF1 AMPK α 1

Para generar el ratón knock-out de AMPK α 1 específico en las neuronas positivas para el factor esteroideogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*) (SF1-Cre AMPK α 1^{flox/flox}), se cruzaron ratones SF1 Cre (Tg(Nr5a1-cre)Lowl/J, número de stock 012462; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) con ratones AMPK α 1 floxeados (AMPK α 1^{flox/flox}, Prkaa1tm1.1Sjm/J; número de stock 014141; The Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME, USA) que poseen sitios loxP flanqueando el exón 3 del gen Prkaa1. Se estableció una colonia de cría manteniendo cruces entre ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} y AMPK α 1^{flox/flox}.

Los ratones SF1 Cre expresaban Cre recombinasa bajo la dirección del promotor de ratón del receptor nuclear subfamilia5, grupo A, miembro 1 (*Nr5a1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*). El patrón de actividad de 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, así como en la hipófisis, gónadas y tejido adrenal. Los animales empleados eran homocigotos para el inserto transgénico, viables y fértiles, de tamaño normal y no mostraban ninguna anomalía física o de comportamiento grave. Al cruzar con una cepa de ratones mutantes para el gen de la subunidad catalítica alfa 1 de la proteína AMPK (*Prkaa1*) que poseían secuencias loxP que flanquean el exón 3 de este gen, la recombinación mediada por Cre resultó en la eliminación tejido-específica del exón 3 en la descendencia. Se utilizaron ratones mutantes homocigotos para el alelo Prkaa1, los cuales eran viables, fértiles, normales de tamaño y no mostraban ninguna anomalía física o de comportamiento grave.

Para los estudios realizados en esta tesis se emplearon los ratones CKO macho y como como controles se usaron los hermanos de camada con el mismo fondo genético mixto. Para seleccionar el genotipo apropiado como control se realizó un seguimiento de todas las combinaciones genéticas para descartar posibles efectos sobre los parámetros estudiados de los distintos genotipos generados en la descendencia. Una vez descartadas posibles anomalías se seleccionó el genotipo AMPK α 1^{flox/flox} basándonos en su amplio uso como control en este tipo de modelo en la bibliografía^{158, 277, 379}. Se genotiparon por PCR (*Ver PCR para genotipado en sección Materiales y Métodos*). El alelo eliminado produce un producto de amplificación de 530 pb.

10.2 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y DE LA MASA CORPORAL

La determinación de la masa corporal y la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión, las medidas se realizaron diariamente en la misma franja horaria (aproximadamente 8-10 a.m), excepto el registro de masa corporal de ratones durante 20 ó 34 semanas, que se registró semanalmente. Para el control de ingesta en este caso, los ratones se estabularon individualmente durante la décima semana y la ingesta se midió diariamente durante 7 días.

10.3 MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

El fenotipado metabólico se llevó a cabo mediante un sistema de calorimetría indirecto. Este sistema está compuesto de jaulas individuales con un sistema de ventilación cerrado y sensores que registran el EE, el coeficiente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*) y la actividad locomotora (LA, *locomotor activity*) (*LabMaster*; *TSE Systems*; Bad Homburg, Germany). El sistema fue calibrado con gases de referencia (20.9% O₂, 0.05% CO₂ y 79.05% N₂) y se introdujo a los animales en una caja con temperatura controlada (24°C) en la que se bombeaba el aire. Los animales estuvieron en adaptación una semana antes de comenzar las mediciones. La tasa metabólica se midió durante 2-3 días. El EE, RQ (VCO₂/VO₂) y la LA se registraron cada 30 min.

10.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Para la medición de la composición corporal, se usó resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) (*Whole Body Composition Analyzer*; *EchoMRI*; Houston, TX). *EchoMRI* es un analizador de composición corporal para sujetos vivos que mide la masa grasa y magra con tiempos de escaneado cortos para mantener el bienestar animal. Los animales no necesitan ser anestesiados ni ninguna otra preparación especial antes de la medición. Se introdujeron en un adaptador apropiado para el tamaño de animal para realizar la medición (tiempo de medición-. 0.5-3.2 minutos). Se tomaron 2 mediciones por animal y se utilizó la promedio de ellas para el cálculo del porcentaje de masa grasa y magra por peso total de animal.

10.5 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL

Para el registro de la temperatura corporal se utilizó una sonda rectal conectada a un termómetro (*BAT-12 Microprobe-Thermometer*; *Physitemp*, Clifton, NJ). Las medidas se tomaron con el animal despierto y parcialmente inmovilizado.

10.6 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DEL BAT

Para adquirir imágenes de temperatura del BAT se afeitó la zona interescapular del animal el día anterior. 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, UK) y analizó con un software específico (*FLIR-Tools-Software*, *FLIR*; West Malling, Kent, UK). Para cada imagen, se delimitó el área del BAT y temperatura media del BAT se calculó como el promedio de 2 imágenes por animal.

10.7 TEST DE DISIPACIÓN DE TEMPERATURA

Para estudiar la posible implicación de la disipación de temperatura por la cola en la regulación de la temperatura, se midió la temperatura máxima de la base de la cola a ratones aclimatados a una temperatura inferior a la termoneutralidad (25°C), en termoneutralidad (30°C) o superior a la termoneutralidad (34°C) en días separados (3-4 días de intervalo) utilizando una cámara térmica. Asimismo, se midió la temperatura rectal utilizando una sonda

rectal conectada a un termómetro. Para la aclimatación a la temperatura indicada se introdujo a los animales en una plataforma con paredes elevadas con la temperatura controlada, en la cual los animales se podían mover libremente. Después de 10 minutos de aclimatación se tomaron las imágenes térmicas y la temperatura rectal. La media de temperatura del BAT se calculó como la media de la temperatura máxima de dos imágenes por cada animal.

10.8 TEST DE TOLERANCIA AL FRÍO

El día del experimento se estableció los animales en una cámara fría a 4°C durante 6 horas. Se midió la temperatura rectal basal antes de introducirlos en la cámara (*BAT-12 Microprobe-Thermometer*; Physitemp, Clifton, NJ) y posteriormente cada 60 min. Cuando se observaron diferencias de temperatura rectal se obtuvieron imágenes térmicas del área del BAT.

10.9 TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA E INSULINA

Para conocer la capacidad del metabolismo de los ratones para tolerar la glucosa y el grado de resistencia a insulina se realizaron test de tolerancia a glucosa e insulina. Para el test de tolerancia a glucosa se sometió a los animales a un ayuno 12h, pero no así para el test de tolerancia insulina. Antes de comenzar el test se recogieron los valores basales mediante la toma de una muestra de sangre de la cola, usando una tira reactiva conectada a un glucómetro. Posteriormente se inyectó IP según el peso del animal, D-glucosa (2 mg/kg para animales en dieta estándar- 1mg/kg para animales en dieta alta en grasa) o insulina (0.75U/kg). Se midió la glucosa circulante a través de la cola a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. Con los datos obtenidos se construyó una curva de la cual se calculó el Área Bajo la Curva (AUC) de los distintos grupos experimentales como el promedio del AUC de cada individuo.

10.10 PET-CT

Reactivos

La 2-18F-Fluoro-2-Deoxy-2-Glucosa (18F-FDG) se sintetizó en un sintetizador TRACERlab MX synthesizer (*GE Healthcare*; Little Chalfont, UK) siguiendo el método estándar proporcionado por el proveedor (sustitución nucleofílica) utilizando casetes y kits de reactivos ABX (*Advanced Biochemical Compounds*, Radeberg, Germany). El producto final presentó una pureza radioquímica de más del 95% con una especificidad próxima a 1000 Mbq/ml y una osmolaridad alrededor de 200-300 mOsm/kg.

Adquisición de imágenes

Se anestesió a los animales en una cámara de anestesia con una mezcla gaseosa de isoflurano 2.5% en oxígeno previo a la inyección de (7.4±1.85) MBq of 18F-FDG en la vena de la cola. Se interrumpió la anestesia inmediatamente después de la inyección y durante el periodo de absorción los animales se mantuvieron despiertos en su caja de estabulación. Se realizó la adquisición de imágenes 45±10 minutos después de la inyección de 18F-FDG. Nuevamente se anestesió a los animales con isoflurano 2.5% en oxígeno en una cámara de anestesia, aproximadamente durante 2 minutos y después se transportaron a la cama del escáner, donde se mantuvieron dormidos bajo una concentración de isoflurano 2% en

oxígeno. Se escaneó el cuerpo entero del animal durante 30 min y se obtuvieron imágenes de 2 posiciones del animal. Las imágenes se generaron usando el software Bruker Albira Suite Software Version 5.0. Las coincidencias dispersas y aleatorias fueron corregidas usando algoritmos proporcionados por el fabricante. No se realizaron correcciones de atenuación. Las imágenes se reconstruyeron usando el algoritmo de Maximum-likelihood expectation-maximization (MLEM): se realizaron 6 interacciones con un tamaño de pixel de salida de $0.4 \times 0.4 \times 0.4$ mm³.

Análisis de imágenes y estadística

Para calcular los valores de absorción estandarizados (SUV, *standardized uptake values*) se delineó el área del BAT usando herramientas implementadas en el software AMIDE Software (<http://amide.sourceforge.net/>) para generar un volumen tridimensional esférico de interés con un radio de 6 mm y centrado en el área del BAT. (*Protocolo experimental realizado por Unidad de Imagen Molecular del departamento de medicina Nuclear de la Universidad de Santiago de Compostela*).

11 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

11.1 ESTEREOTAXIA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Esta técnica se realizó en aquellos animales donde el procedimiento experimental requería la inoculación de sustancias en núcleos específicos del hipotálamo.

Tras la anestesia general de los animales se les realizó un corte transversal en la piel de la cabeza para exponer el cráneo. Se separó la piel con la ayuda de una pinza mosquito para mantener visible el plano quirúrgico y se eliminó el tejido subcutáneo para exponer la zona circundante al bregma. Se tomaron las coordenadas del bregma como punto de referencia para la posterior localización de las coordenadas estereotáxicas y se posicionó al animal en el equipo de estereotaxia (*David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA*). Usando las coordenadas del bregma como referencia se calcularon para los distintos núcleos de la siguiente manera:

- En el caso de rata: en el VMH se realizaron dos inyecciones en cada hemisferio cerebral siguiendo las siguientes coordenadas: eje antero-posterior: 2,4-3,2 mm; eje lateral: 0,6 mm; eje dorso-ventral: 10,1 mm.
- En el caso de ratón: en el VMH se realizó una inyección en cada hemisferio cerebral siguiendo las siguientes coordenadas: eje antero-posterior: 1,7 mm; eje lateral: 0,5 mm; eje dorso-ventral: 5,5 mm.

Posteriormente, se perforó el cráneo en cada punto de las coordenadas con una broca quirúrgica y se procedió a la inyección del tratamiento. En cada inyección se inoculó 1µl de sustancia durante 5 minutos para el caso de ratas y 10-15 minutos para el caso de ratones (velocidad de administración: 200 nl/min). Una vez realizada la inoculación se procedió a suturar el corte en la piel con seda de sutura (*Ethicon Mersilk Soie, Special 2-0* (para ratas) o

4-0 (para ratón), Johnson and Johnson Company, Alemania) y se estabularon los animales de forma individual.

11.2 REGISTRO DE LA ACTIVIDAD SIMPÁTICA

El registro multi-fibra de la actividad de los nervios simpáticos se obtuvo del nervio que inerva el BAT. Para ello se anestesió a los animales mediante administración i.p. ketamina (91mg/kg) y xilacina (9.1 mg/kg) y posteriormente se mantuvieron anestesiados con α -cloralosa (dosis inicial: 25mg/kg, dosis sostenida: 50 mg/kg/h) mediante un catéter insertado en la vena femoral. Se canuló la tráquea para que los animales pudiesen respirar espontáneamente aire enriquecido en oxígeno. La temperatura rectal se mantuvo en 37.5°C usando una mesa de cirugía con temperatura controlada y una lámpara. Bajo un microscopio de disección, se identificaron fibra de inervación del BAT y se colocaron cada una en un electrodo bipolar de platino-iridio. Cada electrodo fue anclado a una sonda de alta impedancia (*HIP-511*, Grass Instruments, Warwick, RI, USA) y la señal del nervio fue amplificada 10^5 veces con un pre-amplificador (*HIP-511*, Grass Instruments, Warwick, RI, USA). Después de la amplificación, la señal nerviosa fue filtrada a 100- y 1000-Hz con un sistema de análisis de señales nerviosas (*nerve traffic analysis system*) (*Model 706C*, University of Iowa Bioengineering; Iowa City, IA, USA). La señal nerviosa fue entonces dirigida a un osciloscopio (*Model 54501A*, Hewlett-Packard; Palo Alto, CA, USA) para monitorizar la calidad del registro nervioso simpático y a un integrador de reseteo de voltaje (*Model B600c*, University of Iowa Bioengineering, Iowa City, IA, USA). Las mediciones basales se realizaron cada 30 min. Para asegurar que el ruido eléctrico fue excluido de la valoración del flujo simpático, se corrigió cada registro por la actividad de fondo post-mortem. (*Protocolo experimental realizado por el Dr. Kamal Rahmouni, Departments of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, 52242, USA*)

11.3 DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

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

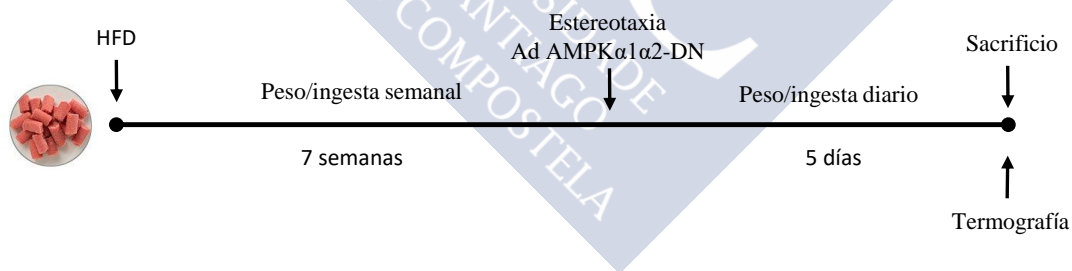
12 DISEÑOS EXPERIMENTALES

12.1 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS AMPK α 1 α 2-DN EN RATAS ALIMENTADAS CON HFD

Para determinar el efecto de la inhibición de AMPK α en el VMH en ratas alimentadas con HFD, después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada al animalario, las ratas fueron divididas en 2 grupos (n =20) con acceso libre a comida, un grupo fue alimentado con comida HFD (45% de las Kcal provenientes de grasa, 4.73 Kcal/g; Research Diet Inc, New Brunswick, NJ) y otro grupo fue alimentado con comida estándar (SD, *standard diet*) durante 8 semanas. Transcurridas 7 semanas de alimentación con HFD se procedió a la inoculación por estereotaxia de los adenovirus AMPK α 1 α 2-DN o GFP en el VMH. Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas en cajas de 4-5 ratas durante la exposición a HFD y posteriormente a la operación con estereotaxia fueron estabuladas de forma individual. Al comienzo de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Después de 6 días y previo a la finalización del experimento se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT.

Se establecieron 4 grupos:

- SD GFP.
- SD AMPK α 1 α 2-DN.
- HFD GFP.
- AMPK α 1 α 2-DN.



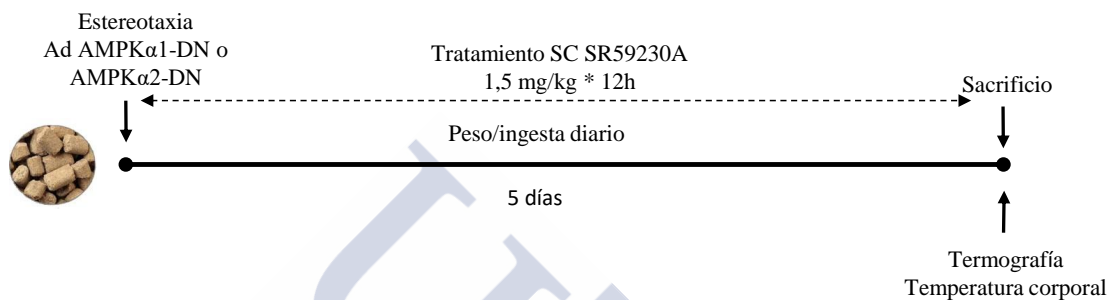
12.2 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS AMPK α 1-DN O AMPK α 2-DN Y SR59230A SC

Para determinar la isoforma de AMPK α que mediaba el efecto regulador de la homeostasis energética en el VMH, después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada al animalario, se procedió a la inoculación por estereotaxia de los adenovirus AMPK α 1-DN, AMPK α 2-DN o GFP en el VMH y a la inyección SC del antagonista de los receptores adrenérgicos β 3 SR59230A o su vehículo (DMSO) en un dosis de 1,5 mg/kg cada 12 horas. Posteriormente a la operación con estereotaxia las ratas se estabularon individualmente. Al comienzo de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Después de 5 días y previo a la finalización del experimento se procedió

a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT y a la medición de la temperatura corporal.

Se establecieron 4 grupos:

- GFP
- AMPK α 1-DN
- AMPK α 1-DN + SR59230A
- AMPK α 2-DN

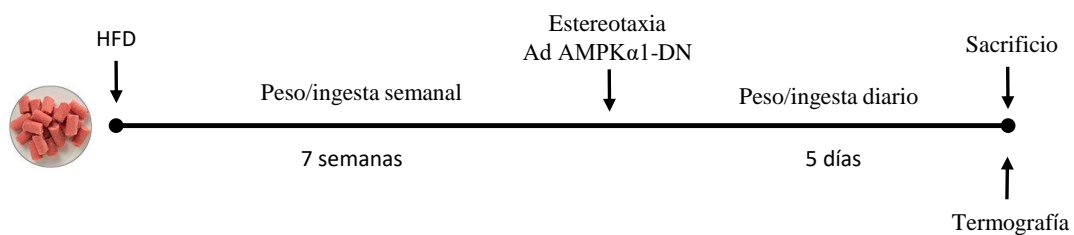


12.3 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS AMPK α 1-DN EN RATAS ALIMENTADAS CON HFD

Para determinar si la inhibición de la isoforma de AMPK α 1 en el VMH era suficiente para contrarrestar la obesidad inducida por dieta, después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada al animalario, las ratas tuvieron acceso libre a comida HFD (45% de las Kcal provenientes de grasa, 4.73 Kcal/g; Research Diet Inc, New Brunswick, NJ) durante 8 semanas. Transcurridas 7 semanas de alimentación con HFD se procedió a la inoculación por estereotaxia de los adenovirus AMPK α 1-DN o GFP en el VMH. Posteriormente a la operación con estereotaxia las ratas se estabularon individualmente. Al comienzo de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Después de 5 días y previo a la finalización del experimento se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT.

Se establecieron 2 grupos:

- HFD GFP.
- HFD AMPK α 1-DN.

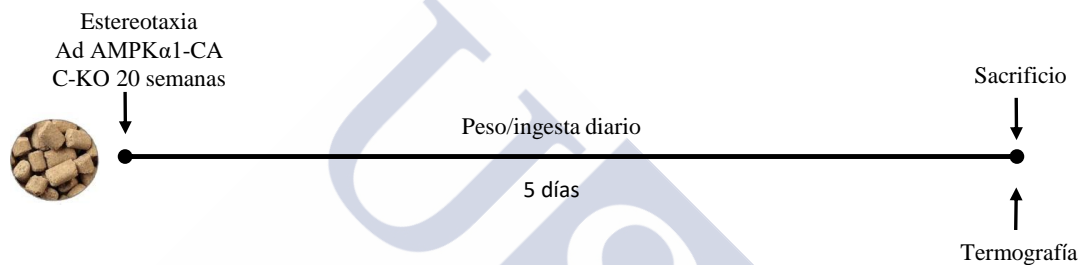


12.4 INOCULACIÓN DE ADENOVIRUS AMPK α 1-CA EN RATONES SF1 CRE AMPK α 1^{FLOX/FLOX}

Para determinar si la sobreexpresión del AMPK α 1 en el VMH de ratones SF1 Cre AMPK α 1 revertía el fenotipo observado se procedió a la inoculación por estereotaxia de los adenovirus AMPK α 1-CA o GFP en el VMH. Posteriormente a la operación con estereotaxia los ratones se estabularon individualmente. Al comienzo de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Después de 5 días y previo a la finalización del experimento se procedió a la toma de imágenes termográficas de la zona del BAT.

Se establecieron 2 grupos:

- SF1 Cre AMPK α 1 GFP.
- SF1 Cre AMPK α 1 AMPK α 1-CA.



13 TÉCNICAS ANALÍTICAS

13.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Extracción de proteína

Durante su manipulación las muestras de tejido estas se mantuvieron en hielo seco. El tejido cortado se introdujo en un tubo de seguridad de 2 ml con una cantidad apropiada (Tabla 1) de tampón de lisis (Tabla 2) que contiene inhibidor de proteasas (*Complete TM, Roche, Mannheim, Alemania*) y una bolita de acero. Durante todo el proceso se mantuvieron las muestras y el tampón de lisis en hielo. Para su homogeneización se utilizó un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, USA*) durante 4 min a 30Hz. Posteriormente se centrifugaron en frío (4°C) a 13200 rpm durante 30 min. Una vez centrifugadas las muestras se extrajo el sobrenadante y se introdujo en otro tubo descartando el precipitado.

Tejido	Volumen
VMH (rata/ratón)	190/90 μ l
BAT (rata/ratón)	0,6/1 ml
Liver	1 ml

Tabla 1. Cantidades de tampón de lisis para cada tejido.

Composición Tampón de lisis	
Tris-HCL pH 7,5	2,5 ml
EGTA 0,2 M (pH8)	2,5 ml
EDTA 0,2 M (pH8)	2,5 ml
Tritón X-100	5 ml
Ortovanadato Sódico 0,1 M	5 ml
Fluoruro Sódico	1 g
Pirofosfato Sódico	1,1 g
Sacarosa	46 g
Ajustar pH a 7,5 y H ₂ O destilada hasta 500 ml	
Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 1 pastilla por cada 50 ml	

Tabla 2. Composición tampón de lisis.

Cuantificación de proteína

A partir del sobrenadante anterior se prepararon alícuotas para cuantificar la concentración de proteína en el homogeneizado. Para ello se extrajeron 10 μ l de muestra a los que se les agregó 250 μ l de agua destilada y se mezclaron adecuadamente. Se preparó una recta de calibrado con siete puntos de soluciones estándar de albumina de suero bovino (*BSA, Albumin, from bovine serum*, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA) (0'03125 mg/ml, 0'0625 mg/ml, 0'125 mg/ml, 0'25 mg/ml, 0'5 mg/ml, 0'7 mg/ml, 1mg/ml).

La placa de lectura para el espectrofotómetro (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) se preparó cargando en cada pocillo y por duplicado 10 μ l de cada uno de los puntos de la recta de calibrado en concentración ascendente y de cada una de las muestras. Posteriormente se agregaron en cada pocillo 250 μ l de solución Bradford (dilución 1:4, *Bio-Rad Protein Assay*, Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) previamente incubada a 37°C durante 10 min protegida de la luz. Para la cuantificación de la concentración de proteína de las muestras se empleó el software Magellan 6.

Western blot

Preparación de geles

Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de electroforesis Tris/glicina SDS-Poliacrilamida en distintas concentraciones. En primer lugar, se prepararon las carcacas verificando que no existiera fuga de líquido. Posteriormente se prepararon los geles separadores (Tabla 3a-b), para eliminar las burbujas de la superficie y nivelar el borde superior se agregó isopropanol al 60% en la parte superior del gel separador. Una vez gelificados se eliminó el isopropanol y se lavó con agua destilada. Los geles concentradores se prepararon (Tabla 4a-b) después de secar el exceso de agua destilada de lavado y se agregaron sobre los geles separadores. Inmediatamente se colocaron peines para formar pocillos, que se extrajeron posteriormente después de que polimerizaran los geles.

Gel 6'5%	
H ₂ O destilada	2,45 ml
Acilamida/bisacrilamida (30%)	2,18 ml
Tampón A	5,06 ml
APS 10 %	56,2 μ l
TEMED	28,1 μ l

Tabla 3a. Preparación gel separador de electroforesis.

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

Tabla 3b. Preparación gel separador de electroforesis.

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

Tabla 4a. Preparación gel concentrador de electroforesis.

Tampón A		Tampón B	
Tris-HCL	90,1 g	Tris-HCL	30,2 g
SDS	2 g	SDS	2 g
Ajustar pH a 8,8 y H ₂ O destilada hasta 1 l		Ajustar pH a 6,8 y H ₂ O destilada hasta 1 l	

Tabla 4b. Preparación de tampón A y tampón B.

Preparación de muestras para electroforesis

A partir de los datos extraídos de la espectrofotometría se calcularon las proporciones de muestra, tampón de carga 1x (Tabla 5) y tampón de lisis con inhibidor de proteasa necesarias para la preparación de las alícuotas que se cargaron posteriormente en cada pocillo del gel, teniendo en cuenta las diluciones previamente realizadas. Para cada tipo de tejido se ajustó la cantidad de proteína adecuada para el análisis por western blot (Tabla 6).

Tejido	
VMH	10 µg
BAT	15 µg
Liver	20 µg

Tabla 5. Proporción de proteína cargada en cada pocillo.

Composición del tampón de carga	
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
β-mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml
Ajustar pH a 6,8 y H ₂ O miliQ hasta 1L	

Tabla 6. Tampón de carga 5X.

Electroforesis

Para proceder a la separación de las proteínas en el gel, se colocaron los placas con los geles en las carcasas de electroforesis y se agregaron 500 ml de tampón de electroforesis 1X (100ml de tampón de electroforesis 5X (Tabla 7) en 400 ml de agua destilada) asegurándonos de que los geles queden sumergidos en el tampón. Se incubaron las muestras a 95°C durante 5 min y se llenaron los pocillos con 16 µl de muestra, dejando el primer pocillo para cargar 5 µl de marcador de pesos estándar para gel (Precision Plus Protein, cat 161-0374 Bio-Rad). Se

colocó la tapa de la carcasa con los electrodos y se conectó la fuente a un voltaje constante de 130V y se dejó transcurrir la electroforesis hasta que el frente de migración llegó hasta 1 cm antes de borde inferior de gel.

Tampón de electroforesis 5X	
Glicina	72 g
Tris-HCl	15 g
SDS	5 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

Tabla 7. Composición del tampón de electroforesis 5X.

Transferencia del gel de electroforesis a una membrana

El siguiente paso consistió en pasar las proteínas del gel a un medio sólido como es una membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*, Millipore, Burlington, MA, USA). Para ello se preparó papel absorbente (Extra thick Blot Paper, Bio-Rad) y se sumergió en tampón de transferencia 1X (Tabla 8a-b). Se cortaron las membranas PVDF con una medida proporcional al tamaño de gel (8,5x7,1 cm) y se activaron, sumergiéndolas en depósitos con metanol, agua y tampón de transferencia 1X. Posteriormente, se colocó el papel absorbente en el Trans-Blot Semy-dry Transference, se agregaron las membranas de transferencia y sobre ellas los geles y se colocó otra pieza de papel absorbente sobre ellos, eliminando en cada paso las burbujas de aire. Se cerró el Trans-blot y se conectó a una fuente de corriente manteniendo el amperaje constante a 0'25A aproximadamente durante 1'40 horas.

Tampón de transferencia 25X	
Glicina	36,5 g
Tris-HCl	72,5 g
SDS	4,5 g
Ajustar H ₂ O destilada hasta 500 ml	

Tabla 8a. Composición tampón de transferencia 5X.

Tampón de transferencia 1X	
Tampón transferencia 25X	40 ml
Metanol	200 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

Tabla 8b. Composición tampón de transferencia 1X.

Inmunodetección

Una vez finalizada la transferencia se retiraron las membranas y se bloquearon con BSA en un depósito que contenía BSA 3% (3g de BSA en 100ml de TBS-TWEEN (Tabla 9a-b) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se cortaron las membranas para aislar las proteínas de interés usando como guía el marcador de pesos moleculares. En el caso de que las proteínas a estudiar tuvieran un peso molecular muy aproximado y no se pudiesen separar cortando la membrana, se procedió al proceso de *stripping* de la membrana explicado más adelante. Cada fragmento de membrana fue incubado con su correspondiente anticuerpo primario diluido en BSA-TWEEN (Tabla 10) durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente (en el caso sólo de UCP1, α -tubulina y β -actina) o durante toda la noche a 4°C.

Una vez transcurrida el tiempo de incubación con anticuerpo primario, se retiró y se procedió a realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN, para eliminar el exceso de anticuerpo. A continuación, se incubaron los fragmentos de membrana con el anticuerpo

secundario diluido en BSA-TWEEN (Tabla 10), durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN.

Tampón TBS 10X	
Tris-HCl	24,2 g
NaCl	80 g
Ajustar pH 7,6 y H ₂ O destilada hasta 1 l	

Tabla 9a. Composición TBS 10X.

TBS-TWEEN-20	
TBS 10X	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta 1 l	

Tabla 9b. Preparación TBS-TWEEN.

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
Rabbit polyclonal Anti-Phospho-AcetylCoA Carboxylase (Ser79)	1:2000	Cell Signaling Technology	3661; RRID: AB_330337
Rabbit monoclonal Anti-AcetylCoA Carboxylase 1	1:1000	Merck Millipore	04-322; RRID: AB_673047
Rabbit monoclonal Anti-phospho-AMPK α (Trh172)	1:2000	Cell Signaling Technology	2535S; RRID: AB_331250
Rabbit polyclonal Anti-AMPK α 1	1:1000	Merck Millipore	07-350; RRID: AB_310542
Rabbit polyclonal Anti-AMPK α 2	1:1000	Merck Millipore	07-363; RRID: AB_310553
Mouse monoclonal Anti-Fatty Acid Synthase	1:1000	BD Biosciences	610963; RRID: AB_398276
Rabbit Anti-Phospho-IRE1 α (Ser724)	1:1000	Abcam	ab48187; RRID: AB_873899
Rabbit Anti-IRE1 α (14C10)	1:1000	Cell Signaling Technology	3294S; RRID: AB_823545
Rabbit Anti-Phospho-PERK (Thr981)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-32577; RRID: AB_2293243
Rabbit monoclonal Anti-PERK (C33E10)	1:1000	Cell Signaling Technology	3192S; RRID: AB_2095847
Rabbit polyclonal to ATF6 beta	1:1000	Abcam	ab26085, RRID: AB_448977
Rabbit Anti-GADD 153 (R-20)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-793; RRID: AB_2242950
Rabbit Anti-GRP78	1:1000	Cell Signaling Technology	3183S; RRID: AB_10695864
Rabbit Anti-Phospho-eIF2 α (Ser52)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-101670; RRID: AB_631364
Rabbit monoclonal Anti-p-SAPK/JNK (T183/Y185)	1:1000	Cell Signaling Technology	4671S; RRID: AB_331338
Rabbit Anti-ATF6 α (H-280)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-22799; RRID: AB_2242950
Rabbit polyclonal Anti-JNK1/3 (C-17)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-474; RRID: AB_632383
Rabbit Anti-Phospho-HSL (S660)	1:1000	Cell Signaling	4126S; RRID: AB_490997

				Technology	
Rabbit polyclonal Anti-Hormone sensitive lipase	1:1000	Abcam		ab45422; RRID: AB_2135367	
Rabbit polyclonal Anti-UCP1	1:10000	Abcam		ab10983; RRID: AB_2241462	
Rabbit polyclonal Anti-UCP3	1:1000	Abcam		ab3477; RRID: AB_2304253	
Rabbit monoclonal TNF alpha (Mouse Specific)	1:500	Cell Technology	Signaling	119485; RRID:AB_2687962	
Rabbit polyclonal to IL1 beta	1:1000	Abcam		ab9722; RRID:AB_308765	
Rabbit polyclonal Anti-NFκB p65 (C-20)	1:1000	Santa Biotechnology	Cruz	sc-372; RRID: AB_632037	
Rabbit polyclonal Anti-p-IKKα/B	1:1000	Santa Biotechnology	Cruz	sc-23470-R; RRID: AB_2122159	
Rabbit polyclonal Anti-IL6	1:1000	Abcam		ab6672; RRID: AB_2127460	
Rabbit monoclonal Anti-pULK (Ser555)	1:1000	Cell Technology	Signaling	5869; RRID:AB_10707365	
Rabbit polyclonal Anti-GCK (H-88)	1:1000	Santa Biotechnology	Cruz	sc-7908; RRID:AB_2107620	
Rabbit polyclonal PECK1	1:1000	Abcam		ab70358; RRID: AB_1925305	
Mouse monoclonal Anti-α-tubulin	1:5000	Sigma-Aldrich		T5168; RRID: AB_477579	
Mouse monoclonal Anti-β-Actin	1:5000	Sigma-Aldrich		A5316; RRID: AB_476743	
Polyclonal Goat immunoglobulins/HPR	Anti-Rabbit	1:5000	Dako	P0448; RRID:AB_2617138	
Polyclonal Rabbit immunoglobulins/HPR	Anti-Mouse	1:5000	Dako	P0260; RRID:AB_2636929	

Tabla 10. Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones

Revelado

Para proceder al revelado de las membranas se preparó el sustrato de revelado (Pierce ECL Western Blotting substrate, Thermo Scientific) en una dilución 1:1. Se extrajeron las membranas del TBS-TWEEN y se incubó cada fragmento en 1 ml de ECL durante 4 min en oscuridad, ya que el sustrato es fotosensible. Posteriormente, se colocaron los fragmentos de membrana en un casete (*Hypercassette*, Amersham biociencias GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) entre papel de acetato transparente, procurando eliminar las burbujas que se formarían encima de las membranas. Se procedió entonces al revelado en cámara oscura. Para ello se colocó una película (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm Corporation, Tokio, Japan) de revelado sobre el papel de acetato y se expuso entre 30 segundos y 5 minutos, dependiendo de la proteína a estudiar. Una vez expuestas las películas se sumergieron en solución reveladora (dilución 1:10) (Developer G150, AGFA Healthcare NV) y seguidamente en solución fijadora (dilución 1:5) (Manual fixing bath, AGFA Healthcare NV) y finalmente en agua para humedecer.

Antes de retirar las membranas del casete, se copiaron los marcadores de pesos moleculares en las películas de revelado, para poder identificar las proteínas estudiadas. Las membranas se extrajeron y se conservaron entre papel Whatman (*3MM Chromatography paper*, GE Healthcare 3030-931).

Stripping

Cuando dos proteínas a estudiar tenían un peso molecular muy similar y no podían ser separadas cortando las membranas, se realizó un *stripping* del fragmento de la membrana correspondiente, para eliminar el anticuerpo primario y secundario y poder incubar de nuevo esa membrana para detectar una nueva proteína. Se realizó una incubación a 55°C solución de *stripping* (Tabla 11) durante 40 minutos y posteriormente 3 lavados de 15 minutos con TBS-TWEEN en agitación fuerte. Al finalizar el *stripping* se bloqueó de nuevo la membrana.

Solución de <i>stripping</i>	
Tris-HCl	0,75 g
SDS	2 g
β-mercaptoetanol	0,7 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta	100 ml

Tabla 11. Componentes solución de *stripping*.

13.2 PCR PARA GENOTIPADO

Extracción de DNA

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

Se obtuvo una sección de cola (de aproximadamente 2-3 mm) de los ratones y se introdujo en tubo estéril al cual se le añadió 0,5 ml de Tampón de lisis de cola (Tabla 12) con 10 µl de proteinasa K (*Proteinase K 600U/ml*, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se dejaron en agitación a 55°C toda la noche para su digestión. Posteriormente se centrifugaron a 13200 rpm durante 10 minutos para precipitar los restos de cola no digeridos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Para precipitar los ácidos nucleicos se añadió 0,5 ml de 2-propanol y se invirtieron los tubos varias veces. Se volvieron a centrifugar 13200 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Para fijar el precipitado se centrifugaron las muestras de nuevo a máxima velocidad durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado antes de resuspender en 100 µl de H₂O autoclavada calentándolo a 55 °C durante 10 minutos.

Tampón de lisis de cola	
1M Tris-HCL pH 8	50 ml
500mM EDTA pH 8	5 ml
SDS 10%	10 ml
5M NaCl	20 ml
Ajustar H ₂ O destilada hasta	500 ml

Tabla 12. Composición del tampón de lisis de cola.

Amplificación por PCR convencional

Para el genotipado de las distintas colonias de ratones empleamos el método de PCR estándar. Mediante un set específico de cebadores (Tabla 13), unas condiciones de temperatura y números de ciclos determinado para el alelo a estudiar, se amplifica la región

de DNA de interés. Posteriormente, se separan los fragmentos de DNA por electroforesis en un gel de agarosa. Los tamaños de los productos de PCR se determinan por un marcador de peso molecular de DNA conocido que se corre en el gel junto con los productos de PCR de las muestras a estudiar. Los cebadores específicos utilizados fueron sintetizados con una purificación tipo HPSF y un concentración de 0.01 μ l (Eurofins, Thermofisher).

Alelo		Secuencia
Sitio AMPK α 1 loxP	Forward 11528	5'- CCCACCATCACTCCATCTCT-3'
	Reverse 11529	5'- AGCCTGCTTGGCACACTTAT-3'
Alelo eliminado AMPK α 1	Forward 11528	5'- CCCACCATCACTCCATCTCT-3'
	Reverse	5'- CCCACATAGGAAAGCGTGTT-3'
Transgen SF1 Cre	Forward oIMR6243	5'- CTGAGCTGCAGCGCAGGGACAT-3'
	Reverse oIMR6244	5'- TGCGAACCTCATCACTCGTTGCAT-3'
Control positivo transgen SF1 Cre	Forward oIMR8744	5'- CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3'
	Reverse oIMR8745	5'- GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3'

Tabla 13. Set de cebadores de genotipado.

- En las siguientes tablas se detallan las condiciones para el genotipado de los ratones AMPK α 1 floxeados:

Paso	T (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	62	30 s	35
Extensión	72	30s	35
Elongación final	72	2 min	1

Tabla 14. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones AMPK α 1 floxeados.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μ l)
H ₂ O destilada	-	-	4,92
5 mM Tampón carga para DNA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,69 mM	1,66
2,5 mM dNTPs (<i>dTTP</i> , <i>dCTP</i> , <i>dGTP</i> , <i>dATP</i>)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,20 mM	0,96
Tampón DreamTaq 10X (20 mM MgCl ₂)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1X	1,2 μ l
Cebador forward 11528	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
Cebador forward 11529	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
DreamTaq polimerasa (5U/ μ l)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,03 U/1 μ l	0,06
Añadir 10 μ l de mezcla de PCR y 2 μ l de ADN genómico			

Tabla 15. Composición de la mezcla de PCR para genotipar los ratones AMPK α 1 flox.

- En las siguientes tablas se detallan las condiciones para para la detección del alelo recombinado:

Paso	T (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineamiento	62	1 min	35
Extensión	72	15 s	35
Elongación final	72	5 min	1

Tabla 16. Condiciones de la PCR para el para para la detección del alelo recombinado

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μ l)
H ₂ O destilada	-	-	3,96
5 mM Tampón carga para DNA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,69 mM	1,66
2,5 mM dNTPs (<i>dTTP</i> , <i>dCTP</i> , <i>dGTP</i> , <i>dATP</i>)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,20 mM	0,96
Tampón DreamTaq 10X (20 mM MgCl ₂)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	1X	1,2 μ l
Cebador forward 11528	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
Cebador deleted alele	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
Taq DNA polimerasa (5U/ μ l)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,03 U/1 μ l	0,06
Añadir 10 μ l de mezcla de PCR y 2 μ l de ADN genómico			

Tabla 17. Componentes de la reacción de PCR para genotipado de alelo eliminado AMPK α 1.

- Los componentes de la reacción PCR para el genotipado del transgen SF1 Cre fueron los siguientes:

Paso	T ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Alineamiento	53	1 min	40
Extensión	72	1 min	40
Elongación final	72	2 min	1

Tabla 18. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones portadores del transgen SF1 Cre.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (μ l)
H ₂ O destilada	-	-	3,96
5 mM Tampón carga para DNA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,69 mM	1,66
25mM MgCl ₂	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	2 mM	0,96
2,5 mM dNTPs (<i>dTTP</i> , <i>dCTP</i> , <i>dGTP</i> , <i>dATP</i>)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,20 mM	0,96
Tampón de PCR 10X	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1X	1,2 μ l
Cebador forward oIMR6243	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
Cebador reverse oIMR6244	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 μ M	0,6
Taq DNA polimerasa (5U/ μ l)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,03 U/1 μ l	0,06
Añadir 10 μ l de mezcla de PCR y 2 μ l de ADN genómico			

Tabla 19. Composición de la mezcla de PCR de los ratones con el transgen SF1 Cre.

Como esta PCR sólo detecta presencia o ausencia de amplificación, fue necesario realizar un control interno positivo. Los componentes de la reacción PCR para el control positivo fueron los siguientes:

Paso	T (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Alineamiento	64	30 s	40
Extensión	72	1 min	40
Elongación final	72	2 min	1

Tabla 20. Condiciones de la PCR para el genotipado del control interno positivo.

Reactivo	Casa comercial	Concentración	Volumen (µl)
H ₂ O destilada	-	-	3,96
5 mM Tampón carga para DNA	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	0,69 mM	1,66
25mM MgCl ₂	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	2 mM	0,96
2,5 mM dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,20 mM	0,96
Tampón de PCR 10X	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	1X	1,2 µl
Cebador forward oIMR8744	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6
Cebador reverse oIMR8745	Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania	1 µM	0,6
Taq DNA polimerasa (5U/ µl)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,03 U/1 µl	0,06
Añadir 10 µl de mezcla de PCR y 2 µl de ADN genómico			

Tabla 21. Composición de la mezcla de PCR para el genotipado del control interno positivo.

Electroforesis de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN correspondientes a los alelos estudiados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó a una concentración de agarosa del 1,5% en tampón de electroforesis TAE (TRIS 40mM pH 7,6; Ácido acético 20mM y EDTA 1mM) para permitir la visualización del ADN se incluyó *Red Safe* (iNtRON biotechnology, 21141) al gel. Tras cargar el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (*Invitrogen*, 15628-019) y las muestras, se aplicó un voltaje de 90 V durante una hora sumergido en el tampón de electroforesis. Para la visualización de los fragmentos de DNA se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 de BIO-RAD.

13.3 ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

Extracción de RNA.

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

Para extraer el RNA se homogeneizó mecánicamente un pequeño fragmento de las muestras congeladas en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 3 min (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, USA) a 30Hz. Posteriormente se centrifugó las muestras a 12000 ref durante 10 minutos y se aspiró la fase intermedia. A esta fracción se le añadió 200 µl de cloroformo (*Chloroform*, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y se mezcló durante al menos 15 segundos para asegurar que se estaba mezclando correctamente. Se dejó reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar a 12000

rcf durante 15 minutos. Se observaron claramente 2 fases: una fase superior acuosa (donde se halla el RNA) y una fase inferior orgánica (que contiene las proteínas y los lípidos). Entre ambas se sitúa una inter-fase (donde está el DNA). Se aspiró la fase superior (de esa manera se separó el RNA del resto de los componentes celulares) y a esta se le añadió 500 µl de 2-propanol y se mezcló asegurando que la mezcla se realizaba correctamente. Luego estas muestras se dejaron reposar 10 minutos a -20°C para favorecer que el RNA precipite y se volvieron a centrifugar a 12000 rcf durante 10 minutos. Al acabar la centrifugación se observó si había precipitado y se eliminó el sobrenadante y posteriormente se le añadió a cada muestra 1 ml de etanol (*Ethanol absolute PA*, Applichem/Pancreac, Darmstadt, Alemania) al 70% en agua DEPC. Se mezcló bien para lavar el precipitado y se volvió a centrifugar a 12000 rcf durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y para eliminar la mayor cantidad posible de etanol, se volvió a centrifugar 1 minuto a 16100 rcf y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. Finalmente, se resuspendió el precipitado en agua DEPC calentándolo a 60 °C durante 10 minutos.

Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm proporcionó la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinó estudiando el ratio 260/280, considerándose el valor de 2 como valor ideal de pureza. Las muestras se alicuotearon a una concentración de 500 ng/µl (para BAT, VMH, córtex, hígado) o 1 µg/µl (para WAT).

Retrotranscripción (RT)

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

Componentes de la reacción de retrotranscripción:

- 6 µl de tampón de reversotranscripción (*5X first strand tampón*; 250 nM Tris-HCl, pH 8.3, 375nM KCl, 15mM MgCl, 50nM DDT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 1.5 µl Mg₂Cl 50 mM (*Mg₂Cl 50 mM*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 6 µl de mezcla de dNTPs (*dTTP, dCTP, dGTP, dATP*, con una concentración de 10 mM de cada uno) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 0.17 µl de Random primers (*Random primers*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 0.25 µl inhibidor de RNasa (*RNaseOUT*, 40 U/µl Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 1 µl de M-MLV reversotranscriptasa (*M-MLV*, 200 U/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Ajustar con de H₂O DEPC (agua destilada con dietilpirocarbonato al 0.1%., dejar una noche a T^a ambiente) para un volumen final de 30 µl.

PCR en Tiempo Real (TaqMan)

Se empleó como sistema de detección las sondas TaqMan, que son sondas específicas marcadas con fluorocromos (donador y aceptor). Este sistema está basado en la transferencia

de energía de fluorescencia mediante resonancia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre los dos fluorocromos. El fluorocromo empleado para la PCR fue TAMRA, que posee un máximo de emisión de 580 nm. El volumen final de reacción de PCR utilizado fue de 12 µl.

Componentes de la reacción de PCR en tiempo real:

- 2.92 µl H₂O-MQ.
- 0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 0.36 µl Sonda (5 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania).
- 6 µl Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- 2 µl de muestra (RT).

En la placa de medición se cargó por duplicado, además de las muestras, una curva patrón para el gen estudiado, un control negativo (-RT) y un blanco. La curva patrón constó de 6 puntos obtenidos por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40µl resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2µl producto de RT de cada muestra, siempre del mismo tratamiento o tejido). Las condiciones de amplificación fueron de 50°C (2min), 95°C (10min), 95°C (15seg) y 60°C (1min) durante 40 ciclos, en un sistema de PCR Tiempo Real (*7500 Real Time PCR System*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de los datos se realizó comparando el ratio entre un gen de referencia (Hprt o 18S) y el gen problema entre los diferentes grupos experimentales.

mRNA	GenBank		Secuencia
18S	M11188.1	Sentido	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
		Sonda	5'-GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA-3'
Aubr3	NM_013108	Sentido	5'-TGCTAGATCTCCATGGTCCTTCA-3'
		Antisentido	5'-AAATCACCGCTGAACAGGTTTGATGCC-3'
		Sonda	5'-TCCCTTACGGACAGCTTACCTTT-3'
Prkaa1	NM_001013367	Sentido	5'-GTACCAGGTCATCAGTACACCATCT-3'
		Antisentido	5'-GTCCAACCTTCCATTTTACAGA-3'
		Sonda	FAM-5'-TGGTGATGGAATATGTCTCTGG-3'-TAMRA
Cidea		Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn04181355_m1
Hprt	NM_012583	Sentido	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Antisentido	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Sonda	5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'
Ppargc1a	NM_031347	Sentido	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Antisentido	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Sonda	5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'
Ppargc1b	NM_176075.2	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
Ucp1 (rat)	NM_012682	Sentido	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA

<i>Ucp1</i> (mouse)	NM_009463	Sentido	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GACCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGACGGCCTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
<i>Lpl</i>	NM_012598.2	Sentido	5'-TGGAGAAGCCATCCGTGTG-3'
		Antisentido	5'-TCATGCGAGCACTTCACCAG-3'
		Sonda	FAM-5'- TGCAGAGAGAGGACTCGGAGACGTGG-3'-TAMRA
<i>Pparg</i>	NM_013124	Sentido	5'-TGGGCCAGAATGGCATCTC-3'
		Antisentido	5'-CTGATGCACTGCCTATGAGCACTTACA-3'
		Sonda	FAM-5'-CTAACTCCAGAAAAGCAAGCAA-3'-TAMRA
<i>Ucp3</i>	NM_013167.2	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00565874_m1
<i>Prdm16</i>	NM_001177995.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Mm01266512_m1
<i>Cpt1b</i>	NM_013200.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00566242_m1
<i>Dio2</i>	NM_031720.3	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays Assay ID Rn00581867_m1

Tabla 22. Primers y sondas para RealTime PCR.

13.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizó inmunohistoquímica (ICH, *immunohistochemistry*) para detectar en el propio tejido la presencia y localización de determinadas proteínas. En este trabajo se realizó inmunohistoquímica de WAT SC de ratón sobre muestras parafinadas. Para ello se extrajeron los tejidos y se fijaron mediante su inmersión en formalina 10% durante 24 horas. Posteriormente se trataron para estudio histológico mediante deshidratación (aumento de las concentraciones de alcohol), montaje en xileno e inmersión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en rodajas en secciones de 3 µm que se procesaron, se desparafinizaron en xileno, se rehidrataron y enjuagaron en agua destilada y luego se tiñeron para inmunohistoquímica de UCP1. Para la inmunohistoquímica UCP1, las rodajas se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario (UCP1, Abcam, Cambridge, RU), se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario (ENVISION, capaz de detectar anti-ratón y anti-conejo de DAKO; Glostrup, Dinamarca). Se tomaron imágenes con una cámara digital Olympus XC50 (Olympus Corporation; Tokyo, Japan) a 20x. Las imágenes se cuantificaron con el software Frida Software: FRamework for Image Dataset Analysis (The Johns Hopkins University; Baltimore, MD, USA).

13.5 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la realización de la hibridación *in situ* (ISH, *in situ hybridization*) se cortaron secciones de cerebro de 16 µm y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de hibridación. Las secciones congeladas se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M (pH 7.4) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se deshidrataron usando distintas concentraciones de etanol (70, 80, 90, 95% y etanol absoluto) durante 5 minutos cada una. La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 37°C en cámara húmeda usando una solución de hibridación que contenía 0.5×10^6 cpm de la sonda marcada

por sección, tampón citrato-salino 4x, formamida desionizada al 50%, solución de Denhardt 1X, dextransulfato al 10% y 10 µg/ml de DNA cortado de cadena sencilla de esperma de salmón (todo de Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Las secciones se hibridaron con un oligonucleótido específico para AMPK α 1 (GenBank Accession Number: NM_001013367; 5'-GCT CTC CTC CAG AGA CAT ATT CCA TCA CCA TGA-3'). La sonda estaba marcada en el extremo 3' con 35S- α ATP (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando transferasa deoxynucleotil terminal (New England Biolabs; Ipswich, MA). La especificidad de la sonda se confirmó mediante la incubación de las secciones con un exceso de sondas no marcadas. Posteriormente, las secciones hibridadas fueron lavadas secuencialmente 1) en tampón citrato-salino 1X a temperatura ambiente, 2) cuatro veces en tampón citrato-salino 1x a 42°C (30 min por lavado) y 3) una vez en tampón citrato-salino 1X a temperatura ambiente durante 1 hora seguido de aclarado en agua y etanol. Finalmente, las secciones se secaron al aire y fueron expuestas a una película autorradiográfica Hyperfilm β -Max (KODAK; Rochester, NY, USA) durante 14 días. Las secciones de cada grupo experimental fueron expuestas a la misma película autorradiográfica y reveladas en revelador (*Developer G150*, AGFA HealthCare: Mortsels, Belgium) y fijador (*Manual Fixing G354*; AGFA HealthCare: Mortsels, Belgium).

13.6 DOBLE HIBRIDACIÓN *IN SITU*/INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la validación de la eliminación del exón 3 del gen Prkaa1 en las neuronas SF1, se realizó un protocolo de doble hibridación *in situ*/inmunohistoquímica para detectar por un lado, la región eliminada del mRNA Prkaa1 y por otro, la proteína SF1. Para la hibridación *in situ* se cortaron secciones coronales del cerebro de ratón (20 µm) abarcando desde el hipotálamo rostral al caudal y se montaron en un portaobjetos Super-Frost Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, USA) y fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis. Para el análisis por hibridación *in situ* se generó una ribosonda antisentido complementaria específica para la secuencia que codifica el exón 3 del gen Prkaa1 de ratón (ribosonda PrKaa1-ex3)³⁸⁰. El exón 3 se extiende desde la posición 278- a la 371- de la secuencia de cDNA (GenBank NM_001013367.3). La secuencia de cebadores fue la siguiente:

Cebador	Secuencia
Cebador forward T3-AMPKex3 sentido	5'-CAGAGATGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAGA GTACCAGGTCATCAGTACACCATCT-3'
Cebador reverse T7-AMPKex3 antisentido	5'-CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAC CTTCCATTTTTACAGATATAATCA-3'

Tabla 23. Cebadores empleados para hibridación *in situ*.

Las secciones de tejido fueron fijadas en paraformaldehído 4%, acetiladas en tampón trietanolamina, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol y deslipidados con cloroformo. Después de estos pasos, se hibridaron con la ribosonda PrKaa1-ex3 durante 16 h a 55°C. La ribosonda PrKaa1-ex3 fue diluida en tampón de hibridación para una concentración final de 0,03 pmol/ml junto con RNA de transferencia de levadura. Posteriormente, se lavaron los cortes, se trataron con RNasa-A y se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol³⁸⁰. Finalizada la hibridación, los cortes fueron procesados para la inmunodetección de SF1. En este punto, se bloqueó la actividad endógena de la peroxidasa mediante la incubación con peróxido de hidrógeno. Después las secciones fueron incubadas toda la noche con anticuerpo anti-SF1 (1:500; Abcam; Cambridge, UK) y lavadas previamente a su incubación con un anticuerpo secundario biotinilado de mono anti-

conejo (dilución 1:500; Jackson Immunoresearch Laboratories; West Grove, PA, USA) durante 90 minutos. La reacción de la peroxidasa se llevó a cabo empleando un kit de VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit (Vector Labs; Burlingame, CA, USA) y se usó 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) como cromógeno. Posteriormente a la tinción de SF1, las secciones fueron sumergidas en emulsión autorradiográfica tipo NTB (*Kodak Autoradiography Emulsion type NTB*, Kodak; Rochester, NY, USA) y expuestas durante 3 semanas a 4°C en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, las secciones se revelaron y fijaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (Kodak; Rochester, NY, USA): (1) 4 minutos en revelador Kodak D-19; (2) 10 segundos en agua destilada; (3) 5 minutos en fijador Kodak; y (4) 5 minutos en agua destilada. Para el montaje, las secciones fueron previamente deshidratadas y aclaradas con medio de depuración Sub-X (Leica Bio-systems; Wetzlar, Germany) y cubiertas con medio de montaje Sub-X (Leica Bio-systems; Wetzlar, Germany). Se analizaron 4 secciones representativas de cada animal que incluyesen el VMH. Las células se consideraron doblemente marcadas si el número de granos de plata contenidos en el citoplasma de las neuronas positivas para SF1 era al menos 3 veces mayor que el nivel de fondo.

13.7 HISTOLOGÍA

Para determinar la morfología y contenido de grasa de distintos tejidos en los modelos estudiados, se realizaron dos técnicas histológicas: Oil-red O (hígado) y hematoxilina-eosina (hígado y WAT).

Tinción hematoxilina/eosina.

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

13.8 ANÁLISIS DE METABOLITOS

Extracción de grasa hepática

Para cuantificar la cantidad de lípidos presentes en el hígado se realizó un protocolo e extracción de grasa consistente en homogeneizar 0,1 g de hígado de rata o ratón en una solución 2:1 vol/vol de cloroformo-metanol (volumen total empleado por muestra: 1 ml), con el mismo procedimiento de disgregación que el empleado para la extracción de proteína explicado anteriormente. Tras la homogeneización, se mantuvieron las muestras en rotación orbital durante tres horas, esto facilitaría la disolución de la grasa en el disolvente orgánico. A continuación se añadieron 0,3 ml de agua destilada y se centrifugaron los tubos a 13000 rpm

durante 30 minutos a temperatura ambiente, lo que va a dar lugar a la separación de las muestras en distintas. Se descartó la fase orgánica superior y se colectó la fase orgánica inferior, que se dejó evaporar dejando los tubos abiertos bajo una campana de extracción de gases durante un periodo de aproximadamente 8 horas, para obtener de esta manera el precipitado con la parte grasa del tejido extraído.

Determinación en extractos grasos de tejido

La cuantificación de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres no esterificados se realizó mediante una cuantificación colorimétrica en un espectrofotómetro mediante el uso de un kit específico para TAG y colesterol (Spinreact S.A., St. Esteve de Bas, España) o para NEFA (Wako Chemicals GmbH, Germany). Para ello se diluyó el precipitado obtenido anteriormente en cloroformo y se mezcló hasta la completa disolución del precipitado. Posteriormente se transfirieron 15 μ l de esta mezcla a otro tubo y se dejaron evaporar para acto seguido mezclarlos con el reactivo indicado en el kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se cargaron por duplicado en una placa las muestras y una recta patrón; y se leyó en el espectrofotómetro. El resultado final se corrigió por el peso del fragmento usado en la extracción.

Determinación en suero de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres

Los niveles de triglicéridos, colesterol y NEFAs se determinaron mediante el uso de kits específicos en una reacción colorimétrica, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (TAG, colesterol, Spinreact; NEFAs, WAKO).

13.9 ANÁLISIS DE NIVELES HORMONALES

Para la determinación de los niveles circulantes de hormonas se empleó la técnica ELISA. En este trabajo se cuantificaron los niveles de insulina (*Rat/Mouse Insulin ELISA EZRMI-13K*, Merk-Millipore, Burlington, MA, USA) y leptina (*Mouse Leptin ELISA EZML-82K*, Merk-Millipore, Burlington, MA, USA) en suero siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

14 ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos tras los procedimientos experimentales *in vivo* e *in vitro*, se presentaron como porcentaje en función del control, tomándose como valor la media (M) y la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{media} \pm \text{SEM}$). En los experimentos en los que se monitorizaron parámetros como la ingesta de alimento y masa corporal, estos datos se representaron brutos sin realizar ningún tipo de relación porcentual de comparación. El tamaño muestral de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados. Para el análisis de los resultados se excluyeron las muestras y/o animales atípicos empleando la calculadora *GraphPad Software Outlier calculator* que realiza la prueba de Grubbs para determinar si uno de los valores en la lista que se ingresa es un valor atípico

significativo del resto; o cuando se observara un comportamiento inadecuado durante el procedimiento experimental.

De forma previa al análisis estadístico se realizó un test de normalidad. Para ello se utilizó el test Shapiro-Wilks para conjuntos de muestras de $n \leq 20$ y ≥ 7 , y el test Kolmogorov-Smirnov cuando el $n \leq 6$ ^{381, 382}. Cuando las poblaciones analizadas mostraron una distribución normal se realizaron test estadísticos paramétricos. En caso de que la población no superase el test de normalidad se realizarían test estadísticos no paramétricos, lo que no ocurrió durante el análisis de los datos de esta tesis.

14.1 TEST PARAMÉTRICOS

Se realizaron sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales siguiesen una distribución Gaussiana (normal).

14.1.1 ANOVA de una vía

El análisis de la varianza (ANOVA) se utiliza para determinar si existen diferencias entre las medias de tres o más grupos que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Existen varios test que se pueden realizar: uno de ellos es el Tukey test que compara dos medias simples cada vez y ejecuta todas las posibles comparaciones; el Dunnett test se realiza cuando se comparan todas las medias con el grupo control, por lo que no es un procedimiento tan exhaustivo y por último, la corrección o test de Bonferroni que es el procedimiento más potente; y su uso se recomienda cuando se realizan comparaciones entre más de tres grupos experimentales³⁸³.

14.1.2 T-test

Compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Es un test robusto, puesto que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ ^{384, 385}. En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas), se estudia la desigualdad entre las medias, siendo la región crítica del estadístico ambas regiones correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (de una cola) la desigualdad en la hipótesis señala en una sola dirección. En esta tesis, se utilizó t-test de una y dos colas, detallado en los pies de figura de los resultados. Cuando estudiamos variables de las cuales no conocemos su efecto o no existe una evidencia previa, realizamos t-test de dos colas; sin embargo, al analizar una premisa ya evaluada, realizamos t-test de una cola. El uso de una cola ofrece un test estadístico más robusto ya que aumenta la sensibilidad para detectar efectos fisiológicos³⁸⁶.

14.2 TEST NO PARAMÉTRICOS

Se realizan sobre aquellos experimentos cuyos grupos experimentales no siguen una distribución Gaussiana (normal).

14.2.1 Test Kruskal-Wallis

Al igual que con el ANOVA, se emplea para comparar múltiples poblaciones que no siguen una distribución normal, se realiza el análisis de la varianza mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de un *post hoc* test de Dunn para determinar entre qué poblaciones existe la significancia^{387, 388}.

14.2.2 Test Mann-Whitney

Se utiliza para comparar dos poblaciones cuya alguna distribución no sea paramétrica³⁸⁹.

En todos los análisis, se considera una diferencia estadísticamente significativa a partir de la probabilidad de error $p \leq 0,05$. Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante el paquete estadístico GraphPad Prism (*GraphPad Instad Software, v5, La Jolla, CA, USA*).







RESULTADOS





1. LA INHIBICIÓN DE AMPK α EN EL VMH REVIERTE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

Para dilucidar el efecto de la inhibición de AMPK en el VMH en la obesidad, inyectamos estereotáxicamente en el VMH una combinación de adenovirus que expresan isoformas dominantes negativas de las subunidades catalíticas AMPK α 1 e AMPK α 2 (AMPK α 1 α 2-DN) en ratas macho obesas alimentadas con HFD. El tratamiento con AMPK α 1 α 2-DN indujo una pérdida de peso independiente de la ingesta en ratas HFD (Figura 1A-B) y sus controles SD (Figures 1C-D).

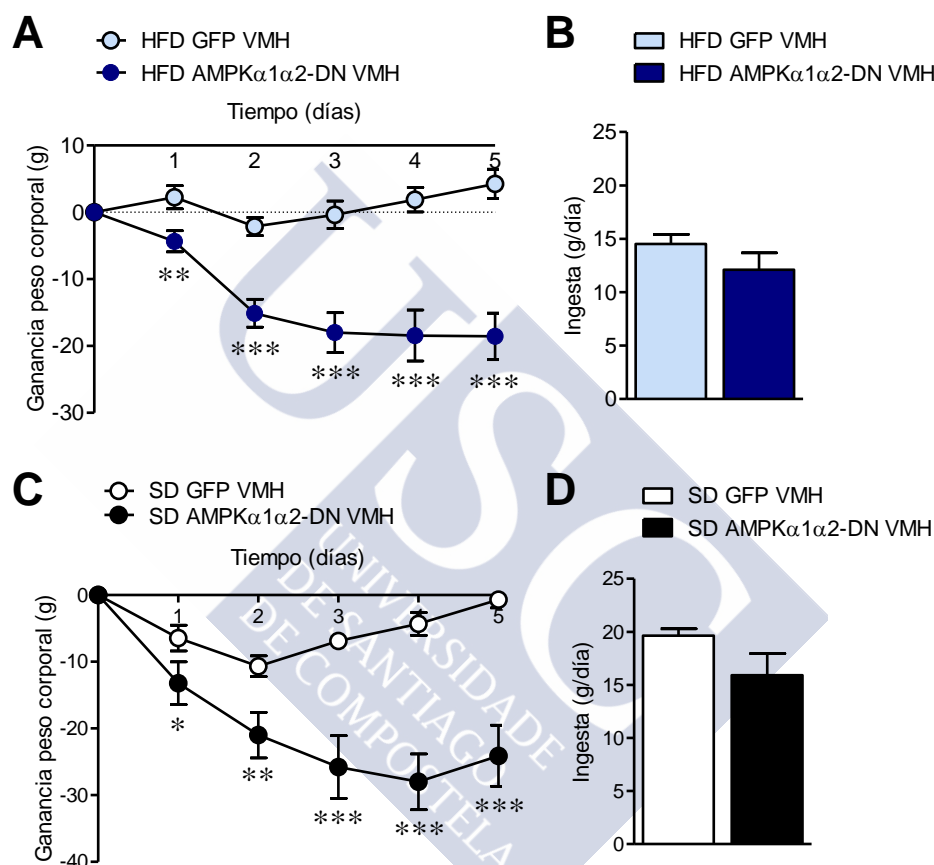


Figura 1. Efecto de la microinyección de AMPK α 1 α 2-DN en el VMH en el balance energético en ratas HFD. (A-C) Ganancia de masa corporal (n= 9 ratas/grupo), (B-D) ingesta diaria (n= 9 ratas/grupo), en ratas alimentadas HFD (A-B) o SD (C-D) tratadas en el VMH con adenovirus GFP o AMPK α 1 α 2-DN. Test t-student (2 colas), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Este efecto se asoció con un descenso de los niveles de acetyl-CoA carboxilasa α fosforilada (Figuras 2A y B) y/o de los marcadores de ER en el VMH en ratas HFD (Figura 2C).

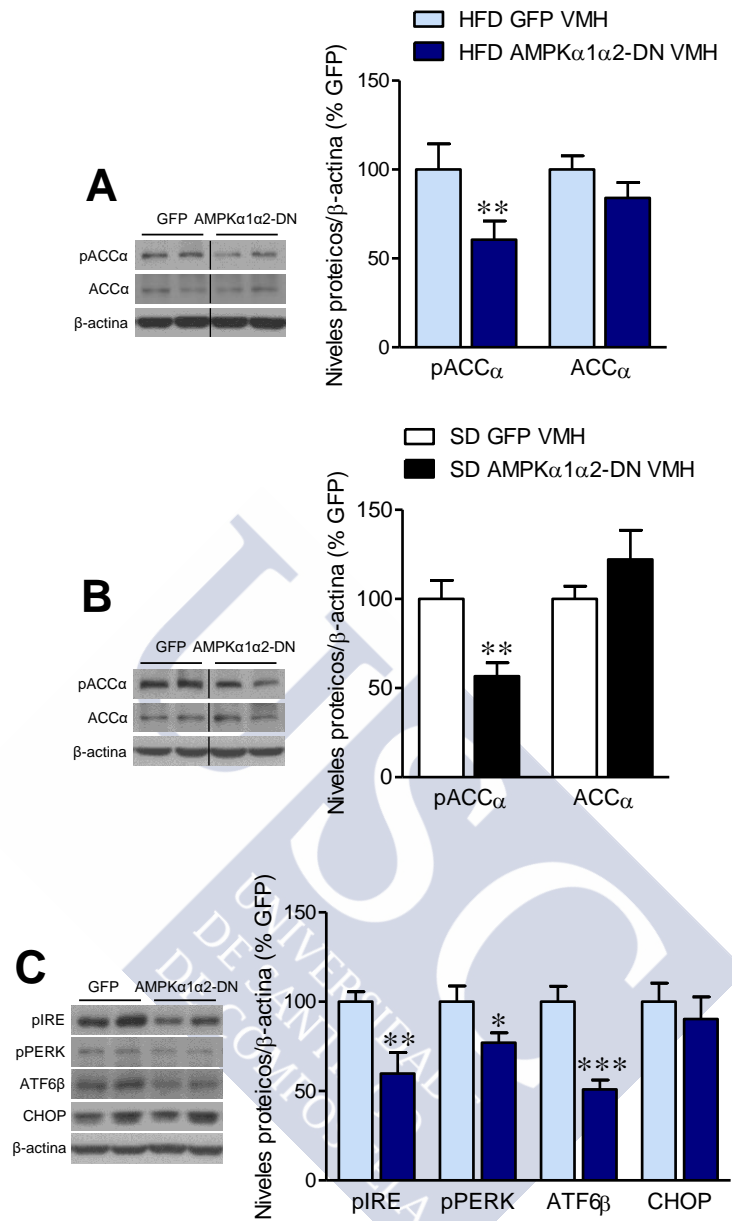


Figura 2. Efecto de la microinyección de AMPK α 1 α 2-DN en el VMH en la ruta de AMPK hipotalámica en marcadores de ER estrés en ratas HFD. (A) Niveles proteicos de pACC α y ACC α en el VMH (n= 7 ratas/grupo), (B) niveles proteicos de pACC α y ACC α en el VMH (n= 7 ratas/grupo) y (C) niveles proteicos de la ruta de ER estrés en el VMH (n= 7 ratas/grupo), en ratas alimentadas HFD (A-B) o SD (C) tratadas en el VMH con adenovirus GFP o AMPK α 1 α 2-DN. Test t-student (2 colas), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los gels de los paneles A, B y C han sido cortadas del mismo gel original.

Análisis más exhaustivos de la función de BAT demostraron que AMPK α 1 α 2-DN facilita un aumento en la temperatura de BAT (Figura 3A), así como en los niveles de proteína y/o expresión del mRNA de UCP1 y de las proteínas 1 alpha y beta coactivadoras del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α y PGC1 β , *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha and beta*) en el BAT de ratas alimentadas con HFD (Figures 3B-C). En conjunto, estos datos indican que la inhibición de AMPK α en el VMH protege frente a la obesidad inducida por dieta.

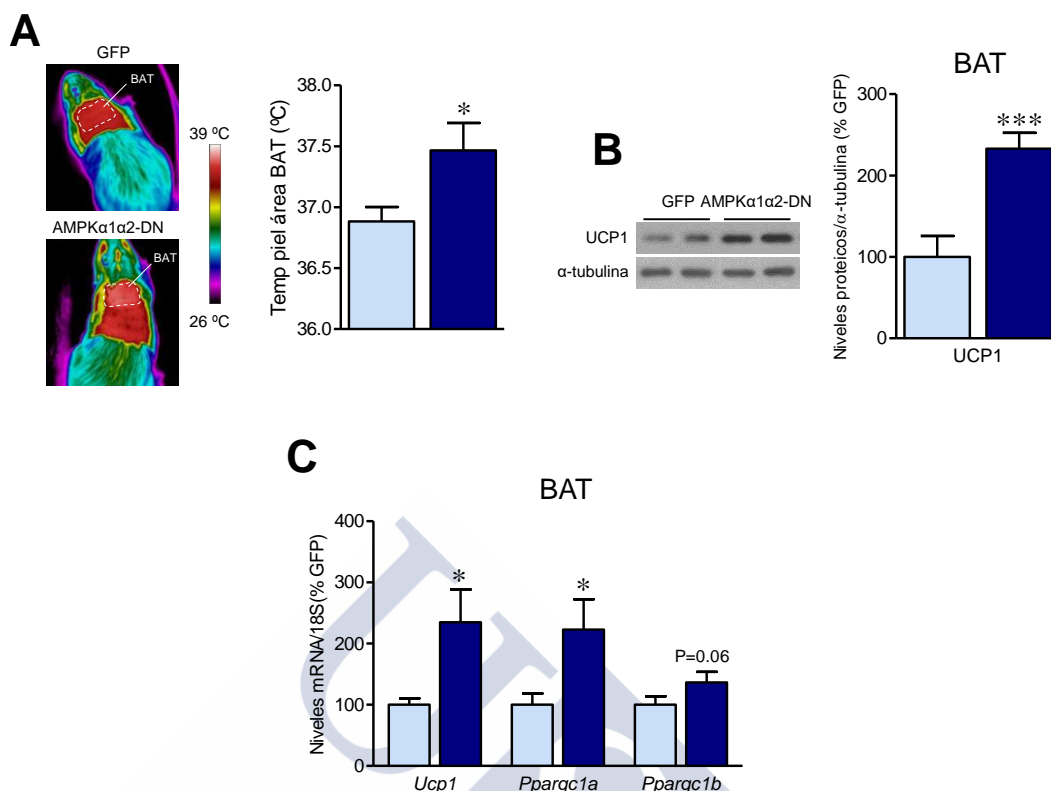


Figura 3. Efecto de la microinyección de AMPKα1α2-DN en el VMH en la termogénesis del BAT en ratas HFD. (A) Temperatura del área del BAT (n= 7 ratas/grupo), (B) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (n= 7 ratas/grupo), (C) niveles de mRNA de marcadores termogénicos en el BAT (n= 9 ratas/grupo) en ratas alimentadas HFD (A-B) o SD (C) tratadas en el VMH con adenovirus GFP o AMPKα1α2-DN. Test t-student (2 colas), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los gels del panel B han sido cortadas del mismo gel original.

2. LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE LA ISOFORMA AMPKα1 EN EL VMH REGULA EL GASTO ENERGÉTICO

Para investigar cual isoforma catalítica de AMPK, AMPKα1 o AMPKα2, era la implicada en la modulación de la termogénesis del BAT mediada por el VMH, tratamos ratas macho estereotáxicamente en el VMH con adenovirus que expresan AMPKα1-DN o AMPKα2-DN. Es necesario remarcar que, aunque ambas isoformas inducen un descenso significativo del peso corporal, AMPKα1-DN, pero no AMPKα2-DN, provoca un descenso del peso corporal de forma independiente de la ingesta (Figures 4A-C).

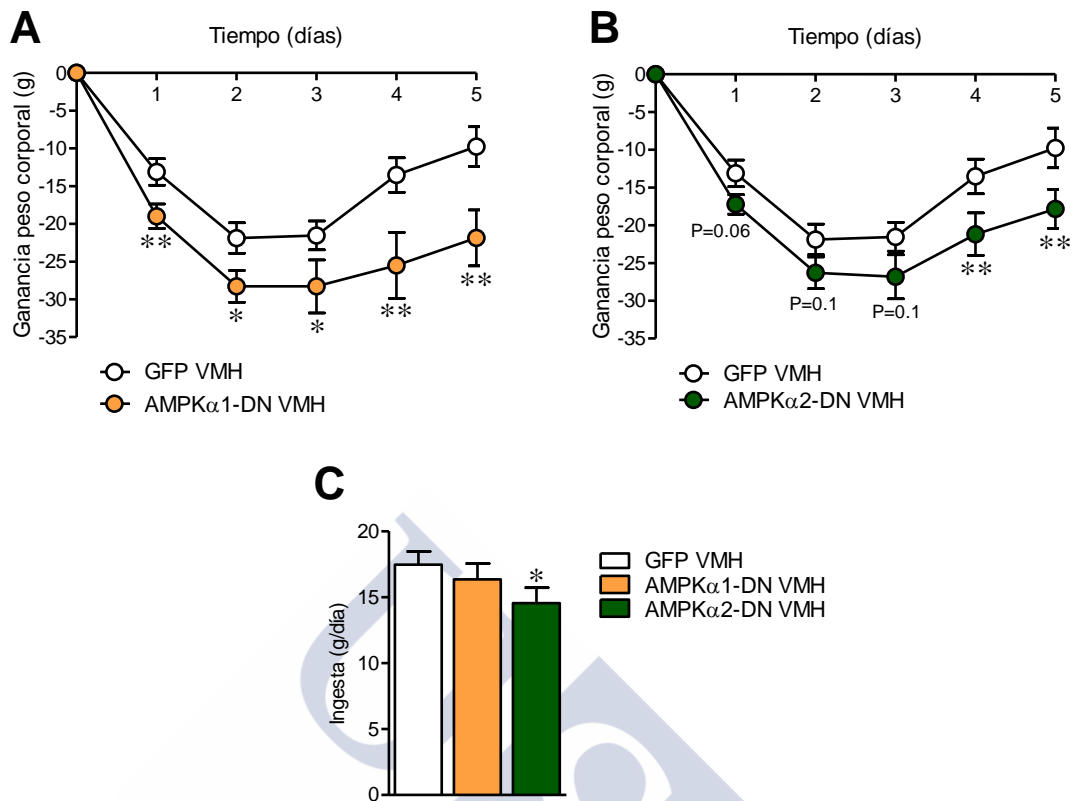


Figura 4. Efecto de la microinyección de AMPK α 1-DN o AMPK α 2-DN en el VMH en el balance energético en ratas. (A-B) Ganancia de masa corporal (n= 14-17 ratas/grupo) (C) ingesta diaria (n= 14-17 ratas/grupo) de ratas tratadas en el VMH con adenovirus GFP (n= 17) o AMPK α 1-DN (n= 14) o AMPK α 2-DN (n= 17). Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Estos datos sugieren que el efecto de AMPK en el BAT probablemente implique a la isoforma AMPK α 1. Dado que la termogénesis en el BAT es mayoritariamente controlada por el SNS a través de los receptores adrenérgicos beta 3^{73, 100}, decidimos investigar si el aumento de la actividad del BAT posterior a la administración de las partículas adenovirales AMPK α 1-DN o AMPK α 2-DN en el VMH era mediado por el SNS. Para ello, inactivamos farmacológicamente los receptores β 3 con el antagonista específico SR59230A^{203, 204, 212, 390} y observamos que el tratamiento con SR59230A prevenía el efecto sobre el BAT (Figure 5A) y la temperatura corporal (Figure 5B) asociada a la inyección de AMPK α 1-DN en el VMH. En consonancia, el tratamiento con SR59230A canceló el efecto reductor de peso de AMPK α 1-DN (GFP VMH: -9.76 \pm 2.62 g; AMPK α 1-DN VMH: -21.86 \pm 3.71 g, P<0.01 vs. GFP VMH; AMPK α 1-DN VMH + SR59230A SC: -12.71 \pm 2.93 g, P<0.05 vs. AMPK α 1-DN VMH).

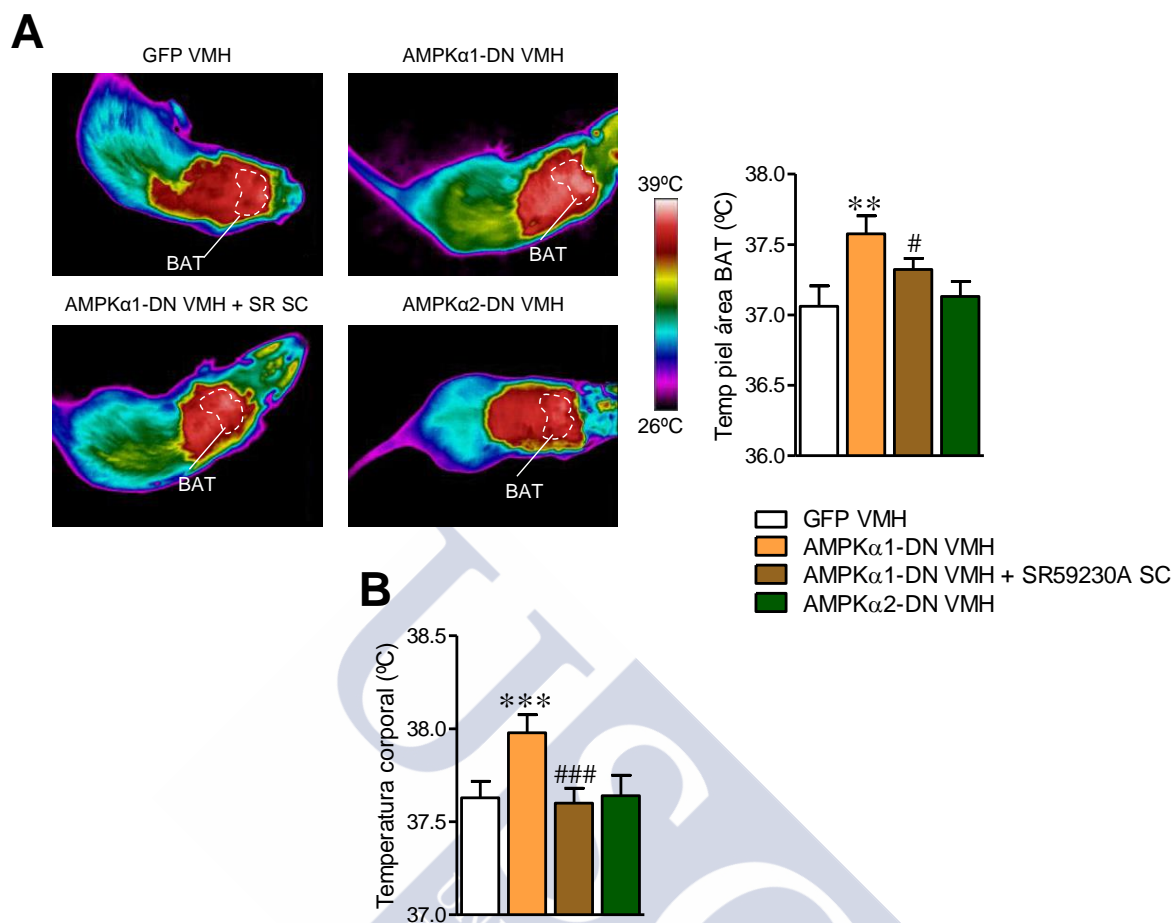


Figura 5. Efecto de la microinyección de AMPK α 1-DN o AMPK α 2-DN en el VMH en la termogénesis del BAT en ratas. (A) Temperatura del área del BAT (n= 14-17 ratas/grupo) y (B) Temperatura corporal (n= 14-17 ratas/grupo) de ratas tratadas en el VMH con adenovirus GFP (n= 17) o AMPK α 1-DN (n= 14) o AMPK α 2-DN (n= 17) y SC con SR59230A (n= 14). Test t-student (1 cola), **P<0.01, ***P<0.001 vs. GFP VMH; #P<0.05, ### P<0.001 vs. AMPK α 1-DN. Los datos están expresados como media \pm SEM.

3. LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE LA ISOFORMA AMPK α 1 EN EL VMH REVIERTE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

El siguiente objetivo fue evaluar el impacto de AMPK α 1-DN en ratas alimentadas con HFD. Observamos que la administración de adenovirus que expresan AMPK α 1-DN en el VMH de ratas macho obesas induce pérdida de peso independientemente de la ingesta (Figures 6A-B), asociados con un aumento de la temperatura del BAT (Figure 6C).

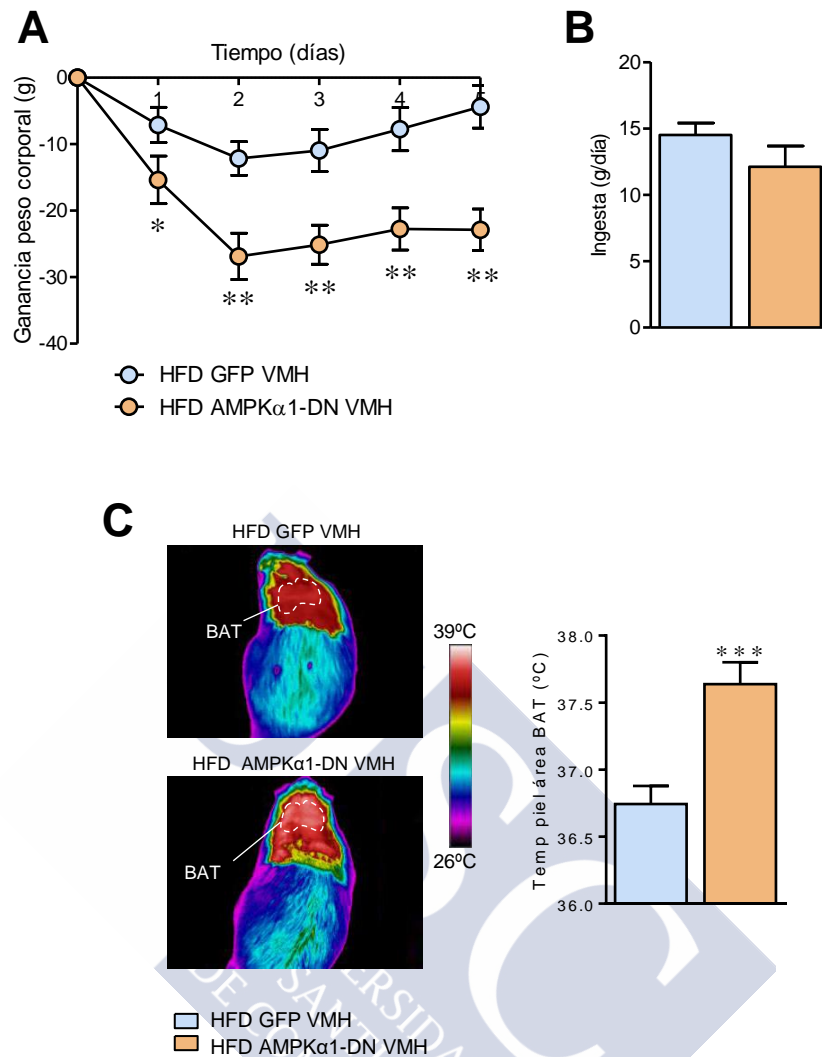


Figura 6. Efecto de la microinyección de AMPK α 1-DN en el VMH en el balance energético en ratas HFD. (A) Ganancia de masa corporal (n= 10-21 ratas/grupo), (B) ingesta diaria (n= 10-21 ratas/grupo) y (C) temperatura del área del BAT (n= 8 ratas/grupo) de ratas tratadas en el VMH con adenovirus GFP (n=21) o AMPK α 1-DN (n=10). Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En conjunto, estos datos indican que AMPK α 1, pero no AMPK α 2, es la isoforma clave que modula la termogénesis del BAT en el VMH y que su inhibición protege frente la obesidad inducida por dieta.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH

La demostración de que la inyección de adenovirus AMPK α 1-DN en el VMH activa la termogénesis de BAT y protege frente la obesidad inducida por dieta nos impulsó a identificar la población neuronal específica que estaba mediando estos efectos en el VMH. Las neuronas SF1 del VMH juegan un papel muy importante en la regulación del balance energético. Estas neuronas integran señales periféricas (como leptina, insulina e estradiol)^{158, 269, 391} con mediadores centrales (como glutamato)²⁷⁷ y proyectan a los centros autonómicos que modulan el SNS^{202, 391}. Debido a ello, generamos una línea de ratón deficiente en AMPK α 1

específica de tejido que expresan SF1 (SF1-Cre AMPK α 1^{flox/flox}) mediante el cruce de ratones floxeados para AMPK α 1 con ratones SF1 Cre, los cuales expresan Cre recombinasa bajo el promotor SF1, por lo tanto dirigiéndolo a este subconjunto de neuronas del VMH¹⁵⁸.

La efectividad de la eliminación del alelo AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH fue demostrada por una combinación de ensayos de PCR, ISH, doble hibridación *in situ* /inmunohistoquímica (IHC/ISH), RT-PCR y WB. Usando PCR específica para AMPK α 1 pudimos demostrar que este alelo estaba suprimido en el VMH, así como en otros tejidos que expresan de forma endógena SF1, tales como la glándula adrenal, testículos e hipófisis (Figure 7A). En contraste, otros tejidos examinados, incluidos el cerebelo, córtex cerebral e hígado no mostraron recombinación mediada por Cre (Figura 7A). Además, también medimos los niveles de AMPK α 1 usando RT-PCR y encontramos un descenso significativo de la expresión de AMPK α 1 en el VMH pero no en el córtex cerebral o el hígado (Figure 7B).

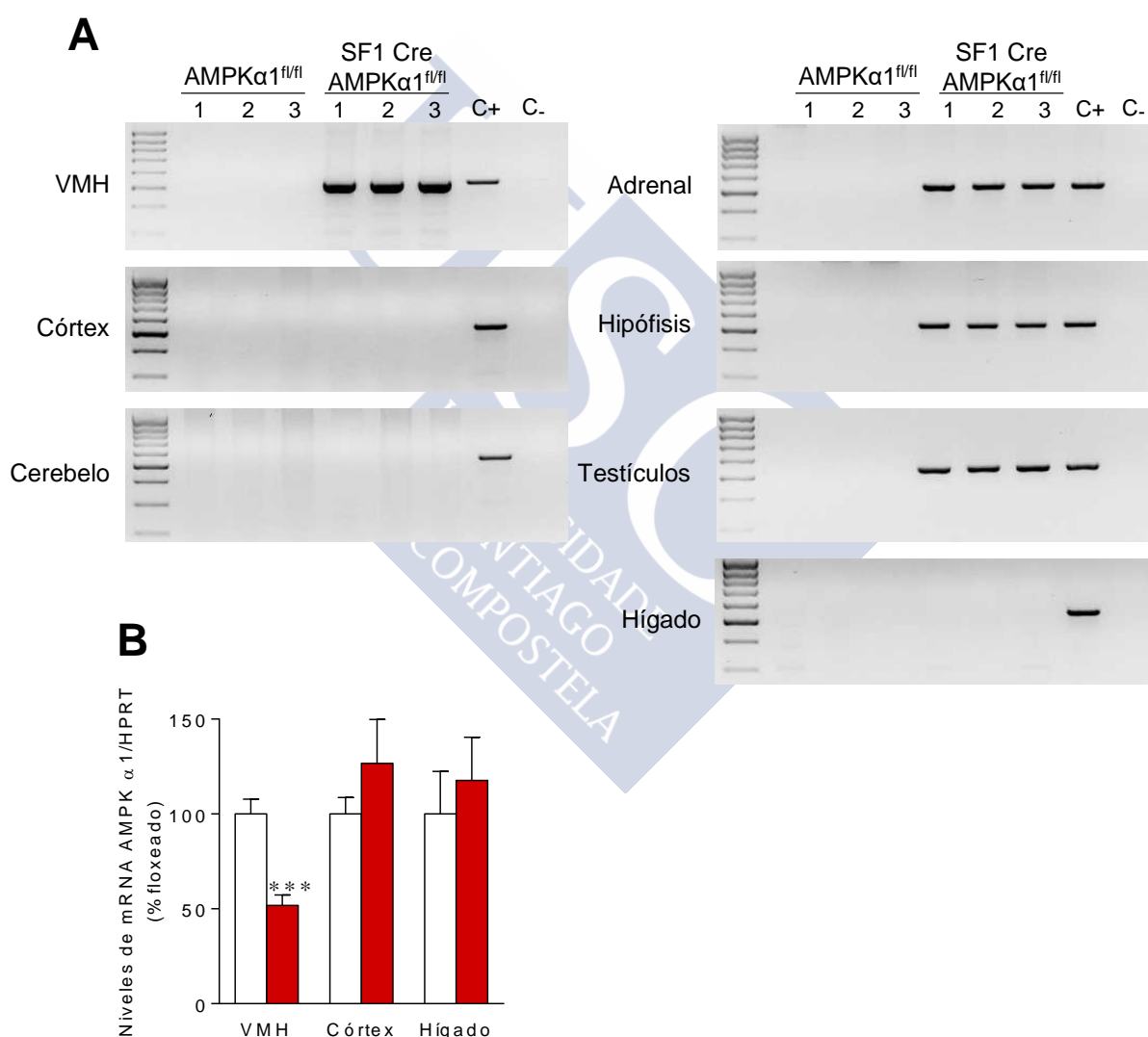


Figura 7. Estudio de la eliminación de AMPK α 1 en tejidos que expresan SF1. (A) PCR para la detección del alelo recombinado del gen Prkaa1 en los siguientes tejidos de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox}: VMH, córtex, cerebelo, glándula adrenal, hipófisis, testículos u hígado, (B) RT-PCR del exón 3 del gen Prkaa1 en el VMH de ratones en los siguientes tejidos de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=7) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=7): VMH, córtex e hígado. Test t-student (1 cola), ***P<0.001 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Para complementar la verificación de la eliminación de AMPK α 1 en el VMH, realizamos ISH empleando una sonda específica para la secuencia suprimida. La señal del mRNA de AMPK α 1 estaba reducida específicamente en el VMH de los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox}, confirmando la eliminación específica en el VMH (Figura 8A). Para caracterizar más profundamente la eliminación específica de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH en el modelo KO condicional (CKO, *conditional knockout*), realizamos una técnica dual para la detección simultánea de inmunoreactividad de SF1 (por IHC) y del mRNA de AMPK α 1 (por ISH). Para esta última técnica empleamos una sonda dirigida selectivamente contra la secuencia eliminada del alelo (es decir, la secuencia flanqueada por los sitios lox-P). Detectamos co-localización del mRNA de AMPK α 1 en una proporción substancial de neuronas SF1 en el VMH. En claro contraste, esta proporción descendía significativamente a casi niveles despreciables en los ratones SF1-Cre AMPK α 1^{flox/flox}, confirmando de esta manera la eliminación efectiva de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH (Figure 8B).

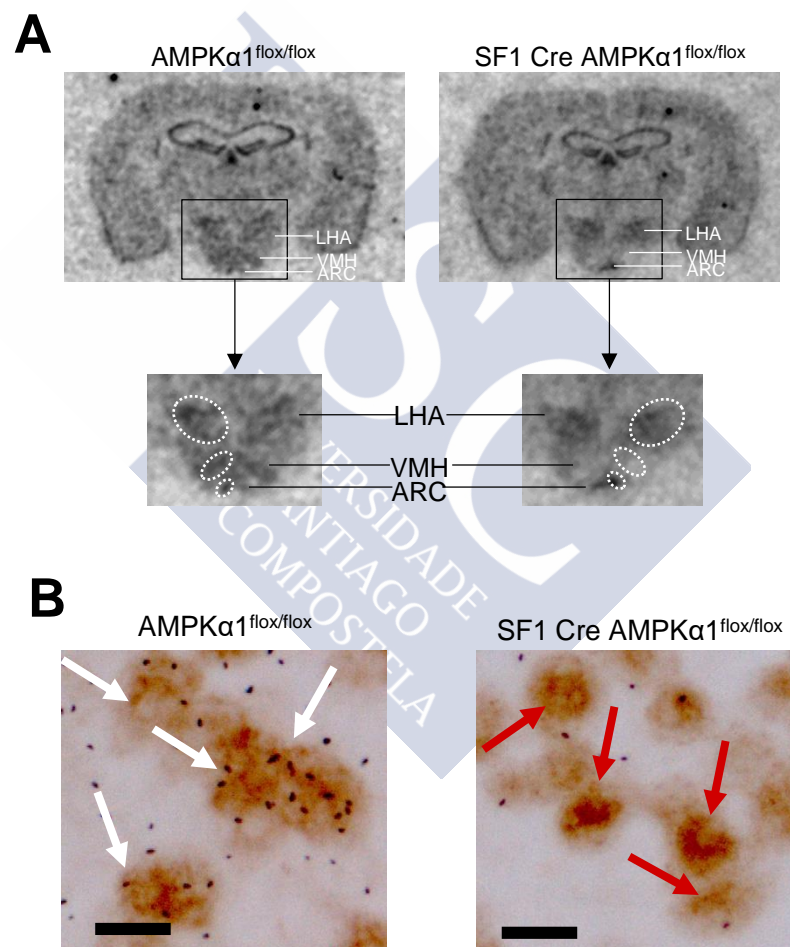


Figura 8. Estudio de la eliminación de AMPK α 1 en tejidos del hipotálamo. (A) Hibridación in situ para el mRNA del exón 3 del gen *Pkraa1* en el cerebro de ratones SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox}, y (B) doble inmunohistoquímica/hibridación in situ para SF1 y AMPK α 1, respectivamente en el VMH de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1-Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Las flechas blancas y rojas indican la presencia o ausencia de colocalización, respectivamente. Barra de escala: 20 μ m.

5. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH DISMINUYE EL PESO CORPORAL Y AUMENTA EL GASTO ENERGÉTICO

Basándonos en el efecto previamente observado que produce la inhibición de AMPK α 1 en el VMH de rata, el siguiente paso de este trabajo consistió en investigar el efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH en la homeostasis energética. Lo que observamos es que los ratones macho SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraban menor peso corporal (Figura 9A) y adiposidad (Figura 9B), mientras que no se observaban diferencias comparables en la longitud corporal (Figura 9C), ni en la ingesta (Figura 9D) entre los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} y sus hermanos de camada.

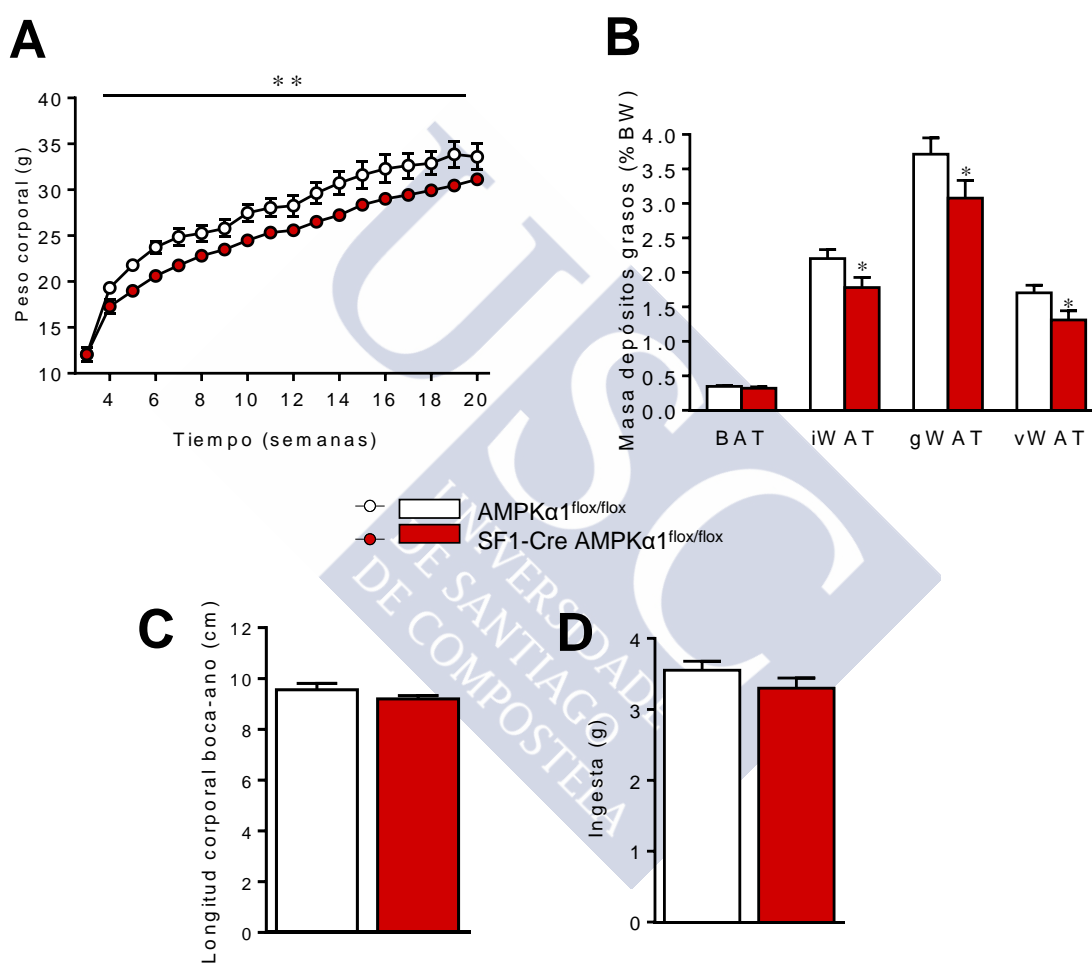


Figura 9. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en el balance energético. (A) Ganancia de masa corporal (AMPK α 1^{flox/flox} n= 12, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 23), (B) masa de depósitos grasos (AMPK α 1^{flox/flox} n= 12, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 23), (C) longitud corporal (AMPK α 1^{flox/flox} n= 7, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 8), (D) ingesta diaria (n= 8 ratones/grupo) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En concordancia con estos datos, los análisis de western blot de la ruta de AMPK hipotalámica en el VMH mostraron un descenso de los niveles proteicos de pAMPK, AMPK α 1 (pero no AMPK α 2) y pACC (Figure 10). Por el contrario, los niveles de FAS, la cual es inhibida por AMPK, estaban elevados en el VMH de los ratones SF1-Cre AMPK α 1^{flox/flox} (Figure 10).

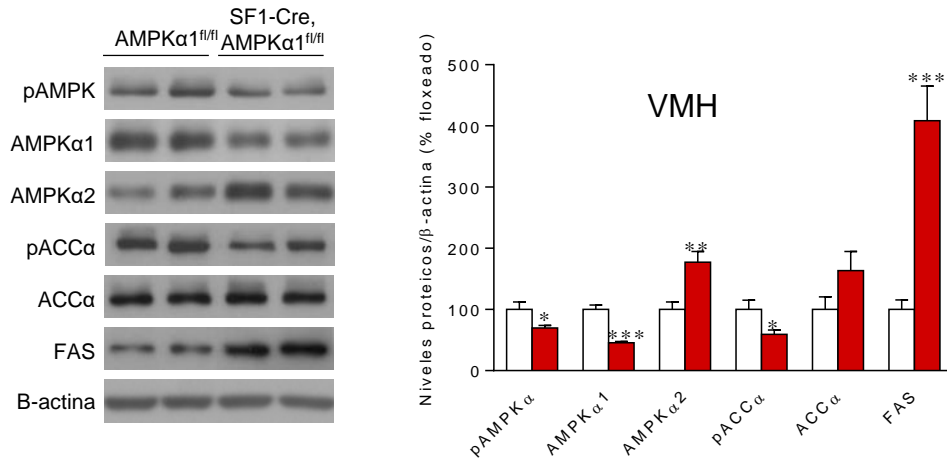


Figura 10. Efecto de la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 en la ruta de AMPK hipotalámica. Niveles proteicos de la ruta de AMPK (n= 7 ratones/grupo; excepto AMPKα1 n=14 ratones/grupo) en el VMH de ratones AMPKα1^{fllox/fllox} y SF1Cre AMPKα1^{fllox/fllox}. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. AMPKα1^{fllox/fllox}. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los geles han sido cortadas del mismo gel original.

Para caracterizar el efecto en el VMH que la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 podía estar ejerciendo en otras rutas clave en la modulación del balance energético, como son el ER estrés y la inflamación. Lo que observamos fue que los ratones SF1 Cre AMPKα1^{fllox/fllox}, presentaban un descenso significativo de estrés del RE (Figura 11).

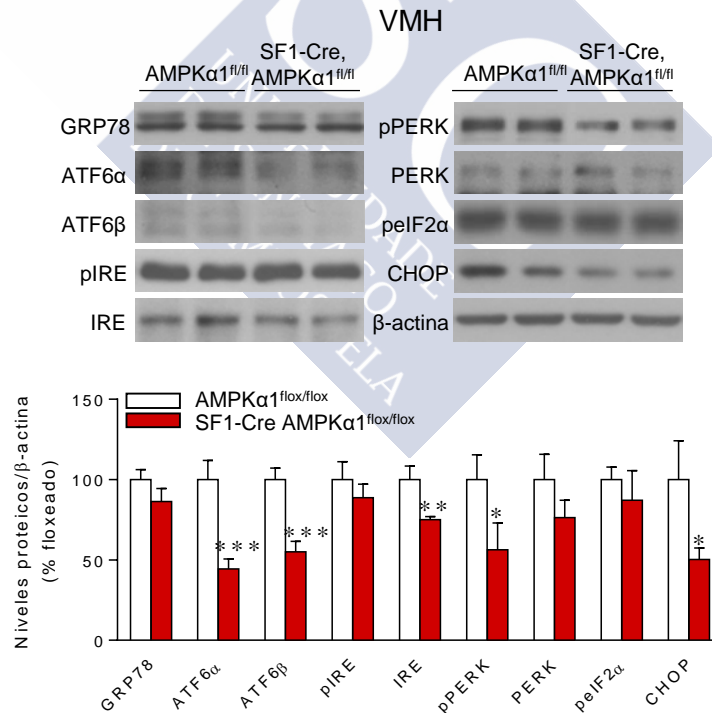


Figura 11. Efecto de la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 en el ER estrés hipotalámico. Niveles proteicos de la ruta de ER estrés (n= 14 ratones/grupo, excepto PERK n=7 ratones/grupo) en el VMH de ratones AMPKα1^{fllox/fllox} y SF1Cre AMPKα1^{fllox/fllox}. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. AMPKα1^{fllox/fllox}. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los geles han sido cortadas del mismo gel original.

Por otro lado, el análisis de los niveles plasmáticos mostró que los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraban menores niveles de triglicéridos, NEFAs y leptina, mientras que los niveles de colesterol no estaban modificados (Tabla 1).

SD	TAG	Colesterol	NEFAs	Leptina
AMPK α 1 ^{flox/flox}	170,3 \pm 17,9	221,5 \pm 28,15	15,6 \pm 2,21	15,9 \pm 1,8
SF1 Cre AMPK α 1 ^{flox/flox}	117,2 \pm 14,0*	225,3 \pm 15,6	10,1 \pm 1,3*	8,17 \pm 1,8**

Tabla 1. Niveles séricos en ratones alimentados SD.

De acuerdo con estos datos, los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraron un mayor EE (Figura 12A) y menor LA (Figura 12B), mientras que no se observaron cambios en el RQ (Figura 12C) en comparación con sus controles.

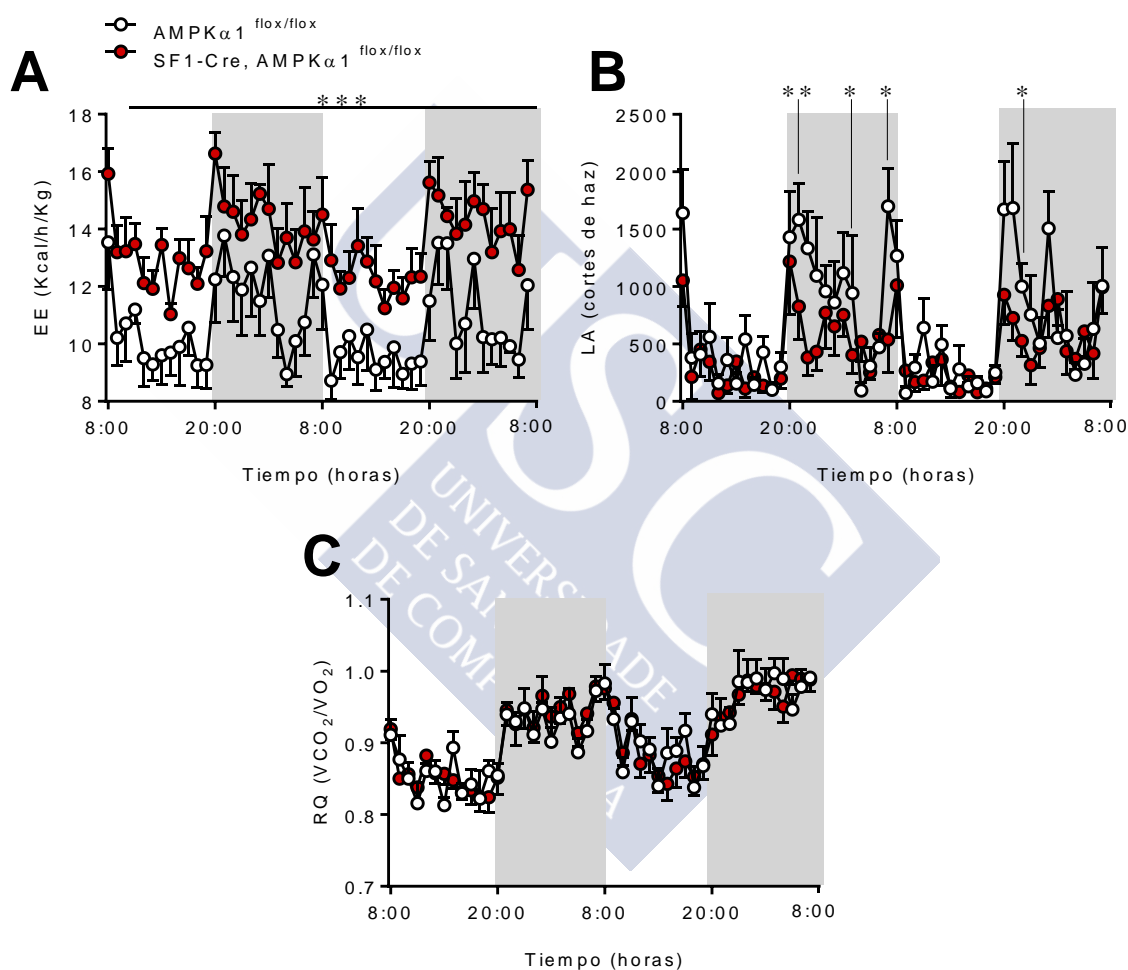


Figura 12. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en gasto energético. (A) Gasto energético (EE, energy expenditure), (B) actividad locomotora (LA, locomotor activity), y (C) coeficiente respiratorio (RQ, respiratory quotient) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=5) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=6). Los datos están expresados como media \pm SEM. Test t-student (1 cola), *P<0.05, ***P<0.001 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Debido a estos resultados, el siguiente paso fue estudiar el efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH en el BAT. En concordancia con los datos obtenidos hasta el momento, los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraban mayor activación del BAT, como lo demuestra la observación mediante PET-CT de una mayor captación de ¹⁸F-FDG por

este tejido analizado (Figure 13A), una mayor temperatura del BAT (Figure 13B) y un mayor “firing” de los nervios simpáticos que inervan el BAT (Figure 13C) que sus controles.

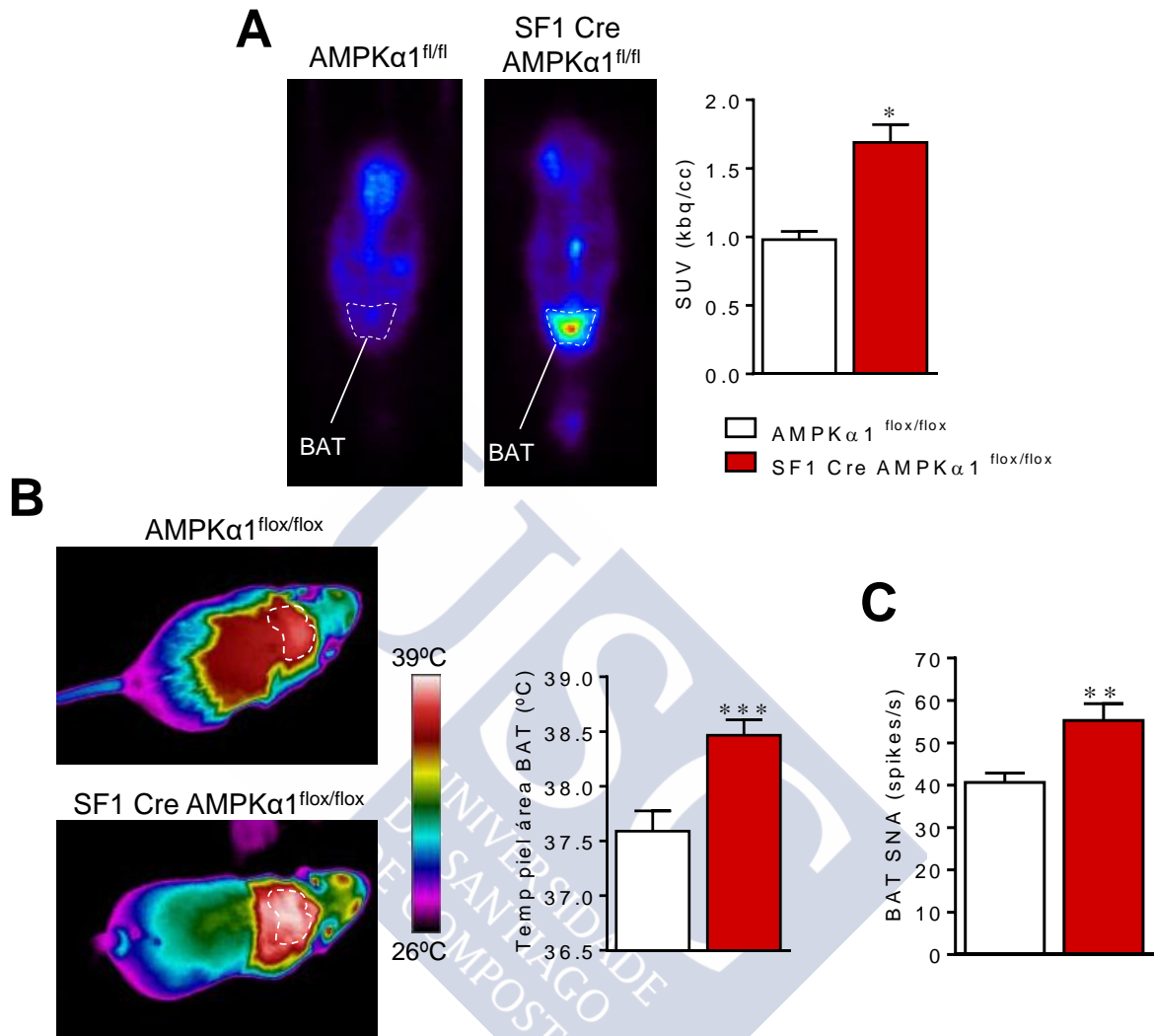


Figura 13. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en la activación del BAT. (A) Escáner PET-CT (AMPK α 1^{flox/flox} n= 5, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 6), (B) temperatura del área del BAT (AMPK α 1^{flox/flox} n= 12, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n= 17) y (C) registro de la actividad nerviosa del SNS al BAT (n= 8 ratones/grupo), de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En concordancia con estos datos, el análisis molecular del BAT mostraba niveles elevados de mRNA y/o expresión proteica de todos los marcadores termogénicos examinados (Figures 14 A-B).

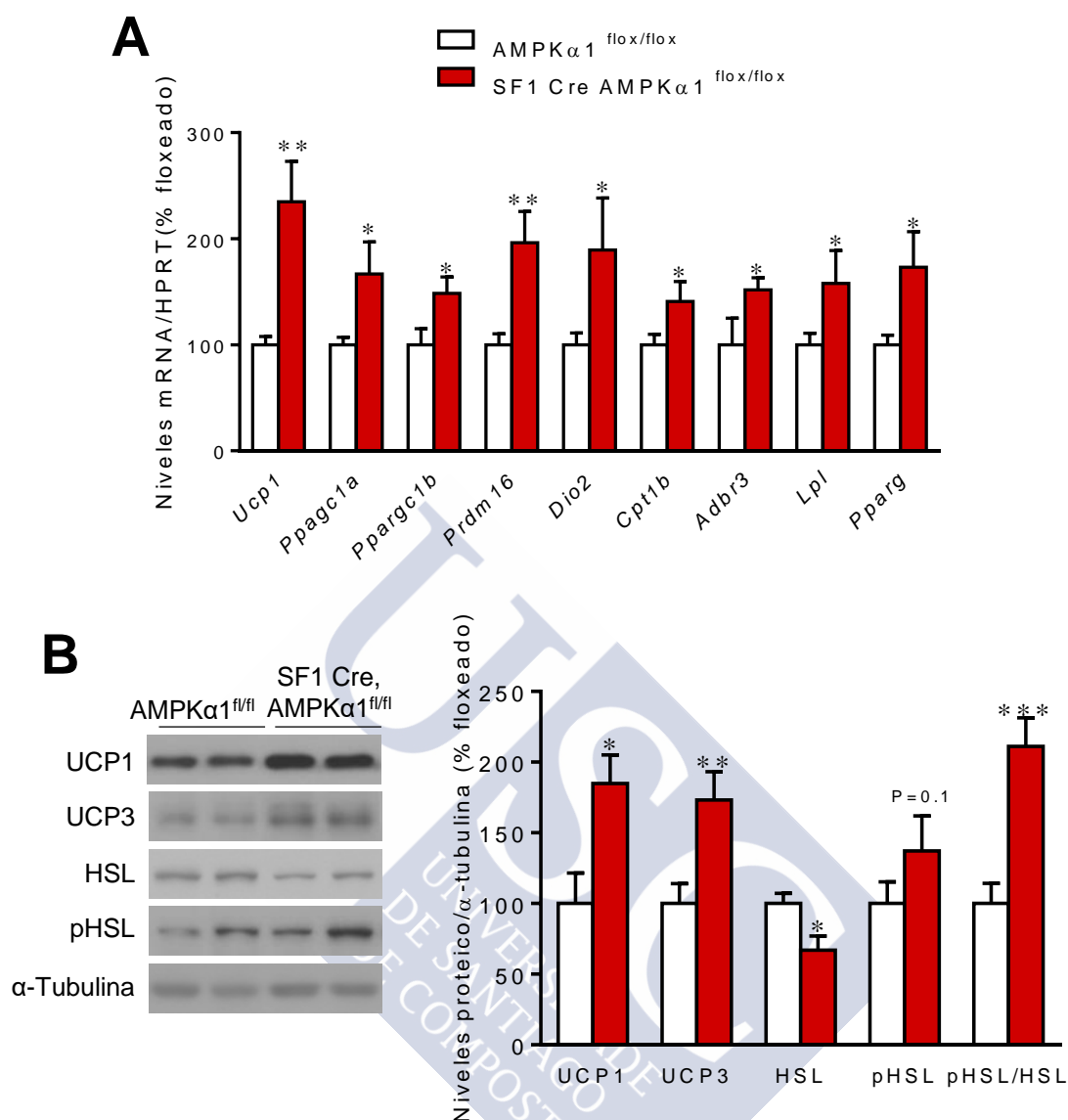


Figura 14. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en la termogénesis del BAT. (A) Niveles de mRNA de marcadores termogénicos en el BAT (n= 8 ratones/grupo) y (B) niveles proteicos de UCP1 y marcadores de actividad del BAT (n= 7 ratones/grupo) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los geles del panel B han sido cortadas del mismo gel original.

Sin embargo, bajo inactivación farmacológica del receptor adrenérgico β 3 mediante el tratamiento SC con el antagonista específico SR59230A^{203, 204, 390} se revertía la pérdida de peso y el incremento en la temperatura del área del BAT en los ratones macho SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} (Figura 15A-C).

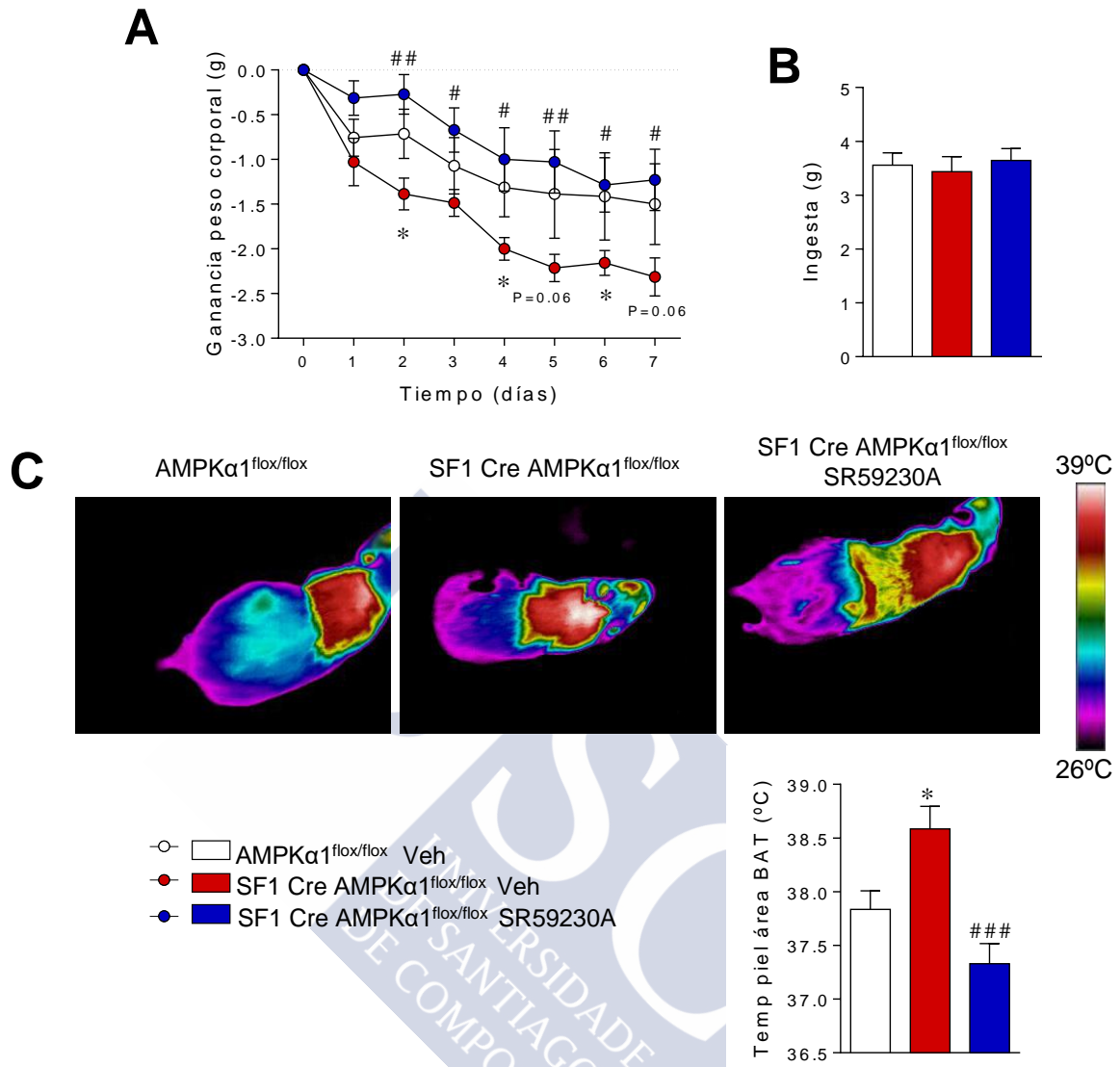


Figura 15. Efecto del bloqueo del SNS en ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1. (A) Ganancia de masa corporal, (B) ingesta diaria, y (C) temperatura del área del BAT de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=6) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=6) tratados SC con SR59230A (n=6). Test t-student (1 cola), *P<0.05, vs. AMPK α 1^{flox/flox}; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs. SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

A pesar de la activación de BAT, al medir la temperatura corporal con una sonda rectal, no pudimos observar diferencias en los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} respecto a sus controles (Figura 16A).

Para identificar el mecanismo mediante el cual los ratones macho SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} estaban minimizando el efecto termogénico del BAT en la temperatura corporal decidimos realizar un procedimiento para observar la posible regulación de la vasoconstricción y vasodilatación de la vascularización de la cola, el cual es un mecanismo de regulación de temperatura muy importante en roedores³⁹². Lo que observamos fue que los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} presentaban una mayor disipación de temperatura por la base de la cola cuando se encontraban en termoneutralidad (30°C) o por debajo de la termoneutralidad (26°C) (Figura 16B-C) lo que derivaba en una regulación eficiente de su temperatura corporal (Figura 16D). Sin embargo, al encontrarse por encima de la

termoneutralidad (34°C) (Figura 16B-D), este mecanismo dejaba de ser eficiente (Figura 16B-C) y los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraban un aumento de temperatura corporal característico de una mayor activación de BAT, en comparación con sus controles en la misma situación (Figura 16D).

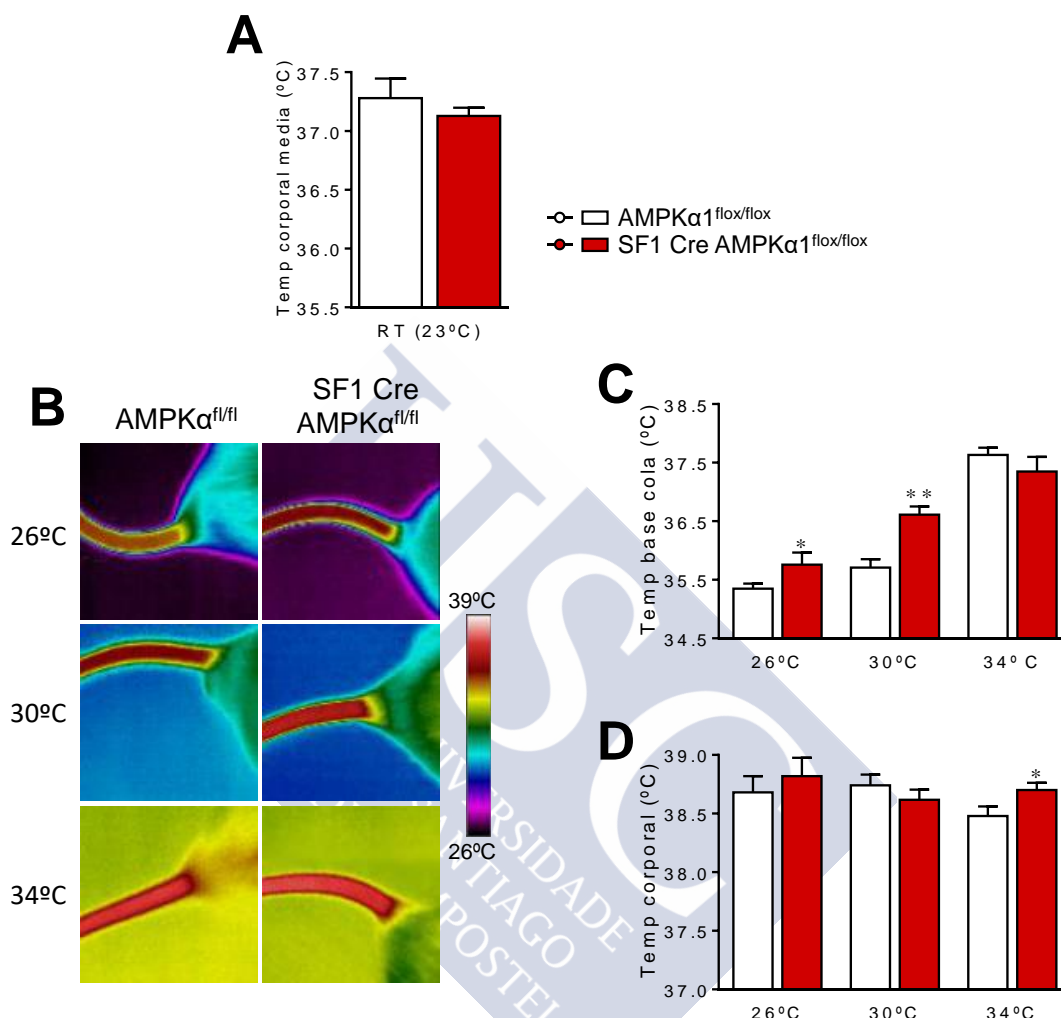


Figura 16. Efecto de la aclimatación a distintas temperaturas en la regulación de la temperatura corporal en ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1. (A) Temperatura media corporal a RT, (B) imágenes térmicas de la base de la cola, (C) temperatura de la base de la cola, y (D) temperatura corporal de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=6) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=6) aclimatados a 26°, 30° o 34°C. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Finalmente, los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} fueron expuestos a frío (4°C) durante 6 horas. Este procedimiento demostró que estos ratones defienden su temperatura corporal (Figura 17E) y la temperatura del área del BAT (Figura 17A-C) mejor que sus hermanos de camada AMPK α 1^{flox/flox}. En estas condiciones ambientales no encontramos diferencias en la disipación de la temperatura por la base de la cola (Figura 17D).

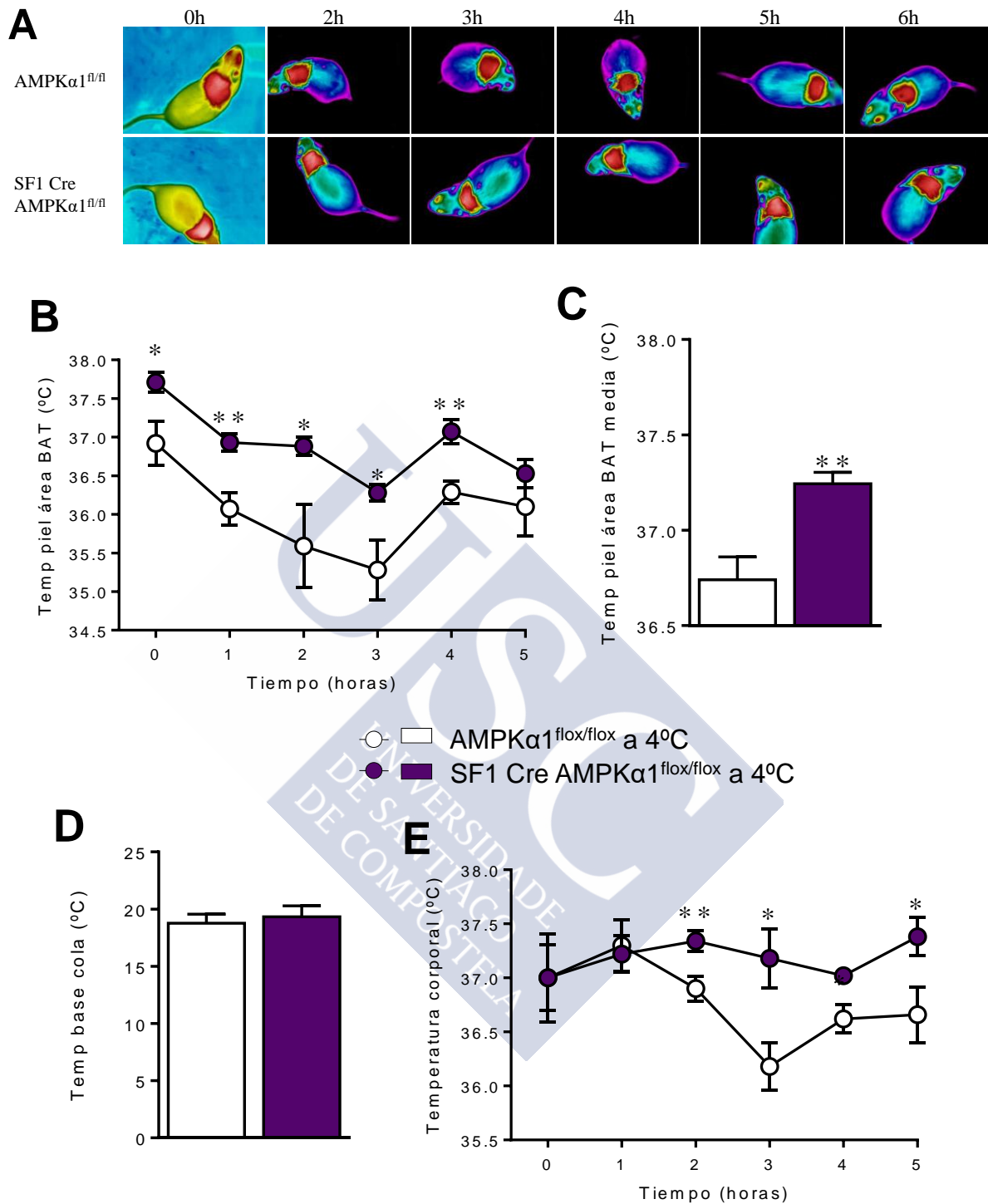


Figura 17. Efecto de la exposición a 4°C en la regulación de la temperatura corporal en ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1. (A) Imágenes térmicas del área de BAT, (B) temperatura del área del BAT, (C) temperatura media del área del BAT en 6h, y (D) temperatura de la base de la cola, y (E) temperatura corporal de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=5) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=5) expuestos a 4°C durante 6h. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. AMPK α 1^{flox/flox} a 4°C. Los datos están expresados como media \pm SEM.

6. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH INCREMENTA EL *BROWNING* DEL WAT

A continuación, decidimos investigar si este aumento de gasto energético también podía ser debido a un aumento de la capacidad termogénica del WAT. Para ello analizamos marcadores termogénicos en el WAT SC, ya que este ha sido descrito como el depósito adiposo con mayor capacidad de *browning*^{102, 393, 394}. Lo que observamos fue que los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} mostraban una mayor expresión de estos marcadores en la grasa SC (Figura 18), lo que sería indicativo de *browning* del WAT.

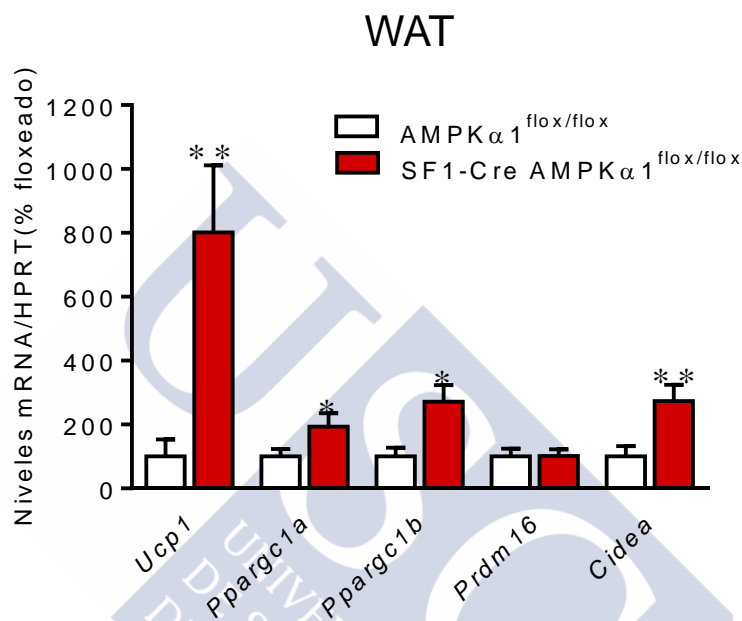


Figura 18. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en el *browning* del WAT. Niveles de mRNA de marcadores termogénicos en el WAT de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=8) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=8). Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

7. LA SOBREEXPRESIÓN DE AMPK α 1 REVIERTE EL BALANCE ENERGÉTICO EN LOS RATONES SF1 AMPK α 1^{FLOX/FLOX}

Aparte de en el VMH, SF1 también es expresado en órganos periféricos, como la glándula adrenal y los testículos. Por ello, es posible que el fenotipo de los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} sea debido a la pérdida de AMPK α 1 en esos tejidos. Para investigar esta posibilidad, los ratones macho SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} fueron tratados estereotáxicamente en el VMH con adenovirus que expresa una isoforma constitutivamente activa de AMPK α 1 (AMPK α 1-CA). Esto promovió un aumento en el peso corporal de forma independiente a la ingesta en los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} /AMPK α 1-CA (Figures 19A-B), asociado con un descenso de la temperatura del área del BAT (Figura 19C) y de la expresión de UCP1 (Figures 19D).

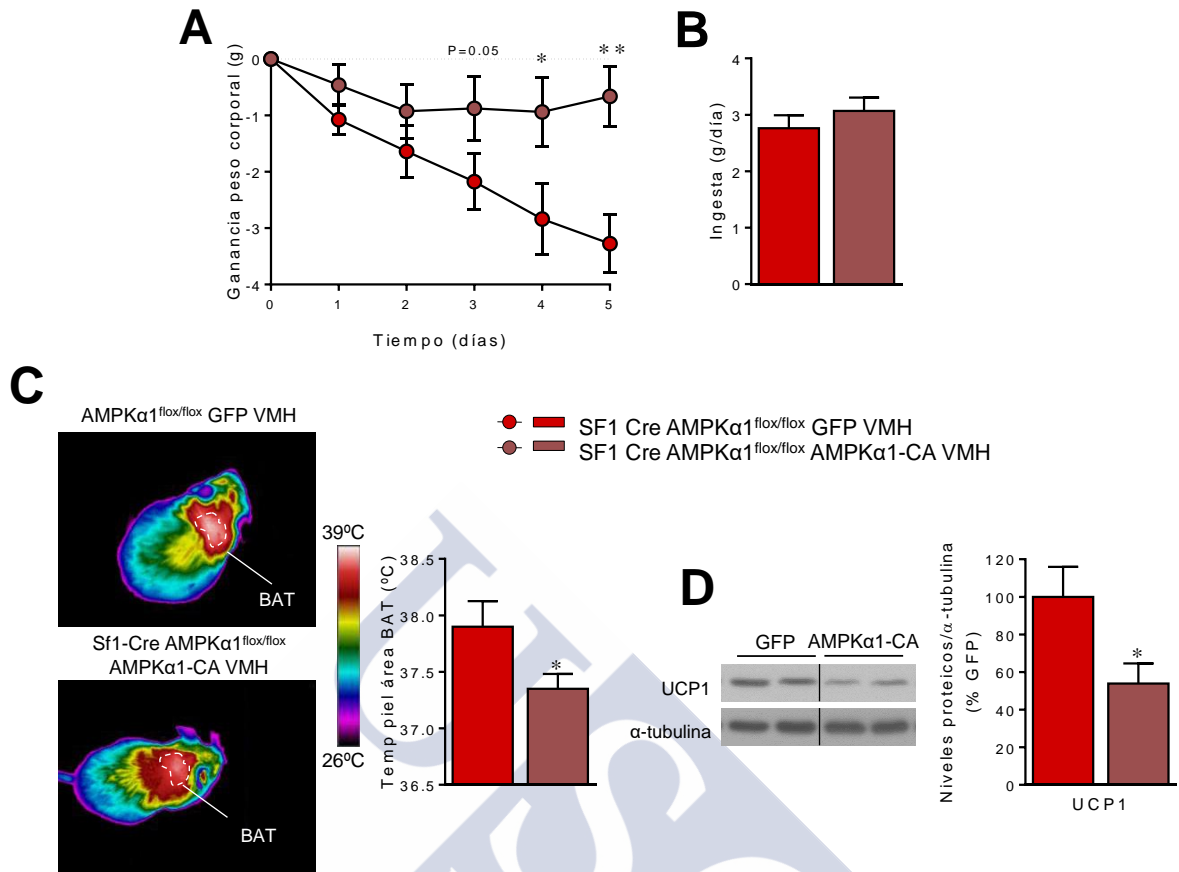


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de AMPKα1-CA en el VMH de ratones deficientes en AMPKα1 en las neuronas SF1 en el balance energético. (A) Ganancia de masa corporal (n= 8 ratones/grupo), (B) ingesta media diaria (n= 8 ratones/grupo), (C) temperatura del área del BAT (n= 8 ratones/grupo), (D) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (n= 7 ratones/grupo) de SF1Cre AMPKα1^{flox/flox} tratados en el VMH con GFP o adenovirus AMPKα1-CA. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los gels del panel D han sido cortadas del mismo gel original.

En conjunto, estas evidencias demuestran que la eliminación específica de AMPKα1 en las neuronas SF1 del VMH promueve un balance energético negativo a través de un proceso que implica la activación de la termogénesis en el BAT y el subsecuente aumento en EE.

8. LA ELIMINACIÓN DE AMPKα1 EN LAS NEURONAS SF1 MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

En relación a hígado, estudios previos²¹² demostraron que la inhibición de AMPKα en el VMH mediada por las THs modula el metabolismo lipídico hepático a través de la señalización de JNK en el VMH, lo que aumenta la señalización del PSNS hacia el hígado²¹². Para corroborar si este efecto estaba mediado por la isoforma AMPKα1, analizamos los niveles de expresión proteica de pJNK en el núcleo VMH y observamos un aumento de esta proteína en los ratones SF1 Cre AMPKα1^{flox/flox} (Figura 20A) respecto a sus hermanos de camada AMPKα1^{flox/flox}. Esto iba acompañado por un descenso en la activación de la ruta de AMPK en el hígado (Figure 20B), lo que es indicativo de un aumento de la lipogénesis, como lo demuestra el aumento de los niveles que TAG hepáticos (Figure 20C).

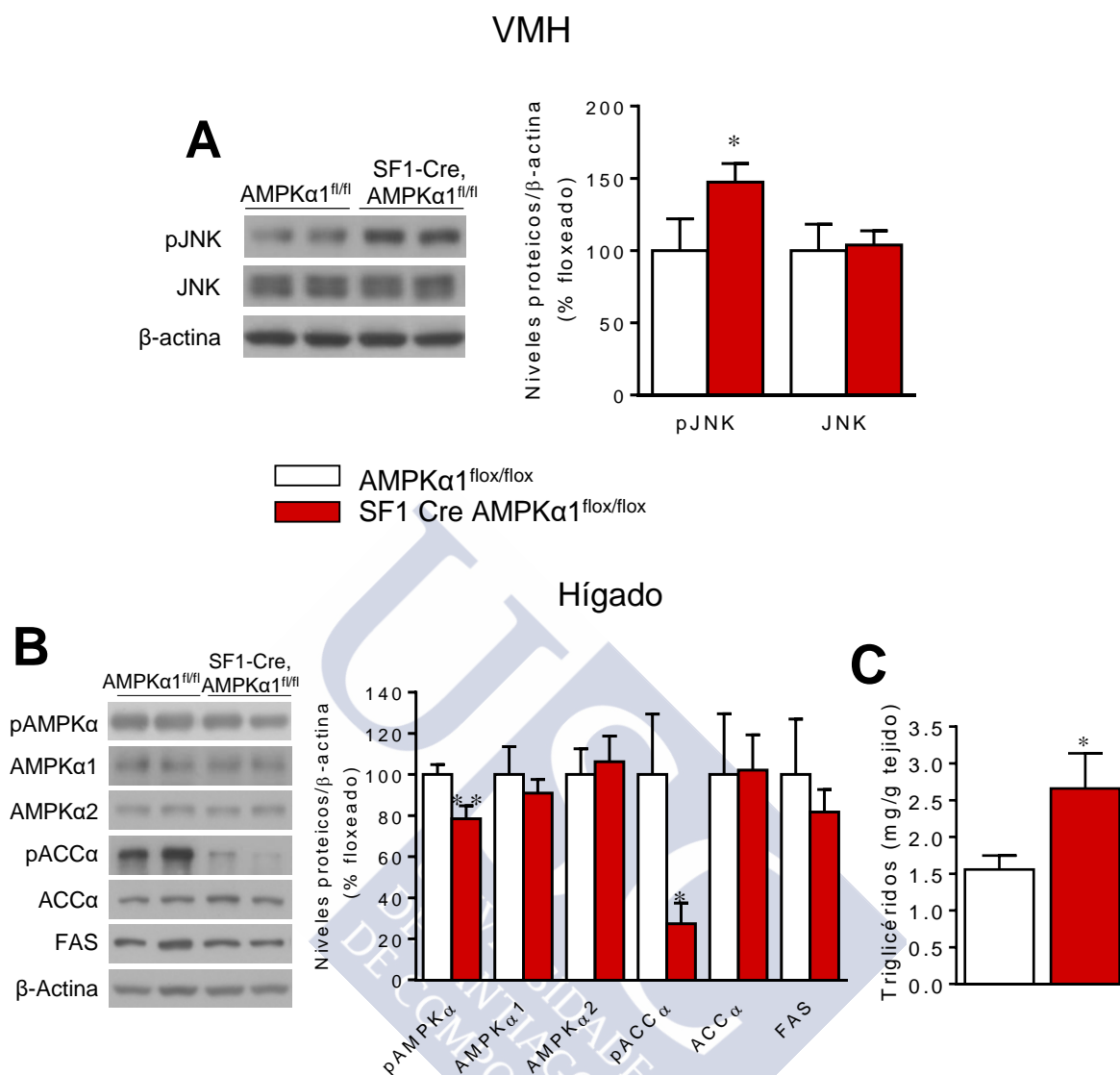


Figura 20. Efecto de la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 en la lipogénesis hepática. (A) Niveles proteicos de pJNK y JNK en el VMH, (B) niveles proteicos de la rutas de AMPK en el hígado, y (C) contenido hepático en TAG de ratones AMPKα1 flox/flox (n=7) y SF1Cre AMPKα1 flox/flox (n=7). Los datos están expresados como media±SEM. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. AMPKα1 flox/flox. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los geles de los paneles A y B han sido cortadas del mismo gel original.

9. LOS RATONES DEFICIENTES EN AMPKα1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH SON RESISTENTES A LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

Una vez demostrado que la eliminación específica de AMPKα1 en las neuronas SF1 inducen un balance energético negativo mediado por el aumento de termogénesis, evaluamos si los ratones macho SF1 Cre AMPKα1 flox/flox estaban protegidos frente al desarrollo de obesidad. Al compararlos con sus hermanos de camada, los ratones CKO alimentados con HFD mostraban un menor peso corporal y adiposidad, independientemente de la ingesta (Figura 21A-D).

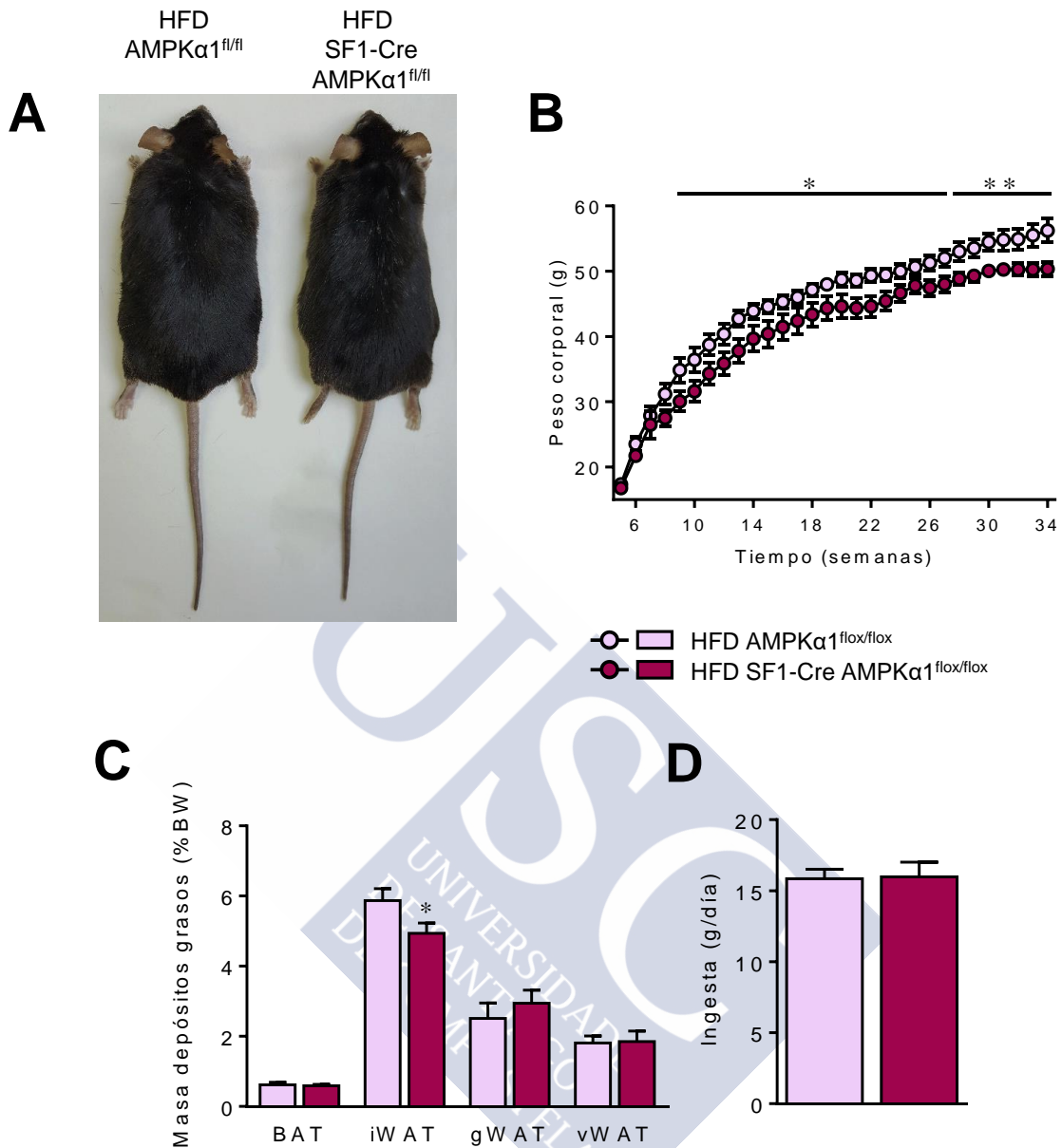


Figura 21. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en el balance energético en ratones HFD. (A) Imágenes representativas, (B) ganancia de masa corporal, (C) masa de depósitos grasos (D) ingesta diaria de ratones AMPK α 1^{fl/fl} (n=11) y SF1Cre AMPK α 1^{fl/fl} (n=10) alimentados con HFD. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01 vs. HFD AMPK α 1^{fl/fl}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En consonancia con estos resultados, los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH mostraban un aumento de EE (Figura 22A) y una ligera tendencia a presentar mayor actividad locomotora (Figura 22B), sin cambios en el RQ (Figura 22C).

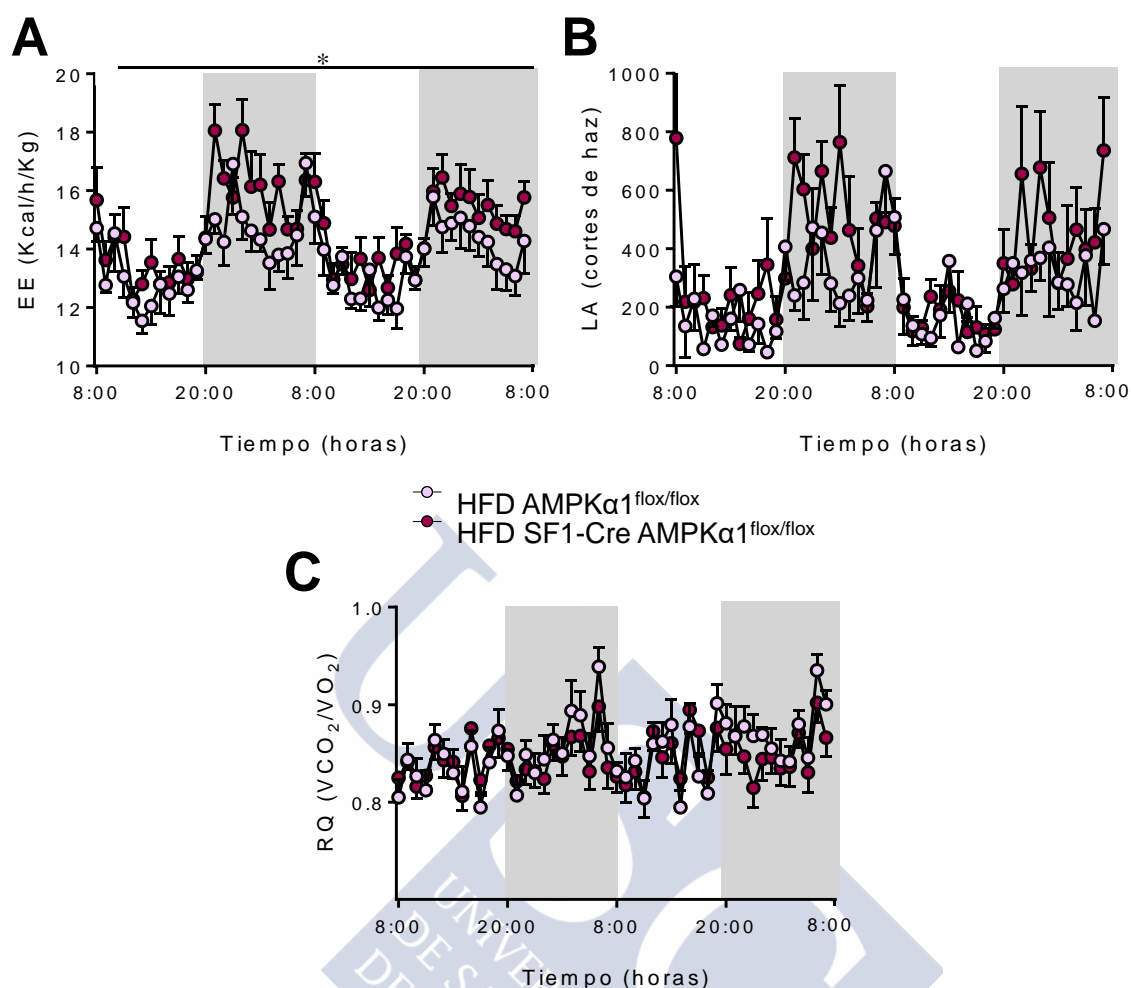


Figura 22. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en el gasto energético en ratones HFD. (A) gasto energético (EE, energy expenditure), (B) actividad locomotora (LA, locomotor activity), y (C) coeficiente respiratorio (RQ, respiratory quotient) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} (n=5) y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} (n=8) alimentados con HFD. Test t-student (1 cola), *P<0.05 vs. HFD AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

A su vez, los niveles plasmáticos de NEFAs y leptina, pero no los de triacilglicéridos y colesterol, estaban disminuidos en los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD (Tabla 2).

HFD	TAG	NEFAs	Colesterol	Leptina
AMPK α 1 ^{flox/flox}	145,74 \pm 27,76	17,22 \pm 2,1	336,28 \pm 34,74	71,37 \pm 5,3
SF1 Cre AMPK α 1 ^{flox/flox}	148,22 \pm 18,49	9,42 \pm 1,25**	303,06 \pm 31,02	57,05 \pm 5,11*

Tabla 2. Niveles séricos en ratones alimentados con HFD.

10. LA ELIMINACIÓN DE AMPK α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH REDUCE EL ER ESTRÉS Y LA INFLAMACIÓN HIPOTALÁMICA EN RATONES OBESOS

El análisis del VMH de los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD demostró un descenso de los niveles de pACC α (Figure 23A), como era de esperar debido a la eliminación de AMPK α 1. Datos recientes demostraron que la inflamación hipotalámica y el estrés de ER induce obesidad e inhibe la termogénesis del BAT y el browning del WAT ²¹²,

221, 296, 379, 390, 395 por lo que estudiamos el estado de estas rutas en los ratones alimentados con HFD. Se observó una reducción en el ER estrés (Figura 23B) y de los marcadores de inflamación (Figura 23C) en el VMH de los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} en comparación con sus controles AMPK α 1^{flox/flox}. Además, los ratones CKO presentaban una inhibición de la ruta de señalización de la autofagia, como mostraban los niveles reducidos de la proteína fosforilada ULK (Figura 23D).

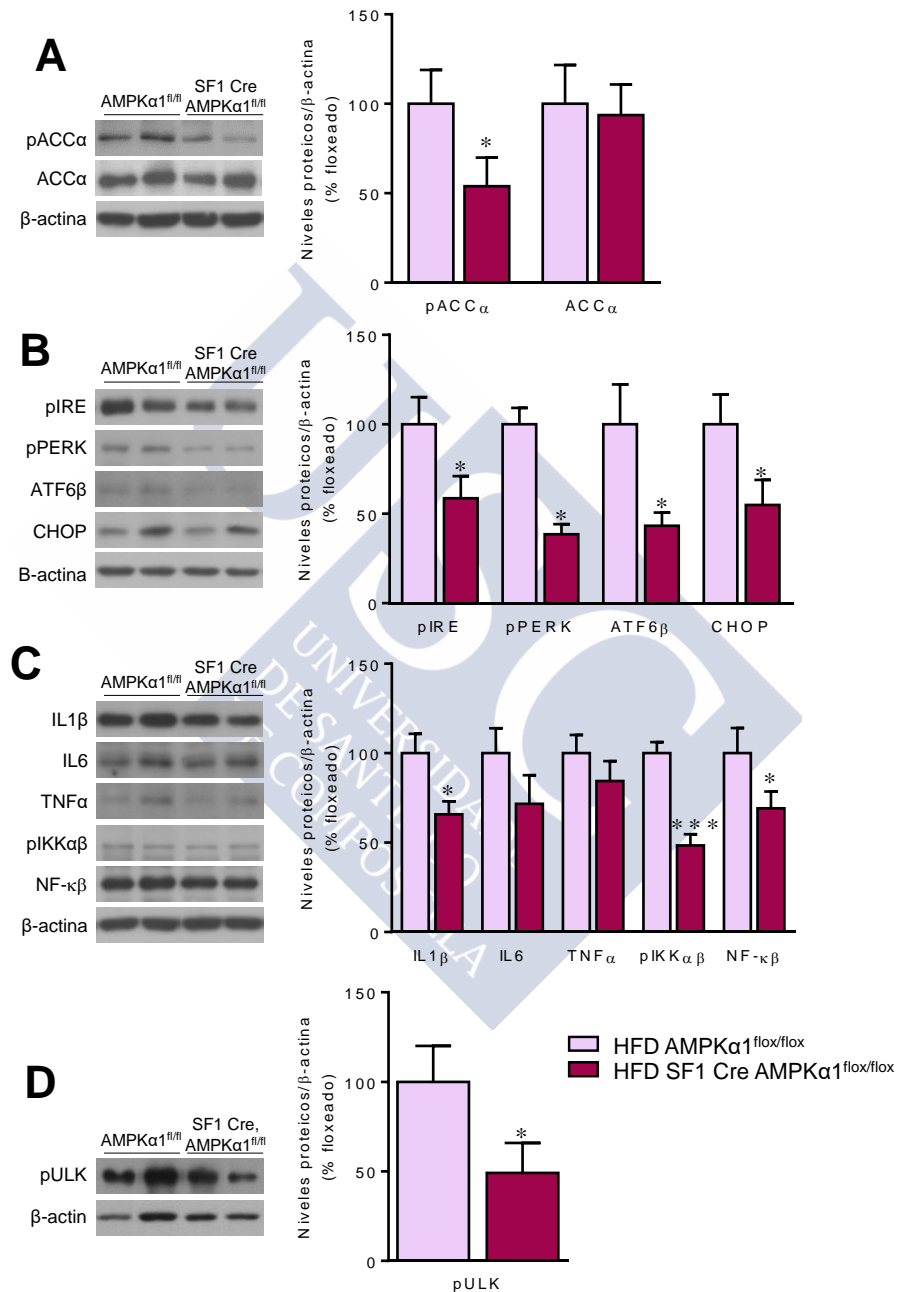


Figura 23. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en el hipotálamo de ratones HFD. (A) Niveles proteicos de pACC α y ACC α en el VMH (n= 7 ratones/grupo), (B) niveles proteicos de la ruta ER estrés en el VMH (n= 7 ratones/grupo), (C) niveles proteicos de marcadores de inflamación en el VMH (n= 7 ratones/grupo), y (D) niveles proteicos de pULK en el VMH (AMPK α 1^{flox/flox} n= 6, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=7 ratones/grupo) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD. Test t-student (1 cola), *P<0.05, ***P<0.001 vs. AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los geles de los paneles A, B, C y D han sido cortadas del mismo gel original.

Notablemente, estos resultados estaban asociados a una mayor temperatura del área del BAT (Figure 24A) y a elevados niveles de mRNA y/o expresión proteica de marcadores termogénicos, tales como UCP1, PGC1 α , PGC1 β y la forma fosforilada de la hormona sensible a lipasa (pHSL) (Figure 24B-C) en el BAT, así como también *browning* del WAT SC, como se comprobó por un descenso del área de los adipocitos (Figure 25A) y un aumento en la inmunoreactividad de UCP1 (Figure 25B).

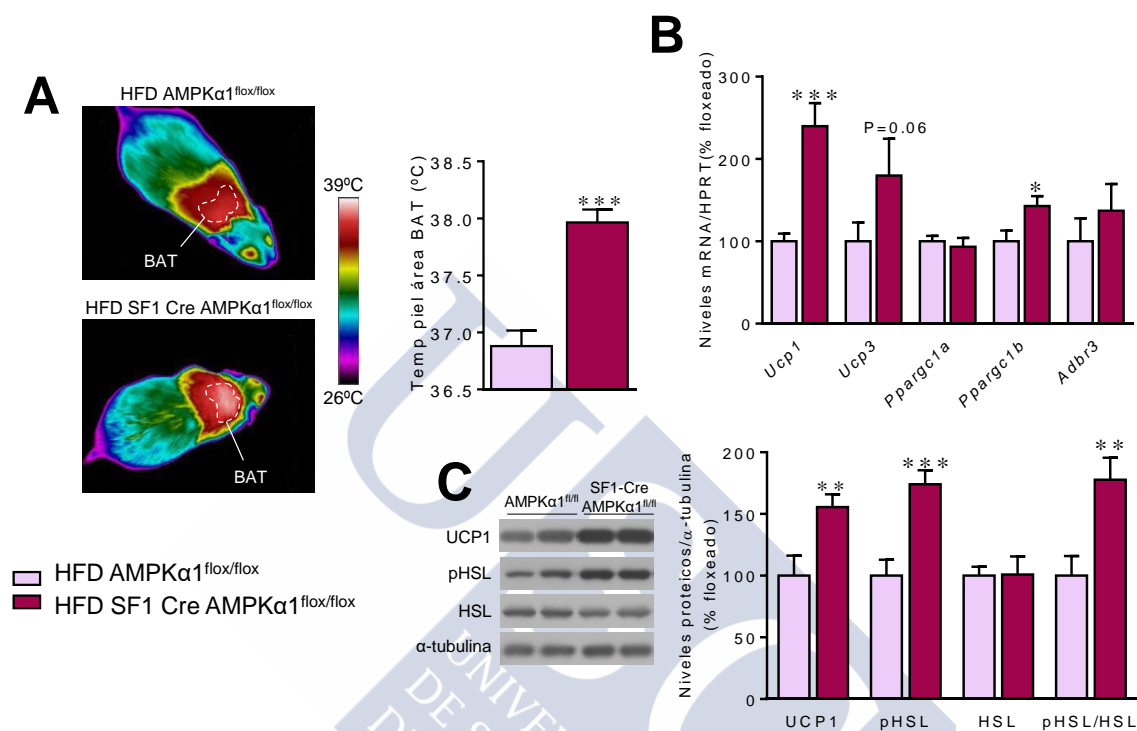


Figura 24. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en BAT de ratones HFD. (A) Temperatura del área del BAT (n=10 ratones/grupo), (B) niveles de mRNA de marcadores termogénicos en el BAT (n= 9 ratones/grupo), (C) niveles proteicos de UCP1 y marcadores de actividad del BAT (n= 7 ratones/grupo) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD. Test t-student (1 cola), *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. HFD AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM. Las bandas de los gels del panel C han sido cortadas del mismo gel original.

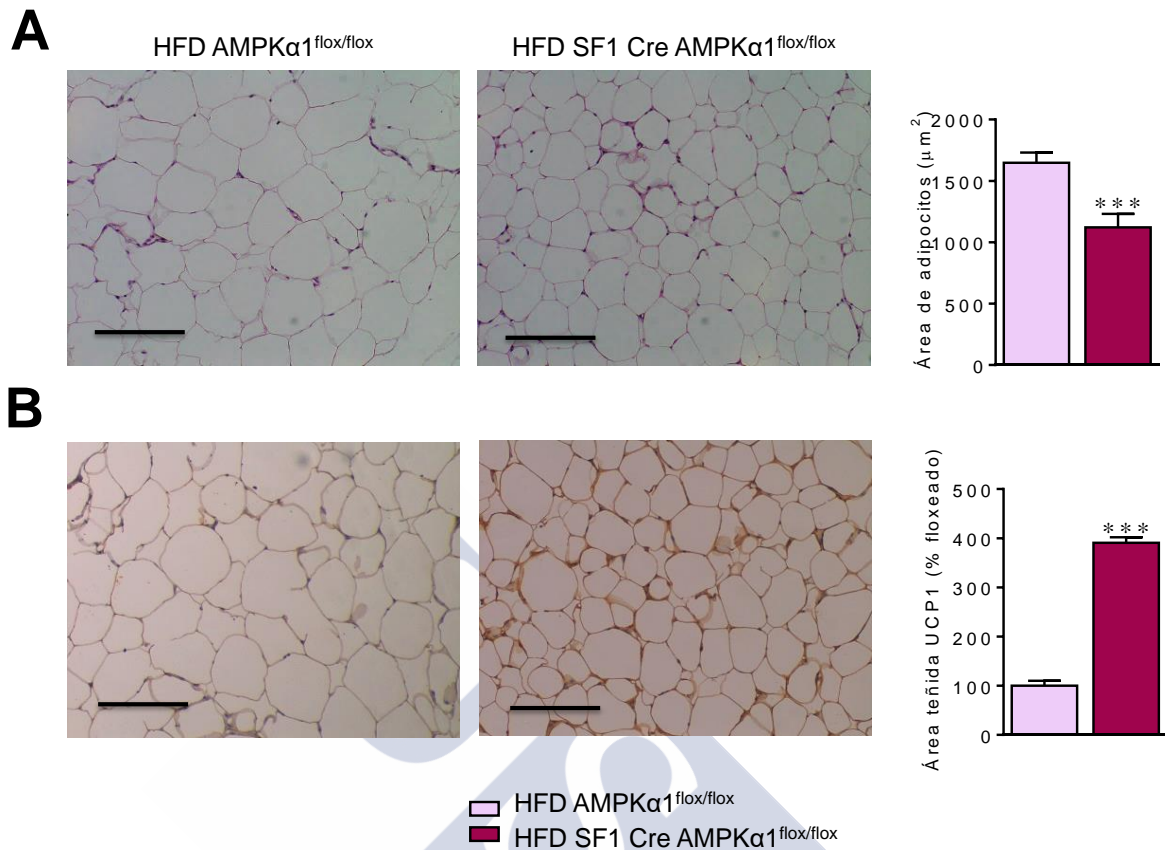


Figura 25. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en WAT de ratones HFD. (A) Tinción hematoxilina-eosina (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μm) y área de los adipocitos (panel derecho) en WAT subcutáneo (AMPK α 1^{flox/flox} n= 11, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=15), y (B) inmunohistoquímica de UCP1 (panel izquierdo; 20X, barra de escala: 100 μm) y área inmunorreactiva a UCP1 (panel derecho) en WAT subcutáneo (AMPK α 1^{flox/flox} n= 11, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=8) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD. Test t-student (1 cola), ***P<0.001 vs. HFD AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

11. LOS RATONES DEFICIENTES EN AMPK α 1 EN LAS NEURONAS SF1 DEL VMH MUESTRAN UNA MEJORA EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Finalmente, evaluamos el impacto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en la homeostasis de la glucosa periférica en el contexto de la obesidad. Los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD mostraban un descenso en los niveles circulantes de glucosa, tanto alimentados *ad libitum* como en ayuno (Figura 25A), mayor tolerancia a la glucosa (Figura 25B-C) sin cambios en la sensibilidad a insulina ni en los niveles de insulina circulantes (Figures 25D-F).

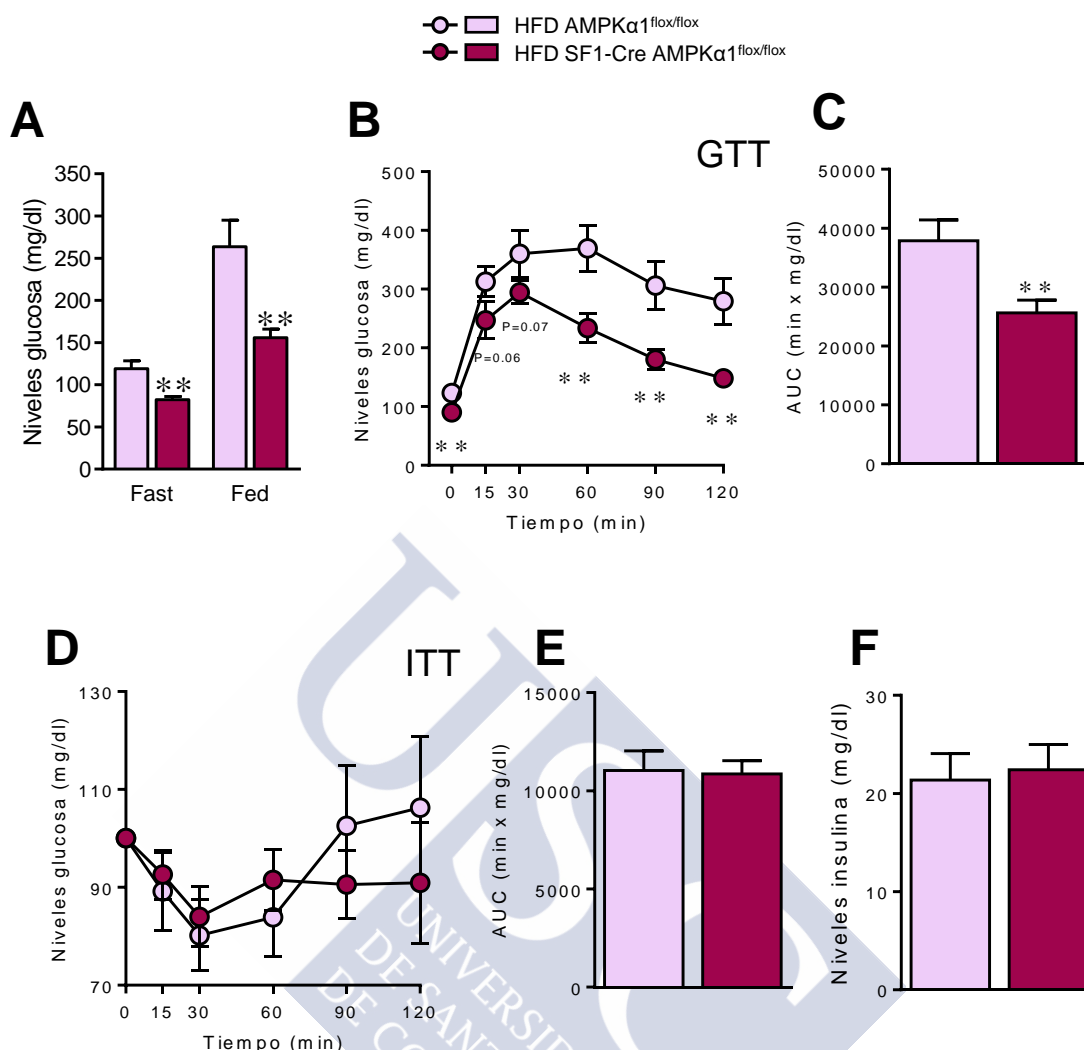


Figura 26. Efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en la homeostasis de la glucosa en ratones HFD. (A) Niveles de glucosa circulantes (AMPK α 1^{flox/flox} n=9, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=11), (B-C) test de tolerancia a la glucosa (GTT, glucose tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n=11, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=10), (D-E) test de tolerancia a la insulina (ITT, insulin tolerance test) y área bajo la curva (AMPK α 1^{flox/flox} n=11, SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} n=10), y (F) niveles de insulina en suero (n=9 ratones/grupo) de ratones AMPK α 1^{flox/flox} y SF1Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD. Los datos están expresados como media \pm SEM. Test t-student (1 cola), **P<0.01 vs. HFD AMPK α 1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media \pm SEM.

En concordancia con estos resultados, en el hígado de los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD se observó una disminución de los niveles proteicos de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PEPCK, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*), que sugeriría una inhibición de la gluconeogénesis hepática (Figura 26), así como un aumento de los niveles de la proteína glucoquinasa (GCK, *glucokinase*) (Figura 26) que ejerce un papel clave en la captación de glucosa y síntesis de glucógeno en el hígado^{396, 397}.

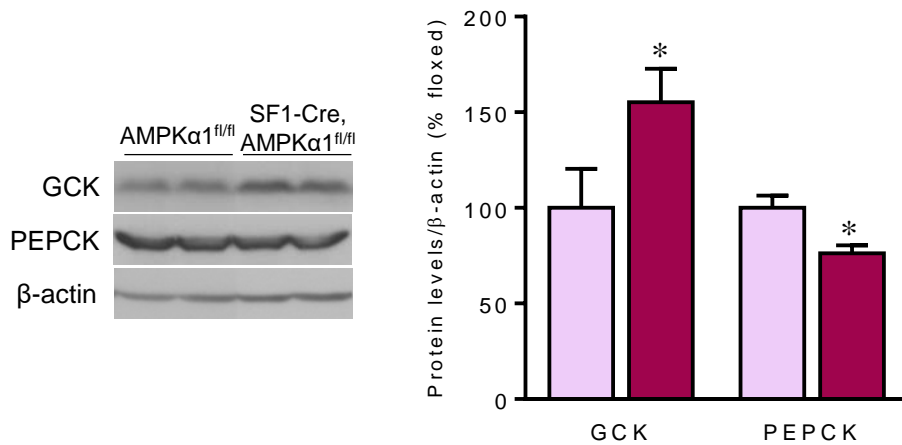


Figura 27. Efecto de la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 en la gluconeogénesis y síntesis de glucógeno hepático en ratones HFD. (A) Niveles proteicos hepáticos de GCK y PEPCK1 ratones AMPKα1^{flox/flox} (n=7) y SF1Cre AMPKα1^{flox/flox} (n=7) alimentados con HFD. Los datos están expresados como media±SEM. Test t-student (1 cola), *P<0.05 vs. HFD AMPKα1^{flox/flox}. Los datos están expresados como media±SEM. Las bandas de los gels han sido cortadas del mismo gel original.

En conjunto, estos hallazgos indican que la eliminación de AMPKα1 en las neuronas SF1 no sólo mejora la obesidad, sino que revierte el deteriorado metabolismo de la glucosa que lleva asociado.







DISCUSIÓN





La obesidad es una de las más importantes causas de mortalidad en el mundo debido a sus comorbilidades asociadas, incluidas ciertas formas de cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2²⁻⁶. La progresión de la obesidad se basa en un estado persistente de balance energético positivo. Por esta razón, parece razonable que muchas estrategias para tratar la obesidad se hayan centrado sólo en la disminución de la ingesta de alimentos³. Sin embargo, hasta la fecha todas las drogas que apuntan de forma exclusiva y directa al apetito han fracasado, entre otras razones debido a las disminuciones compensatorias en EE⁵. Por lo tanto, es imprescindible tener una comprensión más profunda de los principales mecanismos homeostáticos que modulan la homeostasis energética.

La evidencia acumulada durante la última década ha apuntado a la vía AMPK central como una vía canónica que regula la homeostasis energética, al integrar señales periféricas, como hormonas y metabolitos, con redes neuronales^{5, 316, 398}. La AMPK hipotalámica ha sido implicada en la regulación de la alimentación, la termogénesis del BAT y el *browning* de WAT, el metabolismo muscular, la función hepática y la homeostasis de la glucosa^{5, 316, 398, 399}, además de participar en la resistencia a la leptina inducida por la dieta^{375, 376}. La activación del programa termogénico en el BAT a través de SNS depende de la activación de la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo, mediante la inhibición de AMPK²⁰³. De forma más específica, el VMH está involucrado en la integración de señales periféricas, como ghrelin, leptina y hormonas tiroideas^{203, 312}, en la detección de los niveles de glucosa y en los mecanismos de respuesta a la hipoglucemia³⁶⁵. Evidencias previas demostraron que la inhibición global de AMPK α 1 y AMPK α 2 en el VMH mejoraba la obesidad inducida por ovariectomía en ratas hembras²⁰⁴. Pero si este efecto se mantenía en un modelo de obesidad todavía estaba por dilucidar. Nuestros datos muestran que la inhibición global de AMPK α 1 y AMPK α 2 en el VMH en ratas macho obesas debido a una alimentación con dieta alta en grasa, disminuye el peso corporal, sin que se observen cambios en ingesta. Esto está asociado a un aumento en el programa termogénico en el BAT, como se observó con el aumento de la temperatura generada por el BAT y la elevación de los marcadores moleculares de termogénesis en este tejido. Además, se ha reportado que la ablación específica de AMPK α 2 en neuronas POMC o AgRP del ARC produce fenotipos opuestos en términos de equilibrio energético. De hecho, mientras que los ratones deficientes en AMPK α 2 POMC exhiben hiperfagia y obesidad, los ratones deficientes en AMPK α 2 en las neuronas AgRP son hipofágicos y flacos³⁵². Por otra parte, se ha observado también que las THs actuando en el núcleo VMH incrementan el gasto energético modificando los niveles de AMPK α 1, pero no de AMPK α 2²¹², lo que sugiere que los efectos de la modulación de AMPK α en el hipotálamo pueden ser específicos de isoforma. Para dilucidar esto, inhibimos AMPK α 1 o AMPK α 2 en el VMH de ratas macho y observamos que sólo AMPK α 1 producía una disminución del peso corporal independientemente de la ingesta, mientras que AMPK α 2 inducía pérdida de peso, pero también disminución de la ingesta. Además, el efecto de AMPK α 1 sobre la masa corporal era dependiente de la activación del BAT a través de SNS, ya que el bloqueo de los receptores adrenérgicos β 3 revertía los marcadores de activación del BAT a nivel de las ratas control o de las inhibidas sólo con AMPK α 2. Asimismo, los efectos de la inhibición de AMPK α 1 sobre el balance energético se mantenían en ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

Las neuronas SF1 son una población neuronal del VMH, que se sabe que juega un papel importante en el tráfico simpático de la termogénesis mediada por BAT^{202, 212, 269} y la respuesta contrarreguladora frente la hipoglucemia²⁷⁷. Aunque una gran proporción de neuronas en el VMH expresan SF1, se pueden distinguir numerosas subpoblaciones según su

expresión diferencial de proteínas, incluido BDNF¹⁶⁵, receptores de insulina y leptina^{158, 161}, ER α ²⁶⁹ y VGLUT2²⁷⁷. Además de eso, las neuronas SF1 proyectan ampliamente dentro del SNC. Envían axones al núcleo parabraquial, al locus ceruleus, al núcleo retrotapezoidal, así como al grupo de células de catecolamina C1 de la médula ventrolateral rostral, que controla el flujo simpático a BAT²⁰² y al NTS¹⁸¹. Las fibras neuronales que se originan en las neuronas VMH SF1 también alcanzan otras regiones hipotalámicas implicadas en el flujo de salida de SNS y PSNS, que incluyen el ARC y el PVH^{181, 202}. En particular, se ha demostrado que la ablación específica de VGLUT2 en neuronas SF1 afecta la activación neuronal en el DMV²⁷⁷, un sitio clave que da lugar a las fibras PSNS que inervan el hígado¹⁸¹. Esa heterogeneidad podría explicar la capacidad de estas neuronas para controlar tanto el SNS como el PSNS, aunque es probable que los circuitos neuronales que modulan ambas ramas del sistema nervioso autónomo puedan implicar subpoblaciones separadas de neuronas SF1. Notablemente, el efecto de la inhibición en todo el VMH se recapitula mediante la ablación selectiva de AMPK α 1 en neuronas SF1. Los ratones macho SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} presentan una menor masa corporal, sin que se aprecien diferencias en la longitud de los animales, menor adiposidad y niveles de leptina circulantes, así como de TAG y NEFA. Del mismo modo que con la inhibición de AMPK α 1 en todo el VMH, no se observan cambios en la ingesta y asociado a la pérdida de peso, los ratones CKO presentan un aumento el gasto energético y una activación constitutiva de BAT. Igualmente a lo observado en estudios previos^{203, 204, 207, 212} el SNS también media la activación de BAT debida a la inhibición de AMPK α 1 en las neuronas SF1. Así, el tono simpático al BAT de estos ratones está incrementado y al bloquearlo con el antagonista de los receptores adrenérgicos β 3 se revierte el efecto sobre el balance energético de la inhibición de AMPK α 1 en las neuronas SF1. Sin embargo, tras sobreexpresar AMPK en el VMH de ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} se observa una ganancia de peso y los efectos activadores del BAT se revierten. Más aún, el aumento de termogénesis en los ratones CKO no derivaba en un aumento de temperatura o “fiebre” debido a que presentaban una mayor disipación de temperatura a través de los vasos de la cola. Este mecanismo de regulación de la temperatura por la cola, les permitía defender su temperatura corporal de forma más eficiente cuando eran expuestos a bajas temperaturas.

En relación con el mecanismo mediante el cual AMPK en el VMH regula la activación de BAT, se han descrito recientemente, que las ceramidas son importantes reguladores del balance energético y el metabolismo⁴⁰⁰⁻⁴⁰³. La acumulación ectópica de lípidos en tejidos periféricos, como células β pancreáticas, hígado, corazón y músculo esquelético puede derivar en lipotoxicidad, que favorece la resistencia a insulina, diabetes tipo 2, esteatosis hepática e insuficiencia cardíaca³³⁰. Tanto la inflamación como el ER estrés están estrechamente relacionados con la lipotoxicidad⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶. El ER estrés y la UPR pueden ser activados por exceso o privación de nutrientes, o por el estrés oxidativo^{407, 408} y han sido vinculados con el desarrollo de la obesidad, la resistencia a insulina y la consiguiente diabetes tipo II⁴⁰⁹. Estudios recientes han mostrado que la acción de las TH en la activación del BAT y la termogénesis es modulada por los niveles de ceramidas y ER estrés hipotalámicos²¹². Nuestros resultados mostraron que la eliminación de AMPK en el VMH reduce los niveles de ER estrés en este núcleo. Esto se observa por los bajos niveles de pIRE, pPERK y ATF6 β en el hipotálamo de las ratas alimentadas con HFD a las que se les inhibió AMPK α 1 α 2 en el VMH. Estudios recientes han relacionado también la disminución del ER estrés en el VMH con la disminución del peso corporal, asociado con la activación del BAT y el *browning* del WAT, independientemente de ingesta y leptina³⁹⁰. Los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 mostraban, una marcada disminución del ER estrés en el VMH, seguido de aumento de la activación del BAT y *browning* del WAT incrementado, lo que se observó por

un aumento de los marcadores de programa termogénico en la grasa subcutánea. El mecanismo mediante el cual el ER estrés y las ceramidas podrían ejercer efectos en la actividad neuronal todavía no está claro, pero podría ser debido al efecto alterador de la señalización de calcio que ejerce el ER estrés, ya que altera la actividad de los canales de liberación de calcio presentes en el ER así como al receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato; las chaperonas como GRP78 juegan un papel protector en este proceso^{410, 411}. También se ha observado que la interacción entre ER y mitocondrias puede modular la actividad neuronal, puesto que la eliminación de mitofusina 2 (MFN2), provoca la pérdida de los contactos entre el ER y las mitocondrias, aumenta el estrés ER y disminuye el disparo neuronal^{379, 412}.

La obesidad induce un estado de inflamación sistémica de bajo grado que contribuye al desarrollo de sus numerosas comorbilidades^{413, 414}. La activación de las vías inflamatorias por un excesivo aporte calórico se ha observado en las células ubicadas en el hipotálamo mediobasal, cuando esto sucede las citoquinas proinflamatorias, como el TNF α , promueven la resistencia a la insulina y a la leptina mediante la activación de vías de transducción de señales como JNK / AP1 y NF- κ B³⁰² o a través de PTP1B, un importante regulador negativo de la señalización de insulina y leptina, a través de la activación de NF- κ B^{304, 414}. Además, la activación de la microglía hipotalámica está influenciada por la composición de la dieta y por las hormonas secretadas por el tejido adiposo y el tracto gastrointestinal⁴¹⁵ y produce una variedad de citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IL1 β e IL6^{416, 417}. Además, la inflamación hipotalámica conduce a la desregulación de la acción de la insulina periférica⁴¹⁸ y una reducción en la termogénesis adaptativa^{419, 420} ya que altera la señalización a través del SNS y los receptores adrenérgicos β ⁴¹⁴. En consonancia con esto, las vías inflamatorias relacionadas con el desarrollo de resistencia a la insulina también están fuertemente vinculadas al ER²⁸³, de manera que los sensores de la respuesta de ER estrés, como IRE1 y PERK pueden modular los reguladores positivos y negativos de la vía IKK β / NF- κ B⁴²¹⁻⁴²³. Por otra parte, estudios en ratones con sobrenutrición han revelado un mecanismo de retroalimentación positiva en el que la activación hipotalámica de IKK β / NF- κ B promueve la inducción del ER estrés neuronal^{296, 418, 424}. El vínculo entre ER estrés e inflamación todavía no está completamente clarificado, pero en general el ER estrés puede activar la señalización de NF- κ B, que posteriormente puede modular mediadores inflamatorios, y estos pueden inducir estrés de ER⁴²⁵. Por otra parte, se ha demostrado la implicación de AMPK en la activación de la autofagia mediante la activación de la proteína ULK1³⁰⁸, pero la autofagia también puede ser inducida en respuesta al estrés celular, particularmente ER y estrés oxidativo, que si continúan durante largos periodos de tiempo dan lugar a defectos en el mecanismo de autofagia, lo que anula la capacidad de la célula para eliminar el daño, esto puede activar la vía de señalización de IKK β / NF- κ B³¹⁰. Lo que observamos en nuestro modelo de ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 alimentados con HFD fue que estos ratones presentaban niveles de ER estrés reducido, así como los niveles proteicos de ULK1 y de varios marcadores de inflamación, especialmente pIKK $\alpha\beta$ e NF- κ B, lo que sugiere una posible interacción entre las tres rutas de señalización. En concordancia con las evidencias que vinculan la implicación del ER estrés y la inflamación en el hipotálamo con la regulación de la homeostasis energética, los ratones SF1 Cre AMPK α 1^{flox/flox} alimentados con HFD eran más delgados y presentaban una menor adiposidad y niveles circulantes de NEFAs y leptina que los ratones control. Esto era independiente de la ingesta y estaba asociado a un aumento del EE, mayor activación del BAT y browning del WAT.

Durante la última década, varios estudios han asociado AMPK en el VMH con la regulación de la homeostasis de la glucosa. De hecho, la activación farmacológica de AMPK

por AICAR en ratas conduce a un aumento en la contrarregulación de hormonas y una producción de glucosa endógena elevada^{426, 427}. Además, la inhibición de AMPK en el VMH reduce los niveles de glucagón y adrenalina en respuesta a la hipoglucemia³⁶⁵. Dentro del hipotálamo, el VMH juega un papel clave en la respuesta contrarreguladora de la glucosa. Se ha demostrado que el VMH regula la secreción de glucagón por el páncreas en respuesta a los niveles locales de glucosa. Por lo tanto, los niveles bajos de glucosa en VMH conducen a un aumento en la secreción de glucagón, mientras que la infusión de glucosa en el VMH suprime la secreción de glucagón en respuesta a la disminución de la glucosa en sangre^{428, 429}. Por lo tanto, VMH está implicado en la detección de hipoglucemia y en la generación de una respuesta contrarreguladora, en la que AMPK desempeña un papel importante^{365, 427}. Cuando analizamos los niveles de glucosa circulantes en los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 alimentados con HFD, estos presentaban una disminución de la glucosa en sangre tanto en ayuno como alimentados *ad libitum* y eran más tolerantes a la glucosa cuando los sometíamos a un test de tolerancia a la glucosa. Sin embargo, no presentaban diferencias en los niveles de insulina en sangre ni presentaban mayor sensibilidad a esta hormona. Hubiese sido interesante estudiar el ratio insulina/glucagón en estos ratones pero el método de obtención de muestras no nos permitió el poder hacerlo. El efecto observado en la mejora del metabolismo de la glucosa puede ser debido en parte a la protección de la inhibición de AMPK α 1 en las neuronas SF1 frente a la ganancia de peso inducida por la dieta alta en grasa. En consonancia con esto, el BAT está captando más glucosa en los ratones CKO lo que podría ayudar a explicar los menores niveles de glucosa observados. La conversión de glucosa en glucógeno es una vía principal que contribuye a la eliminación de la glucosa de la vena porta por el hígado en el estado posprandial. Está regulado en parte por el aumento en la concentración de glucosa en sangre en la vena porta, que activa la GCK, la primera enzima en la vía de síntesis de glucógeno, de hecho defectos en la activación de esta enzima son considerados potenciales factores para el desarrollo de diabetes tipo II³⁹⁶. Los niveles elevados de esta proteína en el hígado de los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 alimentados con HFD podrían estar facilitando los menores niveles de glucosa observados. En consonancia con esto, la enzima PEPCK es una enzima de la primera reacción de la gluconeogénesis hepática, y su inhibición se ha visto que mejora la regulación de la glucemia, la sensibilidad a insulina y la dislipidemia en obesidad inducida por dieta⁴³⁰ y en modelos genéticos, como los ratones *db/db*³⁹⁷. En nuestro modelo, los ratones CKO muestran una disminución de PEPCK hepática. En conjunto, el menor peso corporal, el posible incremento de la síntesis de glucógeno y la disminución de la gluconeogénesis hepática pueden estar favoreciendo la homeostasis de la glucosa en los ratones deficientes en AMPK α 1 en las neuronas SF1 alimentados con HFD. Para dilucidar la posible implicación de la respuesta contrarreguladora, o si existen otros factores regulando los niveles de glucosa, sería necesaria la realización de más estudios en profundidad, que realizaremos en breve.

El efecto positivo de JNK1 en la activación neuronal se ha descrito previamente en neuronas AgRP (Tsaousidou et al., 2014). Recientemente, se demostró que la señalización de JNK1 desempeña un papel crucial en el SNC y en la hipófisis para controlar el metabolismo sistémico de glucosa y lípidos parcialmente a través de la regulación de las hormonas involucradas en el crecimiento y el gasto energético (Belgardt 2010). La isoforma JNK1 está implicada en el mecanismo de resistencia a la insulina inducida por la obesidad. La dieta alta en grasa provoca la activación de la vía de señalización JNK1, la resistencia a la insulina y la obesidad en ratones. Sin embargo, la ablación en línea germinal de *Jnk1* previene la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina⁴³¹. Estudios a nivel periférico en ratones deficientes en JNK mostraron que controla la acumulación y la captación de lípidos en el

hígado⁴³². En modelos de hipertiroidismo, la activación de JNK en el VMH induce la lipogénesis *de novo* hepática a través del PSNS, y estos niveles se revierten al sobreexpresar AMPK en ratas hipertiroides o tratadas con T3 centralmente, lo que indica que AMPK está *upstream* a JNK²¹². La acción central de JNK es específica sobre el hígado, ya que no se observan cambios en el metabolismo del BAT²¹². El efecto sobre la lipogénesis hepática parece estar mediado por JNK1, pero no se puede excluir una implicación de JNK3^{212, 433}. Basándonos en esto, decidimos comprobar este mecanismo en nuestro modelo de inhibición de AMPK α 1 en las neuronas SF1. Lo que observamos fue que la señalización por JNK 1/3 en el hipotálamo estaba incrementada en los ratones CKO, y en los ratones alimentados con dieta estándar se observaba un aumento en la lipogénesis *de novo*, como se puede comprobar con la inhibición de la ruta de AMPK hepática y la acumulación de TAG en el hígado.

En conclusión, nuestros datos muestran que la ablación de la isoforma AMPK α 1 en las neuronas SF1 de la VMH mejora la obesidad de forma independiente de la ingesta, pero de forma dependiente de la termogénesis. Además, mejora la homeostasis de la glucosa alterada tras HFD. El efecto de la eliminación de AMPK α 1 en las neuronas SF1 del VMH está ligado a la reducción de ER estrés e inflamación hipotalámica. Estos resultados sugieren que modulación de las distintas isoformas de AMPK en tipos neuronales específicos podría ser una diana terapéutica adecuada para combatir la obesidad y las complicaciones metabólicas relacionadas.





CONCLUSIONES





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

- La inhibición de AMPK α 1 y no AMPK α 2 en el VMH de ratas macho regula la activación del BAT, de forma independiente de la ingesta, a través del SNS.
- La deficiencia de AMPK α 1 en las neuronas SF1 en ratones macho induce un marcado incremento en la lipogénesis de novo específicamente en el hipotálamo lo que lleva a un incremento en la actividad del BAT a través del SNS conduciendo a una pérdida de peso.
- En ratones macho expuestos a dieta alta en grasa, AMPK α 1 en las neuronas SF1 regula el ER estrés y la inflamación hipotalámica y mejora la intolerancia a la glucosa inducida por HFD.
- Estos resultados sugieren que AMPK α 1 en el VMH podría ser una posible diana terapéutica para la obesidad y comorbilidades asociadas.





BIBLIOGRAFÍA





Reference List

1. Berthoud, H.R. & Morrison, C. The brain, appetite, and obesity. *Annu. Rev. Psychol.* **59**, 55-92 (2008).
2. Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* **220**, T25-T46 (2014).
3. Tschöp, M.H. *et al.* Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab* **24**, 51-62 (2016).
4. Clemmensen, C. *et al.* Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. *Cell* **168**, 758-774 (2017).
5. Lopez, M. & Tena-Sempere, M. Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol. Ther.* **178**, 109-122 (2017).
6. Cui, H., Lopez, M., & Rahmouni, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 338-351 (2017).
7. Sims, E.A. *et al.* Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog. Horm. Res.* **29**, 457-496 (1973).
8. Leibel, R.L., Rosenbaum, M., & Hirsch, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N. Engl. J. Med.* **332**, 621-628 (1995).
9. Ravussin, Y., Leibel, R.L., & Ferrante, A.W., Jr. A missing link in body weight homeostasis: the catabolic signal of the overfed state. *Cell Metab* **20**, 565-572 (2014).
10. Dietrich, M.O. & Horvath, T.L. Feeding signals and brain circuitry. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 1688-1696 (2009).
11. Spiegelman, B.M. & Flier, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543 (2001).
12. Dieguez, C., Frühbeck, G., & Lopez, M. Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes. Facts.* **2**, 126-135 (2009).
13. Yeo, G.S. & Heisler, L.K. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat. Neurosci.* **15**, 1343-1349 (2012).
14. Williams, L.M. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 521-533 (2012).

15. Murphy, K.G. & Bloom, S.R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* **444**, 854-859 (2006).
16. Morris, D.L. & Rui, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **297**, E1247-E1259 (2009).
17. Goldstone, A.P. The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Prog. Brain Res.* **153**, 57-73 (2006).
18. Currie, P.J., Mirza, A., Fuld, R., Park, D., & Vasselli, J.R. Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **289**, R353-R358 (2005).
19. Lopez, M. *et al.* Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* **7**, 389-399 (2008).
20. Kageyama, H., Takenoya, F., Shiba, K., & Shioda, S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* **44**, 133-138 (2010).
21. Ahima, R.S. & Antwi, D.A. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* **37**, 811-823 (2008).
22. Strader, A.D. & Woods, S.C. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* **128**, 175-191 (2005).
23. Lopez, M., Tovar, S., Vazquez, M.J., Williams, L.M., & Dieguez, C. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc. Nutr. Soc.* **66**, 131-155 (2007).
24. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660 (1999).
25. Simpson, K.A., Martin, N.M., & Bloom, S.R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 120-128 (2009).
26. Iantorno, M. *et al.* Gut hormones and endothelial dysfunction in patients with obesity and diabetes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **27**, 433-436 (2014).
27. Ravussin, E., Tschop, M., Morales, S., Bouchard, C., & Heiman, M.L. Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 4547-4551 (2001).
28. Tschop, M. *et al.* Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest* **24**, RC19-RC21 (2001).
29. Cummings, D.E. *et al.* Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1623-1630 (2002).

30. Callahan,H.S. *et al.* Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**, 1319-1324 (2004).
31. Sam,A.H., Troke,R.C., Tan,T.M., & Bewick,G.A. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* **63**, 46-56 (2012).
32. Foster-Schubert,K.E. *et al.* Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **93**, 1971-1979 (2008).
33. Tschop,M., Smiley,D.L., & Heiman,M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908-913 (2000).
34. Dhillo,W.S. & Bloom,S.R. Hypothalamic peptides as drug targets for obesity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 651-655 (2001).
35. Wren,A.M. *et al.* Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* **50**, 2540-2547 (2001).
36. Theander-Carrillo,C. *et al.* Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J. Clin. Invest* **116**, 1983-1993 (2006).
37. Kamegai,J. *et al.* Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* **50**, 2438-2443 (2001).
38. Shintani,M. *et al.* 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**, 227-232 (2001).
39. Castaneda,T.R., Tong,J., Datta,R., Culler,M., & Tschop,M.H. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* **31**, 44-60 (2010).
40. Faulconbridge,L.F., Cummings,D.E., Kaplan,J.M., & Grill,H.J. Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes* **52**, 2260-2265 (2003).
41. Date,Y. *et al.* The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**, 1120-1128 (2002).
42. Roder,P.V., Wu,B., Liu,Y., & Han,W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **48**, e219 (2016).
43. Saltiel,A.R. & Kahn,C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806 (2001).
44. Saltiel,A.R. & Pessin,J.E. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* **12**, 65-71 (2002).

45. Polonsky, K.S., Given, B.D., & Van, C.E. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest* **81**, 442-448 (1988).
46. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., & Baskin, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671 (2000).
47. Woods, S.C. & Porte, D., Jr. Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *Am. J. Physiol* **233**, E331-E334 (1977).
48. King, G.L. & Johnson, S.M. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* **227**, 1583-1586 (1985).
49. Havrankova, J., Roth, J., & Brownstein, M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* **272**, 827-829 (1978).
50. van, H.M., Posner, B.I., Kopriwa, B.M., & Brawer, J.R. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology* **105**, 666-673 (1979).
51. Varela, L. & Horvath, T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* **13**, 1079-1086 (2012).
52. Sipols, A.J., Baskin, D.G., & Schwartz, M.W. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* **44**, 147-151 (1995).
53. Benoit, S.C. *et al.* The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* **22**, 9048-9052 (2002).
54. Porte, D., Jr., Baskin, D.G., & Schwartz, M.W. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* **54**, 1264-1276 (2005).
55. Obici, S., Zhang, B.B., Karkani, G., & Rossetti, L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* **8**, 1376-1382 (2002).
56. Bruning, J.C. *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-2125 (2000).
57. Halaas, J.L. *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543-546 (1995).
58. Friedman, J. The long road to leptin. *J. Clin. Invest* **126**, 4727-4734 (2016).
59. Considine, R.V. *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292-295 (1996).

60. Schwartz,M.W. *et al.* Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* **20**, 1476-1481 (1997).
61. Saper,C.B., Chou,T.C., & Elmquist,J.K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* **36**, 199-211 (2002).
62. Chaudhri,O., Small,C., & Bloom,S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **361**, 1187-1209 (2006).
63. Coll,A.P., Farooqi,I.S., & O'Rahilly,S. The hormonal control of food intake. *Cell* **129**, 251-262 (2007).
64. Banks,W.A., Kastin,A.J., Huang,W., Jaspan,J.B., & Maness,L.M. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* **17**, 305-311 (1996).
65. Elmquist,J.K., Bjorbaek,C., Ahima,R.S., Flier,J.S., & Saper,C.B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp Neurol.* **395**, 535-547 (1998).
66. Dodd,G.T. *et al.* Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* **160**, 88-104 (2015).
67. Mercer,J.G. *et al.* Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 733-735 (1996).
68. Baskin,D.G., Breininger,J.F., Bonigut,S., & Miller,M.A. Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Res.* **828**, 154-158 (1999).
69. Sahu,A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol.* **24**, 225-253 (2003).
70. Boguszewski,C.L., Paz-Filho,G., & Velloso,L.A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynol. Pol.* **61**, 194-206 (2010).
71. Landsberg,L., Young,J.B., Leonard,W.R., Linsenmeier,R.A., & Turek,F.W. Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism* **58**, 871-876 (2009).
72. Doucet,E. *et al.* Greater than predicted decrease in energy expenditure during exercise after body weight loss in obese men. *Clin. Sci. (Lond)* **105**, 89-95 (2003).
73. Cannon,B. & Nedergaard,J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84**, 277-359 (2004).
74. Labbe,S.M. *et al.* Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst. Neurosci.* **9**, 150 (2015).

75. Lidell,M.E., Betz,M.J., & Enerback,S. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*. **3**, 63-66 (2014).
76. Nedergaard,J., Bengtsson,T., & Cannon,B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **293**, E444-E452 (2007).
77. Zingaretti,M.C. *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J.* **23**, 3113-3120 (2009).
78. van Marken Lichtenbelt,W.D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500-1508 (2009).
79. Cypess,A.M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509-1517 (2009).
80. Virtanen,K.A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1518-1525 (2009).
81. Lim,S. *et al.* Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* **7**, 606-615 (2012).
82. Granneman,J.G. Norepinephrine infusions increase adenylate cyclase responsiveness in brown adipose tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 1075-1080 (1988).
83. Whittle,A.J., Lopez,M., & Vidal-Puig,A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol. Med.* **17**, 405-411 (2011).
84. Villarroya,F. & Vidal-Puig,A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* **17**, 638-643 (2013).
85. Boyer,P.D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749 (1997).
86. Futai,M., Noumi,T., & Maeda,M. ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 111-136 (1989).
87. von,B.C., Wiedenmann,A., & Dimroth,P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 649-672 (2009).
88. Nicholls,D.G. & Locke,R.M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* **64**, 1-64 (1984).
89. Silva,J.E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.* **86**, 435-464 (2006).

90. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376 (2012).
91. Timmons, J.A. *et al.* Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 4401-4406 (2007).
92. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961-967 (2008).
93. Tseng, Y.H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000-1004 (2008).
94. Shan, T. *et al.* Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J. Lipid Res.* **54**, 2214-2224 (2013).
95. Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D.A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat. Commun.* **5**, 4099 (2014).
96. Crisan, M. *et al.* A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells* **26**, 2425-2433 (2008).
97. Kajimura, S. & Saito, M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu. Rev. Physiol* **76**, 225-249 (2014).
98. Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 7153-7164 (2010).
99. Lee, P., Werner, C.D., Kebebew, E., & Celi, F.S. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes. (Lond)* **38**, 170-176 (2014).
100. Contreras, C. *et al.* The brain and brown fat. *Ann. Med.* **47**, 150-168 (2015).
101. Walden, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., & Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **302**, E19-E31 (2012).
102. Shabalina, I.G. *et al.* UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* **5**, 1196-1203 (2013).
103. Nedergaard, J. & Cannon, B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 943-949 (2013).
104. Keipert, S. & Jastroch, M. Brite/beige fat and U. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1075-1082 (2014).

105. Contreras,C., Nogueiras,R., Dieguez,C., Medina-Gomez,G., & Lopez,M. Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol. Cell Endocrinol.* **438**, 107-115 (2016).
106. Lowell,B.B. & Spiegelman,B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660 (2000).
107. van Marken Lichtenbelt,W.D. & Schrauwen,P. Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **301**, R285-R296 (2011).
108. Cypess,A.M. & Kahn,C.R. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **17**, 143-149 (2010).
109. Cao,W., Medvedev,A.V., Daniel,K.W., & Collins,S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27077-27082 (2001).
110. Holm,C., Fredrikson,G., Cannon,B., & Belfrage,P. Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci. Rep.* **7**, 897-904 (1987).
111. Shih,M.F. & Taberner,P.V. Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by beta 3-adrenoceptor agonists. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 601-608 (1995).
112. Clifford,G.M., Londos,C., Kraemer,F.B., Vernon,R.G., & Yeaman,S.J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5011-5015 (2000).
113. Morimoto,C., Kameda,K., Tsujita,T., & Okuda,H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J. Lipid Res.* **42**, 120-127 (2001).
114. Schreiber,R. *et al.* Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* **26**, 753-763 (2017).
115. Shin,H. *et al.* Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab* **26**, 764-777 (2017).
116. Cannon,B. & Nedergaard,J. What Ignites UCP1? *Cell Metab* **26**, 697-698 (2017).
117. Bukowiecki,L.J., Geloan,A., & Collet,A.J. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am. J. Physiol* **250**, C880-C887 (1986).

118. Peirce,V., Carobbio,S., & Vidal-Puig,A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76-83 (2014).
119. Guerra,C. *et al.* Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest* **108**, 1205-1213 (2001).
120. Bartelt,A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* **17**, 200-205 (2011).
121. Gunawardana,S.C. & Piston,D.W. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* **61**, 674-682 (2012).
122. Meyer,C.W. *et al.* Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **299**, R1396-R1406 (2010).
123. Saper,C.B. & Lowell,B.B. The hypothalamus. *Curr. Biol.* **24**, R1111-R1116 (2014).
124. Lopez,M., Lelliott,C.J., & Vidal-Puig,A. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* **29**, 248-261 (2007).
125. Williams,G. *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* **74**, 683-701 (2001).
126. Herwig,A., Ross,A.W., Nilaweera,K.N., Morgan,P.J., & Barrett,P. Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes. Facts.* **1**, 71-79 (2008).
127. Olney,J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721 (1969).
128. Graham,M., Shutter,J.R., Sarmiento,U., Sarosi,I., & Stark,K.L. Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* **17**, 273-274 (1997).
129. Ollmann,M.M. *et al.* Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**, 135-138 (1997).
130. Small,C.J. *et al.* Chronic CNS administration of Agouti-related protein (*Agrp*) reduces energy expenditure. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27**, 530-533 (2003).
131. Aponte,Y., Atasoy,D., & Sternson,S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* **14**, 351-355 (2011).
132. Krashes,M.J. *et al.* Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest* **121**, 1424-1428 (2011).

133. Gehlert,D.R., Chronwall,B.M., Schafer,M.P., & O'Donohue,T.L. Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* **1**, 25-31 (1987).
134. Ziouzenkova,O. & Plutzky,J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett.* **582**, 32-38 (2008).
135. Kane,M.A. *et al.* CrbpI modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol. Cell Biol.* **31**, 3277-3285 (2011).
136. Clark,J.T., Kalra,P.S., Crowley,W.R., & Kalra,S.P. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* **115**, 427-429 (1984).
137. Egawa,M., Yoshimatsu,H., & Bray,G.A. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am. J. Physiol* **260**, R328-R334 (1991).
138. Shi,Y.C. *et al.* Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab* **17**, 236-248 (2013).
139. Fekete,C. *et al.* Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* **142**, 2606-2613 (2001).
140. Fekete,C. *et al.* Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* **143**, 4513-4519 (2002).
141. Mercader,J. *et al.* Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* **147**, 5325-5332 (2006).
142. Vaisse,C., Clement,K., Guy-Grand,B., & Froguel,P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.* **20**, 113-114 (1998).
143. Yaswen,L., Diehl,N., Brennan,M.B., & Hochgeschwender,U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* **5**, 1066-1070 (1999).
144. Chen,A.S. *et al.* Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.* **26**, 97-102 (2000).
145. Challis,B.G. *et al.* Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 4695-4700 (2004).
146. Zhan,C. *et al.* Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* **33**, 3624-3632 (2013).

147. Huszar,D. *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**, 131-141 (1997).
148. Schwartz,M.W. *et al.* Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* **46**, 2119-2123 (1997).
149. Kristensen,P. *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**, 72-76 (1998).
150. Thim,L., Kristensen,P., Larsen,P.J., & Wulff,B.S. CART, a new anorectic peptide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 1281-1284 (1998).
151. Lambert,P.D. *et al.* CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* **29**, 293-298 (1998).
152. Elias,C.F. *et al.* Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* **21**, 1375-1385 (1998).
153. Wang,C., Billington,C.J., Levine,A.S., & Kotz,C.M. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* **11**, 3251-3255 (2000).
154. Kotz,C.M., Wang,C.F., Briggs,J.E., Levine,A.S., & Billington,C.J. Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **278**, R494-R498 (2000).
155. Rothwell,N.J. & Stock,M.J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-35 (1979).
156. Minokoshi,Y., Saito,M., & Shimazu,T. Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation. *Am. J. Physiol* **251**, R1005-R1008 (1986).
157. Amir,S. Intra-ventromedial hypothalamic injection of glutamate stimulates brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Brain Res.* **511**, 341-344 (1990).
158. Dhillon,H. *et al.* Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* **49**, 191-203 (2006).
159. King,B.M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* **87**, 221-244 (2006).
160. Bingham,N.C., Anderson,K.K., Reuter,A.L., Stallings,N.R., & Parker,K.L. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology* **149**, 2138-2148 (2008).

161. Klockener, T. *et al.* High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat. Neurosci.* **14**, 911-918 (2011).
162. McClellan, K.M., Parker, K.L., & Tobet, S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* **27**, 193-209 (2006).
163. Shimogawa, Y., Maekawa, F., & Yamanouchi, K. Unilateral lesion increases oestrogen receptor alpha expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 258-266 (2014).
164. Xu, B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736-742 (2003).
165. Segal, J.P. *et al.* Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurosci.* **25**, 4181-4188 (2005).
166. Kim, B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* **18**, 141-144 (2008).
167. Liao, G.Y. *et al.* Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat. Med.* **18**, 564-571 (2012).
168. Williams, K.W. *et al.* Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J. Neurosci.* **30**, 2472-2479 (2010).
169. Choi, Y.H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., & Kim, K.W. Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front Neurosci.* **7**, 71 (2013).
170. Majdic, G. *et al.* Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* **143**, 607-614 (2002).
171. Kurrasch, D.M. *et al.* The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J. Neurosci.* **27**, 13624-13634 (2007).
172. Palkovits, M. Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogy. Sz* **56**, 288-302 (2003).
173. Lopez-Valpuesta, F.J., Nyce, J.W., Griffin-Biggs, T.A., Ice, J.C., & Myers, R.D. Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc. Biol. Sci.* **263**, 881-886 (1996).
174. Harrold, J.A., Widdowson, P.S., & Williams, G. Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4 (MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R),

- receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* **48**, 267-271 (1999).
175. Li, Y.Z. & Davidowa, H. Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J. Neurosci. Res.* **77**, 596-602 (2004).
176. Pandit, R., de Jong, J.W., Vanderschuren, L.J., & Adan, R.A. Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. *Eur. J. Pharmacol.* **660**, 28-42 (2011).
177. Wang, C., Bomberg, E., Levine, A., Billington, C., & Kotz, C.M. Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **293**, R1037-R1045 (2007).
178. Lyons, W.E. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 15239-15244 (1999).
179. Rios, M. *et al.* Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1748-1757 (2001).
180. Wang, C., Bomberg, E., Billington, C., Levine, A., & Kotz, C.M. Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **293**, R992-1002 (2007).
181. Seoane-Collazo, P. *et al.* Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine.* **50**, 276-291 (2015).
182. Shimazu, T., Fukuda, A., & Ban, T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* **210**, 1178-1179 (1966).
183. Shimazu, T. & Fukuda, A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* **150**, 1607-1608 (1965).
184. Shimazu, T. & Amakawa, A. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **165**, 335-348 (1968).
185. Shimazu, T. Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. *Adv. Metab Disord.* **10**, 355-384 (1983).
186. Shimazu, T. & Minokoshi, Y. Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *J. Endocr. Soc.* **1**, 449-459 (2017).

187. Sudo,M., Minokoshi,Y., & Shimazu,T. Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats. *Am. J. Physiol* **261**, E298-E303 (1991).
188. Shimazu,T., Sudo,M., Minokoshi,Y., & Takahashi,A. Role of the hypothalamus in insulin-independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res. Bull.* **27**, 501-504 (1991).
189. Minokoshi,Y., Haque,M.S., & Shimazu,T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* **48**, 287-291 (1999).
190. Kamohara,S., Burcelin,R., Halaas,J.L., Friedman,J.M., & Charron,M.J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**, 374-377 (1997).
191. Hetherington Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Nutr. Rev.* **41**, 124-127 (1983).
192. Haque,M.S. *et al.* Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* **48**, 1706-1712 (1999).
193. Toda,C. *et al.* Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes* **58**, 2757-2765 (2009).
194. Kim,K.W. *et al.* FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J. Clin. Invest* **122**, 2578-2589 (2012).
195. Toda,C. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase in the ventromedial hypothalamus mediates leptin-induced glucose uptake in red-type skeletal muscle. *Diabetes* **62**, 2295-2307 (2013).
196. Perkins,M.N., Rothwell,N.J., Stock,M.J., & Stone,T.W. Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* **289**, 401-402 (1981).
197. Bamshad,M., Aoki,V.T., Adkison,M.G., Warren,W.S., & Bartness,T.J. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am. J. Physiol* **275**, R291-R299 (1998).
198. Bamshad,M., Song,C.K., & Bartness,T.J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* **276**, R1569-R1578 (1999).
199. Morrison,S.F. RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* **276**, R962-R973 (1999).

200. Uno, T. & Shibata, M. Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **280**, R536-R546 (2001).
201. Cano, G. *et al.* Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J. Comp Neurol.* **460**, 303-326 (2003).
202. Lindberg, D., Chen, P., & Li, C. Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *J. Comp Neurol.* **521**, 3167-3190 (2013).
203. Lopez, M. *et al.* Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* **16**, 1001-1008 (2010).
204. Martinez de Morentin, P.B. *et al.* Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* **20**, 41-53 (2014).
205. Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Rahmouni, K., & Lopez, M. Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox. Biol.* **12**, 854-863 (2017).
206. Whittle, A.J. *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885 (2012).
207. Martinez de Morentin, P.B. *et al.* Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **61**, 807-817 (2012).
208. Seoane-Collazo, P. *et al.* Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology* **155**, 1679-1689 (2014).
209. Martinez de Morentin, P.B. *et al.* Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology* **156**, 947-960 (2015).
210. Martins, L. *et al.* A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep.* **16**, 2231-2242 (2016).
211. Martinez-Sanchez, N. *et al.* Thyroid hormones induce browning of white fat. *J. Endocrinol.* **232**, 351-362 (2017).
212. Martinez-Sanchez, N. *et al.* Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* **26**, 212-229 (2017).
213. Amir, S. & Schiavetto, A. Injection of prostaglandin E2 into the anterior hypothalamic preoptic area activates brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Brain Res.* **528**, 138-142 (1990).

214. Amir,S., Schiavetto,A., & Pollock,R. Insulin co-injection suppresses the thermogenic response to glutamate microinjection into the VMH in rats. *Brain Res.* **527**, 326-329 (1990).
215. Hugie,T., Halvorson,I., & Thornhill,J. Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* **575**, 57-62 (1992).
216. Sakaguchi,T. & Yamazaki,M. Hepatic portal injection of glucose elevates efferent sympathetic discharges of interscapular brown adipose tissue. *Exp. Neurol.* **101**, 464-469 (1988).
217. Sakaguchi,T. & Bray,G.A. Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. *Brain Res.* **492**, 271-280 (1989).
218. Yoshimatsu,H., Egawa,M., & Bray,G.A. Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res.* **601**, 121-128 (1993).
219. Musatov,S. *et al.* Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 2501-2506 (2007).
220. Orozco-Solis,R. *et al.* The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metab* **23**, 467-478 (2016).
221. Contreras,C. *et al.* Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep.* **9**, 366-377 (2014).
222. Beiroa,D. *et al.* GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* **63**, 3346-3358 (2014).
223. Guan,X.M. *et al.* Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport* **9**, 3415-3419 (1998).
224. Garcia,M.C. *et al.* Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB J.* **17**, 1392-1400 (2003).
225. Henry,B.A. *et al.* Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Res.* **918**, 40-50 (2001).
226. Kesterson,R.A., Huszar,D., Lynch,C.A., Simerly,R.B., & Cone,R.D. Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol. Endocrinol.* **11**, 630-637 (1997).
227. Bi,S., Kim,Y.J., & Zheng,F. Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* **46**, 309-314 (2012).

228. Bi,S., Robinson,B.M., & Moran,T.H. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **285**, R1030-R1036 (2003).
229. Mihaly,E., Fekete,C., Legradi,G., & Lechan,R.M. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* **891**, 20-31 (2001).
230. Jureus,A., Cunningham,M.J., McClain,M.E., Clifton,D.K., & Steiner,R.A. Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* **141**, 2703-2706 (2000).
231. Biag,J. *et al.* Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *J. Comp Neurol.* **520**, 6-33 (2012).
232. Sutton,A.K., Myers,M.G., Jr., & Olson,D.P. The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu. Rev. Physiol* **78**, 207-221 (2016).
233. Cowley,M.A. *et al.* Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* **24**, 155-163 (1999).
234. Sutton,A.K. *et al.* Control of food intake and energy expenditure by *Nos1* neurons of the paraventricular hypothalamus. *J. Neurosci.* **34**, 15306-15318 (2014).
235. Kishi,T. *et al.* Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp Neurol.* **457**, 213-235 (2003).
236. Elmquist,J.K., Elias,C.F., & Saper,C.B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**, 221-232 (1999).
237. Li,C., Chen,P., & Smith,M.S. Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain Res.* **854**, 122-129 (2000).
238. Cone,R.D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **8**, 571-578 (2005).
239. Stanley,S. *et al.* Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 7024-7029 (2010).
240. Geerling,J.C., Shin,J.W., Chimenti,P.C., & Loewy,A.D. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J. Comp Neurol.* **518**, 1460-1499 (2010).
241. Hill,J.W. PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J. Endocrinol. Metab* **16**, S627-S636 (2012).

242. Arase,K., York,D.A., Shimizu,H., Shargill,N., & Bray,G.A. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol* **255**, E255-E259 (1988).
243. Atasoy,D., Betley,J.N., Su,H.H., & Sternson,S.M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* **488**, 172-177 (2012).
244. Jansen,A.S., Hoffman,J.L., & Loewy,A.D. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res.* **766**, 29-38 (1997).
245. Song,C.K. *et al.* Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **295**, R417-R428 (2008).
246. Aravich,P.F. & Sclafani,A. Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav. Neurosci.* **97**, 970-983 (1983).
247. Tokunaga,K., Fukushima,M., Kemnitz,J.W., & Bray,G.A. Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am. J. Physiol* **251**, R1221-R1227 (1986).
248. Goforth,P.B., Leininger,G.M., Patterson,C.M., Satin,L.S., & Myers,M.G., Jr. Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J. Neurosci.* **34**, 11405-11415 (2014).
249. MORRISON,S.D., Barnett,R.J., & MAYER,J. Localization of lesions in the lateral hypothalamus of rats with induced adipsia and aphagia. *Am. J. Physiol* **193**, 230-234 (1958).
250. Broberger,C., De,L.L., Sutcliffe,J.G., & Hokfelt,T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp Neurol.* **402**, 460-474 (1998).
251. Horvath,T.L., Diano,S., & van Den Pol,A.N. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci.* **19**, 1072-1087 (1999).
252. Hu,Y. *et al.* Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* **271**, 26315-26319 (1996).
253. Bernardis,L.L. & Bellinger,L.L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 189-287 (1996).
254. ANAND,B.K. & BROBECK,J.R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **77**, 323-324 (1951).

255. Lopez, M. *et al.* Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 41-45 (2000).
256. Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y., & Tominaga, M. Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J. Neurosci.* **30**, 12642-12652 (2010).
257. Sakurai, T. *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573-585 (1998).
258. Hagan, J.J. *et al.* Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10911-10916 (1999).
259. Hara, J. *et al.* Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* **30**, 345-354 (2001).
260. Nixon, J.P., Kotz, C.M., Novak, C.M., Billington, C.J., & Teske, J.A. Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handb. Exp. Pharmacol.* 77-109 (2012).
261. Tupone, D., Madden, C.J., Cano, G., & Morrison, S.F. An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *J. Neurosci.* **31**, 15944-15955 (2011).
262. Bittencourt, J.C. *et al.* The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J. Comp Neurol.* **319**, 218-245 (1992).
263. Chen, Y. *et al.* Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* **143**, 2469-2477 (2002).
264. Qu, D. *et al.* A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**, 243-247 (1996).
265. Imbernon, M. *et al.* Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* **144**, 636-649 (2013).
266. Davis, A.M. *et al.* Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurobiol.* **60**, 424-436 (2004).
267. Zhao, L. *et al.* Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1403-1415 (2008).
268. Kim, K.W. *et al.* Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 10673-10678 (2011).

269. Xu,Y. *et al.* Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* **14**, 453-465 (2011).
270. Jo,Y.H. Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurophysiol.* **107**, 42-49 (2012).
271. Balthasar,N. *et al.* Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* **42**, 983-991 (2004).
272. Zhang,R. *et al.* Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* **149**, 5654-5661 (2008).
273. Xu,Y. *et al.* PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. *Cell Metab* **12**, 88-95 (2010).
274. Ramadori,G. *et al.* SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell Metab* **14**, 301-312 (2011).
275. Toda,C. *et al.* UCP2 Regulates Mitochondrial Fission and Ventromedial Nucleus Control of Glucose Responsiveness. *Cell* **164**, 872-883 (2016).
276. Meek,T.H. *et al.* Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **113**, E2073-E2082 (2016).
277. Tong,Q. *et al.* Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab* **5**, 383-393 (2007).
278. Keen-Rhinehart,E., Kalra,S.P., & Kalra,P.S. AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsky rats. *Peptides* **26**, 2567-2578 (2005).
279. Morton,G.J. *et al.* Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* **2**, 411-420 (2005).
280. Morton,G.J. & Schwartz,M.W. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev.* **91**, 389-411 (2011).
281. Kim,K.H. *et al.* Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat. Med.* **19**, 83-92 (2013).
282. Namkoong,S., Cho,C.S., Semple,I., & Lee,J.H. Autophagy Dysregulation and Obesity-Associated Pathologies. *Mol. Cells*(2018).
283. Hotamisligil,G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900-917 (2010).

284. Yang,L. & Hotamisligil,G.S. Stressing the brain, fattening the body. *Cell* **135**, 20-22 (2008).
285. Ron,D. & Walter,P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519-529 (2007).
286. Bertolotti,A., Zhang,Y., Hendershot,L.M., Harding,H.P., & Ron,D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326-332 (2000).
287. Shen,J., Chen,X., Hendershot,L., & Prywes,R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* **3**, 99-111 (2002).
288. Chen,X., Shen,J., & Prywes,R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* **277**, 13045-13052 (2002).
289. Sidrauski,C. & Walter,P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039 (1997).
290. Yoshida,H. *et al.* ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6755-6767 (2000).
291. Shi,Y. *et al.* Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7499-7509 (1998).
292. Harding,H.P., Zhang,Y., & Ron,D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274 (1999).
293. Cnop,M., Foufelle,F., & Velloso,L.A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* **18**, 59-68 (2012).
294. Fonseca,S.G., Gromada,J., & Urano,F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol. Metab* **22**, 266-274 (2011).
295. Hotamisligil,G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860-867 (2006).
296. Zhang,X. *et al.* Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **135**, 61-73 (2008).
297. Hosoi,T. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1610-1619 (2008).
298. Thaler,J.P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest* **122**, 153-162 (2012).

299. Wisse,B.E. *et al.* Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. *Endocrinology* **148**, 5230-5237 (2007).
300. Hayden,M.S. & Ghosh,S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362 (2008).
301. de Souza,C.T. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192-4199 (2005).
302. Romanatto,T. *et al.* TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* **28**, 1050-1058 (2007).
303. Zabolotny,J.M. *et al.* PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* **2**, 489-495 (2002).
304. Zabolotny,J.M. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* **283**, 14230-14241 (2008).
305. Ito,Y. *et al.* TNFalpha increases hypothalamic PTP1B activity via the NFkappaB pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. *Regul. Pept.* **174**, 58-64 (2012).
306. Butler,D. & Bahr,B.A. Oxidative stress and lysosomes: CNS-related consequences and implications for lysosomal enhancement strategies and induction of autophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 185-196 (2006).
307. Yorimitsu,T., Nair,U., Yang,Z., & Klionsky,D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30299-30304 (2006).
308. Kim,J., Kundu,M., Viollet,B., & Guan,K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132-141 (2011).
309. Carling,D., Thornton,C., Woods,A., & Sanders,M.J. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *Biochem. J.* **445**, 11-27 (2012).
310. Fujishima,Y. *et al.* Autophagy in the intestinal epithelium reduces endotoxin-induced inflammatory responses by inhibiting NF-kappaB activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **506**, 223-235 (2011).
311. Meng,Q. & Cai,D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 32324-32332 (2011).
312. Lage,R., Dieguez,C., Vidal-Puig,A., & Lopez,M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol. Med.* **14**, 539-549 (2008).

313. Gowans,G.J., Hawley,S.A., Ross,F.A., & Hardie,D.G. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* **18**, 556-566 (2013).
314. Obici,S., Feng,Z., Arduini,A., Conti,R., & Rossetti,L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat. Med.* **9**, 756-761 (2003).
315. Kahn,B.B., Alquier,T., Carling,D., & Hardie,D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* **1**, 15-25 (2005).
316. Lopez,M., Nogueiras,R., Tena-Sempere,M., & Dieguez,C. Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 421-432 (2016).
317. Clarke,P.R. & Hardie,D.G. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* **9**, 2439-2446 (1990).
318. Muoio,D.M., Seefeld,K., Witters,L.A., & Coleman,R.A. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem. J.* **338** (Pt 3), 783-791 (1999).
319. Horman,S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr. Biol.* **12**, 1419-1423 (2002).
320. Berasi,S.P. *et al.* Inhibition of gluconeogenesis through transcriptional activation of EGR1 and DUSP4 by AMP-activated kinase. *J. Biol. Chem.* **281**, 27167-27177 (2006).
321. Marsin,A.S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* **10**, 1247-1255 (2000).
322. Marsin,A.S., Bouzin,C., Bertrand,L., & Hue,L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 30778-30783 (2002).
323. Minokoshi,Y. *et al.* AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569-574 (2004).
324. Bass,J. & Takahashi,J.S. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349-1354 (2010).
325. Landree,L.E. *et al.* C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J. Biol. Chem.* **279**, 3817-3827 (2004).

326. Kim,M.S. & Lee,K.U. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. *J. Mol. Med. (Berl)* **83**, 514-520 (2005).
327. Carling,D., Zammit,V.A., & Hardie,D.G. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **223**, 217-222 (1987).
328. Andersson,U. *et al.* AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* **279**, 12005-12008 (2004).
329. Carling,D., Sanders,M.J., & Woods,A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int. J. Obes. (Lond)* **32 Suppl 4**, S55-S59 (2008).
330. Martinez de Morentin,P.B. *et al.* Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 350-361 (2010).
331. Vogel,M. & Heinz,F. Purification and characterisation of the cyclic AMP-dependent protein kinase, the C- and the R-protein from bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 47-55 (1981).
332. Huynh,M.K., Kinyua,A.W., Yang,D.J., & Kim,K.W. Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast.* **2016**, 2754078 (2016).
333. Hawley,S.A. *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879-27887 (1996).
334. Woods,A. *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**, 21-33 (2005).
335. Anderson,K.A. *et al.* Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab* **7**, 377-388 (2008).
336. Claret,M. *et al.* Deletion of Lkb1 in pro-opiomelanocortin neurons impairs peripheral glucose homeostasis in mice. *Diabetes* **60**, 735-745 (2011).
337. Fei,W., Tian,D.R., Tso,P., & Han,J.S. Diet-induced obese rats exhibit impaired LKB1-AMPK signaling in hypothalamus and adipose tissue. *Peptides* **35**, 23-30 (2012).
338. Hawley,S.A. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2**, 9-19 (2005).
339. Woods,A. *et al.* LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004-2008 (2003).

340. Xie, M. *et al.* A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 17378-17383 (2006).
341. Costanzo-Garvey, D.L. *et al.* KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity. *Cell Metab* **10**, 366-378 (2009).
342. Hurley, R.L. *et al.* The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* **280**, 29060-29066 (2005).
343. Steinberg, G.R. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* **4**, 465-474 (2006).
344. Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 185-210 (2007).
345. Martinez de Morentin, P.B., Urisarri, A., Couce, M.L., & Lopez, M. Molecular mechanisms of appetite and obesity: a role for brain AMPK. *Clin. Sci. (Lond)* **130**, 1697-1709 (2016).
346. Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., & Carling, D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem. J.* **403**, 139-148 (2007).
347. Han, S.M. *et al.* Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* **48**, 2170-2178 (2005).
348. Wolfgang, M.J. *et al.* Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 19285-19290 (2007).
349. Vazquez, M.J. *et al.* Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* **149**, 4534-4543 (2008).
350. Kim, E.K. *et al.* C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 19970-19976 (2004).
351. He, M. *et al.* Hypothalamic histamine H1 receptor-AMPK signaling time-dependently mediates olanzapine-induced hyperphagia and weight gain in female rats. *Psychoneuroendocrinology* **42**, 153-164 (2014).
352. Claret, M. *et al.* AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest* **117**, 2325-2336 (2007).
353. Lopez, M. EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? *Eur. J. Endocrinol.* **176**, R235-R246 (2017).

354. Violette, B. *et al.* The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest* **111**, 91-98 (2003).
355. Xue, B. *et al.* Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. *Mol. Cell Biol.* **29**, 4563-4573 (2009).
356. Schulz, T.J. *et al.* Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* **495**, 379-383 (2013).
357. Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS. One.* **8**, e56660 (2013).
358. Guillod-Maximin, E. *et al.* Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J. Endocrinol.* **200**, 93-105 (2009).
359. Kubota, N. *et al.* Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* **6**, 55-68 (2007).
360. Wen, J.P., Liu, C.E., Hu, Y.T., Chen, G., & Lin, L.X. Globular adiponectin regulates energy homeostasis through AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase (AMPK/ACC) pathway in the hypothalamus. *Mol. Cell Biochem.* **344**, 109-115 (2010).
361. Kosari, S., Rathner, J.A., & Badoer, E. Central resistin enhances renal sympathetic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase but reduces the activity to brown adipose tissue via extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 1432-1439 (2012).
362. Koch, C.E. *et al.* Central adiponectin acutely improves glucose tolerance in male mice. *Endocrinology* **155**, 1806-1816 (2014).
363. Kim, M.S. *et al.* Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **10**, 727-733 (2004).
364. Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., & Kahn, B.B. Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. *Endocrinology* **148**, 1367-1375 (2007).
365. McCrimmon, R.J. *et al.* Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* **57**, 444-450 (2008).
366. Fan, X. *et al.* Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of

- type 1 diabetes. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **296**, R1702-R1708 (2009).
367. Canabal,D.D. *et al.* Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **292**, R1418-R1428 (2007).
368. Coppari,R. & Bjorbaek,C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 692-708 (2012).
369. Kinote,A. *et al.* Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology* **153**, 3633-3645 (2012).
370. Yang,C.S. *et al.* Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. *Diabetes* **59**, 2435-2443 (2010).
371. Lamy,C.M. *et al.* Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell Metab* **19**, 527-538 (2014).
372. Natali,A. & Ferrannini,E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* **49**, 434-441 (2006).
373. Maida,A., Lamont,B.J., Cao,X., & Drucker,D.J. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Diabetologia* **54**, 339-349 (2011).
374. Fullerton,M.D. *et al.* Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat. Med.* **19**, 1649-1654 (2013).
375. Martin,T.L. *et al.* Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **281**, 18933-18941 (2006).
376. Dagon,Y. *et al.* p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab* **16**, 104-112 (2012).
377. Paxinos G. & Franklin K. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 4th Edition*(Academic Press,2012).
378. Paxinos G. & Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 7th Edition*(Academic Press,2013).
379. Schneeberger,M. *et al.* Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* **155**, 172-187 (2013).

380. Manfredi-Lozano, M. *et al.* Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol. Metab* **5**, 844-857 (2016).

381. SHAPIRO SS & WILK MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**(3-4):591-611. 1965.

Ref Type: Generic

382. Razali, N.M. & Wah, Y.B. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* (2011).

383. Kao, L.S. & Green, C.E. Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean? *J. Surg. Res.* **144**, 158-170 (2008).

384. Student The probable error of a mean. *Biometrika* (1908).

385. de Winter JC Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. *Practical Assessment, Research & Evaluation* (2013).

386. Milton, J.S. *Estadística para biología y ciencias de la salud* (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2007).

387. Dunn OJ Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* (1964).

388. Campbell G & Skillings JH Nonparametric Stepwise Multiple Comparison Procedures. *Journal of the American Statistical Association* (1985).

389. Bridge, P.D. & Sawilowsky, S.S. Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: comparative power of the t-test and Wilcoxon Rank-Sum test in small samples applied research. *J. Clin. Epidemiol.* **52**, 229-235 (1999).

390. Contreras, C. *et al.* Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes* **66**, 87-99 (2017).

391. Chiappini, F. *et al.* Ventromedial hypothalamus-specific Ptpn1 deletion exacerbates diet-induced obesity in female mice. *J. Clin. Invest* **124**, 3781-3792 (2014).

392. Gordon C.J. Temperature Regulation in Laboratory Rodents. ed. Gordon C.J. 226. 1993. Cambridge Univ Press.

Ref Type: Generic

393. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252-1263 (2013).

394. Cohen, P. *et al.* Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* **156**, 304-316 (2014).

395. Ozcan,L. *et al.* Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* **9**, 35-51 (2009).
396. Agius,L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* **414**, 1-18 (2008).
397. Gomez-Valades,A.G. *et al.* Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes* **57**, 2199-2210 (2008).
398. Schneeberger,M. & Claret,M. Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Front Neurosci.* **6**, 185 (2012).
399. Alvarez-Crespo,M. *et al.* Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol. Metab* **5**, 271-282 (2016).
400. Turpin,S.M. *et al.* Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* **20**, 678-686 (2014).
401. Holland,W.L. *et al.* Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest* **121**, 1858-1870 (2011).
402. Raichur,S. *et al.* CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* **20**, 687-695 (2014).
403. Xia,J.Y. *et al.* Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* **22**, 266-278 (2015).
404. Unger,R.H. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* **53**, 319-336 (2002).
405. Fu,S., Watkins,S.M., & Hotamisligil,G.S. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab* **15**, 623-634 (2012).
406. Summers,S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* **45**, 42-72 (2006).
407. Cunard,R. Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic Kidney, the Good, the Bad and the Ugly. *J. Clin. Med.* **4**, 715-740 (2015).
408. Cunard,R. Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic Kidney, the Good, the Bad and the Ugly. *J. Clin. Med.* **4**, 715-740 (2015).
409. Ozcan,U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461 (2004).

410. Narayanan,R., Dougherty,K.J., & Johnston,D. Calcium store depletion induces persistent perisomatic increases in the functional density of h channels in hippocampal pyramidal neurons. *Neuron* **68**, 921-935 (2010).
411. Higo,T. *et al.* Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron* **68**, 865-878 (2010).
412. Dietrich,M.O., Liu,Z.W., & Horvath,T.L. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* **155**, 188-199 (2013).
413. Gregor,M.F. & Hotamisligil,G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415-445 (2011).
414. Jais,A. & Bruning,J.C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest* **127**, 24-32 (2017).
415. Gao,Y. *et al.* Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* **62**, 17-25 (2014).
416. Nakanishi,M. *et al.* Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 649-658 (2007).
417. Lambertsen,K.L. *et al.* Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci.* **29**, 1319-1330 (2009).
418. Purkayastha,S. *et al.* Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 2939-2944 (2011).
419. Arruda,A.P. *et al.* Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology* **151**, 683-694 (2010).
420. Arruda,A.P. *et al.* Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* **152**, 1314-1326 (2011).
421. Deng,J. *et al.* Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol. Cell Biol.* **24**, 10161-10168 (2004).
422. Hu,P., Han,Z., Couvillon,A.D., Kaufman,R.J., & Exton,J.H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol. Cell Biol.* **26**, 3071-3084 (2006).

423. Yamazaki,H. *et al.* Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J. Immunol.* **183**, 1480-1487 (2009).
424. Valdearcos,M., Xu,A.W., & Koliwad,S.K. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. *Annu. Rev. Physiol* **77**, 131-160 (2015).
425. Kim,O.K., Jun,W., & Lee,J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. *Ann. Nutr. Metab* **67**, 218-227 (2015).
426. McCrimmon,R.J. *et al.* Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* **53**, 1953-1958 (2004).
427. McCrimmon,R.J. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* **55**, 1755-1760 (2006).
428. Borg,W.P., Sherwin,R.S., During,M.J., Borg,M.A., & Shulman,G.I. Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* **44**, 180-184 (1995).
429. Borg,M.A., Sherwin,R.S., Borg,W.P., Tamborlane,W.V., & Shulman,G.I. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J. Clin. Invest* **99**, 361-365 (1997).
430. Liu,Y. *et al.* Reduction of hepatic glucocorticoid receptor and hexose-6-phosphate dehydrogenase expression ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *J. Mol. Endocrinol.* **41**, 53-64 (2008).
431. Sabio,G. & Davis,R.J. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 490-496 (2010).
432. Imbernon,M. *et al.* Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* **144**, 636-649 (2013).
433. Coffey,E.T. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 285-299 (2014).



ANEXO 1

Lista licencias imágenes introducción:

Imagen	Nº de Licencia
Imagen 2. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal y el tejido adiposo. Ref 13	4275460493574
Imagen 3. Adipocitos marrones, beige y blancos. Ref 105.	4276080464972
Imagen 4. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. Ref 118.	4276071175992
Imagen 5. Distribución de los distintos núcleos hipotalámicos. Ref 123.	4275460231667
Imagen 9. Transducción de señal de estrés del retículo endoplasmático. Ref 293.	4274391135764
Imagen 11. Regulación de la lipogénesis de novo. Ref 330.	4276690681990

